

**A KAPSZAICIN-ÉRZÉKENY ÉRZŐIDEG-VÉGZŐDÉSEK
AKTIVÁCIÓS MECHANIZMUSAINAK VIZSGÁLATA ÉS A
FELSZABADULÓ NEUROPEPTIDEK MEGHATÁROZÁSA**

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS



Dr. Börzsei Rita

**Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Neurofarmakológia Program**

**Doktori Iskola vezetője: Dr. Barthó Loránd
Programvezető: Dr. Pintér Erika
Témavezető: Dr. Helyes Zsuzsanna**

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET**

2012.

I. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS, A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI

I. 1. A KAPSAICIN TÖRTÉNETE ÉS FARMAKOLÓGIAI JELENTŐSÉGE

A kapszaicin, a paprika (*Capsicum annuum* és *Capsicum frutescens*) csípős anyaga, kémiai szerkezetét tekintve alkaloid, 8-metil-N-vanillil-transz-6-nonénamid. A kapszaicin a hatásait receptorális úton fejt ki. A kapszaicin receptort expresszázó gént 1997-ben azonosították, és a kapszaicin receptorát elnevezték Vanilloid 1 Receptornak (VR1). Később a receptorok szerkezetén alapuló nemzetközi nomenklatura szerint ezt a nevet megváltoztatták, e ligandfüggő kationcsatornát a Tranziens Receptor Potenciál (TRP) nagycsaládba sorolták és a vanilloid család 1-es számú tagjaként Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1-nek (TRPV1) nevezték. A TRPV1 polimodális szenzor funkciójú ioncsatorna, mely fizikai vagy kémiai ingerekkel pl. fájdalmas, 43°C feletti hőingerral és pH 6 alatti proton-koncentrációval aktiválható intra- és extracellulárisan is. A kapszaicinen kívül számos növényi eredetű vanilloid struktúrájú vegyület, pl. egy marokkói kutyatejfélében (*Euphorbia resinifera*) található reziniferatoxin, a feketeborsban (*Piper nigrum*) lévő piperin, a gyömbérből (*Zingiber officinale*) kivonható zingeron vagy a szegfűszeg (*Syzygium aromaticum*) egyik anyaga, az eugenol, is képes receptorstimulációt okozni. Léteznek a receptornak endogén ligandjai is, mint az endokannabinoid N-arachidonoil-etanol-amin (AEA) vagy más néven anandamid, a 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav (12-HPETE), az N-arachidonoil-dopamin (NADA), valamint a protonok. A receptor aktiválódásakor kialakul a nocicepció, fájdalomérzet és szenzoros neuropeptid szabadul fel az idegvégződésekből. Tartós vagy ismételt aktiváció hatására az idegvégződés működésképtelenné válik (deszenzitizáció), melynek következtében az érzőideg-végzések kémiai ingerekkel szemben érzéketlenekké válnak anélkül, hogy fizikai ingerekkel szemben változna válaszkészségük. A TRPV1 receptor nagy mennyiségben megtalálható a hátsó gyöki és a trigeminus ganglionokban, specifikusan a kis és közepes átmérőjű szenzoros neuronokon, vagyis a vékony mielinhüvelyes (A δ -) és a mielinhüvely nélküli (C-) rostokkal rendelkező neuronok sejttestjein és végződésein fordul elő.

I. 2. A LIPID RAFTOK FELÉPÍTÉSE, FUNKCIÓJA

Singer-Nicolson-féle folyékony mozaik modell alapján úgy gondolták, hogy a foszfolipidek és a plazmaproteinek random módon helyezkednek el a plazma membránban. Egy új elmélet szerint a plazma membránban mikrodomének találhatóak, melyek egyik típusát a lipid raftok

képviselik. A lipid raft („lipid tutaj”) elnevezés abból ered, hogy a komponensek közös régióvá összetömörülve helyezkednek el, mely a plazma membránban kisebb mozgásokra, úszkálásra képes. A lipid raftok a plazma membránban non-raft régiók között lévő mikrodomének, melyek különböző szfingolipidekből, koleszterinből és proteinekből állnak.

Sejttípusonként különböző arányban fordulnak elő a raft komponensek, ám mindegyikre egyaránt jellemző, hogy koleszterinben és szfingolipidekben gazdag. A fehérjék többféle módon kapcsolódhatnak a lipid raft komponensekhez: lehetnek transzmembrán proteinek, glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI)-kapcsolt proteinek, vagy intracelluláris polipeptidláncok, mint például a tirozin-kinázok. Ezen proteinek közül számos receptorként, vagy intracelluláris szignál mediátorként funkcionál. A lipid raftok a transzmembrán proteinek révén kapcsolatot létesítenek a citoszkeletonnal.

Vizsgálatok során megfigyelték, hogy a lipid raftok 4°C-on, Triton X-100 detergenssel szemben oldhatatlanok, emiatt és a magas glikolipid tartalmuk miatt nevezték el a lipid raftokat detergens-oldhatatlan-glikolipid-gazdag komplexeknek (DIGs). Az oldhatatlanságért a koleszterin a felelős, melynek eltávolításával a lipid raftok kioldhatók a plazma membrán non-raft régiói közül Triton X-100 detergenssel. Ezzel a lipid raftokban lévő fehérjék és lipidek különböző protein és lipid próbákkal azonosíthatók. Bizonyos élettani folyamatokban a lipid raftok összekapcsolódnak és együttesen generálnak intracelluláris jelátviteli utakat. Több tanulmány is rámutatott, hogy a TRP receptorcsalád számos tagjának működésében szerepet kapnak a lipid raftok, melyekkel jelátviteli komplexet képeznek. Részt vesznek még több ligandfüggő ioncsatorna, köztük az acetilkolin nikotin receptor, a 2-amino-3-metil-(3-hidroxi-5-metil-izoxazol-4-il)-propionsav (AMPA) típusú glutamát receptor és a γ -aminovajsav (GABA) receptor működésében is. Emellett több G-proteinhez kapcsolt receptorról, mint például a kannabinoid 1 receptorról (CB1R), is bebizonyosodott a lipid raftokkal való szoros kapcsolata.

A lipid raftok részt vesznek bizonyos sejtfunkciók szabályozásában. Szerepet játszanak az endocitózisban a bennük található clathrin proteinek révén. Emellett nemcsak a sejtfelszínen játszódó folyamatokban van jelentőségük, hanem a citoplazmatikus szignáltranszdukció szabályozásában is. A raftokban elhelyezkedő proteinek közül több receptorként funkcionál. E molekulák megfelelő működéséhez és így a receptorális hatásokhoz a lipid raftok megfelelő integritása szükséges. Számunkra a lipid raftok vizsgálatának legfontosabb aspektusa a TRPV1 receptorral való kapcsolatának és ezen keresztül a gyulladásoz út vonalra kifejtett hatásának felderítése volt.

I. 3. A KAPSAICIN-ÉRZÉKENY ÉRZŐIDEG-VÉGZŐDÉSEK ÉS HÁRMAS FUNKCIÓJUK

A klasszikus idegszabályozási elmélet szerint az érzőidegek a szenzoros stimulusokat és a fájdalmat közvetítik a test különféle részeiről a központi idegrendszer felé. A perifériás idegrendszer másik csoportja a befutó ingerekkel kiváltott reflexek útján efferens, azaz mozgató vagy vegetatív működéseket lát el.

A TRPV1-et expresszáló érzőideg-végződés különlegessége, hogy hármas funkcióval rendelkezik. A *klasszikus afferens működés* során a kapszaicinnal vagy más stimulussal izgatott szenzoros idegvégzések a központi idegrendszer felé közvetítenek idegaktivitást, ennek következtében alakul ki a fájdalomérzet, a nocicepció. Emellett a perifériás végzések közül olyan neuropeptidok szabadulnak fel, amelyek erőteljes értágulató, plazmafehérje-kiáramlást és gyulladásozó sejtek aktivációját okozzák a beidegzési területen, ezt a jelenséget összefoglalva *neurogén gyulladásnak* nevezzük. Ezek a gyulladásozó mediátorok közvetítik a kapszaicin-érzékeny afferensek *lokális efferens funkcióját*.

Ugyanezen aktivált szenzoros idegvégzések közül a gyulladásozó neuropeptideken kívül szomatosztatin (SOM) is felszabadul, amely a keringésbe jutva szisztémás gyulladásozó és fájdalomcsillapító hatásokkal rendelkezik. Ez az érzőideg-végzések harmadik, *szisztémás efferens funkciója*, amit a szomatosztatin endokrin és parakrin hatásainak mintájára Szolcsányi professzor *szenzokrin hatásnak* nevezett el.

I.4. A KAPSAICIN-ÉRZÉKENY ROSTOKBÓL FELSZABADULÓ SENZOROS NEUROPEPTIDEK

a.) A kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégzések közül felszabaduló neuropeptidok egyik csoportját a **tachikininek** alkotják. Ide sorolható a P-anyag (SP), valamint a neurokinin A és B (NKA és NKB). Hatásaikat három G-proteinhez kapcsolt tachikinin receptoron keresztül fejtik ki, amelyeket NK₁, NK₂ és NK₃ receptornak nevezzük. A SP az NK₁ receptoron hatva plazmaprotein-kiáramlást vált ki, stimulálja a limfociták proliferációját, citokin termelését, a hízósejtek aktivációját, a T-sejtek kemotaxisát, valamint a neutrofil granulociták akkumulációját is. Az SP kationos peptid, így nem-receptor mediált interakcióba is lép a hízósejtek membránjával. A degranuláció következtében felszabaduló hisztamin a H₁ receptorokon, a szerotonin pedig 5-HT₃ receptorokon keresztül pozitív feedback útján fokozza a neuropeptidok felszabadulását a szenzoros idegvégzések közül. A gyulladásozó érválasz korai

fázisáért a felszabaduló neuropeptidek, míg a későbbi fázisáért a hízósejtekből felszabaduló mediátorok (hisztamin, szerotonin, prosztaglandinok, leukotriének stb.) felelősek.

Az NKA az NK₂ receptorokhoz mutatja a legnagyobb affinitást, a SP-hez hasonlóan erőteljes plazmafehérje-kiáramlást idéz elő, továbbá simaizom-kontrakciót vált ki és stimulálja a gyulladási sejteket (neutrofil granulocitákat, limfocitákat, makrofágokat) elsősorban a periférián, de a központi idegrendszerben is. Az NKB-t kötő NK₃ receptor főként a központi idegrendszerben található, de jelen van a perifériás idegvégződéseken is, e mechanizmusoknak azonban kisebb jelentőséget tulajdonítanak a neurogén gyulladási folyamatokban.

b.) A 37 aminosavból álló **CGRP** egymástól kevéssé eltérő két formája az α CGRP és a β CGRP, melyek hatásaikat a CGRP1 és CGRP2 receptorokon fejtik ki. A CGRP főképp a CGRP1 receptoron keresztül fokozza az adenilát-cikláz aktivitást, amelynek következtében intracellulárisan megnő a cAMP mennyisége. Ez aktiválja a protein kináz A-t (PKA), a foszforiláció hatására megnyílnak az ATP-függő K⁺-csatornák. A folyamat eredménye az érfali simaizom relaxációja és erőteljes értágulat. A CGRP érpermeabilitást fokozó hatását nem közvetlenül, hanem a SP hatásának potenciózásával fejtik ki, amelyben az játszik elsődleges szerepet, hogy gátolja a SP degradációjáért felelős neutrális endopeptidáz enzimet. Mindemellett a CGRP komplex immunmodulátor funkciókkal is rendelkezik: csökkenti a proinflammatorikus citokinek termelődését és fokozza az antinociceptív interleukin-10 (IL-10) felszabadulását a makrofágokból, azonban stimulálja a granulocita-akkumulációt.

c.) Az **endomorfinek** (endomorfín-1: EM-1 és endomorfín-2: EM-2) 4 aminosavból álló endogén opioid peptidok. Különlegességük a többi opioid peptiddel összehasonlítva az eltérő kémiai szerkezetük, valamint a μ receptorok iránti szelektivitásuk és rendkívül nagy affinitásuk. Emlős sejtekben a kódoló géneik, illetve prekursoraik nem ismertek, valószínűleg de novo szintetizálódnak különféle stimulusok hatására. Az EM-ok megtalálhatók a perifériás és központi idegrendszerben, a kapszaicin-érzékeny afferensekben, valamint nem-neurális sejtekben, pl. immunsejtekben. Neuroanatómiai lokalizációjuk alapján számos fiziológiai és patofiziológiai folyamatban, mint pl. a fájdalom, stresszválaszok, neuroendokrin funkciók, kognitív működések, szerepet játszanak. Az irodalmi adatok többsége az EM-ok analgetikus, elsősorban a központi idegrendszeri hatásaira fókuszál gyulladás- és neuropátia állatkísérletes modelljeiben, néhány adat azonban gyulladáscsökkentő, vazodilatátor és angiogenezist elősegítő hatásokról is beszámol. Mivel az EM-ok hidrofilitásuknak köszönhetően nem jutnak át a vér-agy gáton, a periférián

szintetizálódó peptidek közvetlenül az érzőideg-végződésekre kifejtett hatásainak vizsgálata különösen érdekes. Az EM-2 elősorban a gerincvelőben és számos agyterületen található, a periférián a szenzoros rostokban és az immunsejtekben az EM-1 dominál. A perifériás gyulladáshoz és nociceptív folyamatokhoz ezért elősorban az EM-1 szerepe valószínűsíthető.

d.) A hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptidet, a **PACAP**-ot (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) eredetileg birka hipotalamuszból izolálták. A szekretin-glukagon-vazoaktív intesztinális peptid (VIP) család tagja. A legszorosabb, 68%-os egyezést a VIP szerkezetével mutatja, adenilát cikláz aktiváló hatása azonban legalább 1000-szer erősebb a VIP-énél. Szenzoros neuropeptidként tartják számon, mivel megtalálható a gerincvelő hátsó szarvában, a hátsó gyöki ganglionokban, a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok perifériás végződéseiben, pl. az ízületi tokot ellátó afferensekben, de a központi idegrendszer számos területén is. A PACAP szabályozza a neurotranszmitterek felszabadulását, értágulást, illetve bronchodilatációt okoz, fokozza a bélmotilitást, növeli egyes hormonok koncentrációját a vérben, szabályozza a sejtproliferációt és gátolja az apoptózist. Emellett számos fiziológiai folyamatot is befolyásol, mint pl. a táplálkozás, reprodukció, hőszabályozás, katekolamin szintézis és motoros aktivitás. Szerepet játszik nemcsak a központi idegrendszer, hanem a perifériás szervek fejlődésében is.

e.) A **szomatosztatin**, (SOM) 14 illetve 28 aminosavból álló ciklikus peptid. A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződéseken kívül megtalálható a központi és a perifériás idegrendszerben, a gasztrointesztinális traktus neuroendokrin sejtjeiben, a hasnyálmirigyben, a vesében, a mellékvesében, a pajzsmirigyben, gyulladáshoz sejtjeiben, ivarszervekben. A szomatosztatin gátolja számos hormon (pl. növekedési hormon, glukagon, inzulin, gasztrin, szekretin, kolekisztokinin, motilin, pankreatikus polipeptid, prolaktin, pajzsmirigy stimuláló hormon) szekrécióját, a gasztrointesztinális motilitást és az emésztőnedvek termelését. Gátolja a tumorsejtek proliferációját, valamint erős immunmodulátor hatással rendelkezik. A szomatosztatinnak a központi idegrendszerben neuromodulátor szerepe van, gátolja más neurotranszmitterek (glutamát, szerotonin, acetilkolin) és neurohormonok (growth hormone releasing hormone, GHRH) felszabadulását. Befolyásolja a lokomotoros aktivitást és a kognitív funkciókat, jelentőségét számos pszichiátriai és neurológiai kórképben igazolták. A szomatosztatin az idegelemek közül elősorban a kapszaicin-érzékeny, TRPV1 receptort expresszáló szenzoros neuronokban szintetizálódik és tárolódik. Munkacsoportunk számos bizonyítékot szolgáltatott már arra, hogy a kapszaicin-érzékeny rostok aktiválását követően az idegvégződésekből felszabaduló szomatosztatin a keringésbe jut, ahol szisztémás gyulladáscsökkentő és antinociceptív hatást fejt ki.

A SOM hatásait saját receptoraihoz kötve fejt ki. Az öt sst (sst₁₋₅) receptor szintetikus szomatosztatin analóg-kötő képességük alapján két csoportra osztható. A SRIF1 csoportba tartoznak az sst₂, sst₃ és sst₅ receptorok, amelyek nagy affinitással kötnek oktapeptid analógokat (pl. az oktreatidot), míg a SRIF2 csoportba sorolt sst₁ és sst₄ receptorok alacsony oktapeptid analóg-kötő képességgel rendelkeznek. Az endokrin hatást a SRIF1 csoportba tartozó receptorok közvetítik. Elsősorban munkacsoportunk eredményei mutatják, hogy a fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatás a másik csoportba, vagyis az sst₁ és sst₄ receptorokhoz köthető.

II. CÉLKITŰZÉSEK

1. Megvizsgáltuk, hogy a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések membránjában lévő **lipid raftok** koleszterin deplécióval történő módosítása hogyan befolyásolja az idegvégződésekben lévő TRPV1 ioncsatornák működését. Az elemzéshez az idegvégződésekben felszabaduló szenzoros neuropeptidok mérését használtuk.
2. A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekben megtalálható endogén opioid peptid, az **endomorfín-1**, gyulladáscsökkentő hatásaira vonatkozóan volt néhány irodalmi adat. Első kísérletsorozatunkban arra kerestük a választ, hogy az EM-1 milyen hatást fejt ki prejunctionális (szenzoros idegvégződés) és posztjunctionális (granulociták, makrofágok) szinten a neurogén, illetve nem-neurogén gyulladáscsökkentő folyamatokra.
3. A PACAP-38 jelenlétét ugyancsak kimutatták a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronokban. A **PACAP6-38** fragmens számos kutatócsoport irodalmi adatai alapján a PAC1/VPAC2 receptorok hatékony antagonistája különféle kísérleti rendszerekben. Saját korábbi munkánk szerves folytatásaként jelen célkitűzésünk az volt, hogy a PACAP6-38 hatásait vizsgáljuk a perifériás afferensekből történő neuropeptid-felszabadulásra *in vitro* modellünkben.
4. Kísérleteink célja volt továbbá, hogy a **PACAP-38** jelenlétét kimutassuk humán, valamint néhány kérdéses állatfaj plazmájában és anyatejében egyaránt. Vizsgálni kívántuk, hogy a terhesség, a szülés, a laktációs periódus milyen hatással vannak a plazmában, illetve a tejben lévő PACAP-38 koncentrációkra.

III. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

III. 1. IN VITRO KÍSÉRLETI MODELL: SZENZOROS NEUROPEPTID-FELSZABADULÁS KIVÁLTÁSA ÉS BEFOLYÁSOLÁSÁNAK VIZSGÁLATA IZOLÁLT PATKÁNYTRACHEA ÉRZŐIDEG-VÉGZŐDÉSEIBŐL

Az izolált patkány tracheákat (1,8 ml fürdőként 2-2 szerv) oxigenizált Krebs-oldattal (37°C; pH=7,2) 60 perces ekvilibrációs periódus alatt perfundáltuk. A lipid raftok vizsgálatakor a tracheákat 30 percig Krebs oldatban majd 30 percig MCD jelenlétében inkubáltuk. Az átáramlás leállítása után a kamrákban lévő oldatot 8 percenként lecserélve három frakciót gyűjtöttünk. Az első frakcióból meghatározott neuropeptid-mennyiség jelenti az *ingerlés előtti* bazális peptidfelszabadulást. A második periódusban (*ingerelt frakció*) történt a trachea afferens idegvégződéseinek stimulációja elektromos téringerléssel (1200 impulzus: 40 V; 0.1 ms; 10 Hz; 120 s-on keresztül a frakció 5. percétől kezdve) vagy kémiai úton 10^{-6} M kapszaicinnel illetve 10 nM koncentrációjú RTX oldattal. A harmadik periódusban (*ingerlés utáni frakció*) már nem történt stimuláció, ebből a frakcióból az ingerlés utóhatásaként jelentkező peptidfelszabadulást mértük. A vizsgált anyagokat (EM-1, naloxon, PACAP1-38, PACAP6-38) minden periódus elején adtuk az inkubációs médiumhoz. A szervfürdőkéből vett, jégbe hűtött mintákból a SP, CGRP, SOM koncentrációkat RIA módszerekkel határoztuk meg, a peptidok mennyiségét fmol/mg nedves szövetsúlyra vonatkoztatva fejeztük ki.

III. 2. ANALITIKAI VIZSGÁLATOK

Humán minták (plazma, anyatej) előkészítése RIA mérésekhez

A kontroll csoportot 20-40 év közötti egészséges önkéntesek (n=19) alkották, akik között a nemek aránya egyenlő megoszlású volt. Az egyik vizsgálati csoportba 20-35 év közötti kismamákat válogattunk, akiktől minden trimeszter végén és a szülés után 3 nappal vérmintát vettünk (n=30). Vizsgáltuk a magzati vér PACAP-38 koncentrációját is, ezért a háromnapos újszülött felszíni temporális vénájából, valamint a vena umbilicalisból és az arteria umbilicalisból is gyűjtöttünk mintát (n=10). A másik vizsgálati csoportba pedig olyan 20 és 35 év közötti szoptató kismamákat választottunk, akik laktációs ideje 1 és 6 hónap közötti volt. A szoptató kismamáktól vérmintákat (n=31) és anyatej mintákat (n=31) is gyűjtöttünk. A **vért** 3,7 mg etilén-diamin-tetraacetátot (EDTA) és 240 U aprotinint (peptidázgátló) tartalmazó jégbe hűtött csövekbe gyűjtöttük, centrifugáltuk (1000 rpm, 10 perc, majd 4000

rpm, 10 perc, 4°C), majd a plazmákat leszívtuk és -80°C-on tároltuk. A PACAP-38-LI RIA-val történő meghatározásához 3 ml plazmához kétszeres mennyiségű abszolút alkoholt és 20 µl 96%-os ecetsavat adtunk. A plazmában lévő nagy molekulák, fehérjék ennek hatására kicsapódtak, amiket centrifugálással (3000 rpm, 20 perc, 4°C) ülepitettünk. A felülúszót üvegcsővekbe gyűjtöttük és nitrogén gáz alatt bepároltuk. A RIA meghatározás előtt 300 µl assay pufferben oldottuk, mellyel tízszeres koncentrációnövekedést értünk el. A *tej* mintákat jégbe hűtött csövekbe gyűjtöttük. Egy ml tejhez 10 µl 96%-os ecetsavat adtunk és 40°C-os vízfürdőben 5 percig rázogattuk, melynek hatására a tejben lévő fehérjék kicsapódtak. A hűtés és a centrifugálás hatására (4000 rpm, 10 perc, 4°C) a minták tetején vastag zsírréteg jelent meg, középen volt a vizes fázis (savó) és alul a kicsapódott fehérjék. A leszívott, ám még mindig zavaros savót ismét centrifugáltuk (10 000 rpm, 10 perc, 4°C), majd a felülúszót használtuk a RIA meghatározásokhoz.

Humán minták (plazma, anyatej) előkészítése tömegspektrometriás mérésekhez

A *plazma* mintákat centrifugális ultraszűrővel tisztítottuk, ami alkalmas arra, hogy híg makromolekulás oldatokból (pl. vérplazma) nagy hatásokkal, különböző szűrési határértékkel válasszon el kisebb és nagyobb molekulákat. Minden minta esetében 1 ml szérumot mértünk be egy speciális membránnal ellátott centrifugacsőbe, majd 30 percen keresztül, 20°C-on 3000 g-n centrifugáltuk. A minta nem kívánatos részét a membrán pórusméretének köszönhetően eltávolítottuk. Ezt követően a filtrátumokat liofilizáltuk, majd 200 µl 0,1%-os trifluor-ecetsavban (TFA) visszaoldottuk. További tisztítás céljára C18-as bevonatú ZIP-TIP pipettahegyet használtunk. A PACAP-38 megkötődött a ZIP-TIP felszínén, majd 50%-os acetonitril és 0,1%-os TFA 1:1 arányú keverékével történő leoldás után a peptidet közvetlenül detektálhattuk. Az *anyatej* minták esetében a fent leírt tisztítás után nem volt szükség további minta-előkészítési eljárásra, a PACAP-38 közvetlenül mérhető volt.

Kérődző állatfajok mintáinak (plazma, tej, emlőbiopszia) előkészítése RIA mérésekhez

Az állatok szoptatós időszakban lévő 4-5 év közötti Holstein Fríz tehének, Merino juhok és Tejelő Barna Magyar kecskék (fajonként 10-10 példány) voltak. A vér, tej és szövetmintákat reggelente 8 és 10 óra között gyűjtöttük. A *vért* (10 ml) jégbe hűtött EDTA-t (18 mg) valamint Trasylolt (1200 U) tartalmazó üvegcsővekbe gyűjtöttük. A minta-előkészítés ezután a humán mintákkal azonos módon folytatódott. A reggeli fejéskor vettük ugyanezen állatoktól a *tej* mintákat is, melyek RIA analízishez történő előkészítése a fent leírt módszerrel történt. A

vér és tej mintákat a postpartum időszak hetedik, harmincadik és kilencvenedik napján gyűjtöttük. A *tőgybiopsziákat* a szülést követő hetedik és harmincadik napon vettük laktáló Merino juhokból. Mintavétel előtt az állatot stabilan rögzítettük, a tőgyét megtisztítottuk és lidokainnal érzéstelenítettük. Minden állat mintájának egyik részét azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, a laboratóriumba szállítottuk és -80°C-on tároltuk, míg a másik részét 4% (v/v) formalintartalmú foszfát pufferben fixáltuk.

PAC1 receptor immunhisztokémia

Indirekt immunhisztokémiai vizsgálatainkhoz 1 órás 4%-os paraformaldehides fixálást követően az emlő mintákat 6x10 percig mostuk 0,1 M-os foszfát pufferben (PBS), majd 1 órán át inkubáltuk 10%-os szacharózos-PBS-oldatban. A kriosztáttal történő metszésig a preparátumokat 20%-os szacharózos-PBS-oldatban tároltuk 4°C-on. A kriosztátos metszés során fagyasztva [(-25)-(-28)°C] készített 10 µm-es metszeteket zselatinózott tárgylemezekre vettük fel. A metszeteket az immunhisztokémiai eljárás kivitelezéséig -20°C-on tároltuk. Az immunhisztokémiai protokoll során primer antitestként PAC1-R (1:100, anti-nyúl) antitestet, szekunder antitestként Alexa Fluor „568” (1:1000, anti-nyúl) fluoreszcens markert alkalmaztunk. A metszetek specifikus jeleit megfelelő hullámhosszon (568 nm) Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal detektáltuk, SPOT Basic 4.04 program segítségével. Valamennyi antitest alkalmazásakor készítettünk negatív kontrollokat, amelyekkel ellenőriztük, hogy önmagában a primer és szekunder antitestek adnak-e aspecifikus jelet.

III. 3. IN VIVO KÍSÉRLETEK

Mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladás vizsgálata patkány lábháti bőrében

Altatott patkányok mindkét oldali *n. saphenusát* és *n. ischiadicusát* átvágtuk 30 perccel a kísérlet előtt, hogy megakadályozzuk a mustárolaj nociceptív hatásából adódó reflexválaszokat. A baloldali végtag lábháti bőrét 1%-os mustárolajjal kentük, az ellenoldalon kontrollként paraffinolajat alkalmaztunk. A plazmafehérje kiáramlás mértékét az Evans kék akkumuláció módszerével határoztuk meg. Tíz perccel a mustárolajjal történő kenés előtt i.v. Evans kék festéket adtunk, amely erősen kötődik albuminhoz és a plazma extravazáció helyén akkumulálódik a gyulladt szövetekben. Húsz perccel a gyulladás kiváltása után az állatokat elvéreztettük és a kimetszett bőrterületek festéktartalmát formamidban extraháltuk 72 órán keresztül. Az oldat optikai denzitását, amely a gyulladás intenzitásával egyenesen arányos, spektrofotométerrel határoztuk meg 620 nm-en. A mustárolajjal kent lábak eredményeiből az

ellenoldali lábak eredményeit levontuk. Az EM-1-et i.p. 10 perccel a gyulladás kiváltása előtt adtuk. Az egyik vizsgálati csoportban az állatokat 15 perccel az EM-1 adás előtt μ -opioid receptor antagonistá naloxonnal előkezeltük. A kontroll csoportban az EM-1 oldószerét, fiziológiás sóoldatot használtunk a naloxon előkezelést követően. A vizsgálatokat 14-15-ös elemszámú csoportokkal végeztük. Megvizsgáltuk, hogy az EM-1 okoz-e toleranciát, ezért 10 napon át naponta háromszor adtuk az opioid receptor agonistát, majd megismételtük a gyulladásos kísérletet.

Mustárolajjal kiváltott neurogén ödéma vizsgálata egérfülön

Balb/c egerek fülére altatásban 1%-os mustárolajat kentünk és 3 órán keresztül mikrométerrel mértük a fülvastagságot, a duzzadást a kezdeti értékhez viszonyítva adtuk meg. Az EM-1-et 15 perccel a mustárolajjal történő kezelés előtt adtuk. A kontroll csoportban az EM-1 oldószerét, fiziológiás sóoldatot alkalmaztunk. Megvizsgáltuk, hogy ebben a modellben a μ -opioid antagonistá naloxon kivédi-e az EM-1 fülduzzadásra gyakorolt hatását, ezért az egyik vizsgálati csoportban az egereket 15 perccel az EM-1 adás előtt naloxonnal kezeltük. A kontroll csoportban az EM-1 oldószerét, fiziológiás sóoldatot használtunk a naloxon előkezelést követően. A vizsgálatokat 8-10-es elemszámú csoportokkal végeztük.

Mustárolajjal kiváltott nem neurogén gyulladás vizsgálata egérfülön

Altatott Balb/c egerek fülét 1%-os mustárolajjal kentük. Granulocita akkumuláció elérése érdekében a 6 órás vizsgálati periódus alatt a kezelést minden órában megismételtük. Minden mustárolajjal történő kezelés előtt 10 perccel EM-1-et adtunk. A kontroll csoportban a kezeléseket fiziológiás sóoldattal (EM-1 oldószere) és paraffinolajjal (mustárolaj oldószere) ismételtük. Szövetteni vizsgálatokhoz az egerek jobb füléből készült metszeteket (6 μ m) kloroacetát-észteráz festéssel szövetteni vizsgálatoknak vetettük alá. Az állatok bal fülét lemetszettük és -80°C -on tároltuk myeloperoxidáz (MPO) aktivitás mérés céljából. A fagyasztott füleket apró darabokra vágtuk és 0,5% hexadecil-trimetil-ammonium-bromid tartalmú 50 mM-os kálium pufferben homogenizáltuk (pH 6). Centrifugálást (10000Xg, 4°C , 10 perc) követően a felülúszót felhasználva mértük a minták MPO aktivitását. A neutrofil akkumuláció mértékére úgy következtettünk, hogy a minták MPO enzim aktivitását standard humán MPO preparátumhoz hasonlítottuk. Az optikai denzitást 620 nm-en mértük 5 perces intervallumokban 30 percen át microplate leolvasóval (Labsystems). Kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg a minták MPO aktivitását.

IV. EREDMÉNYEK

IV. 1. LIPID RAFTOK: AZ MCD KEZELÉS HATÁSA A SZENZOROS NEUROPEPTID FELSZABADULÁSRA IZOLÁLT PATKÁNY TRACHEÁN

A kapszaicin ingerléssel kiváltott teljes neuropeptid felszabadulást úgy számoltam ki, hogy a stimuláció alatt és után felszabadult CGRP mennyiségéből levontam a stimuláció előtti, bazális peptidmennyiséget és a két értéket összeadtam. A kontroll csoportban 1 μM kapszaicin hatására 13,83 fmol CGRP szabadult fel, amit 100 μM koncentrációjú MCD szignifikánsan, 40%-ra csökkentett. Az MCD sem kisebb, sem nagyobb koncentrációban nem gátolta jelentősen a neuropeptid felszabadulást, koncentráció-hatás összefüggést nem tapasztaltunk: 10 μM esetén 67%-ra, 1 mM és 10 mM alkalmazásakor pedig egyaránt 74%-ra csökkent a CGRP koncentrációja az inkubációs médiumban, azonban ezek statisztikailag nem bizonyultak szignifikánsnak. RTX ingerléssel kiváltott teljes CGRP felszabadulás a kezeletlen csoportban 11,58 fmol/mg nedves szövet volt, ezt vettük 100%-nak. 100 μM MCD alkalmazása 29%-ra csökkentette a felszabadult neuropeptid koncentrációját. Kapszaicin ingerléssel végzett kísérleteinkhez hasonlóan az MCD itt sem volt hatással kisebb vagy nagyobb koncentrációban a CGRP szintekre. RTX ingerléskor a kapszaicinhez képest a reakciókinetikában figyeltünk meg változást, miszerint az ingerlés utáni, harmadik 8 perces frakcióban a CGRP koncentráció nem csökkent a második frakcióhoz képest. A legnagyobb CGRP felszabadulás az ingerlés utáni, harmadik frakcióban volt mérhető.

IV.2. AZ ENDOMORFIN-1 HATÁSA SZENZOROS NEUROPEPTIDEK FELSZABADULÁSÁRA IN VITRO ÉS AKUT GYULLADÁSOS FOLYAMATOKRA IN VIVO

Az EM-1 hatása az elektromos téringerléssel kiváltott SP és CGRP felszabadulásra

Az EM-1 koncentrációfüggő módon gátolta mindkét gyulladáskeltő szenzoros neuropeptid felszabadulását, az alap, ingerlés nélküli peptidkiáramlást azonban nem befolyásolta. A szigmoid koncentráció-hatás görbék analízise azt mutatta, hogy az EM-1 maximális gátló hatása 80,4% volt a SP és 85,2% a CGRP esetében. A hatáserősségre utaló EC_{50} érték 39,48 nM volt a SP és 10,83 nM a CGRP vonatkozásában. A μ -opioid receptor antagonistá naloxon a 100 nM EM-1 gátló hatását mindkét peptid esetében kivédte, önmagában a naloxon nem volt hatással sem a bazális, sem az ingerléssel kiváltott peptidfelszabadulásra.

Az EM-1 hatása a mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladásra patkányban

Az EM-1 dózisfüggően gátolta az 1%-os mustárolajjal kiváltott plazmafehérje-kiáramlást patkány lábhati bőrében. A naloxon előkezelés teljesen kivédte a 100 µg/kg EM-1 gátló hatását, de önmagában nem befolyásolta a gyulladást. A szigmoid dózis-hatás görbe analízisével nyert maximális gátlás 58,4%, az ED₅₀ érték 1,13 µg/kg volt, tehát az EM-1 jelentős hatékonysággal és nagy hatáserősséggel rendelkezik ebben a modellben.

A 10 µg/kg dózis 10 napon keresztül napi 3-szor történő i.p. injekciója a gyulladás kiváltása előtt nem csökkentette a gátló hatást az egyszeri alkalmazáskor tapasztalathoz viszonyítva, az EM-1 tehát nem okoz deszenzibilizációt ebben a kísérleti elrendezésben.

Az EM-1 hatása a mustárolajjal kiváltott akut neurogén fülduzzadásra egérben

Az EM-1 (1, 10 and 100 µg/kg, i.p.) a patkánymodellben tapasztaltakhoz hasonlóan dózisfüggően gátolta a neurogén duzzadást. Az 1 órás mérésnél mindhárom dózis hatása szignifikánsnak bizonyult, a teljes mérési periódus alatt azonban csak a legnagyobb, 100 µg/kg dózis esetében tapasztaltunk szignifikáns gátlást. A naloxonnal történő előkezelés kivédte a 100 µg/kg EM-1 ödémagátló hatását, a naloxon önmagában hatástalan volt. A maximális gátlás 63,2%, az ED₅₀ érték 1,02 µg/kg volt ebben a modellben, ami nagyon hasonló a patkánykísérletekben tapasztaltakhoz.

Az EM-1 hatástalansága a mustárolajjal kiváltott késői gyulladósos reakciókra

A mikrométerrel mért adatok és a szövettani metszetek alapján látható, hogy a mustárolaj-kenés hatására a fülduzzadás 2-3 óra múlva éri el maximumát, 6 órával a gyulladás kiváltása után már csak kb. 20-30%-os. Ekkorra kialakul a sejtes gyulladósos reakció, erőteljes granulocita akkumuláció jellemző. Az EM-1 kezelés az első 3 órában tapasztaltakkal ellentétben nem befolyásolta sem a duzzadást, sem a granulocita akkumulációt ebben a késői időpontban.

IV. 3. A PACAP6-38 AGONISTA HATÁSAI AZ ÉRZŐIDEG-VÉGZŐDÉSEKEN

Kapszaicin ingerlés hatására a bazális, ingerlés előtti értékekhez viszonyítva 2,5-szeres, 11-szeres és 3-szoros SP, CGRP és SOM felszabadulást mértünk izolált patkány tracheán. Elektromos téringerléssel szintén 3-szoros, 3,5-szeres és 2,5-szeres neuropeptid kiáramlás érhető el. A PACAP1-38 szignifikánsan gátolta mind a kémiai, mind az elektromos

téringerléssel kiváltott neuropeptid felszabadulást. A PACAP6-38 2000 nM-os dózisban gátolta a SP és a CGRP felszabadulását, bár kisebb mértékben, mint a PACAP1-38. A SOM felszabadulás során is hasonló eredményeket kaptunk, de az elektromos téringerléssel kiváltott SOM kiáramlást a PACAP6-38 még a PACAP1-38-nál is nagyobb mértékben gátolta. Sem a PACAP1-38 sem a PACAP6-38 nem volt hatással a szenzoros neuropeptidek bazális szintjeire. Amikor a két vegyületet együtt adtuk az inkubációs médiumhoz, a PACAP1-38 által kiváltott gátló hatás nem változott, vagy még kifejezettebb lett.

IV.4. A PACAP-38 KIMUTATÁSA KÜLÖNBÖZŐ FAJOK PLAZMÁJÁBAN ÉS ANYATEJÉBEN

A PACAP-38 kimutatása anyatejben és emberi plazmában tömegspektrometriás módszerrel

A humán szérum és anyatej mintáinkat a PACAP standarddal együtt tömegspektrométer segítségével mértük. A PACAP-38 kvázi-molekula ionját (MW: 4535 Da) a standardban, a szérumban, és az anyatejben sikeresen detektáltuk. Ezt követően az összes minta esetében elvégeztük a MALDI TOF/TOF mérést. Először a standardnál megkaptuk a PACAP-38 szülő ion főbb y fragmenseit az aminosav szekvenciáikkal együtt, majd az eljárást elvégeztük a szérum és az anyatej minták esetében is. Így kapott eredményeink (az összes tömegspektrumon a PACAP-38-ra jellegzetesen megjelenő csúcsok, fragmensek láthatóak) egyértelműen bizonyítják a PACAP-38 jelenlétét humán szérumban és anyatejben egyaránt.

PACAP-38-LI kimutatása humán plazmából és anyatejből RIA módszerrel

Egészséges önkéntesek körében végzett vizsgálataink szerint az életkor, a nem és nők esetében a hormonális ciklus sem befolyásolja a PACAP-38-LI plazmaszintjét. Kismamák esetében szoptatás alatt a plazmában a PACAP-38-LI kismértékben, de szignifikánsan megemelkedik egészséges önkéntesekhez viszonyítva. Szoptató kismamák plazmájában és anyatejében lévő PACAP-38-LI szinteket hasonlítottuk össze. Az anyatejben akár 20-szorosára is megemelkedett a peptidkoncentráció a plazmához képest. Terhes kismamák körében végzett vizsgálataink eredményéből látható, hogy a plazmában a PACAP-38-LI a terhesség második és harmadik trimeszterében enyhén, de szignifikánsan megemelkedik az egészséges önkéntesekhez és a terhesség első trimeszteréhez képest. Ezzel ellentétben szülés alatt szignifikánsan, több mint 70%-kal, csökken a plazma PACAP-38-LI-a. Szülést követő harmadik napra a vér PACAP-38 koncentrációja a normál tartományba tér vissza.

Három napos újszülöttekben a perifériás vér PACAP-38 koncentrációja megegyezik az egészséges felnőttekben mért szinttel. Ezzel ellentétben azokban a mintákban, melyeket közvetlenül szülés után vettünk a vena és arteria umbilicalisból, jelentősen alacsonyabb PACAP-38-LI-t mértünk. A vena umbilicalisban szignifikánsan alacsonyabb volt a peptidkoncentráció, mint az arteria umbilicalisban.

PACAP-38 kimutatása RIA módszerrel kérődző állatok plazmájában és tejében

Humán eredményeinkhez hasonlóan juhok és kecskék tejsavójában mért peptidkoncentráció jelentősen, 10-szer magasabb volt, mint ugyanezen állatok plazmájában. A mintákat az ellés követő 3 hónapos laktációs periódusban gyűjtöttük, és ezalatt az idő alatt a PACAP-38-LI-ben nem volt szignifikáns eltérés. Tehéntejben ugyancsak megtalálható a PACAP-38, melyet RIA módszerrel bizonyítottunk. A peptid szérum/tej aránya hasonló volt, mint a másik két kérődző állatfaj esetén.

PACAP-38-LI meghatározása homogenizált juh tőgy biopsziából

Az emlőmirigyekből vett mintákat homogenizáltuk és RIA módszerrel meghatároztuk a szövetek PACAP-38 koncentrációját. Azt találtuk, hogy szülés után hét nappal a mirigyekben mért PACAP-38-LI $21,07 \pm 3,39$ fmol volt 1 mg nedves szövetre vonatkoztatva. A 30. napra a peptidkoncentráció $12,92 \pm 4,07$ fmol/mg-ra csökkent, ám ez nem tekinthető statisztikailag szignifikánsnak.

PAC1 receptor immunlokalizációja emlőmirigyben

A szülést követő hetedik és harmincadik napon is megtalálható a PACAP-specifikus PAC1 receptor a laktáló juhok emlőmirigyének hámsejtjein. Primér antitest nélkül festett negatív kontrollok (n=10) nem mutattak specifikus immunpozitivitást. A PAC1 receptor eloszlása nem egyenletes az emlőmirigyben. A mirigy hámsejtjei jelentős és intenzív PAC1 receptor immunpozitivitást mutatnak, különösen a sejtmembránban, és a citoplazmában is detektálható a szemcsés festődés. Ezzel ellentétben az interlobuláris kötőszövetben nem kimutatható a receptor.

V. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

V. 1. LIPID RAFTOK SZEREPE A TRPV1 RECEPTOR AKTIVÁCIÓJÁBAN

A lipid raftok TRPV1 receptor aktivációjára kifejtett szerepének vizsgálatakor a kontroll kísérletekben a kapszaicin és az RTX eltérő dinamikával rendelkező CGRP-felszabadulást eredményezett: a kapszaicin a stimulált, az RTX a stimuláció utáni 8 perces frakcióban váltotta ki a maximális peptidkiáramlást. Ez a két agonista esetében a receptor-aktiváció eltérő időtartamával magyarázható. A koleszterin depléción TRPV1 receptor működésére gyakorolt hatását a kapszaicin érzékeny szenzoros idegvégződésekből felszabaduló neuropeptidek mérésével vizsgáltuk izolált patkány tracheán *in vitro*. Eredményeink egybevágóak más kutatók eredményeivel, melyek szerint a koleszterin depléción és ezáltal a lipid raftok károsítása jelentős csökkenést vált ki a kapszaicin által létrehozott TRPV1 receptor aktivációban. Arra következtettünk, hogy a TRPV1 receptorok koleszterin gazdag mikrodoménekben (lipid raft) helyezkednek el a plazma membránban, és ezen mikrodomének integritása elengedhetetlen a receptor működésében. Kísérletsorozatunkban megfigyeltük, hogy mind a kapszaicin, mind az RTX által kiváltott CGRP felszabadulást gátolta a 100 μM koncentrációjú MCD előkezelés. Ezzel szemben a kisebb, illetve a nagyobb koncentrációk nem befolyásolták a neuropeptid felszabadulást. A CGRP felszabadulás kinetikája eltérő volt a kapszaicin és az RTX indukálta receptor aktiváció során. Azon megfigyelésünk, miszerint az RTX alkalmazásakor az ingerlés utáni frakcióban mért CGRP mennyiség nagyobb volt, mint a stimuláció alattiban, megerősítheti a feltevést, hogy az RTX és a kapszaicin a TRPV1 receptoron más-más helyhez kötődve hat.

V. 2. EM-1 HATÁSA AZ ÉRZŐIDEGVÉGZŐDÉSEKBŐL FELSZABADULÓ SZENZOROS NEUROPEPTIDEKRE IN VITRO ÉS NEUROGÉN ÉS NEM-NEUROGÉN GYULLADÁSOS FOLYAMATOKRA IN VIVO

Elsőként igazoltuk, hogy az endogén μ -opioid receptor agonista EM-1 a szomatosztatinhoz/sst₄ agonistákhoz és a PACAP-hoz hasonlóan ugyancsak képes szignifikánsan, koncentráció-függő módon csökkenteni a szenzoros neuropeptidek felszabadulását a kapszaicin-érzékeny idegvégződésekből. Elektromos téringerléssel kiváltott neuropeptid felszabadulást 1 μM tetrodotoxinnal valamint 25 mM lidokainnal gátoltak, mely

igazolja, hogy szelektíven az idegelemekben expresszázó feszültség-függő gyors Na^+ csatornák aktivációja felelős ezen neuropeptidok felszabadulásáért. A különbség, mely az EM-1 SP-re és CGRP-re gyakorolt gátló hatásában megnyilvánul azzal magyarázható, hogy a szenzoros idegvégződéseken a neuropeptidok lokalizációja nem teljesen egyforma. Számos eredmény számol be arról, hogy a szenzoros ganglionokban a neuronok jelentős része csak CGRP-t tartalmaz. Nem áll rendelkezésünkre adat arra vonatkozólag, hogy a különböző neuronális elemeken a μ -opioid receptorok milyen eloszlást mutatnak, de vizsgálataink azt jelzik, hogy a receptorok nagyobb számban találhatók meg azon idegvégződéseken, melyek csak CGRP-t tartalmaznak. Az EM-1 akut neurogén gyulladást gátló hatásait patkányban és egérben ugyancsak sikerült igazolnunk *in vivo*. 10 napig történő ismételt adás után sem csökkent ez a hatás az egyszeri alkalmazáskor tapasztaltnal összehasonlítva, tehát ebben a modellben az EM-1 nem okoz toleranciát. Mindkét fajban a mustárolajjal kiváltott neurogén gyulladást gátló hatás maximuma 55-60%, az ED_{50} megközelítőleg az 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p. dózis volt. Mivel ugyanazok a patológiai folyamatok állnak mind az egér fülön kiváltott ödéma, mind a patkány bőrön indukált plazmaprotein-kiáramlás hátterében, ezért két rágcsáló fajon végzett, ám egyenértékű neurogén gyulladással modellezhető. Az egérfül-duzzadás mérése gyors, megbízható, technikailag egyszerű és széles körben használt neurogén gyulladással modellezhető, mely jól reprodukálható eredményeket biztosít és kismértékű hibalehetőséggel jár. Patkány esetén a fül-duzzadás mérése nem alkalmazható a fül nagy mérete miatt, de a lábhati bőrön mustárolajjal kiváltott plazmaprotein-kiáramlást Evans-kék akkumulációs módszerrel rutinszerűen használják mint tisztán neurogén gyulladással modellezhető. A mustárolaj 5%-os koncentráció alatt hízósejtkiáramlás nélküli, tiszta neurogén gyulladást okoz azáltal, hogy szelektíven a kapszaicin érzékeny szenzoros idegvégződéseket stimulálja. Az EM-1 gyulladásgátló hatásában feltételezett prejunkcionális mechanizmusokra eredményeink egyértelmű, közvetlen bizonyítékokat szolgáltatnak. Mivel a naloxon mindhárom modellben kivédte az EM-1 gátló hatásait, e tetrapeptid ismert μ -opioid receptor agonista hatása jól magyarázza eredményeinket, más, nem specifikus mechanizmusok nem játszanak benne szerepet. Vizsgálataink tehát bizonyították, hogy a szenzoros idegvégződéseken lévő μ -opioid receptorok aktivációja felelős -legalábbis részben- az EM-1 neurogén gyulladást csökkentő hatásaiért, amit SP és CGRP felszabadulás gátlásával ér el.

Korábbi adataink alapján ismert, hogy a mustárolaj az alkalmazását követően 6 órával granulociták beáramlását is kiváltja, ebben a késői gyulladással reakcióban azonban nem-neurogén, szenzoros neuropeptidoktól független mechanizmusok játszanak szerepet. Az EM-1

nem csökkentette a mustárolajjal kiváltott gyulladás késői, sejtés fázisát, a granulocitákra nincs hatása. Számos mechanizmust leírtak, amelyekkel perifériás gyulladásos körülmények között az opioidok hatásai fokozódnak. A primér szenzoros neuronok perifériás végződéseiben az opioid receptorok száma megnő, fokozódik az opioid receptorok G-protein aktiváló képessége, amely csökkenő intracelluláris cAMP-koncentrációhoz vezet. Fokozódik az opioid peptidek felszabadulása a gyulladt területre beáramló gyulladásos és immunsejtekből. A gyulladásos stimulusk serkentik a μ -opioid receptorok szintézisét a primér szenzoros neuronok sejttestjeiben a hátsó gyöki ganglionokban, és fokozódik e receptorok perifériás végződés felé történő axonális transzportja. E folyamatok következtében a μ -opioid receptorok expressziója fokozódik a perifériás érzőideg-végződéseken, ami szerepet játszik a gyulladásos körülmények között nagy mennyiségben felszabaduló opioid peptidek endogén analgetikus és gyulladásgátló hatásaiban, de az exogén opioid receptor agonisták terápiás hatásaiban is. A μ -opioid receptorok perifériás idegvégződéseken történő stimulációja ugyancsak ígéretes új perspektívákat jelenthet a neurogén gyulladás gátlására tolerancia kialakulása nélkül.

V. 3. PACAP1-38 ÉS PACAP6-38 HATÁSAINAK VIZSGÁLATA KAPSZAICINNEL, ÉS ELEKTROMOS TÉRINGERLÉSSSEL KIVÁLTOTT SZENZOROS NEUROPEPTID FELSZABADULÁSRA IZOLÁLT PATKÁNY TRACHEÁN

Az izolált trachea preparátumon nyert adataink közvetlen bizonyítékot szolgáltatottak arra, hogy a PACAP-38 koncentráció-függő módon csökkenti a SP, CGRP és SOM kiáramlását, a maximális gátlás 70-90%. A PACAP-38 EC_{50} értéke 20-90 nM között volt, ami az ss_{t4} agonisták hatáserősségéhez hasonló. Az általunk bizonyított SP és CGRP felszabadulást gátló mechanizmus jól magyarázza azokat az adatokat, hogy a PACAP a trachea és a bronchusok területén simaizom relaxációt okoz, gátolja a nyáktermelést és a plazmafehérje-kiáramlást. A PACAP6-38-ról több vizsgálat is igazolta, hogy PAC1/VPAC2 receptor antagonistá. Azonban már több közleményben felmerült a parciális agonista lehetősége is: Chen és munkatársai (2005) leírták, hogy a PACAP1-27 és a PACAP6-27 önmagában adva is képes enyhe hasnyálmirigy gyulladást kiváltani, ám a PACAP6-27 növeli a PACAP1-27 hatását ceruleinnel kiváltott akut pancreatitis modellben. Viselkedési tesztben igazolták, hogy újszülött patkányok PACAP1-38-cal és PACAP6-38-cal történő hosszútávú kezelése ugyanazon mechanizmussal változtatja meg a felderítő viselkedési mintázatot. Egy másik

vizsgálat szerint a PACAP6-38 ugyanolyan hatású fagocitózis esetén, mint a PACAP1-38. Kísérleteink elsőként mutattak rá a PACAP6-38 agonista hatására, melyet izolált patkány tracheán szenzoros neuropeptid felszabadulására gyakorolt *in vitro*. A PACAP1-38-hoz hasonlóan a PACAP6-38 önmagában is szignifikánsan gátolta mind a kémiai, mind az elektromos téringerléssel kiváltott szenzoros neuropeptid felszabadulást. A kapszaicin szelektíven az idegvégződéseken lévő TRPV1 receptorokat aktiválja, míg az általunk alkalmazott elektromos téringerlés igazoltan a gyors Na⁺ csatornákat nyitja meg, melyek specifikusan a peptiderg afferenseken expresszálódnak. Ebből következően biztosak lehetünk benne, hogy az alkalmazott ingerlési paraméterekkel szelektíven a tracheában lévő kapszaicin-érzékeny szenzoros rostokat stimuláljuk. 2000 nM-os koncentrációban alkalmazott PACAP1-38 és PACAP6-38 közül a PACAP6-38 gátló hatása kisebb mértékű volt a legtöbb esetben, amiből arra következtethetünk, hogy a fragmentum parciális agonista. Ugyanakkor a két peptid együttes adása nagyobb gátló hatást eredményezett a kapszaicin ingerléssel kiváltott szomatosztatin, és az elektromos téringerléssel kiváltott SP felszabadulásra, mint amikor a PACAP1-38-at önmagában alkalmaztuk. Mindez azonban nem támasztja alá, hogy a PACAP6-38 parciális agonista lenne. Azt mondhatjuk tehát, hogy ebben a modellben a PACAP6-38 tiszta agonistaként viselkedik. Korábbi közlemények és jelen eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a PACAP6-38 hatása szövet-és célsejt specifikus.

V. 4. PACAP-38-LI KIMUTATÁSA EMBERI ÉS KÉRŐDZŐ ÁLLATOK PLAZMA- ÉS TEJMINTÁIBAN

Eredményeink elsőként igazolták, hogy a PACAP-38 jelen van az emberi plazmában és koncentrációja 20-40 év közötti egészséges önkéntesek körében viszonylag állandó. Az életkor, a nem, a táplálkozás vagy nők esetében a hormonális ciklus változásai nem befolyásolják a plazma PACAP-38 szintjét. Nem ismert, hogy a PACAP honnan kerül pontosan a plazmába, de nagy valószínűséggel a neurális és endokrin elemekből származik. Előzőleg igazoltuk már, hogy a kapszaicin-érzékeny rostok szisztémás *in vivo* stimulációja következtében a PACAP-38 koncentrációja szignifikánsan megemelkedik a keringésben.

Elsőként igazoltuk, hogy a PACAP-38 ilyen magas koncentrációban megtalálható az emberi anyatejben, és koncentrációja 5-20-szor magasabb tej savóban, mint ugyanezen egyének plazma mintáiban. Vizsgálataink kimutatták továbbá, hogy a PACAP-38 kérődző állatok tejében is megtalálható az emberi anyatejhez hasonló koncentrációban. Szignifikánsan magasabb peptidszinteket mértünk juhok és kecskék tejében, mint tehéntejben. Továbbá, az

emberben mért adatokhoz hasonlóan a tejben mért PACAP-38 koncentráció 5-20-szor magasabb, mint ugyanazon állatok plazmájában. Az, hogy a tehéntej kevesebb PACAP-38 peptidet tartalmaz, összhangban van azokkal a vizsgálatokkal, melyek kimutatták, hogy a tehéntej kisebb mennyiségű növekedési faktort tartalmaz, mint a kecsketej vagy akár az ember anyateje. A tej különböző hormonokat, növekedési faktorokat, peptideket tartalmaz, mint a bombesin, az YY peptid, a neurotenzin, a gasztrin, a kolecisztokinin és a peptid hisztidin metionin. A tejben található gasztrointesztinális peptidek feltételezhetően szerepet játszanak a növekedés szabályozásában és az újszülöttek gyomor-bél rendszerének érésében is. Néhány növekedési faktor nagyobb koncentrációban található az anyatejben, mint a plazmában. Ilyen például a gonadotropin elválasztást serkentő hormon, a thyreotrop hormon, a VIP, a szomatosztatin, a növekedési hormon elválasztást serkentő hormon, a relaxin, az inzulinszerű növekedési faktor-1, az epidermális növekedési factor és a prosztaglandinok. Ezen bioaktív vegyületek valószínűleg szerepet játszanak az emlőmirigyek növekedésében, a különböző tápanyagok szállításában valamint az újszülött szöveiteinek differenciálódásában és fejlődésében.

A PACAP anyatejben betöltött szerepéről csak feltételezéseink vannak. Az a tény, hogy ilyen magas koncentrációban van jelen az anyatejben, arra utal, hogy a PACAP elengedhetetlen az újszülött egészséges növekedése és fejlődése szempontjából. A PACAP fontos szerepet játszik a különböző szervek fejlődésében, különös tekintettel az idegrendszerre. A PACAP, mint neurotrófikus faktor befolyásolja az idegrendszer fejlődésének korai szakaszát, a neurogenézist, majd a születés után az asztrocitogenezisre, mielinizálódásra, az agy fejlődésére és a neuronális migrációra van nagy hatással. Az anyatej multifunkcionális összetevői védelmet nyújtanak különböző patogénekkal szemben és serkentik a természetes immunmechanizmusok kialakulását. A PACAP immunmoduláns hatással is rendelkezik, szabályozza az immunrendszer fejlődését, valamint a limfociták és makrofágok érését. Az emlőmirigyek fejlődésében és növekedésében is szerepet játszhat. Antiapoptotikus és sejtciklus szabályozó hatásai régóta ismertek. Az apoptózis komoly jelentőséggel bír az emlőmirigyek fejlődésében. A növekedési faktorok és antiapoptotikus molekulák expressziója szabályozza a laktáció során az emlőmirigyek növekedését és fejlődését, majd az ezt követő nagymértékű sejtpusztulásban az apoptózis jut szerephez.

Felmerül a kérdés, hogy a tejből származó PACAP milyen orális biohasznosulással rendelkezhet. A PACAP lebontásáért a dipeptidil peptidáz IV a felelős, mely a biológiailag aktív peptidek féléletidejét befolyásoló faktor. Kimutatták, hogy a PACAP és a hozzá hasonló peptidek féléletideje a testnedvekben viszonylag rövid, percekben mérhető. Az emlőmirigyek

termelnek proteáz inhibitorokat, melyek a tejben lévő fehérjék és peptidek stabilitásáért felelősek. Az újszülöttekben a proteolitikus aktivitás kisebb mértékű, a dipeptidil peptidáz IV enzimük még éretlen, és a bélhámsejtek makromolekulákkal szemben nagyobb permeabilitást mutatnak, ami lehetővé teszi fehérjék és peptidek nagyobb arányú felszívódását.

Egészséges kismamák körében végzett vizsgálataink elsőként mutatták ki, hogy a PACAP-38 plazmaszintje a terhesség második és harmadik trimeszterében folyamatosan növekszik, a szülés alatt jelentősen csökkent, és a szülést követő harmadik napon újra normál értékek mérhetők. Újszülöttekben a PACAP-38 koncentrációja a periférián hasonló, mint felnőttekben, azonban az umbilicalis erekből nyert vér alacsonyabb PACAP koncentrációt tartalmazott. A vena umbilicalisban szignifikánsan kevesebb PACAP volt mérhető, mint az artériás oldalon. Ezen adatok alapján ugyan nem vonható le messzemenő következtetés a PACAP fiziológiai folyamatokban betöltött szerepére vonatkozóan, azonban méréseink bizonyítják, hogy az endogén PACAP szintek érzékenyen reagálnak olyan hormonális változásokra, mint a terhesség, szülés, szoptatás. Érdekes az az eredmény, miszerint az arteria umbilicalisban mérhető PACAP koncentráció magasabb, mint a vénában, ami arra utal, hogy a magzati szervekben aktív peptidszintézis zajlik.

A PACAP egy pleiotropikus és többfunkciós neuropeptid, melyről ma már több bizonyíték is rendelkezésre áll, hogy fontos szerepet játszik a női hormonháztartás szabályozásában, tehát hatással van a terhességre, a fertilitásra ugyanúgy, mint a méhizomzat kontraktilitására és ezáltal a keringésére is. A terhesség késői szakaszában (második trimeszter után) mért PACAP koncentráció magasabb volt, ami azt mutatja, hogy a placentában és/vagy más anyai szervekben az átlagosnál nagyobb mértékű peptidszintézis folyik. Mindez összhangban van azzal a megállapítással, hogy a placenta PACAP tartalma a terhesség során folyamatosan növekszik. Ezen eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a PACAP komoly fiziológiai szerepet játszik a terhességben, de a különböző folyamatok és mechanizmusok pontosabb megismeréséhez további vizsgálatok szükségesek. Nem ismert, hogy a köldökzsinór ereiben lévő PACAP honnan származik, de az a tény, hogy az artériákban magasabb PACAP koncentrációt mértünk, arra utal, hogy az újszülöttben PACAP szintézis zajlik. A PACAP jelenléte a fejlődés nagyon korai szakaszában már kimutatható egérben és zebraháiban is. PACAP hiányos egerekben igazolták, hogy a peptid hatással van számos fejlődési folyamatra a kisagy fejlődésétől a viselkedési mintázatok kialakulásáig. Bár további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy pontosan ismerjük a PACAP emberi prenatális és postnatális fejlődésben betöltött funkcionális jelentőségét, jelen eredmények alapvetően fontosak, hogy e területen további kutatásokat indítsanak el.

VI. ÚJ EREDMÉNYEIM ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Igazoltuk, hogy a TRPV1 receptorok koleszterin gazdag mikrodoménekben helyezkednek el az érzőideg-végződések membránjában, és ezen mikrodomének integritása elengedhetetlen a receptor aktivációjához.
2. Kimutattuk, hogy az endogén opioid peptid, az endomorfín-1, ugyancsak képes szignifikánsan csökkenteni a szenzoros neuropeptidok kapszaicin-érzékeny afferensekből történő felszabadulását és a neurogén mechanizmussal létrejövő akut plazmafehérje-kiáramlást. Ezzel szemben azonban a mustárolajjal kiváltott gyulladási folyamat késői, nem-neurogén vaszkuláris és sejtes komponenseire nincs hatása.
3. Bizonyítottuk, hogy a számos modellrendszerben PAC1/VPAC2 receptor antagonistaként használt PACAP6-38 fragmentum bizonyos sejteken, jelen esetben az érzőideg-végződéseken a PACAP1-38-hoz hasonlóan agonistaként viselkedik: koncentráció-függő peptidfelszabadulás-gátlást eredményez. A PACAP6-38 által közvetített hatások tehát szövet és sejtspecifikusak. Mivel a gátló hatás nem magyarázható a PACAP receptorainak eddig ismert G_s és G_q proteinhez kapcsolt jelátviteli mechanizmusaival, egy jelenleg még nem azonosított receptor vagy splice variáns jelenlétét valószínűsítjük az idegvégződéseken. E mechanizmus további vizsgálata, a célmolekula azonosítása, és a jelátviteli folyamatok analízise jövőbeli kísérleteink tárgyát képezi.
4. Elsőként mutattuk ki a PACAP-38 jelenlétét emberi és kérődző állatoktól származó plazmában és anyatejben, valamint változásait terhesség és szülés alatt. Megállapítottuk, hogy a PACAP-38 plazma koncentrációja terhesség során fokozatosan növekszik az anyában, majd szülés alatt jelentősen csökken és viszonylag gyorsan, három napon belül normalizálódik. Mind anyatejben, mind kérődző állatok tejében 5-20-szor magasabb PACAP szinteket mértünk. Ezen eredmények funkcionális jelentőségének felderítése, és annak eldöntése, hogy a PACAP milyen szerepet játszik az újszülött fejlődésében, növekedésében, illetve az emlőállomány proliferációjában és a tejtermelés folyamatában, további vizsgálatokat igényel.

VII. PUBLIKÁCIÓS LISTA:

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ EREDETI KÖZLEMÉNYEK:

1. **Börzsei R**, Pozsgai G, Bagoly T, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs: Inhibitory action of endomorphin-1 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neuroscience* 152(1):82-88, 2008. **IF: 3,556; FC: 11**
2. Reglődi D, **Börzsei R**, Bagoly T, Boronkai A, Rácz B, Tamás A, Kiss P, Horváth G, Brubel R, Németh J, Tóth G, Helyes Zs: Agonistic behavior of PACAP6-38 on sensory nerve terminals and cytotrophoblast cells. *J. Mol. Neurosci.* 36(1-3):270-278, 2008. **IF: 2,061; FC: 4**
3. **Börzsei R**, Márk L, Tamás A, Bagoly T, Bay C, Csanaky K, Bánki E, Kiss P, Váczy A, Horváth G, Németh J, Szauer E, Helyes Z, Reglődi D: Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *Eur J Endocrinol.* 160(4):561-565. 2009. **IF: 3,539; FC: 3**
4. Reglődi D, Gyarmati J, Ertl T, **Börzsei R**, Bodis J, Tamás A, Kiss P, Csanaky K, Bánki E, Bay C, Németh J, Helyes Zs: Alterations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in the human plasma during pregnancy and after birth. *J Endocrinol Invest.* 33(7):443-445 2010. **IF: 1,476; FC: 2**
5. Czeglédi L, Tamás A, **Börzsei R**, Bagoly T, Kiss P, Horváth G, Brubel R, Németh J, Szalontai B, Szabadfi K, Jávora A, Reglődi D, Helyes Zs: Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. *Gen. Comp Endocrinol.* 172(1):115-119, 2011. **IF: 3,108**

Az értekezés alapját képező közlemények összesített impakt faktora: 13,740

Ezekre kapott idegen citációk száma: 20

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBA KÖZVETLENÜL NEM ILLESZKEDŐ EGYÉB KÖZLEMÉNYEK:

1. Szolcsányi J, Bölcskei K, Szabó A, Pintér E, Pethő G, Elekes K, **Börzsei R**, Almási R, Szűts T, Kéri G, Helyes Zs: Analgesic effect of TT-232, a heptapeptide somatostatin analogue, in acute pain models of the rat and the mouse and in streptozotocin-induced diabetic mechanical allodynia. *Eur J Pharmacol.* 498(1-3):103-109, 2004. **IF: 2,432; FC: 20**
2. Jakab B, Helyes Zs, Varga A, Bölcskei K, Szabó A, Sándor K, Elekes K, **Börzsei R**, Keszthelyi D, Pintér E, Pethő G, Németh J, Szolcsányi J: Pharmacological characterization of the TRPV1 receptor antagonist JYL1421 (SC0030) in vitro and in vivo in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 517(1-2):35-44, 2005. **IF: 2,477; FC: 22**
3. Helyes Zs, Pozsgai G, **Börzsei R**, Németh J, Bagoly T, Márk L, Pintér E, Tóth G, Elekes K, Szolcsányi J, Reglődi D: Inhibitory effect of PACAP-38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammatory processes in the rat. *Peptides* 28(9):1847-1855, 2007. **IF: 2,368; FC: 7**
4. Elekes K, Helyes Zs, Németh J, Sándor K, Pozsgai G, Kereskai L, **Börzsei R**, Pintér E, Szabó A, Szolcsányi J: Role of capsaicin-sensitive afferents and sensory neuropeptides in endotoxin-induced airway inflammation and consequent bronchial hyperreactivity in the mouse. *Regul. Pept.* 141(1-3):44-54, 2007. **IF: 2,422; FC: 10**

5. Helyes Zs, Elekes K, Németh J, Pozsgai G, Sándor K, Kereskai L, **Börzsei R**, Pintér E, Szabó A, Szolcsányi J: Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in endotoxin-induced airway inflammation in the mouse. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292(5):L1173-1181, 2007. **IF: 4,214; FC: 17**
6. Sütő B, Bagoly T, **Börzsei R**, Lengl O, Szolcsányi J, Németh T, Loibl C, Bardonicsek Z, Pinter E, Helyes Zs: Surgery and sepsis increase somatostatin-like immunoreactivity in the human plasma. *Peptides* 31(6):1208-12, 2010. **IF: 2,654**
7. Szőke E, **Börzsei R**, Tóth DM, Lengl O, Helyes Z, Sándor Z, Szolcsányi J: Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. *Eur J Pharmacol.* 628(1-3):67-74, 2010. **IF: 2,737; FC: 7**
8. Markovics A, Szőke E, Sándor K, **Börzsei R**, Bagoly T, Kemény A, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs: Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of cortistatin-14 and somatostatin-14 in distinct in vitro and in vivo model systems. *J Mol Neurosci.* 46(1): 40-50. 2012. **IF: 2,922**
9. Csanaky K, Bánki E, Helyes Zs, **Börzsei R**, Bagoly T, Márk L, Bay Cs, Gyarmati J, Ertl T, Kiss P, Brubel R, Váczy A, Németh J, Szauer E, Tarcai I, Szalontai B, Heronyányi D, Bilonka Zs, Reglődi D, Tamás A: Hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) kimutatása vér- és tejmintákból várandósság, szülés és szoptatás alatt. *Védőnő folyóirat* (közlés alatt) 2012.

Az értekezés témájába közvetlen nem illeszkedő egyéb közlemények impakt faktora: 22,226
Ezekre kapott független citációk száma: 83

Az összes eredeti közlemény kumulatív impakt faktora: 35,966
Kumulatív független citációk szám: 103

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek dr.Helyes Zsuzsannának, amiért oly nagy kitartással és türelemmel irányította munkám, valamint szeretetével és támogatásával mindig mellettem állt magánemberként is. Köszönöm dr. Pintér Erikának és dr. Szolcsányi János Professzor Úrnak hasznos szakmai segítségüket és tanácsaikat. Köszönöm dr. Barthó Loránd Professzornak, az intézet vezetőjének, hogy támogatta kutató munkámat. Hálás vagyok dr. Németh Józsefnek, hogy végtelen türelmével és komoly szaktudásával segítette a radioimmunassay módszerek elsajátításában. Köszönöm Bagoly Teréznek és Zöldhegyi Józsefné, Marának, hogy örök vidámságukkal, precíz munkájukkal és szakmai tapasztalatukkal segítettek a perfúziós kísérletekben és a radioimmunassay mérések elvégzésében. Köszönöm dr. Sándor Katalinnak, PhD hallgató társamnak a barátságát, és mindig vidám, optimista szavait, tanácsait, amikre nemcsak szakmai kérdésekben, de magánéleti problémákban is számíthattam. Köszönöm dr. Szőke Évának, dr. Lengl Orsolyának, dr. Kemény Ágnesnek, dr. Pozsgai Gábornak, dr. Csanaky Katának, dr. Bánki Eszternek a munkám során nyújtott segítségüket. Köszönöm dr. Reglődi Dórának, dr. Tamás Andreának a fantasztikus ötleteket és jókedvet, amit közös munkánk során élvezhettünk. Köszönet dr. Czeglédi Leventének, aki a biológiai minták gyűjtését oly szorgalmasan végezte. Köszönöm dr. Szabadfi Krisztának az immunhisztokémiai vizsgálatokban nyújtott segítségét, Hírné Perkecz Anikónak a biológiai metszetek készítését és dr. Márk Lászlónak, aki a tömegspektrometria világába engedett betekintést. Köszönöm a Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézet minden dolgozójának a támogatást és a jó munkahelyi légkört megteremtését. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Családomnak, Szüleimnek, Bátyámnak és Sógornőmnek, Férjemnek a rengeteg türelmet, támogatást és biztatást, amit az elmúlt években kaptam tőlük.