

A TACHYKININ RENDSZER ÉS AZ ÉRZŐIDEG- VÉGZŐDÉSEK AKTIVÁCIÓJÁNAK SZEREPE BÉL- ÉS LÉGÚTI GYULLADÁSMODELLEKBEN

Doktori (PhD) értekezés tézisei



Dr. Szitter István

Gyógyszertudományok – Neurofarmakológia Program

Programvezető: Dr. Pintér Erika

Témavezető: Dr. Helyes Zsuzsanna

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM, ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET

Pécs

2014

1. Bevezetés

1.1 A kapszaicin-érzékeny idegvégződések, funkcióik, és a neurogén gyulladás

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések hármas funkcióval rendelkeznek: afferens, lokális és szisztémás efferens feladatokat látnak el. A **klasszikus afferens** működés során az érzőideg-végződés az öt ingerlő hatásra (kapszaicin, hő, mechanikus inger, pH változás, stb.) ingerületet küld a központi idegrendszerbe és létrejön a nocicepció, amelynek szubjektív érzékelése a fájdalom. Az aktiválódott idegvégződésből emellett felszabadulnak különböző neurotranszmitterek, amelyek lokális és szisztémás hatást is kifejtenek. Lokálisan vazodilatációt, plazmafehérje kiáramlást, gyulladós sejt aktivációt, ödémát (neurogén gyulladást) okoznak. Ilyen neurotranszmitter például a substance P (SP), neurokinin A (NKA), neurokinin B (NKB), amelyek a tachykininek családjába tartoznak. Ezt tekinthetjük a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések **lokális efferens** funkciójának. Ugyanezen aktivált idegvégződésekből szomatosztatin is felszabadul, amely a szisztémás keringésbe jutva gyulladásgátló és fájdalomcsillapító funkcióval rendelkezik (Pintér & Szolcsányi 1996; Szolcsányi, Helyes, et al. 1998; Szolcsányi, Pintér, et al. 1998). Ezt tekinthetjük a **szisztémás efferens** funkciónak.

1.2 Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1) receptor

A Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 receptor egy nem szelektív kationcsatorna, amelyet fájdalmas hőinger (43 °C felett), savas pH (Tominaga et al. 1998), számos exogén vegyület (kapszaicin, reziniferatoxin, piperin, zingeron, gingerol, etanol) (Szolcsányi 1983; Szallasi & Blumberg 1989; Patacchini et al. 1990; Szallasi & Blumberg 1990; Caterina et al. 1997; Liu et al. 2000; Dedov et al. 2002), illetve endogén anyag (anandamid, lipoxigenáz termékek, N-oleoil-dopamin) (Hwang et al. 2000; Trevisani et al. 2002; Chu et al. 2003) aktivál. A TRPV1 receptort több, mint másfél évtizede sikeresen klónozták (Caterina et al. 1997; Caterina & Julius 2001; Clapham et al. 2003). Hat transzmembrán doménből épül fel, az ötödik és hatodik domént egy rövid hidrofób flexibilis szakasz köti össze, amely részt vesz a csatorna kialakításában. A receptor tetramer formában aktív (Clapham et al. 2003). Aktiválódásával többféle jelátviteli út aktiválódik vagy inaktiválódik, legfontosabb következmény a kalcium influx okozta sejtmembrán depolarizáció. A kalcium akkumuláció cGMP emelkedését okozhatja specifikus módon (Wood et al. 1988). A TRPV1 receptoron megtalálhatók PKC

(Bhave et al. 2003; Dai et al. 2004; Premkumar et al. 2004), PKA (De Petrocellis et al. 2001; Rathee et al. 2002; Bhave et al. 2003), illetve Ca^{2+} /calmodulin dependens protein kináz II (CaMKII) enzimek foszforilációs helyei (Wood et al. 1988).

A TRPV1 receptornak a periférián fontos szerepe van a fájdalmas ingerek központi idegrendszerbe közvetítésében (nocicepció), de kimutatták jelenlétét a központi idegrendszerben is, ahol részt vesz a fájdalmas ingerek integrálásában (Huang et al. 2002; Cui et al. 2006). A TRPV1 receptorok aktiválódása többek között a tachykininek felszabadulását okozza az érzőideg-végződésekből, így a tachykinin rendszer egyik fontos szabályozó receptoraként is funkcionál.

1.3 Tachykinin rendszer

A tachykinin rendszer első tagját 1931-ben fedezte fel von Euler és Gaddum. Az 1980-as években új tagokkal bővült az emlős tachykinin család, úgymint substance K (új nevezéktan szerint neurokinin A, NKA) és neuromedin K (most neurokinin B, NKB), neuropeptide K és neuropeptide γ , amelyek az NKA variánsai (Kimura S. 1983; Nawa et al. 1984; Tatemoto et al. 1985; Kage et al. 1988). A mediátorok felfedezésével párhuzamosan a receptorokat is felderítették és jellemezték (Masu et al. 1987; Yokota et al. 1989; Bielow et al. 1990). A tachykininek legfőképpen a kapszaicin érzékeny idegvégződésekből szabadulnak fel, de idegi struktúrákon kívül más szövetekben is kimutatták őket. A tachykinin receptorok G-protein kapcsolt receptorok. Eddig 3 receptort ismerünk (neurokinin 1, 2, 3-as receptor), ezek affinitása és szelektivitása eltérő az egyes tachykininekre nézve.

A tachykininek számos élettani folyamatban szerepet játszanak. A gerincvelő hátsógyöki részében felszabaduló tachykininek a fájdalom érzékelésében érintettek. A kolinerg és adrenerg jelátvitelt befolyásolják (Grant 2002), de legfontosabb hatásuk azonban a neurogén gyulladás mediálása. A neurogén gyulladást lokálisan értágulat, plazma extravazáció, ödéma kialakulása, gyulladásosejtek akkumulációja jellemzi. A tachykininek közvetlenül vagy közvetve a hízósejtek degranulációja által felszabaduló hisztamin révén simaizom összehúzódást is kiválthatnak (Jancsó et al. 1967; Jancsó et al. 1968; Szolcsányi 1984; Szolcsányi 1996a; Barthó et al. 2004).

A SP preferenciálisan a NK1 receptorhoz, a NKA a NK2 receptorhoz, míg a NKB a NK3 receptorhoz kötődik; a preferált receptorokon teljes agonistaként viselkednek a tachykininek. A SP a NK1 receptort aktiválva érpermeabilitás fokozódást, plazmafehérje kiáramlást okoz, fokozza a gyulladásosejtek termelődését, a T-sejtek kemotaxisát. Ennek révén elősegíti a

neutrofil granulociták akkumulációját, hízósejtek degranulációját, limfociták proliferációját (Grant 2002). A SP fokozza a nyálmirigy, a gyomor-bélrendszer, köztük a hasnyálmirigy elválasztását (Lembeck & Starke 1968; Konturek et al. 1981). Továbbá elősegítik az endothelsejtek osztódását, vándorlását és új erek képződését (Maggi 1995). A NKA a legnagyobb affinitást a NK2 receptorok iránt mutatja, a SP-hez hasonlóan plazma-extravazációt okoz és simaizom-kontrakciót vált ki, gyulladást stimulál (De Swert & Joos 2006). A NK2 receptorok elsősorban periférián játszanak szerepet, de központi idegrendszerben is megtalálhatóak. A NK3 receptor, amely a NKB-t köti meg, elsősorban a központi idegrendszerben található meg, de kimutatták perifériásan is (Frossard & Advenier 1991), szerepük azonban kisebbnek tűnik a neurogén gyulladást előidéző folyamatokban.

A 2000-es években a tachykinin családja tovább bővült a hemokininek felfedezésével, amelyeket a Tac4 gén kódol (Zhang et al. 2000). Emberekben ennek a génnek számos terméke termelődik alternatív splicing révén, amelyeket endokinineknek (EKA, B, C, D) és hemokinineknek (HK) nevezünk. Egérben és patkányban csak egy variáns létezik amelyet hemokinin-1-nek (HK-1) nevezünk. A tachykinin család új tagjaiként valamint a javasolt receptor konformerekkel és a szövetspecifikus poszt-transzlációs módosulásokkal egy finoman szabályozott tachykinin rendszer valósul meg, amelyben számos sejtvonal és jelátviteli út érintett (Page 2004; Page 2005).

1.4 A neurogén gyulladás szerepe a légutakban

A légúti gyulladás kísérletes modellezése többféle módszerrel történhet. Ezek közül gyakran alkalmazott az endotoxin (LPS) kiváltotta légúti gyulladás (Helyes & Hajna 2012), illetve a dohányfüst indukálta krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) modell (Shapiro 2000). A LPS-indukálta légúti gyulladás döntően neutrofil granulocita aktivációval járó akut gyulladásmodell, míg a dohányfüst expozíció krónikus változásokat okoz, emfizémát, fibrózist indukál (Churg et al. 2008).

Gyulladást és immunsejtek is képesek tachykinineket termelni bizonyos gyulladást előidéző stimulusokra. A celluláris eredetű tachykininek fontos szerepet játszhatnak a gyulladással járó légúti kórképekben, úgymint asztmában és a krónikus obstruktív tüdőbetegségben (COPD) (Groneberg et al. 2006). Vírusinfekcióban a tüdő epithel sejtek képesek SP-t expresszálni (Stewart et al. 2008).

A NK1 és NK2 receptorok vesznek részt a biológiai reakciók mediálásában, a preferált ligandok a SP és a NKA, sorrendben (Frossard & Advenier 1991; Regoli et al. 1994). Kutatócsoportunk

korábban igazolta, hogy akut tüdőgyulladásban a NK1 és NK2 receptorok szimultán aktivációja részt vesz a neutrofil akkumulációban, de a NK2 receptorok legfőképp a megnövekedett légúti ellenállásért felelősek (Elekes et al. 2007).

A harmadik preprotachykinin gén (Tac4) felfedezése óta megduplázódott a tachykininek száma, számos peptidet azonosítottak a perifériás szervekben több fajban és széleskörű hatásokat írtak le (Page 2004; Page 2005; Page 2006). A hemokininek és endokininek jelentős szelektivitást és potenciát mutatnak a NK1 receptoron és részt vehetnek gyulladásos sejtfunciókban (Groneberg et al. 2006; Page 2006). Az elsősorban perifériásan expresszálandó SP-szerű endokinineket a perifériás NK1 receptorok agonistájának gondolták (Page 2004), de a tachykinin rendszer annál sokkal összetettebbnek tűnik, mint ahogy kezdetben feltételezték. Számos tachykinin-mediálta folyamat szövetspecifitást mutat, amely így tachykininek és receptorkonfigurációk egyedülálló interaktív kombinációit teszi lehetővé (Page 2006).

1.5 A neurogén gyulladás jelentősége a vastagbélben

A neurogén gyulladás és a neuro-immun interakciók bizonyítottan szerepet játszanak az IBD kialakulásában, fontos a szenzoros idegrendszer érintettségének tanulmányozása. Néhány szerző leírt TRPV1 expresszálandó afferens idegrostokat az extrinsic szenzoros neuronok között rágcshálókbán (Patterson et al. 2003; Ward et al. 2003), mások TRPV1-szerű immunoreaktivitást mutattak ki intrinsic enterális neuronokon tengerimalacban, sertésben és emberben (Poonyachoti et al. 2002; Anavi-Goffer & Coutts 2003; Chan et al. 2003). Fiziológiai körülmények között a TRPV1 expresszálandó afferensek fontos szerepet töltenek be a gasztrointesztinális keringés, szekréció, mukózális homeosztázis, motilitás és nocicepció szabályozásában (Holzer & Barthó 1996; Holzer & Maggi 1998).

A gyulladásos bélbetegségek adekvát farmakológiai kezelése egy jelentős probléma napjainkban is. A jelenlegi kezelések számos nem kívánt mellékhatással járnak. A legutóbbi fejlesztések eredményeképpen kerültek terápiába bevezetésre a proinflammatorikus mediátorok elleni specifikus antitestek (anti-TNF- α antitest, infliximab), de a belekben zajló anti- és proinflammatorikus folyamatokat szabályozó mechanizmusok még mindig nem kellőképpen tisztázottak.

A bélgyulladás patomechanizmusának legvalószínűbb oka az epithel sejtek közti szoros kapcsolatok (*tight junction*) károsodása, és ennek következtében a bélfalba hatoló lumenális antigének által kiváltott reakció. Ennek egyik fontos komponense az érzőideg-végződések aktivációja és a neurogén gyulladás (Yamamoto et al. 1996; Gross & Pothoulakis 2007). Új

eredmény, hogy a TRPV1 expresszálo neuronokból felszabaduló SP súlyosbító faktor az ulceratív colitisben (Engel et al. 2012).

1.6 Új gyulladáscsökkentő gyógyszerek kifejlesztésének szükségessége

Jelenleg a gyulladással megbetegedések adekvát terápiaja nem megoldott, mivel a gyulladás neurogén komponensének gátlására pillanatnyilag nem érhető el célzott szer. Egyik ilyen jelentős egészségügyi probléma a gyulladással bélbetegségek csoportja, illetve a légúti gyulladással kórképek. Mindkettőnél bizonyítást nyert a neurogén komponens szerepe a gyulladás létrejöttében. Kutatásomban azért fókuszáltam a bélrendszer és légutak gyulladására, mert mindkettő kiterjedt, nagy szervrendszer, közvetlen kapcsolatban áll a külvilággal, gyulladással megbetegedésük nagyszámú embert érint.

Tekintve, hogy a pontos patomechanizmus még nem feltárt (és feltehetőleg multifaktoriális kórképpel állunk szemben), oki terápia nem tudunk megvalósítani, a cél a kórlefolyás kézbe tartása, lassítása (Gaál 2012).

A bélgyulladások terápiajában számos nagyhatású gyulladáscsökkentő szerrel rendelkezünk (kortikoszteroidok, TNF- α inhibitor), azonban ezek súlyos mellékhatást okozhatnak, különösen krónikus adagolás esetén. Jelenleg a terápiaiban használt hatóanyagok 3 fő csoportba oszthatók: lokális kortikoszteroidok, szisztémásan alkalmazott immunszuppresszáns farmakonok (methotrexát, ciklofoszfamid, azathioprin) valamint a legújabban alkalmazott monoklonális antitestek (influximab, etanercept, adalimumab, certolizumab, natalizumab).

Hasonló farmakológiai megközelítés érvényesül a légúti gyulladással megbetegedések kezelésében is. A krónikus légúti gyulladással kórképek (asthma bronchiale) terápiajának alapját képezik a lokálisan alkalmazott kortikoszteroidok (budesonid, fluticason, mometason), illetve a szisztémásan alkalmazott leukotrién-antagonisták (montelukast, zafirlukast, pranlukast). Fenti hatóanyagokat tartósan szükséges adagolni, hogy megelőzzük a krónikus gyulladás kialakulását, amelynek a talaján akut rohamok alakulhatnak ki. Súlyosabb esetekben itt is alkalmazzák a biológiai terápiai hatóanyagokat (omalizumab a kortikoszteroidra nem reagáló allergiás asztma terápiajában).

A kortikoszteroidok mellékhatásaként a lokális vagy szisztémás immunszuppresszióból következően opportunisták fertőzések léphetnek fel (gomba-, baktérium-, vírusfertőzések), illetve a hormonális egyensúly megbomlása révén endokrin elváltozások alakulnak ki. A legújabb biológiai terápiai eljárások sem mentesek a mellékhatásoktól, megfigyelték súlyos lappangó fertőzések exacerbációját (például tuberkulózis), valamint szklerózis multiplex,

progresszív multifokális leukoencefalopátia (PML) kialakulását (Mir Subías et al. 2013; Piusińska-Macoch 2013). Továbbá a biológiai terápia igen költséges.

A krónikus gyulladás a tüdőszövetben is visszafordíthatatlan károsodást okozhat, tartós szöveti átalakulás (emfizéma, fibrózis) gátolja a légzőfunkció ellátását, amely nagymértékben rontja a páciens életminőségét. Értelemszerűen itt nem áll rendelkezésre műtéti beavatkozás, amely érdemben javíthatná a beteg állapotát.

Mindezek indokolják, hogy erőfeszítéseket tegyünk új mechanizmusú gyulladásgátló szerek kifejlesztésére a gyulladást szabályozó mechanizmusok feltárásával. Egyik ilyen módszer lehet a szelektív receptor antagonizmus alkalmazása, amellyel beavatkozhatunk a gyulladás kialakulásába.

2. Célkitűzések

Légúti gyulladás modellben:

- a) Megvizsgálni a neurokinin 1 receptor szerepét LPS-indukálta légúti gyulladás modellben.
- b) Feltárni az egyes transzmitterek (SP, NKA) és receptoruk (NK1) szerepét az endotoxinnal kiváltott légúti gyulladásban, elemezni az egyes mediátorok és receptoruk hatását a gyulladásos folyamat különböző komponenseire nézve.
- c) Megfigyelni a krónikus dohányfüst expozíció okozta gyulladásos folyamatokat és következményeit (légúti hiperreaktivitás) Trpv1 KO és Tac1 KO, NK1 KO egerekben.

Bélgyulladás modellben:

- a) Meghatározni a TRPV1 receptorok szerepét a dextrán-szulfáttal kiváltott colitis ulcerosa állatmodelljében, kétféle dextrán-szulfát koncentrációnál is.
- b) Megvizsgálni a NK1 receptor és különböző tachykinin gének expresszióját intakt és colitis-indukált állatokban.
- c) Felderíteni a NK1 receptor-antagonizmus hatását DSS-indukálta colitis modellben a lokális citokin termelésre.

3. Kísérletes modellek és vizsgálati módszerek

3.1 Légúti gyulladásmodellek

3.1.1 Állatok

Kísérleteinkben felhasznált minden egér a C57Bl/6 vad típusú törzsbe tartozott, illetve ilyen törzsből előállított genetikailag módosított egér volt. Az ivarérett egerek testtömege 20-25 g volt, életkoruk 8-10 hét. Mindkét csoportban egyforma arányban használtunk hím és nőstény állatokat.

A Tac1 KO egerek (Zimmer et al. 1998) és a NK1 KO (Tacr1 KO) egerek előállítását korábban részletesen leírták (De Felipe et al. 1998; Laird et al. 2000). A kettős knockout törzs eredeti tenyészpárja a fenti két törzs (Tac1 KO x NK1 receptor KO) szelektív keresztezésével jött létre, ezek az egerek teljesen nélkülözik az SP/NK1 jelátviteli utat.

3.1.2 Légúti gyulladás indukciója és kísérleti protokoll

3.1.2.1 Szubakut légúti gyulladás

A szubakut légúti gyulladást intranazálisan adagolt 60 μ l *Escherichia coli* (szerotípus: 083) endotoxinnal (167 μ g/ml steril PBS-ben feloldva) váltottuk ki, és 24 óra múlva végeztük a méréseket. A kontroll állatok ugyanekkora térfogatú steril PBS-t kaptak.

3.1.2.2 Krónikus légúti gyulladás

A krónikus légúti gyulladást 2 hónapon át tartó teljes test dohányfüst expozícióval értük el. Ennek során az állatokat ketrecekben a dohányoztató kamrába helyeztük és heti 10 alkalommal kaptak dohányfüst expozíciót. Ehhez referencia cigarettát alkalmaztunk (Reference Cigarette, 3R4F típus).

3.1.3 Légúti reaktivitás meghatározása

Éber, spontán lélegző állatok légúti reaktivitását teljes test pletizmográfiával végeztük. Aeroszolizált fiziológiás sóoldatot majd muszkarin receptor agonista carbacholt emelkedő koncentrációban (50 μ l egerenként, 0, 5,5, 11 és 22 mM koncentrációkban) porlasztottunk be a készülék kamrájába a bronchokonstrikció kiváltására 24 órával az LPS beadása után. Az úgynevezett „enhanced pause” (P_{enh}) értékét számítottuk, ki mint a bronchokonstrikció és a következményes légúti ellenállás-fokozódás indikátorát. A krónikus dohányfüst expozícióval kiváltott légúti gyulladás során hasonló metodikát követtünk. Előzetes mérések alapján kiválasztott 0, 11 és 22 mM koncentrációjú carbachol oldatot porlasztottunk be a kamrákba. A légúti reaktivitás meghatározását havonta elvégeztük.

3.1.4 Bronchoalveoláris lavage

A ketamin-xyzilazinnal elaltatott állat tüdejét tracheakanülön keresztül 5 ml hideg PBS oldattal öt részletben átöblítettük, a visszamért tömegű mosófolyadékból CD45 FITC és propidiumjodid festés után Partec áramlási citométer készülékkel számoltuk meg a megfestett sejteket.

3.1.5 Szöveti vizsgálatok és pontozás

A teljes jobb tüdőlebenyt 4%-os formaldehidben fixáltuk 8 órán keresztül, paraffinba ágyazás után mikrotómmal 5-7 μm vastag metszeteket készítettünk és rutinszerűen hematoxin-eozinnal megfestettük. A perjódsavas Schiff reakcióval tettük láthatóvá a nyáktermelő kehely sejteket. A metszeteket a kísérleti elrendezést nem ismerő tapasztalt patológus pontozta szemikvantitatív módon (Zeldin et al. 2001), majd kompozit gyulladási pontszámot számított.

3.1.6 Myeloperoxidáz (MPO) aktivitás meghatározása

A tüdőt felolvastva és apró darabokra vágva 4 ml 20 mM koncentrációjú kálium-foszfát pufferben (pH=7,4) homogenizáltuk majd lecentrifugáltuk. A felülúszóból H_2O_2 -3,3',5,5'-tetrametil-benzidin színreakcióval, spektrofotometriás módszerrel meghatároztuk az MPO enzimaktivitást. Ehhez 96-lyukú lemez lyukaiba mértünk 25 μl mintát, 25 μl MPO puffert és 100 μl TMB/ H_2O_2 festék reagenst. Gyors összerázás után azonnal megmértük az optikai denzitást 620 nm hullámhosszon majd 5 perccel később (Labsystems, kinetikus mérés). A minták MPO aktivitását unit/mg nedves szövet egységben fejeztük ki. A neutrofil akkumulációt a minták MPO aktivitásának humán MPO standard preparátumhoz történő viszonyításával határoztuk meg.

3.1.7 Gyulladási citokinek koncentrációmérése a tüdőben

A tüdőminták homogenizálása 450 μl RPMI 1640 pufferben történt, amely 50 μl fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) tartalmazott. A lecentrifugált homogenizátum felülúszójából az interleukin 1 β (IL-1 β) és tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) koncentrációját mértük meg specifikus ELISA technikával.

3.1.8 IL-1 β citokin meghatározás

Az IL-1 β citokin meghatározásához a felolvastott szövetminta tömegét lemértük, 0,5 ml 1% PMSF tartalmú RPMI tápoldatban homogenizáltuk jégbe hűtve 1 percre, 4 °C-on 10000 g-vel 10 percre centrifugáltuk, majd a felülúszót használtuk fel az ELISA lemez gyártójának (BD Biosciences) előírása szerint. Az eredményt ng/g szövet egységben fejeztük ki.

3.1.9 Statisztika

A P_{enh} érték százalékos változása az alapvonalhoz viszonyítva, MPO aktivitás értékek és citokin koncentrációk átlag \pm SEM értéként lettek megadva és kétutas ANOVA Newman-Keuls poszt-teszttel kerültek statisztikai értékelésre. A szövettani gyulladásos pontszámok esetében a Kruskal-Wallis tesztet és Dunn poszt-tesztet alkalmaztunk a szignifikancia megállapítására. Statisztikai analízishez a GraphPad Prism 5.02 for Windows (GraphPad Software, USA) alkalmaztuk. Minden esetben a $p < 0,05$ értéket fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

3.1.10 Etika

Minden kísérleti tevékenységet a 1998. évi XXVIII. számú állatvédelmi törvény állatkísérletekre vonatkozó szakaszának (243/1988) előírásainak megfelelően végeztünk. A kísérleteket etikailag elfogadta a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérletes Etikai Bizottsága az Állatkísérletes Etikai Kódex alapján és engedélyezte azt (engedélyszám: BA 02/2000-11-2006).

3.2 Bélgulladás modellek

3.2.1 Állatok

Nőstény Trpv1 génhíányos (knockout, KO) egereket és C57Bl/6 vad típusú társaikat (8-10 hetes életkor, 20-25 g testsúly) használtuk a TRPV1 receptor szerepét vizsgáló kísérlethez. Az eredeti tenyészpárt a Jackson Laboratories-tól (USA) vásároltuk a Charles River Hungary segítségével. Az NK1 receptor és tachykininek szerepét vizsgáló kísérleteket hím NK1 receptor (Tacr1 KO) génhíányos állatokon végeztük. C57Bl/6 egerek szolgáltak vad típusú (WT) kontroll állatként. A NK1 KO egereket a University of Liverpool laboratóriumában állították elő eredetileg (Zimmer et al. 1998; De Felipe et al. 1998; Laird et al. 2000; Helyes et al. 2004).

3.2.2 Kísérleti protokollok

3.2.2.1 Colitis indukciója

A kezelt csoport 2% és 5%-os koncentrációban kapott dextrán-szulfátot (DSS) az ivóvízben feloldva, 7 napon át. Az oldatot 2 g vagy 5 g DSS 100 ml csapvízben történő oldásával állítottuk elő. A kontroll csoport csapvizet fogyasztott.

A colitis indukciója után az állatokat egy éjszakányi éheztetés után mély ketamin-xylazin altatásban (100 mg/kg ketamin i.p.; 5 mg/kg xylazin i.p.) öltük le. A disztális colon (az anustól a coecumig mért colon egyharmada) került kimetszésre, amely után elvégeztük a kísérleti elrendezésben meghatározott vizsgálatokat (Szitter et al. 2010).

3.2.2.2 *Netupitant kezelés*

Az NK1 receptor és a tachykinin rendszer vizsgálatához a szintetikus, szelektív NK1 receptor antagonistá netupitant naponta egyszer került beadásra a kísérleti állatoknak intraperitoneálisan (6 mg/kg, 100 µl a 0,6 mg/ml koncentrációjú oldatból) a kísérlet kezdetétől 7 napon át. A DSS kezelés kontrollcsoportja a vivőanyagot kapta ugyanilyen térfogatban és adagolási sémával. Egy csoport receptorhiányos állat is kapott netupitantot, hogy meggyőződhessünk arról, hogy a netupitantnak van-e egyéb hatása a NK1 receptor gátlás mellett. A gyártó utasítása szerint elkészített netupitant törzsoldatot 2 °C-on tároltuk és minden nap frissen készítettük belőle fiziológiás sóoldattal hígítva a 0,6 mg/ml végkoncentrációjú beadandó oldatot.

3.2.3 **Receptor expresszió vizsgálata**

A bélszövet mintákat RNAlater oldatban tároltuk feldolgozásig. A homogenizálás 1 ml TRI reagensben történt és teljes RNS izolálást a gyártó utasításai szerint végeztük el. β-aktin szolgált referencia háztartási géneként. A PCR termékek agaróz gélen futtatás után DNS specifikus festékekkel lettek megfestve és UV fény alatt tettük őket láthatóvá.

3.2.4 **A Disease Activity Index (DAI – betegség aktivitás index) meghatározása**

A colitis tüneti manifesztációját naponta ellenőriztük. Pontoztuk a testtömeg-csökkenést, széklet-konzisztenciát, székletvér-tartalmat. A DAI-t a pontszámok összesítésével és átlagolásával határoztuk meg (Kihara et al. 2003). Az okkult székletvér jelenlétét Hemocare gyorseszttel végeztük, amely a módosított guajak próbán alapul.

3.2.5 **Szöveti vizsgálat és szemikvantitatív pontozás**

A 4%-os pufferelt formaldehid oldatban fixált colon szegmentumokat paraffinba ágyztuk és 6 µm vastag metszeteket készítettünk. A metszetek festése hematoxin-eozin festéssel történt. A metszetekről digitális felvételt készítettünk. A szemikvantitatív pontozásnál a gyulladás kiterjedtségét, kriptakárosodást és a károsodás százalékos mértékét vettük figyelembe és pontoztuk, ahogy az irodalomban korábban leírták (Kihara et al. 2003).

Kiegészítésül kvantitatív analízissel is értékeltük a gyulladásos elváltozások mértékét; a gyulladásos göcök száma és a károsodott terület százalékos arányát számítottuk ki a digitális felvételek alapján.

3.2.6 **Myeloperoxidáz aktivitás meghatározása**

A módszer megegyezik a 3.1.6 pontban leírtakkal.

3.2.7 IL-1 β koncentráció meghatározása

Az eljárás teljes egészében megegyezik a 3.1.8 pontban leírt módszerrel.

3.2.8 Citokinek meghatározása „Cytokine Array Panel” segítségével

A citokin mérést a gyártó utasításai szerint történt. A fagyasztott minták tömegét meghatároztuk kiolvasztás után és azonnal 10 mg/ml fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF) proteáz inhibitor tartalmú PBS oldatba helyeztük őket és a fentebb leírtak szerint homogenizáltuk. Ezután Triton X-100-at adtunk minden egyes mintához 10 mg/ml koncentrációban és 5 percig 10000 g gyorsulással centrifugáltuk a sejttörmelékek eltávolítása céljából. A citokin koncentráció mérése előtt teljes fehérje koncentráció meghatározást végeztünk. Kemilumineszcens eljárással detektáltuk a befogott citokineket. Az egyes foltok fénykibocsátása arányos volt az oda befogott citokinek mennyiségével. A denzitometriás értékeket ImageJ freeware programmal értékeltük.

3.2.9 Statisztika

Az eredményeket átlag \pm SEM formájában fejeztük ki. Az adatok kiértékeléséhez kétutas ANOVA-t követő Bonferroni poszt-tesztet (DAI), páratlan t-próbát Welch korrekcióval (MPO aktivitás, citokin profil, IL-1 β koncentráció, kvantitatív szövettani eredmények) vagy Mann-Whitney U-próbát (szemikvantitatív szövettani pontszámok) használtunk. Statisztikai analízishez a GraphPad Prism 5.02 for Windows (GraphPad Software, USA) alkalmaztuk. 0,05-nél kisebb p értéket fogadtunk el szignifikánsnak.

3.2.10 Etika

Minden kísérleti beavatkozás a Magyar Országgyűlés 1998. évi XXVIII törvényének a figyelembevételével zajlott, valamint a 243/1988 kormányrendelet előírásainak megfelelően történt. A kísérletet etikailag ellenőrizte a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérleti Etikai Bizottsága az Állatkísérletek Etikai Kódexének megfelelően és BA 02/2000-11-2006 és BA 02/2000-2/2012 szám alatt engedélyezte azt.

4. Eredmények

4.1 Légúti gyulladásmodell

4.1.1 A tachykininek és az NK1 tachykinin receptor szerepének vizsgálata endotoxinnal kiváltott akut légúti gyulladásmodellben

4.1.1.1 Gyulladásos légúti hiperreaktivitás *Tac1*, *NK1* és kettős knockout egerekben

A P_{enh} alapértéke szignifikáns emelkedést mutatott 24 órával az LPS intranazális adagolását követően minden csoportban, a PBS-kezelt kontroll állatok csoportjához viszonyítva. Az emelkedő koncentrációban (5,5, 11, 22 mM) belélegzett muszkarin receptor agonista carbachol koncentráció-függő módon okozott bronchokonstriktiót. A vad típusú egerekben százalékos P_{enh} emelkedés jelentősen nagyobb mértékű volt az LPS-kezelt csoportban a nem gyulladt kontroll állatokhoz hasonlítva, amely így alátámasztja a gyulladásban kialakuló bronchiális hiperreaktivitást.

Tac1 és *Tac1/NK1* génhiányos egerekben az LPS-indukálta légúti hiperreaktivitás markánsan csökkent, különösen a magasabb carbachol koncentrációnál mért értékek. Az LPS-kiváltotta légúti hiperreaktivitás nem csökkent jelentős mértékben a *NK1* knockout csoportban.

4.1.1.2 Gyulladásos hisztopatológiai változások a *Tac1*, *NK1* és kettős knockout állatokban

Az LPS kezelés markáns peribronchiális/perivaszkuláris ödémát, a bronchusok körül neutrofil akkumulációt, az aktivált makrofágok/limfociták alveoláris térbe szűródését és a nyáktermelő kehelysejtek mérsékelt felszaporodását okozta a vad típusú állatcsoportban. A PBS-kezelt állatok tüdejében gyulladásos elváltozás nem volt megfigyelhető, csupán néhány makrofág jelent meg az alveoláris térben. Eközben a *Tac1* gén hiánya miatt SP-t és NKA-t szintetizálni nem képes egerekben az ödéma kiterjedése és az ödémás szövetstruktúrák, neutrofil akkumuláció és makrofág infiltráció jelentősen kisebb mértékű volt, kivéve a kehelysejt hiperpláziát. Emiatt a kompozit gyulladásos pontszámok is markánsan alacsonyabbak voltak. Ezzel szemben a *NK1* receptor hiánya nem befolyásolta ezeket a gyulladásos markereket. Meglepő módon alacsonyabb ödéma intenzitást és neutrofil akkumulációt nem tapasztaltunk a SP és NKA hiánya mellett, ha a *NK1* receptor is deletálva volt. A kontroll állatokban nem észleltünk semmilyen eltérést az egyes génhiányos állattörzsek között.

4.1.1.3 Myeloperoxidáz aktivitás a tüdő homogenizátumokban

Az LPS kezelés több mint kétszeres növekedést okozott a tüdő MPO aktivitásában 1 nappal az LPS intranazális beadását követően. Ez a gyulladt szövetben akkumulálódott neutrofilek és

makrofágok kvantitatív markere. A Tac1 génhányos állatokban jelentősen csökkent a szintje, míg a NK1 és kettős KO állatokban nem.

4.1.1.4 Gyulladásos citokinek koncentrációja a tüdőben.

A tüdőben mért IL-1 β és TNF- α szintje markánsan megnőtt 25 órával az LPS intranazális beadását követően a PBS-kezelt állatok tüdejében mért értékekhez viszonyítva. Az utóbbi citokin abszolút értékben 10-szer kisebb volt. A TNF- α az IL-1 β szintjével ellentétben szignifikánsan kisebb volt a Tac1 KO csoportban. Ezzel szemben a LPS-indukálta TNF- α és IL-1 β termelés megemelkedett a NK1 KO állatokban. A kettős KO állatok tüdőszövetében nem volt megfigyelhető változás.

4.1.2 A TRPV1, NK1 receptorok és a Tac1 géntermék tachykininek szerepének vizsgálata dohányfüst okozta krónikus légúti gyulladásban

4.1.2.1 Légúti reaktivitás változása

A negyedik héttől mérhető a reaktivitás emelkedése a Trpv1 KO állatok esetében szignifikánsan. Az NK1 receptor hiányos, Tac1 KO állatok légúti reaktivitása csak a 8. hétre mutat emelkedő tendenciát, de a különbség statisztikailag nem szignifikáns.

4.1.2.2 Szöveti elváltozások krónikus légúti gyulladásban

A metszeteken jól látható a dohányzás okozta krónikus gyulladás következtében megjelenő granulociták és makrofágok megjelenése a tüdőszövetben. A Trpv1 KO állatokban kifejezettebb gyulladási sejt felszaporodás figyelhető meg, különösen a második hónapban. A Tac1 KO állatokban kevésbé kifejezett gyulladási sejt felszaporodás és szöveti károsodás volt megfigyelhető a C57Bl/6 állatokhoz képest, míg az NK1 receptor hiányos állatokban hangsúlyosabb makrofág és ödémás elváltozás volt tapasztalható a vad típusú állatok csoportjához viszonyítva. Ez összhangban van a BALF analízisével kapott eredményekkel.

4.1.2.3 Gyulladásos sejtek változása és aránya a mosófolyadékban

Az első hónapban csak a vad törzsben volt szignifikáns emelkedés a nemdohányzó állatokhoz viszonyítva a granulociták számában, illetve a makrofágok számában volt statisztikailag lényeges különbség a Trpv1 KO állatokban a dohányos C57Bl/6 állatokhoz viszonyítva. A második hónap végén legnagyobb mértékben a Trpv1 KO csoportban emelkedett meg mindhárom gyulladási sejt típus mind az intakt, mind a dohányos vad típusú állatok csoportjához képest. A NK1 receptor hiánya kisebb mértékben, de szignifikánsan magasabb gyulladási sejt számot okozott a vad típusú dohányos csoporthoz viszonyítva.

4.1.2.4 Myeloperoxidáz aktivitás

Az első hónap végére minden dohányos csoportban szignifikánsan magasabb MPO aktivitás volt mérhető. A második hónap végére a Trpv1 KO és NK1 receptor hiányos állatok csoportjában volt szignifikánsan magasabb a myeloperoxidáz enzimaktivitás a vad típusú dohányos csoporthoz képest.

4.1.2.5 IL-1 β citokin termelés

Legnagyobb mértékben a Trpv1 KO állatokban emelkedett meg az IL-1 β citokin szintje 1 és 2 hónap dohányzás után. A Tac1 KO és NK1 KO állatokban nem volt megfigyelhető szignifikáns különbség.

4.2 Bélgyulladás modellben:

4.2.1 A TRPV1 receptorok szerepe a dextrán-szulfát kiváltotta colitis ulcerosa egérmodelljében

4.2.1.1 Disease Activity Index

A hetedik nap végére a megjelentek a colitis tipikus tünetei mind a 2%, mind az 5% DSS-ot fogyasztó állatcsoportban. A TRPV1 receptor genetikai hiánya szignifikánsan csökkentette a DAI pontszámot az 5. naptól kezdve a 2%-os csoportban. Ez a különbség nem volt megfigyelhető az 5%-os csoportban, ahol súlyos véres hasmenés alakult ki mind a vad típusú, mind a génhányos törzsben. 5% DSS itatása szignifikánsan magasabb DAI-t okozott a 2%-oshoz viszonyítva. A kompozit pontszámok emelkedéséhez legnagyobb mértékben a székletkonzisztencia változása és a megjelenő székletvér miatti nagyobb pontszámok járultak hozzá.

4.2.1.2 Szemikvantitatív szövettani elemzés és pontozás

A kompozit gyulladási pontszámok minden DSS-ot fogyasztó csoportban magasabbak voltak a csapvizet fogyasztó csoporthoz viszonyítva, amely utóbbiaknál nem volt felfedezhető gyulladási elváltozás. 5%-os DSS kezelés jelentősen nagyobb szövetkárosodást okozott a 2%-os DSS kezeléssel szemben. A TRPV1 receptorok hiánya csökkentette a szövettani elváltozások mértékét; általános tendencia volt megfigyelhető az enyhébb gyulladási jelekre nézve, ez statisztikailag is szignifikáns volt a disztális bélszakaszokban. A TRPV1 receptorok hiánya az 5%-os DSS-kezelt csoportban nem csökkentette, hanem még fokozta is a szövettani paraméterek romlását.

4.2.1.3 Myeloperoxidáz aktivitás a Trpv1 KO és vad típusú egértörzsben

Az orális DSS kezelés 7 nap után mind a 2% és 5%-os csoportban növelte az MPO aktivitást mindhárom colon szegmentumban a csapvizet fogyasztó kontroll állatok csoportjához viszonyítva. A 2%-os DSS okozta MPO aktivitás-emelkedés szignifikánsan magasabb volt a C57Bl/6 állatok összes mintájában a Trpv1 KO állatokhoz hasonlítva. Bár az 5% DSS fogyasztása is jelentősen megemelte az MPO aktivitást a csapvizet fogyasztó kontroll csoporthoz képest, szignifikáns különbség nem volt a vad típusú és a génhiányos állattörzsek között.

4.2.1.4 IL-1 β termelés a Trpv1 KO és vad típusú állatokban

A 2% DSS kezelés okozta IL-1 β termelés csak a disztális colon szegmentumban volt értékelhető, a citokin termelés a többi bél szegmentumban hasonló volt az intakt állatokban mért citokin szinthez. Ez a mérsékelt, nem-szignifikáns IL-1 β emelkedés hasonló volt a Trpv1 KO és vad típusú állatokban is. Ezzel ellentétben az 5%-os DSS kezelés jelentősen csökkenő IL-1 β szintet okozott mindkét csoportban, a mért szintek elmaradtak az intakt állatokban mért szintektől.

4.2.2 A neurokinin 1 receptor és szelektív receptor antagonist (netupitant) és tachykinin rendszer szerepe a dextrán-szulfát kiváltotta bélgyulladás modellben

4.2.2.1 Receptor expresszió

A receptor expressziós vizsgálat eredménye szerint a Tac1 gén (SP-t és NKA-t kódolja) kifejeződött mind az intakt, mind a DSS-kezelt egerek disztális colonjában. A Tac3 és Tac4 gének (NKB és HK-1 íródik át róluk) nem voltak detektálhatóak. A gyulladás nem befolyásolta ezt az expressziós mintázatot. Ezzel ellentétben a Tacr1 gén, amely a NK1 receptort kódolja, szignifikánsan upregulálódott 7 napos DSS-kezelés hatására. Az intakt bélszakaszban nem tudtuk kimutatni a Tacr2 és Tacr3 gének expresszióját (NK2 és NK3 receptorokat kódolják), de DSS kezelés hatására minimális mértékben emelkedett az expressziójuk.

4.2.2.2 Disease Activity Index

A DAI értékét naponta meghatároztuk a testtömeg, széklet-konzisztencia és székletvértartalom alapján. Ez az érték a 6. naptól kezdve jelentősen kisebb volt a NK1 receptor hiányos illetve a receptor antagonist netupitantal kezelt (6 mg/kg i.p.) állatokban. A netupitant kezelt NK1 receptor hiányos állatok hasonló DAI értékeket mutattak, mint a vivőanyag-kezelt receptor-hiányos állatok.

4.2.2.3 Szöveti analízis

A nem gyulladt bélszövet szövettani képéhez (intakt kripták és normál nyálkahártya epithel réteg viszonyítva a 2% DSS fogyasztása jellegzetes gyulladást és szövetkárosodást okozott a netupitanttal nem kezelt C57Bl/6 csoportban. Szignifikáns mukózális és szubmukózális neutrofil infiltráció, kripták eltűnése és a mukózális struktúra dezintegrációja volt megfigyelhető. A súlyossága és kiterjedtsége ezeknek a karakterisztikus elváltozásoknak jelentősen csökkent mind NK1 receptor hiányában, mind a NK1 receptor antagonistá netupitant napi adagolása hatására. A NK1 receptor hiányos állatokban a netupitant kezelés nem befolyásolta a gyulladás súlyosságát a vivőanyag-kezelt csoporthoz képest.

4.2.2.4 Myeloperoxidáz enzim aktivitás

A DSS kezelés hozzávetőleg kétszeresére emelte a bélhomogenizátum MPO aktivitását a megfelelő, vizet fogyasztó vad típusú és NK1 receptor hiányos állatok intakt mintájához viszonyítva. Ezt az emelkedést szignifikánsan csökkentette a naponta i.p. adagolt 6 mg/kg dózisú netupitant. Meglepő módon a netupitant kezelés csökkentette az MPO aktivitást a DSS-kezelt NK1 receptor hiányos állatokban is a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoporthoz viszonyítva hasonlóan, mint ahogy a vad típusú csoportban tapasztaltuk.

4.2.2.5 Egér gyulladási citokin chip (cytokine array panel)

A 40 vizsgált citokin közül 11 volt az, amely szignifikáns emelkedést mutatott a DSS kezelés hatására a vad típusú egerekben az intakt kontroll állatokhoz viszonyítva. Ezzel ellentétben a NK1 receptor hiányos csoportban a BLC, sICAM-1, IFN- γ , IL-1 α , IL-16 és JE nem változott szignifikánsan, míg az IL-1ra, IP-10, MIG és TIMP hasonlóan magas volt, mint a vad típusú állatokban. Az intakt állatokban nem tapasztaltunk eltérést a fenti citokinek expressziójában. A netupitant kezelés jelentős mértékben csökkentette a DSS-indukálta megemelkedett BLC, IFN- γ , IL-13 és IL-16 szinteket a vivőanyaggal kezelt csoporthoz viszonyítva. Ezek a változások hasonlóak voltak, mint amelyeket a NK1 receptor-hiányos állatokban tapasztaltunk.

5. Új eredmények összefoglalása, következtetések

1. A Tac 1 kódolt tachykininek (SP és NKA) hiányában – azonban a NK1 receptor hiánya esetén nem – csökken az endotoxinnal kiváltott bronchiális hiperreaktivitás, MPO termelés és gyulladáshozó citokintermelődés. E peptidek fontos szerepet játszanak ebben az akut tüdőgyulladás modellben, de nem a NK1 receptorok aktivációján keresztül.
2. A dohányfüsttel kiváltott légúti gyulladásmodellben a TRPV1 receptor hiányában minden gyulladáshozó paraméter súlyosabb, amely arra utal, hogy ezen ioncsatorna aktivációja egyértelműen protektív hatásokat közvetít. A SP/NKA és a NK1 receptor hiányában fokozott MPO aktivitás volt megfigyelhető, amelyet a szövettani képen és a BALF analízis során tapasztalt nagyobb makrofág infiltráció magyarázhat. Ezzel szemben az IL-1 β termelés nem változott. Meglepő módon, e krónikus modellben az akut tüdőgyulladással ellentétben a Tac1-kódolt tachykininek bizonyos gyulladáshozó paramétereket gátolnak az NK1 receptor aktivációján keresztül.
3. Colitis kísérleteinkben az ideális DSS koncentráció 2%, amelynek felhasználásával jól modellezhető a vastagbélgyulladás egerekben. Az ennél magasabb, 5% DSS koncentráció már citotoxikusnak bizonyult, a kialakuló szöveti destrukció alkalmatlanná teszi a betegségmodell létrehozására. A TRPV1 receptorok proinflammatorikus szerepet játszanak a DSS kiváltotta egér colitis ulcerosa modelljében, mivel Trpv1 génhányos állatokban szignifikánsan kisebb mérvű volt a kialakuló gyulladás fiziológiai, szövettani és immunológiai szempontokat vizsgálva.
4. A DSS indukálta vastagbélgyulladás modellben a Tac1 gén expressziója nem fokozódik, azonban a NK1 receptoroké növekedzik. A receptor antagonizmusa, illetve a receptor hiányos állatok esetén szignifikánsan kisebb gyulladáshozó elváltozások voltak megfigyelhetőek funkcionális, szövettani és molekuláris szinten is. A NK1 receptor komplexen szabályozza a gyulladáshozó folyamatokat a bélben, mert hiánya esetén magasabb MPO aktivitás volt megfigyelhető. Citokin panelben nyert adataink arra utalnak, hogy az aktiválódó NK1 receptorok fokozzák a B-sejtek migrációját, a sICAM-1 elősegíti a különböző immunsejtek kitapadását és transzmigrációját. A NK1 receptorok gátlása csökkenti a BLC, IFN- γ , IL-13, IL-16 citokinek termelését, ezért ezek további farmakológiai kutatások ígéretes célpontjai lehetnek.

Köszönetnyilvánítás

Legelőször szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Helyes Zsuzsannának a rengeteg segítségért és iránymutatásért. Köszönöm Pintér Erikának a Neurofarmakológia PhD program vezetőjének, hogy részt vehettem a képzésben. Sok hasznos tanáccsal segítette a dolgozat elkészültét. Külön köszönet illeti Szolcsányi Jánost az iskolateremtő koncepciójáért. Szeretném megköszönni Sándor Katának, Perkecz Anikónak, Elekes Krisztiánnak, Bagoly Teréznek, Kemény Ágnesnek, Markovics Adriennek, Kun Józsefnek a kísérletek során nyújtott nélkülözhetetlen elméleti és gyakorlati segítségüket. Hálával tartozom Bölcskei Katának, aki segített, hogy a kéziratban minél kevesebb hiba maradjon. Köszönöm Ömböli Gyulánának, Zádor Csillának, Zöldhegyi Máriának precíz asszisztensi munkájukat. Közreműködésük nélkülözhetetlennek bizonyult az állatkísérletek elvégzésében. Továbbá köszönet jár a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden tagjának, akik bármilyen módon segítettek a kutatásban. Munkám során a Társadalmi Megújulás Operatív Program (TÁMOP) 4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0002 és 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0024 számú projektjének támogatását élveztem, amelyet ezúton szeretnék megköszönni.

És végül, de nem utolsósorban szüleimnek, akik végig támogattak, bátorítottak és segítettek.

Irodalom

- Anavi-Goffer, S. & Coutts, A.A., 2003. Cellular distribution of vanilloid VR1 receptor immunoreactivity in the guinea-pig myenteric plexus. *European Journal of Pharmacology*, 458, pp.61–71.
- Barthó, L. et al., 2004. Effects of capsaicin on visceral smooth muscle: a valuable tool for sensory neurotransmitter identification. *European Journal of Pharmacology*, 500(500), pp.143–157.
- Bhave, G. et al., 2003. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), pp.12480–5.
- Bielow, M. et al., 1990. Cloning and expression of a rat neuromedin K receptor cDNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(2), pp.623–8.
- Caterina, M.J. et al., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(389), pp.816–824.
- Caterina, M.J. & Julius, D., 2001. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual Review of Neuroscience*, 24(24), pp.487–517.
- Chan, C.L., Facer, P. & Davis, J.B. et al, 2003. Sensory fibres expressing capsaicin receptor TRPV1 in patients with rectal hypersensitivity and faecal urgency. *Lancet*, 361(361), pp.385–391.
- Chu, C.J. et al., 2003. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(16), pp.13633–13639.
- Churg, A., Cosio, M. & Wright, J.L., 2008. Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(4), pp.L612–31.
- Clapham, D.E. et al., 2003. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacological Reviews*, 55(55), pp.591–596.
- Cui, M. et al., 2006. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(37), pp.9385–93.
- Dai, Y. et al., 2004. Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(18), pp.4293–9.
- Dedov, V.N. et al., 2002. Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. *British Journal of Pharmacology*, 137(6), pp.793–798.
- Elekes, K. et al., 2007. Role of capsaicin-sensitive afferents and sensory neuropeptides in endotoxin-induced airway inflammation and consequent bronchial hyperreactivity in the mouse. *Regulatory Peptides*, 141(1-3), pp.44–54.
- Engel, M.A. et al., 2012. The proximodistal aggravation of colitis depends on substance P released from TRPV1-expressing sensory neurons. *Journal of Gastroenterology*, 47(3), pp.256–65.
- De Felipe, C. et al., 1998. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature*, 392(6674), pp.394–397.
- Frossard, N. & Advenier, C., 1991. Tachykinin receptors and the airways. *Life Sciences*, 49(26), pp.1941–1953.
- Gaál, C. ed., 2012. *Sebészeti, Medicina Kiadó*.
- Grant, A., 2002. Leukocytes and neurogenic inflammation. *Inflammopharmacology*, 9, pp.403–420.
- Groneberg, D.A. et al., 2006. Tachykinins in the respiratory tract. *Current Drug Targets*, 7, pp.1005–1010.
- Gross, K.J. & Pothoulakis, C., 2007. Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 13(13), pp.918–932.
- Helyes, Zs. et al., 2004. Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis and Rheumatism*, 50(5), pp.1677–85.
- Helyes, Zs. & Hajna, Zs., 2012. Endotoxin-Induced Airway Inflammation and Asthma Models. In A. Szallasi & T. Bíró, eds. *TRP Channels in Drug Discovery*. pp. 301–342.

- Holzer, P. & Barthó, L., 1996. Sensory neurons in the intestine. In P. Geppetti & P. Holzer, eds. *Neurogenic Inflammation*. Boca Raton: CRC Press.
- Holzer, P. & Maggi, C., 1998. Dissociation of dorsal root ganglion neurons into afferent and efferent-like neurons. *Neuroscience*, 86(86), pp.389–398.
- Huang, S.M. et al., 2002. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), pp.8400–5.
- Hwang, S.W. et al., 2000. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), pp.6155–6160.
- Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A. & Szolcsányi, J., 1967. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 31(31), pp.138–150.
- Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A. & Szolcsányi, J., 1968. The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 33(33), pp.32–41.
- Kage, R. et al., 1988. Neuropeptide-gamma: a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from gamma-preprotachykinin. *Journal of Neurochemistry*, 50(5), pp.1412–7.
- Kihara, N. et al., 2003. Vanilloid receptor-1 containing primary sensory neurones mediate dextran sulphate sodium induced colitis in rats. *Gut*, 52(5), pp.713–719.
- Kimura S., 1983. Novel neuropeptides, neurokinins A and B, isolated from porcine spinal cord. *Proceedings of the Japan Academy*, 5, pp.101–104.
- Konturek, S.J. et al., 1981. Effect of substance P and its C-terminal hexapeptide on gastric and pancreatic secretion in the dog. *The American Journal of Physiology*, 241(1), pp.G74–81.
- Laird, J.M. et al., 2000. Deficits in visceral pain and hyperalgesia of mice with a disruption of the tachykinin NK1 receptor gene. *Neuroscience*, 98(2), pp.345–352.
- Lembeck, F. & Starke, K., 1968. Substance P and salivary secretion. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 259(5), pp.375–385.
- Liu, L. et al., 2000. Different responses to repeated applications of zingerone in behavioral studies, recordings from intact and cultured TG neurons, and from VR1 receptors. *Physiology & Behavior*, 69(1-2), pp.177–186.
- Maggi, C., 1995. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Progress in Neurobiology*, 45(1), pp.1–98.
- Masu, Y. et al., 1987. cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. *Nature*, 329(6142), pp.836–8.
- Mir Subías, A. et al., 2013. [Multiple sclerosis as an adverse effect of anti-tumor necrosis factor agents: an infrequent but important complication of infliximab in Crohn's disease]. *Gastroenterología y Hepatología*, 36(2), pp.81–5.
- Nawa, H. et al., 1984. Substance K: a novel mammalian tachykinin that differs from substance P in its pharmacological profile. *Life Sciences*, 34(12), pp.1153–60.
- Page, N.M., 2006. Characterization of the gene structures, precursor processing and pharmacology of the endokinin peptides. *Vascular Pharmacology*, 45(4), pp.200–208.
- Page, N.M., 2004. Hemokinins and endokinins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(13), pp.1652–63.
- Page, N.M., 2005. New challenges in the study of the mammalian tachykinins. *Peptides*, 26(8), pp.1356–1368.
- Patacchini, R., Maggi, C. & Meli, A., 1990. Capsaicin-like activity of some natural pungent substances on peripheral endings of visceral primary afferents. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 342(1), pp.72–77.
- Patterson, L.M. et al., 2003. Vanilloid receptor (VR1) expression in vagal afferent neurons innervating the gastrointestinal tract. *Cell and Tissue Research*, 311(311), pp.277–287.

- De Petrocellis, L. et al., 2001. The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Neurochemistry*, 77(6), pp.1660–3.
- Pintér, E. & Szolcsányi, J., 1996. Systemic anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of the dorsal roots in the rat. *Neuroscience Letters*, 212, pp.33–36.
- Piusińska-Macoch, R., 2013. [Neurological complications during treatment of the tumor necrosis alpha inhibitors]. *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 34(203), pp.293–7.
- Poonyachoti, S., Kulkarni-Narla, A. & Brown, D.R., 2002. Chemical coding of neurons expressing delta- and kappa-opioid receptor and type I vanilloid receptor immunoreactivities in the porcine ileum. *Cell and Tissue Research*, 307(307), pp.23–33.
- Premkumar, L.S. et al., 2004. Enhancement of potency and efficacy of NADA by PKC-mediated phosphorylation of vanilloid receptor. *Journal of Neurophysiology*, 91(3), pp.1442–9.
- Rathee, P.K. et al., 2002. PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(11), pp.4740–5.
- Regoli, D., Boudon, A. & Fauchère, J.L., 1994. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacological Reviews*, 46(4), pp.551–599.
- Shapiro, S.D., 2000. Animal models for COPD. *Chest*, 117(5 Suppl 1), p.223S–7S.
- Stewart, J.P.J. et al., 2008. Induction of tachykinin production in airway epithelia in response to viral infection. *PLoS one*, 3(3), p.e1673.
- De Swert, K.O. & Joos, G.F., 2006. Extending the understanding of sensory neuropeptides. *European Journal of Pharmacology*, 533(1-3), pp.171–181.
- Szallasi, A. & Blumberg, P.M., 1989. Neurogenic component of phorbol ester-induced mouse skin inflammation. *Cancer Research*, 49(21), pp.6052–6057.
- Szallasi, A. & Blumberg, P.M., 1990. Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. *Life Sciences*, 7, pp.1399–1408.
- Szitter, I. et al., 2010. The role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptors in dextran sulfate-induced colitis in mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, 42(1), pp.80–8.
- Szolcsányi, J., 1984. Capsaicin-sensitive chemoceptive neural system with dual sensory-efferent function. In L. A. Chahl, J. Szolcsányi, & F. Lembeck, eds. *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation*. Budapest: Akadémiai Kiadó, pp. 27–55.
- Szolcsányi, J., 1996. Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. *Progress in Brain Research*, 113, pp.343–359.
- Szolcsányi, J., Helyes, Z., et al., 1998. Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *British Journal of Pharmacology*, 125, pp.936–942.
- Szolcsányi, J., Pintér, E., et al., 1998. Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *British Journal of Pharmacology*, 125, pp.916–922.
- Szolcsányi, J., 1983. Tetrodotoxin-resistant non-cholinergic neurogenic contraction evoked by capsaicinoids and piperine on guinea-pig trachea. *Neuroscience Letters*, 42, pp.83–88.
- Tatemoto, K. et al., 1985. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 128(2), pp.947–53.
- Tominaga, M. et al., 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21(3), pp.531–543.
- Trevisani, M. et al., 2002. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nature Neuroscience*, 5(6), pp.546–551.
- Ward, S.M. et al., 2003. Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. *Journal of Comparative Neurology*, 465, pp.121–135.
- Wood, J.N. et al., 1988. Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 8(9), pp.3208–20.

- Yamamoto, H. et al., 1996. Abnormal neuropeptide concentration in rectal mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology*, 31(4), pp.525–532.
- Yokota, Y. et al., 1989. Molecular Characterization of a Functional cDNA for Rat Substance P Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(30), pp.17649–17652.
- Zeldin, D.C. et al., 2001. Airway inflammation and responsiveness in prostaglandin H synthase-deficient mice exposed to bacterial lipopolysaccharide. *American Journal of Respiratory Cellular and Molecular Biology*, 25(4), pp.457–465.
- Zhang, Y. et al., 2000. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nature Immunology*, 1(5), pp.392–7.
- Zimmer, A.M. et al., 1998. Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the tachykinin 1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), pp.2630–2635.

Saját közlemények listája

A dolgozat alapját képező közlemények

Szitter I, Pintér E, Perkecz A, Kemény Á, Kun J, Pietra C, Quinn J P, Zimmer A, Berger A, Paige C J, Helyes Zs „Role of neurokinin 1 receptors in dextran sulfate-induced colitis: studies with gene-deleted mice and the selective receptor antagonist netupitant”. *Inflammation Research* (2014) (IF: 2,143 (2013))

Szitter I, Pozsgai G, Sándor K, Elekes K, Kemény Á, Perkecz A, Szolcsányi J, Helyes Zs, Pintér E “The role of transient receptor potential vanilloid 1 (Trpv1) receptors in dextran sulfate-induced colitis in mice”. *Journal Of Molecular Neuroscience* 42:(1) pp. 80-88. (2010) (IF: 2,922, FC: 12)

Helyes Zs, Elekes K, Sándor K, **Szitter I**, Kereskai L, Pintér E, Kemény A, Szolcsányi J, McLaughlin L, Vasiliou S, Kipar A, Zimmer A, Hunt S P, Stewart J P, Quinn J P “Involvement of preprotachykinin A gene-encoded peptides and the neurokinin 1 receptor in endotoxin-induced murine airway inflammation”. *Neuropeptides* 44:(5) pp. 399-406. (2010) (IF: 1,917 FC: 7)

Az értekezés alapját képező publikációk kumulatív impakt faktora: 6,982

Független citációk száma: 19

Értekezés alapját képező konferencia prezentációk

Szitter I, Pintér E, Perkecz A, Kemény Á, Pietra C, Quinn J P, Zimmer A, Berger A, Helyes Zs „Effect of neurokinin 1 (NK1) receptor antagonism and the differential role of NK1 receptors in dextran-sulfate (DSS) induced colitis in mice” In: Proceedings of the British Pharmacological Society. Konferencia helye, ideje: Granada, Spanyolország, 2012.07.17-2012.07.20. Paper C049 (2012) (poszter)

Szitter I, Pintér E, Kemény Á, Pietra C, Quinn J, Zimmer A, Berger A, Helyes Zs “Neurokinin 1 (NK1) receptor antagonizmus hatása és a NK1 receptorok szerepe a dextranszulfáttal (DSS) kiváltott colitisben egérmodellben” p. 189. A Magyar Élettani Társaság a Magyar Anatómusok Társasága a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa Absztraktfüzet, Debrecen, Magyarország, 2012.06.10-2012.06.13 (2012) (poszter)

Szitter I, Pintér E, Perkecz A, Berger J A, Paige C J, Szolcsányi J, Helyes Zs „Role of the tachykinin system in dextran sulphate-induced colitis in mice” In: Journal of Molecular Neuroscience. Konferencia helye, ideje: Boston; Pécs, Amerikai Egyesült Államok, 2011.05.22-2011.05.25. p. 199. (2011) (poszter)

Szitter I, Pintér E, Pozsgai G, Sándor K, Kemény Á, Perkecz A, Elekes K, Helyes Zs, Szolcsányi J, Quinn J “Investigation of the role of TRPV1 capsaicin receptors and tachykinins in dextrane-sulphate induced mouse colitis model” Tue 271. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology (WorldPharma2010), Koppenhága, Dánia, 2010.07.17-2010.07.23. (2010) (poszter)

Szitter I, Pintér E, Sándor K, Bánvölgyi A, Elekes K, Szolcsányi J, Quinn J, Helyes Zs “Investigation of the role of TRPV1 capsaicin receptors and tachykinins in dextrane-sulphate induced mouse colitis model” *Acta Physiologica Hungarica* 97:(1) pp. 139-140. (2010) (IF: 1,226) (poszter)

Szitter I, Pintér E, Markovics A, Perkecz A, John Q, Szolcsányi J, Helyes Zs „Tachykininek szerepének vizsgálata génihiányos egerekkel dextrán-szulfáttal kiváltott bélgyulladás modellben” In: A Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXXIV. Vándorgyűlése és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság (MFT) II. Közös Tudományos Konferenciája. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország, 2010.06.16-2010.06.18. Szeged: Szegedi Tudományegyetem, Paper P139. (2010) (poszter)

Szitter I, Pintér E, Sándor K, Bánvölgyi Á, Elekes K, Szolcsányi J, John Q, Helyes Zs “A TRPV1 kapszaicin receptor és a tachykininek szerepének vizsgálata dextrán-szulfáttal kiváltott bélgyulladás modellben” p. 51. Biológus Doktoranduszok Konferenciája, Pécs, Magyarország, 2009.11.12-2009.11.13. (2009) (előadás)

Pintér E, **Szitter I**, Sándor K, Bánvölgyi A, Elekes K, Szolcsányi J, Quinn J P, Helyes Zs “Investigation of the role of TRPV1 capsaicin receptors and tachykinins in dextran sulfate- induced mouse colitis model” *Neuropeptides* 43:(5) pp. 427-428. (2009) (IF: 2,036) (poszter)

Egyéb publikációk

Sütő B, **Szitter I**, Bagoly T, Pintér E, Szolcsányi J, Loibl Cs, Námeth T, Tánczos K, Molnár T, Leiner T, Várnai B, Bardonicsek Zs, Helyes Zs “Plasma somatostatin-like immunoreactivity increases in the plasma of septic patients and rats with systemic inflammatory reaction: experimental evidence for its sensory origin and protective role”. *Peptides* 54: pp. 49-57. (2014) (IF: 2,614 (2013))

Egyéb konferencia előadások, poszterbemutatók

Szitter I, Kiss T, Perkecz A, Helyes Zs „Lung morphometry: quantitative assessment of tissue changes in mice exposed to chronic whole body cigarette smoke” In: Bruker User Meeting 2013. Konferencia helye, ideje: Hasselt, Belgium, 2013.04.16-2013.04.18. pp. 93-95. (2013) (előadás)

Kun J, Helyes Zs, **Szitter I**, Gódi Sz, Szabó I, Kemény Á, Pohóczky K, Perkecz A, Pintér E “A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) és vanilloid 1 (TRPV1) receptor mRNS expresszió gyulladással járó bélbetegségben (IBD) és dextrán-szulfát (DSS) által indukált egér colitis modellben” p. A-0184. A Magyar Élettani, Farmakológiai és Mikrocirkulációs Társaságok 2013. évi közös Tudományos Kongresszusa, Budapest, Magyarország, 2013.06.05-2013.06.08. (2013) (poszter)

Szitter I, Barbara K, Kiss T, Perkecz A, Feller D, Helyes Zs “Tüdő morfometria: dohányfüst okozta szöveti elváltozások kvantitatív követése mikroCT módszerrel C57Bl/6 és galanin 3 receptor (Gal3r) deficiens egerekben” p. A-0191. A Magyar Élettani, Farmakológiai és Mikrocirkulációs Társaságok 2013. évi közös Tudományos Kongresszusa, Budapest, Magyarország, 2013.06.05-2013.06.08. (2013) (poszter)

Kemény Á, Boros M, Hajna Zs, **Szitter I**, Sétáló Gy, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs “Complex cytokine profiling of tissues obtained from chronic mouse inflammation models” p. P300. 6th European Congress of Pharmacology (EPHAR2012), Granada, Spanyolország, 2012.07.17-2012.07.20. (2012) (poszter)

Helyes Zs, **Szitter I**, Hajna Zs, Elekes K, Kemény Á, Kereskai L, Quinn J P, Sándor K, Pintér E, Szolcsányi J
“Role of the TRPV1 ion channel and sensory neuropeptides in cigarette smoke-induced chronic airway inflammation model of the mouse” BPS Focused Meeting on Neuropeptides, London, Anglia, 2012.06.07-2012.06.09. (2012) (előadás)

Kun J, Pintér E, **Szitter I**, Szabó I, Gódi Sz, Perkecz A, Helyes Zs “A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) receptor expresszióváltozása gyulladásoos bélbetegségben (IBD) és dextrán-szulfát által indukált egér colitis modellben” p. 135. A Magyar Élettani Társaság a Magyar Anatómusok Társasága a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa Absztraktfüzet, Debrecen, Magyarország, 2012.06.10-2012.06.13. (2012) (poszter)

Kun J, Pintér E, Gódi S, Szabó I, **Szitter I**, Perkecz A, Helyes Zs “Expression change of the transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor in inflammatory bowel disease (IBD) and dextran sulfate-induced colitis in mice” p. P302. Proceedings of the British Pharmacological Society, Granada, Spanyolország, 2012.07.17-2012.07.20. (2012) (poszter)

Elekes K, Sándor K, Szőke E, Tóth D, Markovics A, **Szitter I**, Jakab L, Szakacs B, Kereskai L, Szolcsányi J, Molnár T, Helyes Zs “Peripheral effect of the marijuana smoke in the lung of mice” Mon 283. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology (WorldPharma2010), Koppenhága, Dánia, 2010.07.17-2010.07.23. (2010) (poszter)

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: 12,858

Összes független citációk száma: 19