

**SZOMATOSZTATIN 4 RECEPTOR ÉS KAPSZAICIN-
ÉRZÉKENY NEURONOK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA
STRESSZ ÉS FÁJDALOM EGÉRMODELLJEIBEN**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

dr. Scheich Bálint

Gyógyszertudományok Doktori Iskola – Neurofarmakológia Program

Programvezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezetők: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna és Dr. Gaszner Balázs

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet



Pécs

2016.

BEVEZETÉS

1. A stresszhez kapcsolható betegségek

A stressz a szervezet különböző (pszichológiai, fizikai, biológiai, stb.) igénybevételekre adott nem-specifikus válasza (Selye, 1936), amely lehet élettani, adaptív jelenség, azonban a hosszan tartó, krónikus stressz kimerüléshez, kóros folyamatok beindulásához vezet. A stresszhez kapcsolható pszichiátriai betegségek, mint a depresszió és a szorongásos kórképek jelentősen rontják az életminőséget és mind egyéni, mint társadalmi szinten jelentős problémát jelentenek. Bár a klinikai vizsgálatok és a stressz állatmodelljei számos adatot szolgáltatottak a kóros állapotok mechanizmusára vonatkozólag, a pontos neurobiológiai folyamatok még mindig nagyrészt ismeretlenek (Krishnan és Nestler, 2008). A napjainkban használatos szorongáscsökkentő és antidepresszáns szerek a GABA és monoamin rendszereken keresztül fejtik ki hatásukat, azonban mivel hatékonyságuk gyakran nem kielégítő, az új gyógyszercélpontok azonosítása alapvető jelentőségű. Ebből a szempontból az agyi neuropeptid-rendszerek igen ígéretesek (Kormos és Gaszner, 2013).

A stressz a fájdalomérző (nociceptív) rendszerekre kifejtett hatása révén fontos szerepet játszik a szintén nagy klinikai problémát jelentő krónikus fájdalommal járó betegségekben is. Egyes kórképekben (pl. neuropátiák, reumatoid arthritisz) a krónikus stressz súlyosbítja a tüneteket és a lefolyást, míg másokban, mint például a fibromialgia (FM), fontos etiológiai tényezőnek tekinthető (Diatchenko és mtsai., 2013). A stressz és a nocicepció összefüggéseit tekintve eddig elsősorban a központi idegrendszeri fájdalom-feldolgozás zavarának, a centrális szenzitizációnak a jelentőségét vizsgálták (Yunus, 2008). Újabb klinikai vizsgálatokban azonban FM-ben is kimutattak perifériás idegrendszeri zavarokat, paradox módon a nociceptív vékonyrostok funkcionális és morfológiai deficitjét találták (Üçeyler és mtsai., 2013). A különböző specifikus perifériás nociceptor populációk jelentősége az utóbbi időben egyre nyilvánvalóbbá válik a krónikus fájdalom szempontjából (Minett és mtsai., 2014). A fentiek alapján ez a megközelítés a stressz- és nociceptív rendszerek interakciói szempontjából is érdekes lehet.

2. A szomatosztatin és receptorai

A szomatosztatin mind a perifériás, mind a központi idegrendszerben megtalálható ciklikus neuropeptid, amely számos élettani és kóros folyamat szabályozásában részt vesz, például különböző hormonok felszabadulását gátolja, ill. fájdalomcsillapító hatást fejt ki. Az utóbbi időben egyre nagyobb figyelem irányul a szomatosztatin központi idegrendszeri jelentőségére.

Számos agyi struktúrában a GABA-erg neuronok egyik populációja expresszája a peptidet, amely gátló neuromodulátorként élettani agyi funkciókat (pl. alvás, motoros aktivitás, fájdalom, memória) és kóros (pl. neurodegeneratív betegségek) folyamatokat is befolyásol (Martel és mtsai., 2012). Számos klinikai és kísérletes adat utal arra, hogy a szomatosztatin az érzelmi szabályozásban és a hangulatzavarok kialakulásában is részt vesz (Guilloux és mtsai., 2012). Akut stressz-szituációkban a peptid szorongáscsökkentő és antidepresszáns-szerű hatásokat fejt ki (Engin és mtsai., 2008), a krónikus stressz állatmodelljeiben pedig gátolja a maladaptív funkcionális, endokrin és neurobiológiai változásokat (Lin és Sibille, 2013).

A szomatosztatinnak öt, G-proteinhez kapcsolt heptahelikális receptorát (sst₁-sst₅) írták le, amelyek gyógyszerfejlesztési szempontból különösen érdekesek és központi idegrendszeri jelentőségükre nézve is vannak adatok. Az agyban legnagyobb mennyiségben expresszáldó sst₂ receptor „antiepileptikus” hatását, ill. a szenzoros és motoros funkciók és a memória szabályozásában játszott szerepét mutatták ki. Az sst₂ jelentős szerepet játszik a stressz-szabályozásban (Viollet és mtsai., 2000), ill. a szomatosztatin szorongáscsökkentő és antidepresszáns-szerű hatásainak közvetítésében is (Engin és Treit, 2009). A második legnagyobb mennyiségben jelenlévő sst₄ receptor jelentőségét eddig elsősorban a memória szabályozásában, ill. az Alzheimer-kór egyik állatmodelljében lejátszódó neurodegeneratív folyamatokban vizsgálták (Sandoval és mtsai., 2011). Az sst₄ számos, a stressz-regulációban és a hangulatzavarok kialakulásában szerepet játszó agyterületen (pl. hippocampus, amygdala) megtalálható (Schreff és mtsai., 2000), e folyamatokban játszott szerepére vonatkozólag azonban nem áll rendelkezésre adat.

3. A kapszaicin-érzékeny neuronok

Az erős paprika csípős anyagának, a kapszaicinnek a receptorát, a tranziens receptor potenciál vanilloid 1-et (TRPV1) expresszálo perifériás szenzoros neuronok a nocicepcióban és a fájdalom szabályozásában egyaránt alapvető szerepet játszanak. A TRPV1-et többféle fájdalmas inger, így fizikai (pl. hőinger), kémiai (pl. alacsony pH), stb. hatások képesek aktiválni, vagyis a kapszaicin-érzékeny neuronok polimodális nociceptorok. A fájdalmas ingerek érzékelése és központi idegrendszer felé történő továbbítása e neuronok klasszikus afferens funkciója. Emellett azonban a kapszaicin-érzékeny peptiderg afferensek aktiválódásakor belőlük fájdalom- és gyulladáskeltő neuropeptidek (pl. tachikininek) is felszabadulnak, amelyek lokálisan ún. neurogén gyulladást váltanak ki (lokális efferens funkció). A gyulladáskeltő anyagok mellett az idegvégződésekből fájdalom- és gyulladáscsökkentő peptidek (pl. szomatosztatin, opioid peptidek) is felszabadulnak, amelyek

a véráramba kerülve az egész testben képesek hatásukat kifejteni (szisztémás efferens vagy „szenzokrin” funkció). Összességében a kapszaicin-érzékeny neuronok egyedülálló módon hármas funkcióval rendelkeznek, ami a fájdalom érzékelése mellett annak fokozását és csillapítását is magában foglalja (Pintér és mtsai., 2006).

A rendelkezésre álló adatok alapján egyértelmű, hogy a kapszaicin-érzékeny neuronok a fiziológiás és kóros nocicepcióban, így a krónikus fájdalomban is alapvető jelentőségűek (Immke és Gavva, 2006). Figyelembe véve a stresszel összefüggésbe hozható krónikus fájdalomállapotokban, így FM-ben is kimutatható vékonyrost rendellenességeket (Üçeyler és mtsai., 2013) és azokat a kísérletes eredményeket, amelyek a krónikus stressz mediátorainak a perifériás TRPV1-expresszióra kifejtett hatását bizonyították (Hong és mtsai., 2011), a kapszaicin-érzékeny neuronok és a krónikus stressz interakcióinak vizsgálata értékes új adatokat szolgáltat, amelyek hozzájárulhatnak a krónikus fájdalom egyes aspektusainak megértéséhez.

CÉLKITŰZÉSEK

A stressz, mint kórélettani tényező, számos betegség kialakulásában és lefolyásában fontos szerepet játszik. Mind a stresszhez köthető pszichiátriai kórképek, mind a krónikus fájdalommal járó állapotok esetében igaz, hogy a pontos mechanizmusok nagyrészt ismeretlenek és a jelenleg rendelkezésre álló farmakoterápiás eszközök nem kielégítőek. Ezért az e folyamatokban jelentős molekulák felderítése és új gyógyszer-célpontok azonosítása igen fontos feladat.

Az itt bemutatott munkákban az sst₄ receptor és a kapszaicin-érzékeny neuronok stressz-folyamatokban játszott szerepét kívántuk vizsgálni. Célkitűzéseink a következők voltak:

- I. Az sst₄ receptor aktiváció hatásának vizsgálata akut stressz-szituációkban mutatott szorongásra és depresszió-szerű viselkedésre, valamint az akut stresszre adott neuronális válaszokra.
- II. Az sst₄ receptor szerepének vizsgálata a krónikus stresszre adott viselkedéses, endokrin és neuronális válaszokban.
- III. A kapszaicin-érzékeny neuronok szerepének vizsgálata krónikus stressz hatására létrejövő nociceptív, valamint a kapcsolódó viselkedéses, neuronális és perifériás immunológiai változásokban.

KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok

Az sst₄ aktiváció akut stressz-folyamatokban játszott szerepének felderítéséhez vad típusú (*Sstr4*^{+/+}) és *Sstr4* génhíányos (*Sstr4*^{-/-}) egereket (Helyes és mtsai., 2009), ill. az sst₄ agonista J-2156 hatásának vizsgálatához C57Bl/6J és CD1 egereket használtunk. Krónikus stressz-modelljeinkben az sst₄ receptor jelentőségét *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} állatokban, míg a kapszaicin-érzékeny neuronok szerepét CD1 egerekben vizsgáltuk.

Az állatokat a PTE-ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet Állatházában tenyésztettük és tartottuk, standard ketrecekben, 24-25 °C-on, 12-12 órás sötét-világos ciklusban, *ad libitum* ellátva normál rágcsáló táppal és vízzel.

2. Kísérleti elrendezések, csoportok

2.1. Az sst₄ receptor szerepének vizsgálata szorongásban és depresszió-szerű viselkedésben

Akut viselkedéstesztben az *Sstr4* gén-deléció és az sst₄ agonista J-2156 kezelés hatását vizsgáltuk. A törzskülönbségek esetleges szerepe miatt (Cryan és Mombereau, 2004), a J-2156 hatását C57Bl/6J és CD1 egerekben is vizsgáltuk. A következő csoportokat használtuk:

- *Sstr4*^{+/+} vs. *Sstr4*^{-/-} egerek (n=7-12),
- fiziológiás sóoldattal kezelt (NaCl) vs. J-2156-al kezelt C57Bl/6J egerek (n=6-13),
- NaCl vs. J-2156-al kezelt CD1 egerek (n=8-14).

A J-2156 *tail suspension* tesztben (TST) kifejtett hatásának háttérben álló mechanizmusokat Fos (akut neuronális aktivációs marker) immunhisztokémiával vizsgáltuk számos, a stresszhez köthető agyterületen. Ehhez a TST után 7-8, random módon kiválasztott CD1 egeret az NaCl-, ill. J-2156-oldattal kezelt csoportokból elaltattunk, majd paraformaldehid (PFA) oldattal perfundáltuk őket és agyukat coronalis szeletekre metszettük. Kontroll csoportokként TST-nek nem exponált NaCl-, ill. J-2156-oldattal kezelt CD1 egereket használtunk (n=6/csoport).

Az *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egerek között *forced swim* tesztben (FST) talált funkcionális különbség mechanizmusát szintén Fos immunhisztokémiával vizsgáltuk (n=5-6/csoport).

Az sst₄ receptor jelenlétét az eger agyban sst₄^{LacZ} immunhisztokémiával mutattuk ki, melynek alapja az *Sstr4* gén deléciójához használt *LacZ* génről expresszálandó β-galaktózidáz fehérje detektálása. Ehhez *Sstr4*^{-/-} egereket perfundáltunk Zamboni fixálóval (n=3), majd agyukat az amygdala és a nucleus raphe dorsalis szintjében metszettük.

2.2. A krónikus variábilis stressz (KVS)

Az sst_4 receptor szerepét a krónikus stressz-érzékenységben KVS paradigmában vizsgáltuk. Négy csoportot használtunk: nem stresszelt, ill. krónikusan stresszelt $Sstr4^{+/+}$ és $Sstr4^{-/-}$ egereket (n=9-11/csoport). A 4 hetes kísérlet első hetében végzett tesztekben („1. kísérlet”) az alap viselkedéses paramétereket határoztuk meg. A következő 3 hétben végeztük a KVS-t (Sterrenburg és mtsai., 2011), ami 6 különböző stresszorból állt (rázás, éjszakai megvilágítás, stb.), amelyekből naponta 2 különbözőt alkalmaztunk. A viselkedésteszteket a KVS 3. hetében megismételtük („2. kísérlet”). Az „1. és 2. kísérletben” mért paraméterek abszolút értékei mellett a különbségeiket, vagyis a változásukat [„1. kísérlet” érték - „2. kísérlet” érték] is összehasonlítottuk a statisztikai analízis során. Végül az egereket PFA oldattal perfundáltuk.

A hypothalamus-hypophysis-mellékvese (HPA)-tengely aktivitást a relatív mellékvese és csecsemőmirigy súlyok [szervek súlya (mg)/testsúly (g)] és a plazma kortikoszteron szintek mérésével (RIA) határoztuk meg, míg a stresszhez köthető agyterületek aktivitását FosB (krónikus neuronális aktivációs marker) immunhisztokémiával jellemeztük.

2.3. Krónikus restraint stressz (KRS)

Az kapszaicin-szenzitív neuronok krónikus stressz-indukált hiperalgéziában játszott szerepének vizsgálatához e neuronok ultrapotens kapszaicin analóggal, reziniferatoxinnal (RTX) végzett deszenzibilizációját, valamint KRS modellt alkalmaztunk. A vizsgált 4 csoport a következő volt: nem stresszelt és krónikusan stresszelt előkezelés nélküli és RTX előkezelt egerek (n=9-11/csoport). Az RTX deszenzibilizációt 3 héttel a KRS megkezdése előtt végeztük. A kontroll nociceptív mérések után az állatokat 4 hétig minden nap 6 órán át lyukakkal ellátott, jól szellőző 50 ml-es műanyag csövekbe helyeztük, amelyekben mozgásuk korlátozott volt (Ihne és mtsai., 2012). A nociceptív méréseket a KRS ideje alatt hetente ismételtük, a viselkedésteszteket a 4. héten végeztük.

Ezután az egereket elaltattuk, a hátsó lábakat levágtuk citokin koncentrációméréshez, majd perfundáltuk őket, meghatároztuk a relatív mellékvese- és csecsemőmirigy súlyukat, agyukban és lumbalis gerincvelőjükben pedig FosB immunhisztokémiát végeztünk.

3. Farmakológiai módszerek

3.1. J-2156 kezelés

A J-2156 kismolekulájú peptidomimetikum, potens és szelektív sst_4 agonista (Engström és mtsai., 2005), amit 15 perccel a viselkedésteszteket előtt adtunk i.p. (dózis: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

3.2. Reziniferatoxin (RTX) deszenzibilizáció

A kapszaicin-érzékeny neuronok hosszú távú deszenzibilizációját szisztémás RTX (Sigma Aldrich) kezeléssel végeztük (10, 20, 70 és 100 µg/kg RTX s.c. injekciója 4 egymást követő napon). Az idegvégződések funkciójának kiesését a szemtörlés hiányával igazoltuk 10 µl 0,1%-os kapszaicin szembe cseppentése után (Borbély és mtsai., 2015).

4. Vizsgálati módszerek

4.1. Viselkedésteszték

4.1.1. Emelt keresztpalló teszt (EKP)

Az EKP-t a szorongás mérésére használtuk. Az egereket először a 4 karú (2 szabad és 2 falakkal körülvett kar) EKP középső platformjára helyeztük. A kísérlet 5 perce alatt a nyitott karokon töltött időt mértük, ami a szorongással fordítottan arányos.

4.1.2. Sötét-világos doboz teszt (SVD)

Az SVD szintén a szorongás mérésére alkalmas. A doboz egy sötét és egy világos térfelet tartalmaz, amelyek között egy lyuk található a padló szintjében. A világosban töltött időt, valamint a világosba lépések és lesések számát vizsgáltuk az 5 perces kísérlet alatt (a fénypreferencia a klasszikus értelmezés szerint fordítottan arányos a szorongással).

4.1.3. Open field teszt (OFT)

Az egereket egyenként egy felülről megvilágított arénába helyeztük, amelynek padlóját egyforma területekre osztottuk, majd viselkedésüket 5 percig vizsgáltuk. A lokomotoros aktivitást jellemző paramétereket (keresztezett területek száma és mozgással töltött idő), ill. a szorongással fordítottan arányos középső négyzetekben töltött időt határoztuk meg.

4.1.4. Forced swim teszt (FST)

Ebben a tesztben az egereket vizet tartalmazó átlátszó műanyag hengerekbe helyeztük és az immobilitással (passzív lebegéssel) töltött időt mértük a 6 percig tartó teszt utolsó 4 percében. Az immobilitás e tesztben a depresszió-szerű viselkedésnek felel meg.

4.1.5. Tail suspension teszt (TST)

A TST-t szintén a depresszió-szerű viselkedés vizsgálatára alkalmaztuk. Az egereket farkuknál fogva 50 cm magasságban lógattuk fel 6 percre és az immobilitást az utolsó 4 percben mértük.

4.1.6. Szacharóz preferencia teszt (SPT)

Az anhedónia jellemzésére alkalmas SPT-ben az állatokat 48 órára olyan ketrecekbe helyeztük, amelyekben iváskor egy csapvizet, ill. egy 1 %-os szacharóz oldatot tartalmazó palack közül választhattak. A teszt után megmértük az elfogyasztott csapvíz és szacharóz oldat mennyiségét és kiszámítottuk a szacharóz preferencia indexet: $[\text{elfogyasztott szacharóz oldat tömege}/(\text{elfogyasztott csapvíz tömege}+\text{elfogyasztott szacharóz oldat tömege})\cdot 100]$.

4.2. Nocicepció tesztek

4.2.1. Dinamikus plantáris eszteziometria (DPA)

A mechanonociceptív küszöböt a hátsó végtagokon DPA-val határoztuk meg (Ugo Basile, Olaszország). A talpi felszínre kis átmérőjű, tompa végű tű segítségével növekvő erőt fejtettünk ki. A mechanonociceptív küszöböt a láb elrántásakor mérhető erő jellemzi.

4.2.2. Hidegtolerancia teszt

A hidegtoleranciát a hátsó végtagokon, 0°C-os jeges vízből való lábkirántás látenciájának mérésével határoztuk meg.

4.2.3. Emelkedő hőmérsékletű forrólap teszt

A fájdalmas melegküszöböt emelkedő hőmérsékletű forrólap tesztben mértük (Life Sciences, USA). Az egereket folyamatosan melegedő fémlapra helyeztük az egyértelmű nocifenzív reakció megjelenéséig.

4.3. Immunhisztokémiai módszerek

4.3.1. Fos és FosB immunhisztokémia

A TST-re, ill. az FST-re, mint akut stresszorokra adott neuronális válaszok vizsgálatára Fos, míg a KVS és KRS modellekben a krónikus neuronális aktiváció jellemzésére FosB immunhisztokémiát használtunk számos, a stressz, ill. a fájdalom szabályozásában részt vevő agyterületen.

Az elsődleges antitest nyúlban termelt Fos, ill. FosB elleni poliklonális antiszérum (1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), a másodlagos antitest pedig biotinilált kecske anti-nyúl IgG (1:200) volt (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, USA; Sterrenburg és mtsai., 2011). A vizsgált központi idegrendszeri struktúrákban a Fos- ill. FosB immunpozitív magvak számát határoztuk meg.

4.3.2. *Sst4^{LacZ}* immunhisztokémia

A szöveti β -galaktozidáz detektálására csirke poliklonális anti- β -galaktozidáz primér antitestet (1:20000, Abcam), torma peroxidáz-konjugált poliklonális anti-csirke másodlagos antitestet (1:200, Jackson Immunoresearch) és tiramid szignál amplifikáción alapuló kítet (TSATM-Plus Fluorescein System, PerkinElmer) alkalmaztunk (Fu és mtsai., 2010).

4.4. Kortikoszteron radioimmunoassay (RIA)

A KVS kísérlet után az *Sstr4^{+/+}* és *Sstr4^{-/-}* állatok plazmamintáiból a kortikoszteron RIA-t ³H-kortikoszteron (12000 cpm; NEN, NET-399, 90-120 Ci/mmol) és CS-RCS-57 (Józsa és mtsai., 2005) kortikoszteron antiszérum segítségével végeztük. A radioaktivitás méréséhez kétfázisú folyadék szcintillációs rendszert használtunk. Az inter- és intra-assay variációs koefficiensek 9,0% és 6,1% voltak.

4.5. Citokin koncentrációmérések hátsó láb szövetekből

A KRS kísérlet után az előkezeletlen és RTX előkezelt állatok jobb hátsó láb szövetekből fehérje-extraktumokat készítettünk, amelyekből citokin méréseket végeztünk, BDTM CBA *Flex Set*-k (USA) felhasználásával (Dénes és mtsai., 2015).

5. Statisztikai módszerek

Két csoport adatainak összehasonlításakor független mintás t-próbát, négy csoport adatainak összehasonlításakor két utas varianciaanalízist (ANOVA) és Fisher *post hoc* tesztet használtunk. A KVS modell esetében az ismételt viselkedésteszték eredményeit ismételt mérés két utas ANOVA-val és Fisher *post hoc* teszttel, a nociceptív tesztek eredményeit ismételt mérés két utas ANOVA-val és Bonferroni *post hoc* teszttel analizáltuk. A statisztikai erőt 0,05-nél kisebb p érték esetén tekintettük szignifikánsnak.

6. Etikai vonatkozások

Minden kísérlet megfelelt az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. számú törvény előírásainak, ill. az International Association for the Study of Pain (IASP) ajánlásainak. A kísérleti eljárásokat a Pécsi Tudományegyetem állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszámok: BA02/2000-25/2011 és BA 02/2000-2/2012).

EREDMÉNYEK, MEGBESZÉLÉS

Az sst4 receptor szerepe a szorongás és depresszió-szerű viselkedés szabályozásában, egérmodellekben

Eredmények

1. Az *Sstr4* génhiány és az sst4 aktiváció befolyásolja az akut stressz-szituációkban mutatott viselkedést

Az EKP-ben az *Sstr4* génhiányos állatok szignifikánsan, majdnem 80%-al kevesebb időt töltöttek a nyitott karokon, mint *Sstr4*^{+/+} társaik. Az FST-ben az *Sstr4*^{-/-} egerek jelentősen, mintegy 50%-al több időt töltöttek immobilitással, a TST-ben azonban nem volt különbség a csoportok között. Az OFT-ben egyik paraméterben sem volt különbséget az *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egerek között.

Az sst4 agonista J-2156 C57Bl/6J egerekben növelte a nyitott karokon töltött időt EKP-ben és bár az FST-ben nem befolyásolta az immobilitást, TST-ben szignifikánsan csökkentette azt. CD1 egerekben a J-2156 nem fejtett ki hatást az EKP-ben és az FST-ben, azonban jelentős antidepresszáns-szerű hatása volt a TST-ben. Az OFT-ben mutatott lokomotoros aktivitást a J-2156 kezelés sem C57Bl/6J, sem CD1 egerekben nem befolyásolta.

2. Stresszhez kapcsolható agyterületek stressz-indukált aktivációs mintázatának változása sst4 aktiváció hatására és az *Sstr4* gén hiányában

A J-2156 TST-ben kifejtett antidepresszáns-szerű hatásának hátterében álló mechanizmusok felderítéséhez Fos immunhisztokémiával vizsgáltuk a neuronális aktivációs mintázat változásait TST és/vagy J-2156 kezelés hatására CD1 egerekben.

A nucleus raphe dorsalisban (dRN) a J-2156-al kezelt, TST-nek kitett állatokban a Fos pozitív magvak számának szignifikáns, több mint 3,5-szeres növekedését találtuk, míg a TST és a J-2156 önmagukban nem fejtettek ki hatást. A centrálisan projiciáló nucleus Edinger-Westphalban (EWcp) szintén csak a J-2156-al kezelt állatok mutattak jelentős stressz-indukált Fos expresszió növekedést. A periaqueductalis szürkeállomány laterális (IPAG) és dorsalis (dPAG) részében a stresszre adott jelentős Fos választ az agonista kezelés tovább növelte.

A Fos immunpozitív magvak száma a nucleus paraventricularis hypothalami parvocellularis részében (pPVN) mind az NaCl-el, mind a J-2156-al kezelt csoportban növekedett a TST után, míg ez a válasz a magnocellularis részben (mPVN) csak a J-2156-al kezelt állatokban jelentkezett. A TST-nek önmagában nem volt hatása a Fos immunpozitív sejtszámra a dorsalis

(dLS) és a ventralis lateralis septumban (vLS), míg a J-2156-al kezelt állatokban az LS mindkét része erős választ adott a stresszre.

A stressz-indukált Fos választ erősen növelte az agonista kezelés a nucleus interstitialis striae terminalis ovalis (ovNIST) és ventralis (vNIST) almagjában, míg a növekedés csak a J-2156-al kezelt csoportban jelentkezett a dorsolateralis (dINIST) és dorsomedialis (dmNIST) almagokban. A TST-re adott Fos válasz J-2156 adása után szignifikánsan növekedett a centralis (CeA) és basolateralis (BLA) amygdalában, míg a medialis amygdalában (MeA) nem változott.

Az *Sstr4* gén deléciója a depresszió-szerű viselkedés jelentős növekedéséhez vezetett FST-ben, ezért vizsgáltuk az FST-indukált Fos expresszió változásait is a *knockout* állatokban. A Fos immunreaktivitás szignifikáns növekedését találtuk az FST után az amygdala és a NIST almagjaiban, a PVN-ben, a dRN-ben és a vLS-ben *Sstr4*^{+/+} egerekben. Az *Sstr4*^{-/-} csoportban a Fos expresszió stressz-indukált növekedése a CeA-ban kisebb volt, mint a vad típusúakban, a többi vizsgált struktúra esetében azonban nem találtunk különbséget.

3. Sst4 expresszió a stresszhez kapcsolható agyterületeken

Az sst4 receptort expresszáló neuronok láthatóvá tételéhez sst4^{LacZ} immunhisztokémiát használtunk az amygdala és a dRN környékén különböző rostro-caudalis síkokban. Erős sst4^{LacZ} immunreaktivitást találtunk a neuronok egy kompakt csoportján a rostralis CeA-ban, ill. közepes-erős immunpozitivitás volt látható elszórt neuronokon a basolateralis/basomedialis amygdalában, a MeA-ban és a piriform cortexben. Ezzel ellentétben sst4^{LacZ} immunreaktivitás nem volt kimutatható a PVN-ben, a dRN-ben és a PAG-ban.

Összefoglalás, megbeszélés, következtetések

Az itt bemutatott kísérletekben elsőként bizonyítottuk az sst4 receptor szerepét az akut stressz-folyamatok szabályozásában. Az *Sstr4* génhíányos egerek nagyobb szorongása és a J-2156 (egértörzs függő) szorongáscsökkentő hatása EKP-ben az sst4 receptor aktiváció szorongáscsökkentő hatását bizonyítja. Az *Sstr4*^{-/-} állatok immobilitása FST-ben emelkedett volt, de TST-ben nem különbözött a vad típusúakétól, míg a J-2156 TST-ben fejtett ki antidepresszáns-szerű hatást, az FST-ben azonban nem. Ezek alapján az FST-ben mutatott viselkedést az sst4 endogén aktivációja befolyásolja, de az agonistával való stimuláció további hatást már nem vált ki. Ugyanakkor, a TST-ben az sst4 akut exogén stimulációja bizonyult hatásosnak, míg az endogén sst4 krónikus hiánya nem befolyásolta az immobilitást. Ezek az eltérések a J-2156 speciális farmakológiai sajátágaiból, az FST-ben és a TST-ben mutatott viselkedés eltérő mechanizmusából (Cryan és mtsai., 2005), vagy a génhíány és az akut

farmakológiai stimuláció közti alapvető különbségekből adódhatnak (pl. komplex neuronhálózatok jelentős átrendeződése, kompenzatorikus mechanizmusok). Az OFT-ből kapott negatív eredmények bizonyítják, hogy a tapasztalt eltérések nem a lokomotoros aktivitás változásának következményei. Összefoglalva, ezek az első funkcionális adatok, amelyek az *sst4* szerepét bizonyítják a stressz, a szorongás és depresszió-szerű viselkedés szabályozásában az *sst2* korábban már leírt jelentősége mellett (Engin és mtsai., 2008; Engin és Treit, 2009).

A vizsgált agyterületek többségében érdekes módon a J-2156 növelte a TST-re adott Fos választ. A szomatosztatin receptorok közvetlenül gátló neuronális hatásokat közvetítenek, ezért a leírt jelenség valószínűleg diszinhibíciós mechanizmusokhoz, GABA-erg neuron gátláshoz köthető, amit az *sst2* esetében már kimutattak (Bassant és mtsai., 2005). Meglepőnek tűnhet, hogy az antidepresszáns-szerű hatást a Fos válasz növekedése kísérte, azonban hasonló hatásokat korábban standard antidepresszáns és szorongáscsökkentő szereknél is leírtak (Choi és mtsai., 2013; Lkhagvasuren és mtsai., 2014). Az agonistával végzett kísérletek alapján *Sstr4* génhiányos állatokban elvárt FST utáni Fos válasz csökkenés csak a CeA-ban volt kimutatható. Az amygdalában *sst4^{LacZ}* immunreaktivitást találtunk a korábbi, patkányokban végzett vizsgálatokkal összhangban (Schreff és mtsai., 2000). Ezek alapján feltételezhető, hogy a stressz-szabályozás szempontjából az amygdala *sst4* receptorai különösen jelentősek. Az amygdalából kiinduló projekciók számos egyéb agyterület aktivitását szabályozzák (Drevets és mtsai., 2008), így lehetséges, hogy az *sst4* aktiváció az amygdala stresszre adott válaszában befolyásolásán keresztül, indirekt módon módosítja a többi agyterület (pl. dRN, PAG) működését. A pontos mechanizmusok felderítése és a leírt folyamatokban résztvevő neuronok pontos karakterizálása azonban további vizsgálatokat igényel.

Az *Sstr4* génhiányos egerek fokozott érzékenysége krónikus stressz-indukált viselkedéses és neuroendokrin változásokra

Eredmények

1. Módosult viselkedéses válaszok KVS-re *Sstr4^{-/-}* egerekben

Az *Sstr4^{-/-}* és vad típusú egerek között az „1. kísérlet” során nem találtunk különbséget az SVD-ben a kontroll viselkedési paraméterekben. A „2. kísérletben” a KVS-nek kitett *Sstr4^{+/+}* állatok esetében a világosban töltött idő és a világosba lépések száma ugyan nem különbözött a nem-stresszelt vad típusúakétól, azonban szignifikánsan növekedett a megfelelő kontroll („1. kísérlet) adatokhoz képest. A stresszelt *Sstr4^{-/-}* állatok e paraméterei alacsonyabbak voltak, mint a stresszelt *Sstr4^{+/+}* egerekben. A világosban töltött idő és a világosba lépések számának

változásait összehasonlítva a nem-stresszelt és stresszelt vad-típusú csoportok között jelentős különbséget találtunk, utóbbiban növekedés volt kimutatható. Ezzel ellentétben, a KVS nem fejtett ki hatást ezeknek a magatartási paramétereknek a változására az *Sstr4^{-/-}* csoportban. A világosba lesések száma a „2. kísérletre” minden csoportban egyforma mértékben csökkent.

A TST-ben a KVS előtt („1. kísérlet”) nem volt különbség az *Sstr4^{+/+}* és *Sstr4^{-/-}* csoportok között. A krónikus stressz után („2. kísérlet”) a depresszió-szerű viselkedés növekedett a stresszelt *knockout*-okban ugyanennek a csoportnak az „1. kísérletben” mért adataihoz, ill. a „2. kísérleten” belül a stresszelt *Sstr4^{+/+}* és a nem stresszelt *Sstr4^{-/-}* csoportokhoz képest is. Az immobilitás változása jelentősen nagyobb volt a KVS-nek kitett *Sstr4^{-/-}* egerekben a stresszelt vad típusúakhoz és a nem stresszelt génhányosokhoz hasonlítva is.

Az FST-ben mért immobilitás az „1. kísérletben” szignifikánsan nagyobb volt az *Sstr4^{-/-}* állatokban, mint a vad típusúakban. A KVS után a krónikusan stresszelt *knockout*-ok immobilitása csökkent és hasonlónak vált a vad típusúakéhoz, amelyekben a stressz nem fejtett ki hatást, így e paraméter csökkenése csak a stresszelt *Sstr4^{-/-}* állatokban volt jelentős.

Az OFT-ben a genotípus nem volt hatással a viselkedési paraméterekre az „1. kísérletben”. Ebben a tesztben a KVS jelentősen nem befolyásolta a viselkedést, azonban a „2. kísérletben” a lokomotoros aktivitás és a középén töltött idő csökkenésének irányába mutató tendencia volt kimutatható az összes csoportban az „1. kísérlet” adataihoz képest (vagyis a teszt ismétlésének volt hatása). Ez az *Sstr4^{-/-}* állatok esetében erősebb volt, azonban a viselkedésváltozásokat tekintve nem volt kimutatható különbség a csoportok között.

Az SPT-ben nem találtunk szignifikáns eltéréseket a csoportok között sem a szacharóz preferenciában sem annak változásában.

2. Neuroendokrin és szomatikus paraméterek változása az *Sstr4* gén-deléció és a KVS hatására

Bár a nem stresszelt *Sstr4^{+/+}* és *Sstr4^{-/-}* egerek között nem volt különbség a relatív mellékvese súlyban, e paraméter KVS hatására létrejövő növekedése jelentősen nagyobb volt a *knockout*-okban. A nem-stresszelt génhányos állatok a relatív csecsemőmirigy súlya jelentősen nagyobb volt, mint a megfelelő vad típusúaké, azonban a KVS hatására az *Sstr4^{+/+}* és *Sstr4^{-/-}* egerekben is hasonló értékre csökkent. A bazális plazma kortikoszteron koncentráció szignifikánsan magasabb volt az *Sstr4^{-/-}* állatokban, de az alkalmazott kísérleti elrendezésben a KVS erre nem volt hatással. A nem stresszelt *Sstr4^{-/-}* egerek testsúlya alacsonyabb volt, mint a megfelelő

Sstr4^{+/+} állatoké, azonban a KVS egyforma mértékben csökkentette azt, a genotípustól függetlenül.

3. Az *Sstr4* gén-deléció és a KVS hatása a stresszhez kapcsolható agyterületek aktivációs mintázatára

A FosB immunreaktivitást a KVS egyik vizsgált agyterületen (amygdala, NIST, hippocampusban, LS, PVN, dRN, EWcp, PAG) sem befolyásolta *Sstr4*^{+/+} egerekben, a krónikusan stresszelt *Sstr4*^{-/-} állatokban azonban a CeA-ban és a BLA-ban jelentősen növelte azt.

Összefoglalás, megbeszélés, következtetések

Elsőként mutattuk ki, hogy az *Sstr4* génhány jelentősen módosítja a krónikus stresszre adott viselkedéses, endokrin és neuronális válaszokat. A KVS egyetlen viselkedéses hatása *Sstr4*^{+/+} egerekben az SVD-ben mért fénypreferencia enyhe növekedése volt, ami az *Sstr4*^{-/-} állatokban nem volt detektálható. Következésképpen e korábban már leírt, krónikus stressz modellekben maladaptív válasznak tekinthető „paradox anxiolitikus hatás” (Ihne és mtsai., 2012) közvetítésében szerepe van az sst₄ receptornak. A TST-ben a KVS ugyan nem befolyásolta a vad típusú egerek immobilitását, azonban jelentősen növelte a depresszió-szerű viselkedést *Sstr4*^{-/-} állatokban, ami az utóbbiak fokozott érzékenységét bizonyítja a krónikus stressz „depressziogén” hatására. Ezzel szemben, a KVS csökkentette az *Sstr4*^{-/-} egerek alapból nagyobb immobilitását az FST-ben, ami így hasonlóvá vált a vad típusúakéhoz, amelyekben a krónikus stressz nem fejtett ki hatást. Az FST klasszikus értelmezése szerint az immobilitás csökkenése a KVS antidepresszáns-szerű hatását jelentené, azonban krónikus stressz esetén reaktívabb, impulzív viselkedésnek, maladaptív válasznak is tekinthető (Harro és mtsai., 2001). A TST-ben és FST-ben talált ellentétes irányú változások a két, depresszió-szerű viselkedés vizsgálatára használt teszt jelentősen eltérő mechanizmusára utalnak (Cryan és mtsai., 2005). Az OFT és SPT eredmények alapján a KVS és az *Sstr4* génhány közötti interakció modellünkben nem befolyásolja a lokomotoros aktivitást és az anhedóniát.

Az *Sstr4* génhányos állatokban enyhén, de szignifikánsan megnövekedett bazális kortikoszteron koncentráció a receptor gátló aktivitására utal a HPA-tengely szabályozásában. Bár a KVS az alkalmazott protokoll (a mintavétel 24 órával az utolsó stresszor után történt) mellett nem befolyásolta a plazma kortikoszteron szintet, az *Sstr4*^{-/-} egerekben kimutatható nagyobb stressz-indukált relatív mellékvese súly növekedés arra utal, hogy az sst₄ receptor szerepet játszik az endokrin stressz-válaszban is. Mivel a HPA-tengely komponenseiben az sst₄

receptor nem expresszálódik (Schreff és mtsai., 2000), ezek a hatások feltehetően indirekt módon, magasabb rendű szabályozó struktúrák aktivitásának befolyásolása révén jönnek létre. A génhányos állatok nagyobb kezdeti relatív csecsemőmirigy súlya alapján az sst₄ receptor részt vehet a szomatosztatin csecsemőmirigy súlyt és thymocyta számot csökkentő hatásában (Petrovic-Dergovic és mtsai., 2004). A KVS az *Sstr4* génhányos egerekben szelektíven növelte a CeA és a BLA FosB immunreaktivitását, ami a vad típusú állatokban nem volt kimutatható. A CeA és a BLA plasztikus folyamatai jól ismert módon szerepet játszanak a krónikus stressz-folyamatok szabályozásában (Rau és mtsai., 2015). Következésképpen, az amygdala sst₄ receptorai fontos szerepet játszanak a szomatosztatin hatásainak közvetítésében, ill. a krónikus stressz-indukált viselkedéses és endokrin válaszokban résztvevő neuroplaszticitási folyamatok gátlásában.

Kapszaicin-érzékeny neuronok szerepének vizsgálata krónikus stressz hatására létrejövő nociceptív válaszokban

Eredmények

1. A mechano- és termonocicepció változásai KRS és RTX deszenzibilizáció hatására

A hátsó lábakon a KRS megközelítőleg 20%-os stabil mechanonociceptív küszöbcsökkenést (hiperalgéziát) okozott. Nem stresszelt állatokban az RTX kezelés a mechanoszenzitivitást nem befolyásolta, azonban a stressz-indukált mechanikai hiperalgézia nagyobb volt a deszenzibilizált állatokban (az első héten 30%, utána végig 40% körül). A hidegtolerancia a kontroll mérések után a nem stresszelt csoportokban is csökkent, azonban a KRS-nek kitett állatokban nagyobb mértékben. A KRS hatását a hidegérzékenységre a deszenzibilizáció nem befolyásolta. Az RTX-előkezelt állatok fájdalmas meleg küszöbe kb. 3°C-al magasabb volt, mint az előkezeletleneké, ami már a kontroll vizsgálatoknál kimutatható volt és a kísérlet során végig fennmaradt. Mindazonáltal, a KRS nem fejtett ki hatást a fájdalmas meleg érzékenységre.

2. Viselkedésváltozások KRS és RTX deszenzibilizáció után

SVD-ben a világos térfélben töltött időt a KRS jelentősen megnövelte előkezelés nélküli állatokban, azonban az RTX-előkezelt csoportban nem. A krónikus stressz jelentősen növelte a világosba lépések és csökkentette a kilesések számát, azonban ezek a változások deszenzibilizált állatokban nem voltak kimutathatók. OFT-ben a KRS-nek kitett, RTX-kezelt állatokban a keresztezett területek száma és a mozgással töltött idő alacsonyabb volt, mint a megfelelő előkezeletlen csoportban. Egyik faktor sem befolyásolta a középső területeken töltött időt. A TST-ben mutatott immobilitást sem a KRS, sem az RTX előkezelés nem befolyásolta.

3. Szomatikus paraméterek változása KRS és RTX deszenzibilizáció után

A KRS növelte a relatív mellékvese súlyt, míg a relatív csecsemőmirigy súlyt csökkentette. A nem stresszelt állatok testsúlya a kísérlet ideje alatt nem változott, míg a stresszelt csoportok 7-8%-os csökkenést mutattak. Az RTX ezeket a változásokat nem befolyásolta.

4. A KRS és RTX deszenzibilizáció hatása a stresszhez kapcsolható agyterületek aktivációs mintázatára

Az insularis cortex-ben (InsC) a KRS növelte a FosB pozitív sejtek számát az előkezeletlen állatokban, ez a hatás azonban RTX deszenzibilizáció után nem volt megfigyelhető. Az RTX előkezelés növelte a FosB immunreaktivitást a szomatoszenzoros cortex-ben (SsC), a KRS azonban ezt nem befolyásolta. A nucleus dorsomedialis hypothalami-ban (DMH) és a dRN-ben a krónikus stressz növelte az immunpozitív magvak számát mind előkezeletlen, mind deszenzibilizált állatokban. A stressz és fájdalom szabályozásában fontos egyéb vizsgált agyterületek, a medialis prefrontalis cortex, az anterior cingularis cortex, a NIST, a PVN, az amygdala, a hippocampus, a PAG és a rostralis ventromedialis medulla FosB expressziója nem változott sem az RTX előkezelés sem a KRS hatására. Hasonlóképpen, egyik faktor sem befolyásolta a gerincvelő felületes hátsó szarvában (FHSz) a FosB immunpozitivitást.

5. A KRS és RTX deszenzibilizáció hatása a perifériás citokin koncentrációkra

Az RTX előkezelés növelte az interleukin (IL)-1 α és a RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*, más néven kemokin CCL5) koncentrációkat nem stresszelt állatokban, ami a krónikus stressznek kitett egerekben nem jelentkezett, bár a stressz önmagában nem fejtett ki hatást. A KRS az előkezeletlen állatokban jelentősen csökkentette a KC koncentrációt. Az interferon γ , az IL-1 β , az IL-4, az IL-10, a monocyta kemoattraktáns protein-1, a tumor nekrosis faktor α , a granulocita kolónia stimuláló faktor és az IL-6 esetében nem találtunk különbséget a csoportok között.

Összefoglalás, megbeszélés, következtetések

Ez az első kísérletes vizsgálat, amely egy specifikus nociceptor populáció és a krónikus stressz interakciójára, ill. annak nocicepcióra kifejtett hatására szolgáltat bizonyítékot. Elsőként mutattuk ki, hogy a stressz-indukált mechanikai hiperalgécia specifikusan növekszik a kapszaicin-érzékeny neuronok deszenzibilizációja után, ami látszólag ellentétben áll a fájdalomérzésben játszott központi szerepükkel. Ugyanakkor, e neuronpopuláció mechanikai hiperalgéciaiban játszott szerepe krónikus fájdalomban kérdéses és az adott fájdalomállapot

mechanizmusától függ (Xu és mtsai., 2015). A KRS hatására kialakult hideg hiperalgéziát (Bardin és mtsai., 2009), az RTX előkezelés nem befolyásolta. A KRS a fájdalmas meleg küszöböt nem befolyásolta, azonban a deszenzibilizáció jelentősen megemelte azt, ami összhangban van a kapszaicin-érzékeny idegsejtek termonocicepcióban játszott központi szerepével (Bölcskei és mtsai., 2010). SVD-ben a fénypreferencia KRS hatására létrejövő növekedése az RTX deszenzibilizáció után nem volt kimutatható, ami az RTX hosszantartó hatását bizonyítja a krónikus stresszre adott viselkedéses válaszra. Összességében azonban az RTX előkezelés szelektíven a KRS-indukált mechanikai hiperszenzitivitást növelte. A többi nociceptív, viselkedéses és endokrin paraméterre vagy ellentétes irányú hatást fejtett ki, vagy nem befolyásolta őket, vagyis a mechanikai hiperalgézia fokozódás az RTX specifikus hatása és nem egy általános viselkedési vagy endokrin zavar következménye.

Az InsC-ben a KRS hatására kialakuló FosB expresszió növekedés RTX deszenzibilizáció után nem volt detektálható a mechanikai hiperalgézia fokozódása mellett, ami anti-nociceptív mechanizmus működésére utal ebben a struktúrában (Imbe és Kimura, 2015). Az SsC-ben az RTX előkezelés önmagában növelte a FosB expressziót, ami a perifériás szomatoszenzoros bemenet módosulásával lehet összefüggésben (Nussbaumer és Wall, 1985) és szerepet játszhat a mechanikai hiperalgézia fokozódásában. A szubkortikális magvak közül a DMH és a dRN aktivitásának fokozódása is részt vehetett a KRS-indukált nociceptív válaszokban. A gerincvelő FHSz-ban sem a KRS sem az RTX deszenzibilizáció nem fejtett ki hatást, vagyis modellünkben a spinothalamicus pálya aktivitása a perifériás rostok felől nem fokozódik. A kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok gátló szerepet játszanak az IL-1 α és a RANTES bazális („housekeeping”) termelésének szabályozásában. Ezek a perifériás immunológiai változások azonban valószínűleg nem jelentősek a KRS hatására létrejövő hiperalgézia szempontjából, figyelembe véve a stressz negatív irányú hatásait. Ezek alapján a leírt nociceptív válaszokban elsősorban agyi neuroplaszticitási változások jelentősége feltételezhető. Kísérletes adataink elősegíthetik a központi- és perifériás érző idegrendszer és a stressz közötti összetett interakciók felderítését és hozzájárulhatnak azoknak a meglepő klinikai megfigyeléseknek a megértéséhez, amelyek a hiperalgézia mellett vékonyrost hiányt mutattak ki FM-ben (Üçeyler és mtsai., 2013).

ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS EGYSÉGES ÉRTELMEZÉSE

1. Elsőként mutattuk ki, hogy az sst4 receptorok aktivációja szorongáscsökkentő és antidepresszáns-szerű hatásokat közvetít akut stressz-szituációkban, egérmodellekben.

Ezek a hatások a stresszhez köthető agyterületeken a stresszre adott akut neuronális válasz módosításán keresztül jönnek létre, amiben az amygdalában található sst4 receptorok szerepe tűnik különösen jelentősnek. Bár a szomatosztatint expresszáló neuronok központi szerepét az emocionális és stressz-szabályozásban számos irodalmi adat támasztja alá, az itt bemutatott eredményeink az elsők, amelyek az sst4 receptor jelentőségét bizonyítják e folyamatokban.

2. Az sst4 receptor szerepét a pszichiátriai betegségek szempontjából nagy transzlációs jelentőségű KVS-re adott válaszokban is bizonyítottuk.

A receptor hiánya komplex módon befolyásolja a krónikus stressz-szenzitivitást, döntően maladaptív viselkedéses változásokhoz vezet és módosítja a HPA-tengely aktivitását. E jelenségek szintén az amygdala stresszre adott válaszána módosulásához köthetők. Adataink arra utalnak, hogy az sst4 receptor a stresszhez köthető pszichiátriai betegségekben ígéretes gyógyszer-célpont lehet. Ebből a szempontból lényeges megemlíteni az sst4 aktiváció fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatásait, figyelembe véve a krónikus fájdalomállapotok és a depresszió gyakori együttes előfordulását. Ráadásul, a szomatosztatin változatos endokrin hatásainak közvetítésében az sst4 nem vesz részt (szemben az sst₂-vel), ami a mellékhatások szempontjából előnyös.

3. Elsőként írtuk le, hogy a kapszaicin-érzékeny neuronok deszenzibilizációja fokozza a krónikus stressz hatására létrejövő mechanikai hiperalgéziát.

Ez a hatás modalitás-specifikus, nem egy robusztus viselkedéses vagy endokrin zavar következménye. A jelenség az agyi fájdalom-feldolgozásban résztvevő struktúrák aktivitásának módosulásához köthető, míg a perifériás nociceptorok aktivitásfokozódása és az immunológiai változások szerepe nem valószínű. E következtetéseknek fontos szerepe lehet a stressz a nociceptív rendszerek interakcióinak megértésében. E kérdés jelentőségét a pszichológiai faktorok krónikus fájdalomállapotokban játszott szerepe emeli ki. Eredményeink hozzájárulhatnak a stresszhez kötődő fájdalomállapotok, például az FM patomechanizmusának megértéséhez, figyelembe véve az utóbbiban kimutatott paradox vékonyrost patológiát.

Vizsgálataink a stressz összetett folyamataiban eddig ismeretlen tényezőket derítettek fel, amelyek további részletes vizsgálata újabb pszichofarmakológiai és krónikus fájdalomra ható ágensek kifejlesztéséhez járulhat hozzá.

IRODALOM

- Bardin L** és **mtsai.** (2009). Chronic restraint stress induces mechanical and cold allodynia, and enhances inflammatory pain in rat: Relevance to human stress-associated painful pathologies. *Behav Brain Res.* 205(2):360-6.
- Bassant MH** és **mtsai.** (2005). Medial septal GABAergic neurons express the somatostatin sst2A receptor: functional consequences on unit firing and hippocampal theta. *J Neurosci.* 25(8):2032-41.
- Bölskei K** és **mtsai.** (2010). Antinociceptive desensitizing actions of TRPV1 receptor agonists capsaicin, resiniferatoxin and N-oleoyldopamine as measured by determination of the noxious heat and cold thresholds in the rat. *Eur J Pain.* 14(5):480-6.
- Borbély É** és **mtsai.** (2015). Capsaicin-sensitive sensory nerves exert complex regulatory functions in the serum-transfer mouse model of autoimmune arthritis. *Brain Behav Immun.* 45:50-9.
- Choi SH** és **mtsai.** (2013). Changes in c-Fos Expression in the Forced Swimming Test: Common and Distinct Modulation in Rat Brain by Desipramine and Citalopram. *Korean J Physiol Pharmacol.* 17(4):321-9.
- Cryan JF** és **Mombereau C** (2004). In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry.* 9(4):326-57.
- Cryan JF** és **mtsai.** (2005). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev.* 29(4-5):571-625.
- Denes A** és **mtsai.** (2015). AIM2 and NLRC4 inflammasomes contribute with ASC to acute brain injury independently of NLRP3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(13):4050-5.
- Diatchenko L** és **mtsai.** (2013). The phenotypic and genetic signatures of common musculoskeletal pain conditions. *Nat Rev Rheumatol.* 9(6):340-50.
- Drevets WC** és **mtsai.** (2008). Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct.* 213(1-2):93-118.
- Engin E** és **mtsai.** (2008). Anxiolytic and antidepressant effects of intracerebroventricularly administered somatostatin: behavioral and neurophysiological evidence. *Neuroscience.* 157(3):666-76.
- Engin E** és **Treit D** (2009). Anxiolytic and antidepressant actions of somatostatin: the role of sst2 and sst3 receptors. *Psychopharmacology (Berl).* 206(2):281-9.
- Engström M** és **mtsai.** (2005). Superagonism at the human somatostatin receptor subtype 4. *J Pharmacol Exp Ther.* 312(1):332-8.
- Fu W** és **mtsai.** (2010). Chemical neuroanatomy of the dorsal raphe nucleus and adjacent structures of the mouse brain. *J Comp Neurol.* 518(17):3464-94.
- Guilloux JP** és **mtsai.** (2012). Molecular evidence for BDNF- and GABA-related dysfunctions in the amygdala of female subjects with major depression. *Mol Psychiatry.* 17(11):1130-42.
- Harro J** és **mtsai.** (2001). Chronic variable stress and partial 5-HT denervation by parachloroamphetamine treatment in the rat: effects on behavior and monoamine neurochemistry. *Brain Res.* 899(1-2):227-39.
- Helyes Z** és **mtsai.** (2009). Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(31):13088-93.
- Hong S** és **mtsai.** (2011). Corticosterone mediates reciprocal changes in CB1 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons in the chronically stressed rat. *Gastroenterology.* 140(2):627-637.

- Ihne JL** és mtsai. (2012). Pharmacological modulation of stress-induced behavioral changes in the light/dark exploration test in male C57BL/6J mice. *Neuropharmacology*. 62(1):464-73.
- Imbe H** és **Kimura A** (2015). Repeated forced swim stress prior to complete Freund's adjuvant injection enhances mechanical hyperalgesia and attenuates the expression of pCREB and Δ FosB and the acetylation of histone H3 in the insular cortex of rat. *Neuroscience*. 301:12-25.
- Immke DC** és **Gavva NR** (2006). The TRPV1 receptor and nociception. *Semin Cell Dev Biol*. 17(5):582-91.
- Józsa R** és mtsai. (2005). Circadian and extracircadian exploration during daytime hours of circulating corticosterone and other endocrine chronomes. *Biomed Pharmacother*. 59 Suppl 1:S109-16.
- Kormos V** és **Gaszner B** (2013). Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides*. 47(6):401-19.
- Krishnan V** és **Nestler EJ** (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 455:894-902.
- Lin LC** és **Sibille E** (2013). Reduced brain somatostatin in mood disorders: a common pathophysiological substrate and drug target? *Front Pharmacol*. 4:110.
- Lkhagvasuren B** és mtsai. (2014). Distribution of Fos-immunoreactive cells in rat forebrain and midbrain following social defeat stress and diazepam treatment. *Neuroscience*. 272:34-57.
- Martel G** és mtsai. (2012). Somatostatinergic systems: an update on brain functions in normal and pathological aging. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 3:154.
- Minett MS** és mtsai. (2014). Pain without nociceptors? Nav1.7-independent pain mechanisms. *Cell Rep*. 6(2):301-12.
- Nussbaumer JC** és **Wall PD** (1985). Expansion of receptive fields in the mouse cortical barrelfield after administration of capsaicin to neonates or local application on the infraorbital nerve in adults. *Brain Res*. 360(1-2):1-9.
- Petrovic-Dergovic DM** és mtsai. (2004). Somatostatin-14 alters the thymus size and relation among the thymocyte subpopulations in peripubertal rats. *Neuropeptides*. 38(1):25-34.
- Pintér E** és mtsai. (2006). Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther*. 112(2):440-56.
- Rau AR** és mtsai. (2015). Increased Basolateral Amygdala Pyramidal Cell Excitability May Contribute to the Anxiogenic Phenotype Induced by Chronic Early-Life Stress. *J Neurosci*. 35(26):9730-40.
- Sandoval KE** és mtsai. (2011). Chronic peripheral administration of somatostatin receptor subtype-4 agonist NNC 26-9100 enhances learning and memory in SAMP8 mice. *Eur J Pharmacol*. 654(1):53-9.
- Schreff M** és mtsai. (2000). Distribution, targeting, and internalization of the sst4 somatostatin receptor in rat brain. *J Neurosci*. 20(10):3785-97.
- Selye H** (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. 138: 32.
- Sterrenburg L** és mtsai. (2011). Chronic stress induces sex-specific alterations in methylation and expression of corticotropin-releasing factor gene in the rat. *PLoS One*. 6(11):e28128.
- Üçeyler N** és mtsai. (2013). Small fibre pathology in patients with fibromyalgia syndrome. *Brain*. 136(Pt 6):1857-67.
- Viollet C** és mtsai. (2000). Involvement of sst2 somatostatin receptor in locomotor, exploratory activity and emotional reactivity in mice. *Eur J Neurosci*. 12(10):3761-70.
- Xu ZZ** és mtsai. (2015). Inhibition of mechanical allodynia in neuropathic pain by TLR5-mediated A-fiber blockade. *Nat Med*. 21(11):1326-31.
- Yunus MB** (2008). Central sensitivity syndromes: a new paradigm and group nosology for fibromyalgia and overlapping conditions, and the related issue of disease versus illness. *Semin Arthritis Rheum*. 37(6):339-52.

PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapját képező publikációk

Scheich B, Gaszner B, Kormos V, László K, Adori Cs, Borbély É, Hajna Zs, Tékus V, Bölcskei K, Ábrahám I, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs (2016). Somatostatin receptor subtype 4 activation is involved in anxiety and depression-like behavior in mouse models. *Neuropharmacology*. 101:204-215. (IF: 5,106)

Scheich B, Csekő K, Borbély É, Ábrahám I, Csernus V, Gaszner B, Helyes Zs. Higher susceptibility of somatostatin 4 receptor gene-deleted mice to chronic stress-induced behavioral and neuroendocrine alterations. *Közlésre benyújtva a Brain Structure and Function folyóirathoz, bíráló alatt.*

Scheich B, Vincze P, Szőke É, Borbély É, Szolcsányi J, Dénes Á, Környei Zs, Gaszner B, Helyes Zs. Chronic stress-induced mechanical hyperalgesia is controlled by capsaicin-sensitive neurons in the mouse. *Közlésre benyújtva a Brain Research folyóirathoz.*

Összesített impakt faktor: **5,106**

Egyéb eredeti publikáció

Borbély É, **Scheich B**, Helyes Zs (2013). Neuropeptides in learning and memory. *Neuropeptides*. 47: 439-50. (IF: 2.546, FC: 25)

Idézhető absztraktok

Scheich B, Kormos V, Tékus V, Hajna Z, Gaszner B, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z (2012). Somatostatin receptor subtype 4 (sst4) plays an inhibitory role in anxiety and depression-like behaviours of mice. *CLINICAL NEUROSCIENCE* 65:(1) p. 57.

Scheich B, Kormos V, Tékus V, Hajna Zs, Borbély É, Gaszner B, László K, Lénárd L, Karádi Z, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs (2012). A szomatostatin 4 receptor szerepének vizsgálata funkcionális tesztekkel és C-FOS immunhisztokémiával szorongás és depresszió-szerű viselkedés egérmodelljeiben. *In: Dr. Csernoch László (szerk.) A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómusok Társasága, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa. p. 175.*

Hajna Zs, Borbély É, László K, **Scheich B**, Berger A, Quinn JP, Lénárd L, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs (2012). A tachykininek és neurokinin 1 (NK1) receptor szorongásban és tanulási

folyamatokban betöltött szerepének funkcionális vizsgálata. In: Csernoch László (szerk.) *A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómusok Társasága, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa*. p. 111.

Scheich B, Kormos V, Tékus V, Hajna Zs, Borbély É, Gaszner B, László K, Lénárd L, Karádi Z, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs (2012). Functional and immunocytochemical evidence for anxiolytic and antidepressant actions of somatostatin receptor subtype 4 activation in mice. In: *Dr. Csillag András (szerk.) XIV. Conference of the Hungarian Neuroscience Society*. 282 p.

Helyes Zs, **Scheich B**, Kormos V, Tekus V, Hajna Zs, Gaszner B, Pinter E, Szolcsanyi J (2013). Activation of somatostatin receptor subtype 4 (sst4) inhibits anxiety and depression-like behaviours in mouse models *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY* 125:(1)p. 230. 1 p.

Borbély É, **Scheich B**, Berger A, Paige CJ, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs (2014). Regulatory role of hemokinin-1 in chronic restraint stress model of mice *J Mol Neurosci*. 53:(Suppl 1)) pp. S138-S183.

Kongresszusi szóbeli előadások jegyzéke

Scheich B.: A krónikus stressz fájdalomfokozó hatásainak vizsgálata egérmodellekben (II. Pécs-Oklahoma Szimpózium, Pécs, Magyarország, 2013.)

Helyes Zs., **Scheich B.**, Borbély É., Vincze P., Menghis A., Keeble J., Szolcsányi J.: Krónikus fájdalom és stressz kapcsolattrendszereinek komplex vizsgálata egérmodellekben (A Magyarországi Fájdalom Társaság 2014. évi kongresszusa és a IV. Neurostimulációs Szimpózium a Magyar Neurológiai Társaság részvételével, Pécs, 2014.)

Helyes Zs., **Scheich B.**, Horváth Á., Botz B., Tékus V., Czompa A., Ludmerczki R., Pozsgai G., Boros M., Pintér E., Szolcsányi J., Mátyus P.: A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatorna szerepe és aktivációs mechanizmusa gyulladás és neuropátia egérmodelljeiben (A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának IX. szimpóziuma, Velence, 2015.)

Scheich B. A szomatosztatin 4 receptor szerepe krónikus variábilis stressz viselkedésre kifejtett hatásaiban, egérmodellekben (II. Magyar Neuroendokrinológiai Szimpózium, 2015.)

Scheich B. A szomatosztatin 4 receptor szerepe krónikus variábilis stresszre adott viselkedéses és neuroendokrin válaszokban, egérmodellekben (II. Idegtudományi Centrum/Szentágotthai János Kutatóközpont PhD és TDK konferencia, 2015.)

Scheich B. The somatostatin 4 receptor is involved in chronic variable mild stress-induced behavioural and neuroendocrine changes in the mouse (*Neuropeptides 2015, Aberdeen, Egyesült Királyság, 2015.*)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának és Dr. Gaszner Balázsnak TDK, majd PhD hallgatóként végzett munkám során nyújtott irányításukért, tanácsaikért és segítségükért. Hálával tartozom nekik lelkes, kitartó és kiváló oktatóként és kutatóként mutatott szakmai és emberi példájukért, közvetlenségükért és támogatásukért, amire mindig számíthattam.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Pintér Erikának, a Doktori Iskola vezetőjének és intézetvezetőnknek kutatómunkám támogatásáért.

Köszönetemet szeretném kifejezni kollégáimnak, Dr. Borbély Évának, Dr. Bölcskei Katának, Dr. Csekő Katának, Dr. Hajna Zsófiának, Dr. Kormos Viktóriának, Dr. Szőke Évának, Dr. Tékus Valériának és volt TDK hallgatónak, Dr. Vincze Patriciának, hogy együtt dolgozhattam velük a dolgozatban bemutatott munkák során. Köszönettel tartozom a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben dolgozó minden kollégámnak és PhD hallgató társamnak, hogy a kutatómunkámat egy szakmailag és emberileg is kiváló közösségben végezhettem.

Hálás vagyok Prof. Dr. Ábrahám Istvánnak és Prof. Dr. Szolcsányi Jánosnak szakmai tanácsaikért és kutatói példamutatásukért. Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Ádori Csabának, Prof. Dr. Csernus Valérnak, Dr. Dénes Ádámnak, Dr. Környei Zsuzsannának és Dr. László Kristófnak munkám során nyújtott segítségükért, értékes szakmai tanácsaikért.

Hálás vagyok Bagoly Teréz, Gógl Katalin, Önböli Dóra és Szentes Nikolett professzionális asszisztensi munkájáért, amellyel hozzájárultak a kísérletek sikerességéhez. Külön köszönetet szeretnék mondani Orbán Izabella szakmai segítségéért, baráti támogatásáért és a jó hangulatú közös munkáért.

Végül szeretném megköszönni Családomnak, elsősorban Szüleimnek és Nővéremnek rengeteg türelmüket, támogatásukat és bátorításukat, amellyel munkámat is segítették.