

# SZENZOROS NEUROPEPTIDEK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA ÍZÜLETI GYULLADÁS ÉS NEUROPÁTIA EGÉRMODELLJEIBEN

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**



**dr. Botz Bálint**

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Neurofarmakológiai Program

Programvezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezető: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM, ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET,

SZENTÁGOTHAJ JÁNOS KUTATÓKÖZPONT

PÉCS

2015

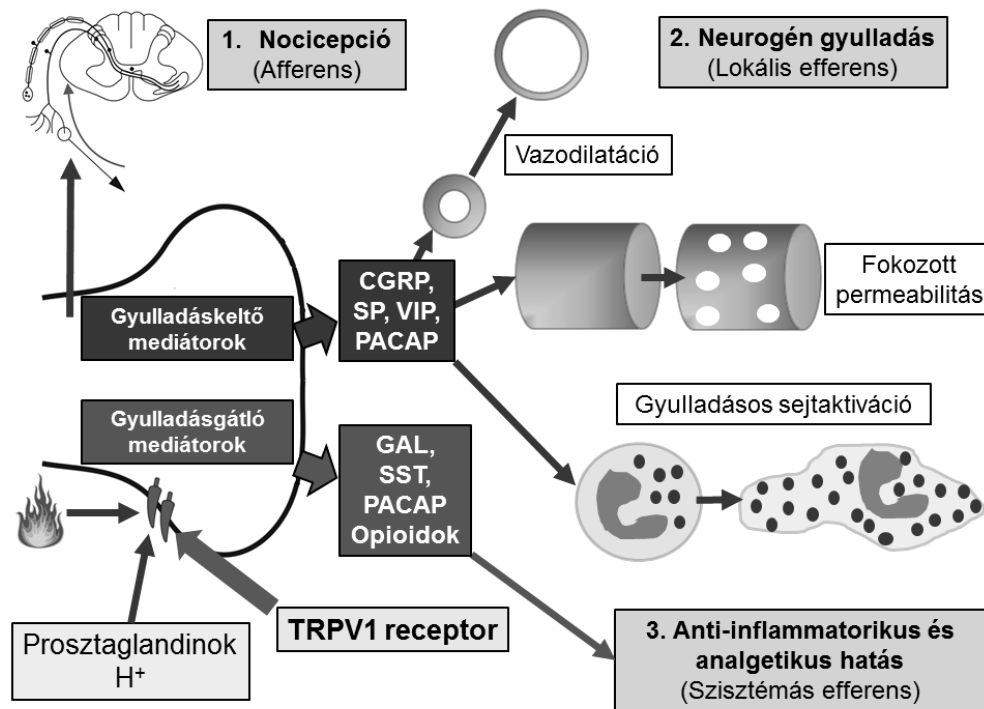
# BEVEZETÉS

## A peptiderg idegvégződés és TRP receptorok szerepe nocicepcióban és gyulladásban

A kapszaicint évszázadok óta alkalmazták gyulladással és fájdalommal járó kórképek empirikus kezelésére. Az 1960-as években fedezték fel, hogy szelektíven deszenzitizál egy bizonyos neuronális szubpopulációt, amiket ez alapján kapszaicin-szenzitív afferenseknek neveztek el (Jancsó 1960). Szolcsányi János megfigyelte, hogy ezen idegvégződés ingerlése vazodilatációt ill. lokális hiperpermeabilitást idéz elő, ami kapszaicin előkezeléssel gátolható (Jancsó és *mtsai.* 1967). Az ezen hatásért felelős receptort 1997-ben azonosították és Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1)-nek nevezték el. (Caterina és *mtsai.* 1997). A TRPV1 receptor egy nem szelektív kationcsatorna mely számos fizikokémiai inger polimodális érzékelője. A kapszaicin mellett más vanilloid vegyületek mint pl. a reziniferatoxin (RTX) is képesek aktiválni. Emellett endogén agonistái is vannak (pl. anandamid), továbbá mind a bradykinin, mind pedig a prosztaglandinok képesek indirekt módon szenzitizálni (Szállási és *mtsai.* 1999). A TRPV1 receptorok megtalálhatóak a hátsógyöki ganglionban, a szenzoros neuronokon, ill. a vékonyan myelinizált A $\delta$  és C-rostokon is (Caterina és *mtsai.* 1997; Tominaga és *mtsai.* 1998). A TRPV1 receptor központi jelentőségű hiperalgéziában, de krónikusan anti-inflammatorikus ill. analgetikus hatásokat is közvetít (Bölcskei és *mtsai.* 2005). Bár eredetileg úgy gondolták, hogy kizárólagosan neuronális sejteken fordul elő, azonban az elmúlt évtized vizsgálatai számos nem neurális szövetben is igazolták jelentőségét.

A kapszaicin szenzitív idegvégződés ún. hármas funkcióval bírnak 1) szenzoros afferens 2) lokális ill. 3) szisztémás efferens hatásai révén (**Fig. 1.**). Az afferens funkció alatt a nocicepcióban betöltött szerepüket értjük. Ugyanakkor az aktiváció során a végződés gyulladáskeltő mediátorok felszabadításával is válaszolnak, így ún. neurogén gyulladás jön létre (lokális efferens funkció; Maggi és *mtsai.* 1988). Egyidejűleg azonban gátló neuropeptidok is felszabadulnak, melyek gyulladásgátló és analgetikus hatást fejtenek ki nem csak lokálisan, de szisztémásan is. (szisztémás efferens vagy más névvel „szenzokrin” funkció; Szolcsányi és *mtsai.* 2004). A TRPV1 receptor felfedezését követően felélénkült a más hasonló exogén irritánsok vagy fizikokémiai stimulusok hatását közvetítő receptorok utáni kutatás. Ma már közel 30 különböző TRP receptor ismert, melyek közül a TRPA1 (Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1) tűnik mai tudásunk alapján különösen fontosnak neurogén gyulladásban. A TRPA1 hidegérzékesség szenzora, emellett pedig csípős fűszerek

mint pl. a mustárolajban megtalálható allil-izotiocianát (AITC) is aktiválják. Gyulladásos mediátorok mint a bradikinin szintén szenzitizálják a TRPV1 receptorhoz hasonlóan. A TRPA1 receptor jelentősége bebizonyosodott a nociceptív neurotranszmisszióban, neuropátiás és gyulladásos fájdalomban, ill. a perifériás neuropeptide-felszabadulásban (Nilius és *mtsai.* 2011). Ez alapján felvetették, hogy a gyulladásos neuro-vaszkuláris-immun interakciók központi regulátora lehet (Caceres és *mtsai.* 2009, Pozsgai és *mtsai.* 2010).



**Fig.1.** A kapszaicin-szenzitív afferensek hármass funkciója.

## Perifériás fájdalom és gyulladás peptid mediátorai

A kapszaicin-érzékeny idegvégződésekben szenzoros neuropeptid szabadul fel gyulladás és idegi trauma hatására (Brain 1997). A P anyag (Substance P; SP), ill. más rokon peptid mint pl. a Neurokinin A (NKA), Neurokinin B (NKB) az ún. tachykinin-családot alkotják. További fontos neuropeptid a hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid (Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide; PACAP), a Vazoaktív Intesztinális Polipeptid (VIP), a Calcitonin Gén-Rokon Peptid (CGRP), a szomatosztatin, galanin (GAL), ill. endogén opioidok. Ezek a mediátorok befolyásolják az értónust, gyulladásos sejtaktivitást, fájdalmat és összességében egy szisztémás választ indukálnak mely a potenciálisan káros stimulus hatását limitálja. Egyes neuropeptideket hagyományosan pronociceptívnek és proinflammatorikusnak tekintünk (pl. SP, CGRP), míg mások enyhítik és kiegyensúlyozzák a neurogén válaszokat (pl. szomatosztatin vagy GAL). A neurogén komponens nocicepcióban betöltött szerepe mellett viszonylag korán felvetődött az egyes immunbetegségekben való

jelentősége is, mint pl. reumatoid artritiszben (RA; Levine és *mtsai.* 1985). Később bebizonyosodott, hogy ez a neurogén útvonal szerepet játszik a gyulladásos mikrokörnyezet kialakításában azáltal, hogy vazodilatációt indukál, fokozza az érpermeabilitást és hízósejt-degranulációt, ill. a leukocita kiáramlást (Keeble és *mtsai.* 2004). Ez a mechanizmus döntő jelentőségűnek tűnik bizonyos autoimmun gyulladásos kórállapotokban (Stangenberg és *mtsai.* 2014).

Kutatócsoportunk korábban igazolta, hogy ezen peptiderg érző idegvégződések RTX segítségével történő szelektív deszenzitizációja paradox módon súlyosabb gyulladásos tünetekhez vezet artritisz állatmodelljében, ami a TRPV1-expresszázó szenzoros idegvégződések protektív szerepére utal (Helyes és *mtsai.* 2004). Ez alapján célunk volt, hogy a felszabaduló neuropeptidek jelentőségét karakterizáljuk, továbbá hogy a megfigyelt hatásokat bizonyos mediátor-csoportokhoz köthessük, melyhez traumás mononeuropátia és immun-mediált gyulladásos betegségek transzlációs állatmodelljeit használtuk.

## **A PACAP jelentősége fájdalomban és gyulladásban**

A PACAP a VIP/szekretin/glukagon peptidcsalád jelentős tagja, mely 27 ill. 38 aminosavas formában expresszáldik (PACAP-27 és -38). A PACAP-38 a domináns forma emlősökben. A PACAP ubikviter módon expresszáldik az idegrendszerben, ill. számos nem neurális szövetben is (erek, immunsejtek). A periférián antinociceptív, azonban a központi idegrendszerben elsősorban pronociceptív hatású. Ez alapján felvetődött, hogy centrális szenzitizáció kialakulásában központi szerepe lehet (Vaudry és *mtsai.* 2009). A PACAP emellett egy fontos endogén immunoregulátornak is tűnik. Hagyományosan három G-protein-kapcsolt receptorát (G-Protein-Coupled Receptor; GPCR) ismerjük. Ezek közül a PAC<sub>1</sub> receptoron egyedüli endogén agonista, míg a VPAC<sub>1</sub> és VPAC<sub>2</sub> receptorokhoz való affinitása a VIP-éhez hasonló (Laburthe és *mtsai.* 2007). A PACAP-27-ről ezen felül bebizonyosodott, hogy az FPRL1 (Formyl Peptide Receptor-Like 1) aktiválására is képes (Kim és *mtsai.* 2006). A PAC1 receptor elsősorban idegi és simaizomsejteken expresszáldik, míg a VPAC1 és VPAC2 receptorok főleg a hátsógyöki ganglionokban, érző idegvégződéseken és immunsejteken találhatóak meg (Vaudry és *mtsai.* 2009). A PACAP receptorai az immunrendszerben is számos helyen előfordulnak: a PAC1 receptor megtalálható a makrofágokon és monocitákon, míg a VPAC1 receptor ezen felül limfocitákon is expresszáldik. Ezzel szemben a VPAC2 receptor csak stimulált limfocitákon és makrofágokon fordul elő (Delgado és *mtsai.* 2003). Az FPRL1 receptor mind leukocitákon, mind limfocitákon előfordul (Kim és *mtsai.* 2006).

## **A tachykininek funkcionális jelentősége**

Mindezidáig három tachykinin-kódoló gént írtak le (Tac1, Tac3, Tac4), azonban poszt-transzlációs modifikáció következtében a mediátorok száma ennél nagyobb. Az elsőként azonosított Tac1 gén a SP-t és NKA-t, míg a Tac3 gén az NKB-t, a Tac4 gén pedig a hemokineket – a tachykinin-család legújabban azonosított tagjai – kódolja (Page 2005). Az SP és NKA neurális, vaszkuláris, és immunsejtekben is expresszálódik. Fiziológias hatásai sokrétűek, befolyásolják a neurogén gyulladási választ, a vizcerális simaizom működését, stimulálják a limfocitákat és a citokintermelést, serkentik a T sejtek és neutrofilek kemotaxisát (Keeble és *mtsai*. 2004). Fokozzák a hisztamin és szerotonin felszabadulását a hízósejtekből, mely pozitív feedback mechanizmussal növeli a szenzoros idegvégződésekből a neuropeptide-release-t (Szallasi és *mtsai*. 1999). Három G-protein kapcsolt tachykinin-receptort vált ismertté: Neurokinin 1-3 (NK1, NK2, NK3; Maggi 1995). Bár minden tachykinin aktiválja mindegyik receptort, az NK1-en elsősorban az SP, az NK2 receptoron az NKA, míg az NK3-on az NKB a fő endogén agonista. Ugyanakkor a hemokineket szintén potens agonisták az NK1-en is. Az NK1 receptor ubikviter expressziót mutat, de legnagyobb mértékben a neurális sejteken fordul elő (Pinto és *mtsai*. 2004).

## **A Galanin receptor 3 jelentőség neurogén gyulladásban**

A galanin egy ubikviter expressziót mutató neuropeptid. Későbbi vizsgálatok kimutatták számos rokon peptid létezését, mint pl. a galanin-rokon peptid (Galanin-Like Peptide; GALP) és splice variánsa az alarin (Lang és *mtsai*. 2015). A galanin szerepét számos életműködésben leírták, úgy mint nocicepció vagy gyulladás. A galanin és a GALP hatásait három különböző GPCR-en keresztül mediálják, (GalR1-3). A galanin potens agonista a GalR1 és GalR2 receptoron, míg a GalR3-on jóval gyengébb agonista. A GALP csak a GalR2 és GalR3 iránt mutat jelentős affinitást (Webling és *mtsai*. 2012). A GalR1 és GalR2 széleskörben megtalálható az idegrendszerben, míg a GalR3 expressziója jóval limitáltabb. Ez alapján arra következtettek, hogy az előbbi két receptor játszik elsődleges szerepet a nociceptív transzmisszióban. Nem neurális szövetekben ugyanakkor elsősorban a GalR2 és GalR3 expresszálódik. A KIR-ben mutatott csekély expressziója miatt a GalR3 jóval kevesebb figyelmet kapott a többi receptorral összehasonlítva. Azonban a GalR3 jelentősége felértékelődött amióta kiderült, hogy ez a domináns galaninerg receptor a periférián, különösen hogy a legfrissebb eredmények igazolták számos új, az előbb említetteknél jóval potensebb endogén GalR3-agonista létezését (Kim és *mtsai*. 2014).

# KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS METODIKA

## Kísérleti állatok

A kísérleteket 10-14 hím hetes PACAP, Tac1, Tacr1, és GalR3 génhianyos egereken és megfelelő vad típusú kontrolljaikon végeztük. Az emelkedő hőmérsékletű hot plate tesztekhez nőstény egereket is használtunk. A PACAP<sup>-/-</sup> egereket outbred CD1 háttéren hozták létre (*Oszakai Egyetem, Japán*). Az SP és NKA knockout (Tac1<sup>-/-</sup>) (*Liverpooli Egyetem, Egyesült Királyság*), az NK1 receptor génhianyos (Tacr1<sup>-/-</sup>) (*Bonni Egyetem, Németország*) állatokat az inbred C57Bl/6 háttéren állították elő (Helyes és mtsai. 2010). A GalR3<sup>-/-</sup> (LEXKO-230) egerek az European Mouse Mutant Archive-ből kerültek beszerzésre.

## Traumás mononeuropátia részleges ischiadicus-lekötéses modellje

Az állatok altatását követően a *nervus ischiadicus* egyharmadát unilaterálisan szorosan ligáltuk egy atraumatikus monofilamenttel (Seltzer és mtsai. 1990). Korábbi eredményeink alapján a krónikus traumás mononeuropátia ezen modellje mind megbízható, mind pedig jól megismételhető és standardizálható.

## Autoimmun artritisz K/BxN szérum transzfer modellje

A K/BxN transzgenikus kiméra egértörzsben spontán poliartritisz fejlődik ki, melyet elsősorban az autoantitestek és egyéb gyulladáshoz vezető mediátorok termelődése jellemez. Ezen egerek szérumának szisztémás transzferével egészséges egerekben is kiváltható egy súlyos, de tranzitens sokízületi gyulladás, amelyet elsősorban neutrofilek és makrofágok tartanak fenn (Korganow és mtsai. 1999). Kísérleteink során az ízületi gyulladást artritogén (K/BxN) és kontroll (BxN) szérum i.p. injekálásával váltottuk ki.

## Atópiás kontakt dermatitisz oxazolon-indukált modellje

Az oxazolon nevű allergénként viselkedő hapténnel végzett ismételt epikután szenzitizáció egy az atópiás kontakt dermatitiszhez (AKD) hasonló késői típusú hiperszenzitív reakciót vált ki egerekben. Ez egy elsősorban dendritikus sejt és T limfocita mediált gyulladás, mely együtt jár a hízósejtek aktiválásával, ill. a neutrofilek beáramlásával az érintett szövetekbe (Petersen és mtsai. 2006). Az egereket két egymást követő napon szenzitizáltuk oxazolonnal a hasi bőrfelületen, majd a tényleges gyulladást 6 nappal később a fül kenésével váltottuk ki (Bánvölgyi és mtsai. 2005).

## **Mechano és termonocicepció vizsgálata**

A mechanonociceptív küszöböt a hátsó végtag talpi bőrfelszínén mértük dinamikus plantáris eszteziométer segítségével. A termonociceptív küszöböt szintén a hátsó lábon vizsgáltuk emelkedő hőmérsékletű hot plate segítségével.

## **Motoros koordináció és kapaszkodási képesség meghatározása**

A motoros teljesítményt folyamatosan gyorsuló Rota-Rod készülékkel követtük. Az arthritiszos ízületi diszfunkciót ezen felül egy horizontális fémhálón végzett függeszkedési teszttel is vizsgáltuk.

## **A bőrvérkeringés meghatározása (lézer Doppler flowmetria)**

A hátsó végtag plantaris bőrfelszínének perfúzióját lézer Doppler imaging-gel vizsgáltuk. Az egereket altattuk, majd egy testhőmérsékletet tartó melegítőpadra helyeztük. Először néhány kontroll felvételt készítettünk mind az operált mind az intakt oldali lábról hogy meghatározzuk az alaphelyzeti keringés mértékét. Ezt követően frissen készített mustárolajjal (AITC) kentük meg mindkét oldali talpbőrt, ezzel kiváltva egy TRPA1-mediált vazodilatátor választ. A talpbőr mikrocirkulációjának mértékét ezt követően kb. 60 percig vizsgáltuk.

## **Az ízület gyulladás és ödéma súlyosságának értékelése**

Az arthritiszos folyamat súlyosságát (ez alatt értve a hiperémiát és hátsó végtagi ödémát) napi rendszerességgel értékeltük szemikvantitatív klinikai pontozással egy tizes skálán. A hátsó végtagi ödémát ezen felül pletizmotriával is vizsgáltuk.

## **Az érpermeabilitás vizsgálata *in vivo* fluoreszcens képalkotással**

Az indocyanin green (ICG) nevű fluoreszcens markerből non-ionos detergens segítségével micelláris oldatot készítettünk (Kirchherr és *mtsai*. 2009). Az ilyen módon formulált festék az érpályából csak a gyulladás miatt fokozott permeabilitású régiókban tud kilépni. Az altatott állatokat a kontrasztanyaggal i.v. injektáltuk, majd pedig az IVIS Lumina II optikai imager-rel vizsgáltuk. Néhány későbbi vizsgálat során ICG helyett IR-676-ot alkalmaztunk, mely egy előnyösebb fluorofór. Standardizált ún. Region Of Interest-eket (ROI; érdeklődésre számot tartó terület) jelöltünk ki az ízületeken, majd pedig a fluoreszcencia mértékét kvantifikáltuk.

## **Szabadgyöktermelődés *in vivo* vizsgálata**

A luminol egy kemilumineszcens vegyület, mely *in vivo* jól használható a mieloperoxidáz (MPO) enzim aktivitásának vizsgálatára. A fényreakció elsősorban H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelenlétében jön

létre, amit elsősorban az aktivált neutrofilek fagoszomális MPO-enzimeit termelnek. Így ez a módszer egy indirekt de igen szenzitív eszköz az MPO-aktivitásának noninvazív módon való *in vivo* követésére (Gross és *mtsai*. 2009). Az egerekbe a luminol oldatát i.p. adtuk, majd 10 perccel később az IVIS Lumina II készülékkel lumineszcens felvételeket készítettünk. ROI-kat jelöltünk ki az ízületek körül, a lumineszcencia mértékét pedig kvantifikáltuk.

A lucigenin szintén kemilumineszcens, ám ez a molekula elsősorban az extracelluláris szuperoxiddal reagál, amit pedig elsősorban a gyulladás során aktivált makrofágok NADPH-oxidáz enzimeit termelnek (Tseng és *mtsai*. 2012). A lucigenin oldatát szintén i.p. adtuk, majd lumineszcens képalkotást és értékelést végeztünk a korábban említett módon.

### ***In vivo* mikro-komputertomográfia (mikro-CT)**

A mikro-CT vizsgálatokat végig ugyanazon az egereken végeztük, hogy csökkentsük az esetleges interindividuális különbségek jelentette zavaró tényezőt. A bokaízületeket ismételt szkeneltük a SkyScan 1176 mikro-CT segítségével. A felvételek rekonstrukcióját követően elemeztük a csontstruktúra eltéréseit. Standard méretű ROI-kat jelöltünk ki a tibiotarzális és tarzometatarzális ízület, valamint a tibia és fibula periartikuláris régiójában. Ezekben a ROI-kban meghatároztuk a csontvolumen és csontfelszín, melyeket a standardizált ROI térfogatának %-ában fejeztünk ki (% csontvolumen és felszíni denzitás).

### **A fülbőr ödémájának vizsgálata**

A fülvastagságot mikrokaliperrel mértük a fülkagylón. A méréseket közelítőleg hasonló pozícióból végeztük az oxazon-kezelés előtt és után.

### **Szövettan**

Az arthritiszos bokaízületeket paraformaldehidben fixáltuk, dekalifikáltuk, dehidráltuk, majd paraffinba ágyasztuk. Az elkészült metszeteket Safrainin O-val festettük majd szemikvantitatív módon értékeltük. A szinoviális proliferáció és mononukleáris sejtes infiltráció mértékét 0 és 3 között pontoztuk. Az AKD-modellben az egerek füleit hematoxylin-eozinnal (HE) festettük.

### **Statisztika**

A statisztikai kiértékelést a GraphPad Prism<sup>®</sup> szoftvercsomaggal végeztük. Minden adatot az átlag és az átlag standard hibájaként fejeztünk ki. A funkcionális eredmények többségét ismételt vagy kétutas ANOVA-val értékeltük. Egyszerű összehasonlításokhoz a páratlan t-próbát alkalmaztuk. A függeszkedési tesztek logrank teszttel elemeztük. A megfigyelt különbségeket legalább  $p < 0.05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.



# CÉLOK

Kísérleteinkben három különböző peptid mediátorcsoport patofiziológiai jelentőségét vizsgáltuk. Céljaink a következők voltak:

- 1. Megvizsgálni a PACAP és Tac1 gén által kódolt tachykininek (elsősorban SP, NKA, ill. az NK1 receptor) szerepét traumás mononeuropátia egérmódeljében.** Mind a PACAP, mind pedig az SP/NKA fontos képviselői a szenzoros neuropeptidek családjának, továbbá mindkettő jelentőségét felvetették perifériás és centrális fájdalomban. A PACAP jelentős mértékben befolyásolja a nocicepciót, míg a tachykininek, de különösen az NK1 receptor a legutóbbi időkig egy ígéretes célpontnak tűnt az analgetikum-fejlesztés szempontjából. Jelen kísérleteinkkel értékelni kívántuk szerepüket a mechanikai hiperalgéziában, motoros koordinációban, ill. a perifériás vazoregulációban mind intakt, mind pedig neuropátiás körülmények között.
- 2. Tisztázni a PACAP, a Tac1 gén kódolta tachykininek, ill. az NK1 receptor szerepét reumatoid artritisz állatmodelljében.** Mivel a PACAP nem pusztán neurogén mediátor, hanem számos nem neurális sejtípusban is expresszálódik, ezért metodikák széles palettáját alkalmaztuk, hogy értékeljük funkcióját nocicepcióban, gyulladásban, ill. a neuro-vaszkuláris interakcióban. Az a tény, hogy e peptid egy saját receptorral (PAC<sub>1</sub>) rendelkezik, melyre nézve specifikus, különösen alkalmassá teszi gyógyszerfejlesztési szempontból is. A SP-NK1 receptor az első olyan neuropeptiderg jelátviteli út volt, amelynek szerepét felvetették reumatoid artritiszben. Sajnos a későbbi adatok ellentmondásosnak bizonyultak, egyes eredmények támogatják, míg mások cáfolják jelentőségét.
- 3. Értékelni a Galanin 3 receptor patofiziológiai jelentőségét gyulladásos betegségmodellekben.** A galanin gyulladásgátló és analgetikus tulajdonságai jól ismertek. Azonban kevés adat áll rendelkezésre az ezen funkcióiért felelős receptorális mechanizmusokról. Mivel a GalR3 idegi szövetekben gyengén expresszált, ezért mostanáig viszonylag kevés figyelmet kapott. A periférián, ill. különösen az erek körüli markáns jelenléte azonban azt vetette fel, hogy a galanin anti-inflammatorikus hatását közvetítő receptorok egyike lehet. Kísérleteinkben a GalR3 jelentőségét RA és AKD egérmódeljeiben vizsgáltuk.

# EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

## **1. A PACAP, Tac1 gén kódolta tachykininek, ill. az NK1 receptor szerepe traumás mononeuropátia egérmodelljében**

Mivel a PACAP és a tachykininek egyaránt megtalálhatóak peptiderg érző idegvégződéseken, ezért fő célunk e peptidek jelentőségének vizsgálata volt traumás mononeuropátia ún. Seltzer-modelljében PACAP, SP/NKA génhiányos egerek segítségével. Ezen felül az NK1 receptor szerepét szintén elemeztük. Erre azért volt szükség, mivel önmagában a Tac1 génhiányos állatokon végzett megfigyelésekből nem következtethetünk arra, hogy egy esetleges eltérést az SP vagy az NKA hiánya okozza-e.

### **Mechanikai hiperalgémia**

A *n. ischiadicus* egyharmadának szoros lekötése az érintett oldali nociceptív küszöb szignifikáns csökkenését idézte elő vad típusú állatokban. Ezzel szemben a neuropátiás hiperalgémia elhanyagolható mértékű volt a PACAP<sup>-/-</sup> állatoknál. A SP/NKA vagy NK1 receptor hiánya nem befolyásolta a mechanikai hiperalgémia mértékét.

### **Motoros koordináció és teljesítmény**

Az intakt PACAP<sup>-/-</sup> és Tac1<sup>-/-</sup> állatok gyorsuló Rota-Rod-on mért motoros teljesítménye szignifikánsan rosszabb volt vad típusú társaikénál. Ezzel szemben az NK1 receptor hiánya nem volt hatással a motoros teljesítményre. A részleges *n. ischiadicus* lekötés egyik csoportban sem befolyásolta a motoros koordinációt.

### **Talpbőr-mikrocirkuláció és neurogén vazodilatáció**

Az AITC-stimulációt követő 30-ik perctől kezdődően szignifikánsan csökkent neurogén vazodilatációt figyeltünk meg a PACAP<sup>-/-</sup> állatok talpbőrén. A Tac1<sup>-/-</sup> és Tacr1<sup>-/-</sup> egerek esetében a bazális mikrocirkuláció mindkét végtagon jelentősen csökkent volt a C57Bl/6 vad típusú állatokhoz képest, viszont a mustárolajjal kiváltott neurogén válasz hasonló volt.

Eredményeink bizonyítják, hogy: 1) A PACAP neuropátiás hiperalgémia fontos mediátora, 2) Mind a PACAP, mind a SP/NKA fontos szerepet játszanak a normál motoros koordinációban. 3) A tachykininek a bazális mikrocirkuláció fontos regulátorai, míg a PACAP szerepet játszik neurogén vazodilatációban. 4) Bár az *n. ischiadicus* kevert ideg, a részleges

lekötésével kiváltott traumás mononeuropátia tisztán szenzoros természetű (mechanikai hiperalgécia), anélkül hogy direkt hatása lenne a motoros és vaszkuláris funkciókra.

## **2. A PACAP, Tac1 gén kódolta tachykininek, és az NK1 receptor szerepe autoimmun artritisz egérmodelljében**

Az irodalmi előzményekre alapozva a PACAP, a Tac1 gén kódolta tachykininek és az NK1 receptor szerepét kívántuk vizsgálni RA K/BxN szérúm transzfer modelljében, mely legalább részben neurogén mediátoroktól és intakt perifériás innervációtól függően alakul ki, így kiválóan alkalmas a neuro-immun-vaszkuláris interakciók, komplex és klinikopatológia szempontból is releváns elrendezésben való tanulmányozására. Először funkcionális módszerek segítségével meg kívántuk határozni ezen mediátoroknak a betegség lefolyására gyakorolt hatását. Ezt követően a legígéretesebb jelölteket tovább vizsgáltuk szofisztikáltabb módszerek segítségével, különösen nagy hangsúlyt helyezve a vaszkuláris fázisra, mivel ez az a pont ahol a neuropeptiderg mechanizmusok a legerősebb befolyással bírnak.

### **Artritiszes mechanikai és termális hiperalgécia**

Az artritisz kialakulását követően szignifikáns hiperalgécia fejlődött ki a vad típusú állatokban mely a PACAP<sup>-/-</sup> egereknél nem volt tapasztalható. eredményeink alapján ebben a modellben termális hiperalgécia nem alakul ki. A Tac1 és Tacr1 génhányos állatokban a mechanikai hiperalgécia mértéke hasonló volt a vad típusú kontroll állatok értékeihez.

### **Hátsó végtagi ödéma és az ízületi gyulladás súlyossága**

Az artritiszes ödéma határozottan csökkent mértékű volt a PACAP<sup>-/-</sup> állatokban, emellett elnyújtottabb lassabb kinetikát mutatott vad típusú társaikhoz képest. A szemikvantitatív klinikai pontozás igazolta ezt a megfigyelést, a PACAP<sup>-/-</sup> egerek általában kisebb súlyossági pontszámokat mutattak. Ezzel szemben sem a Tac1, sem pedig a Tacr1 génhányos egerek nem mutattak semmilyen különbséget sem a betegség súlyossága, sem pedig a hátsó végtagi ödéma szempontjából a vad típusú C57Bl/6 egerekkel összehasonlítva.

### **Gyulladásos kapillárispermeabilitás-fokozódás**

Két nappal az artritisz indukcióját követően az ICG akkumulációja jelentősen emelkedett volt a bokaízületekben, ami jelezte a hiperémiát és fokozott permeabilitást. Ezzel szemben a PACAP-génhányos állatokban az emelkedés szignifikánsan kisebb mértékű volt.

## **Függeszkedési képesség és motoros teljesítményváltozás**

A függeszkedési teszt a kapaszkodási képesség jelentős csökkenését mutatta vad típusú állatokban, míg PACAP<sup>-/-</sup> egereknél ez nem volt megfigyelhető. A tanulási folyamat következtében a Rota-Rod-on mért motoros teljesítmény minden csoportban fokozatosan javult a kísérlet során, így a módszer alkalmatlannak bizonyult az artrisz funkcionális károsodás követésére. A Tac1 és Tacr1 génhányos egerek teljesítménye nem különbözött a vad típusú kontrolloktól.

## **Neutrofil eredetű mieloperoxidáz-aktivitás**

A biolumineszcens képalkotás azt mutatta, hogy a bokaízületi MPO-aktivitás a gyulladás hiperakut fázisában tetőzött a vad típusú állatokban (1. nap), a későbbiekben ehhez képest csökkenő tendenciát mutatott. A PACAP<sup>-/-</sup> egerekben a korai MPO-aktivitás jelentősen kisebb volt, de a 4. napra szignifikánsan megemelkedett.

## **Makrofág eredetű szuperoxid termelődés**

A vad típusú egerekben a szuperoxid-termelődés fokozatosan emelkedett az artritisz indukcióját követően, míg a PACAP<sup>-/-</sup> egerekben ez szignifikánsan alacsonyabb volt.

## **Csontelváltozások vizsgálata mikro-CT képalkotással**

A kontroll mikro-CT felvételek azt mutatták, hogy PACAP<sup>-/-</sup> egereknél a csont-architektúra intakt állapotban is eltérő. A csontvolumen/teljes volumen (BV/TV) hányados nem szignifikáns mértékben, de konzisztensen magasabb volt. Az artritiszes folyamat nem változtatta meg lényegesen a csontstruktúrát a bokaízület régiójában egyik csoportban sem. Ezzel szemben a tibia és fibula periartikuláris régiójában kiterjedt oszteofita-képződés indult meg a PACAP<sup>-/-</sup> egerekben. Ezek a csontfelrakódások, kompakt, tömör csontszövet alakultak a kísérlet végére.

## **Hisztopatológiai elváltozások az érintett ízületekben**

Négy nappal az artritisz indukcióját követően jelentős hisztológiai változások voltak megfigyelhetők az ízületek körül: 1) Irreguláris porc-csont határ, 2) Megvastagodott, gyulladásos sejtekkel beszűrt szinovium, 3) A periartikuláris kötőszövet gyulladásos sejtek általi masszív infiltrációja és mononukleáris sejtes aggregátumok megjelenése. A celluláris infiltráció hasonló, míg a szinoviális hiperplázia fokozottabb mértékű volt PACAP<sup>-/-</sup> állatokban. A 28. napra az akut gyulladás jelei visszaszorultak, de a csont-porc határ irregularitása fokozódott, a porcvastagság pedig mindkét csoportban jelentősen csökkent.

Kísérleteink fő eredménye, hogy elsőként szolgáltatunk adatot a PACAP sokrétű szerepéről RA betegségmodelljében. Adataink alapján a PACAP fokozza a vazodilatációt, plazmakiáramlást, ill. gyulladást sejtakkumulációt. Továbbá növeli a hiperalgéziát, funkcionális károsodást és szabadgyök-termelődést, míg csökkenti a kései gyulladást sejtaktivitást, szinoviális proliferációt, és patológiás csontképződést. Ezzel szemben a SP/NKA és NK1 receptor szérumszűrés modelljében betöltött szerepét eredményeink nem támasztják alá. Másik következtetésünk, hogy ez a modell alkalmasnak bizonyult az RA korai és krónikus fázisában fellépő számos különböző elváltozás *in vivo* noninvazív módszerekkel való követésére. Erre a célra módosítottunk és beállítottunk különböző képalkotó technikákat, ill. egy önkontrollos experimentális protokollt, ami segíthet a gyulladást és degeneratív ízületi betegségek patomechanizmusának feltárásában.

### **3. A Galanin receptor 3 szerepe autoimmun artritisz és atópiás kontakt dermatitisz egérmódeljében**

A korábbi eredmények igazolták, hogy a galanin gyulladásgátló és antiödémás hatást fejt ki gyulladást állatmodelljeiben (Lang és *mtsai*. 2011). Mivel a periférián a GalR3 az egyik fő galaninerg receptor, így felvetődött esetleges szerepe ezeknek a gyulladásgátló hatásoknak a mediálásában (Schmidhuber és *mtsai*. 2009). Ezek alapján célunk volt megvizsgálni a GalR3 szerepét immun-mediált gyulladást betegségek egérmódeljében, különös hangsúlyt helyezve az ödéma kialakulására és a gyulladást sejtaktivitásra. Erre a célra RA K/BxN szérumszűrés modelljét és AKD oxazolon-módeljét alkalmaztuk.

#### **Artritisz súlyossága, mechanikai hiperalgézia, az ízületi funkció változása**

A klinikai súlyossági score és a pletizmometria egyaránt azt mutatta, hogy a GalR3<sup>-/-</sup> állatokban a betegség gyorsult ütemben alakul ki egészen az artritisz-indukciót követő 6. napig. Ugyanakkor a maximális score-értékek a vad típusú állatokban is hasonlóak voltak. Jelentős mechanociceptív küszöbcsökkenés is megfigyelhető volt mindkét csoportban. Az ízületi diszfunkció tekintetében szintén nem volt megfigyelhető különbség.

#### **Plazmakiáramlás és MPO-aktivitás az érintett ízületekben**

A plazmakiáramlás mértéke jelentősen nagyobb volt GalR3<sup>-/-</sup> egerek esetében az első napon mint vad típusú kontrolljaikban, de ez a szignifikáns különbség az 5. napra megszűnt. Az

MPO-aktivitás mindkét csoportban a gyulladás hiperakut fázisában tetőzött, anélkül hogy eltérés lett volna a csoportok között megfigyelhető.

### **Az érintett ízületek hisztológiai vizsgálata**

A 14. napon vett szövettani minták vizsgálata elsősorban a krónikus artritiszre jellemző elváltozásokat mutatta. A szinovium kiszélesedett, míg az intakt állapotban zsírsejtgazdag kötőszövet egy fibroblasztosan transzformált hegszövetté alakult, kisszámú gyulladásos sejt jelenléte mellett. Ebből a szempontból nem figyeltünk meg különbséget a csoportok között, ami egybevág a betegség késői fázisában hiányzó funkcionális különbséggel.

### **Fülbőr ödémája, MPO-aktivitás, plazma-extravazáció, és hisztológia**

Az oxazonon kenését követően jelentős mértékű fülvastagság-növekedés volt megfigyelhető mindkét csoportban, ami 24 óránál tetőzött. Az MPO-aktivitás és érpermeabilitás szintén drámaian emelkedett volt 24 óránál, azonban a génhányos állatok ebből a szempontból sem mutattak eltérést. A szövettani vizsgálat igazolta a kötőszövet jelentős kiszélesedését, a gyulladásos sejtinfiltrációt, ill. a fül erezetének dilatációját. Ezen felül jelentős mennyiségű exszudátum volt megfigyelhető a szubkutisz és a fül porcos váza között.

Eredményeink azt mutatják, hogy a GalR3 endogén protektív mechanizmusok mediátora neurogén érválaszok által facilitált ízületi gyulladásban. Azonban a legfrissebb kutatási eredményeket is figyelembe véve ez nem feltétlenül a galanin hatásának köszönhető (Kim és *mtsai*. 2014). Az, hogy a neutrofil-eredetű MPO-aktivásban nem találtunk különbséget arra enged következtetni, hogy a génhányos állatokban megfigyelt fokozott gyulladásos reakció teljes egészében a fokozott vaszkuláris válasz, nem pedig a GalR3 leukocitákra gyakorolt direkt hatásának következménye. Az AKD-modellben hiányzó különbség arra utal, hogy a GalR3-mediált antiödémás hatás csak akkor alakul ki, ha a betegség kezdeti fázisában a neurogén komponensnek jelentős szerepe van. Véleményünk szerint a gyulladásos mikroenvironment kialakulási módja a döntő különbség eközött a két modell közt. A szérum transzfer artritiszben egy nagyon korai neurogén permeabilitás-fokozódás tapasztalható az ízületek környezetében (Stangenberg és *mtsai*. 2014), ami lehetővé teszi a gyulladásos sejtek kiáramlását. Ezzel szemben az oxazonon-modellt a lokálisan jelen lévő dendritikus ill. T sejtek indukálják, az érpermeabilitás-fokozódás és leukocita-kiáramlás csak később, áttételesen jön létre (Petersen és *mtsai*. 2006). Így a GalR3-mediált antiödémás hatás feltételezhetően nem befolyásolja érdemben a betegség lefolyását.

## ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KONKLÚZIÓK

Eredményeink számos peptiderg mediátor szerepét igazolták fájdalomban és gyulladás kialakulásában *in vivo* betegségmodellekben:

1. A PACAP pronociceptív nemcsak perifériás neuropátiában, de autoimmun artritiszben is.
2. A PACAP és az SP/NKA egyaránt szerepet játszik motoros koordinációban.
3. A PACAP a neurogén vazodilatáció kulcsmediátora, míg az SP/NKA és az NK1 receptor a normál értónus fenntartásában tűnnek jelentősebb tényezőnek.
4. A PACAP komplex módon befolyásolja az artritisz kialakulását: fokozza a kapillárispermeabilitást, hiperémiát, ill. ödémát.
5. A PACAP fokozza a korai neutrofil-akkumulációt azáltal hogy facilitálja az erekből való kiáramlásukat, ugyanakkor a gyulladás későbbi fázisában csökkent az aktivitásukat. Ezzel szemben növeli a makrofág-aktivitást és szuperoxidtermelést, de csökkenti a gyulladás által indukált patológiás csontátépülést és szinoviális degenerációt.
6. SP/NKA vagy NK1 receptor génhiányos egerekben a szérum-transzfer artritisz lefolyása nem mutat eltérő képet, ami arra utal, hogy ezek a jelátviteli utak döntő jelentőségűek, vagy pedig endogén bypass-mechanizmusok miatt megkerülhetőek.
7. A GalR3 jelentős antiödémás hatásokat mediál neurogén módon triggerelt gyulladásban, de nincs szerepe a nociceptív transzmisszióban és a gyulladásos sejtaktivációra sincs közvetlen hatással. Így a GalR3 endogén agonistái a neurogén gyulladás regulátoraként fontos védő szerepet tölthetnek be.

# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek Dr. Helyes Zsuzsannának, több mint 6 évvel ezelőtti napon diákkörösének fogadott és megismertette velem a kutatómunka világát. Köszönöm Dr. Pintér Erikának hogy az ő általa vezetett doktori iskolában és Intézetben végezhettem munkámat. Köszönettel tartozom Dr. Szolcsányi János professzornak a kutatócsoport megalapítójának és Dr. Barthó Loránd professzornak az Intézet korábbi vezetőjének.

Szeretném megköszönni a kutatócsoport összes tagjának az elmúlt években mind technikai mind pedig elméleti problémák megoldásában nyújtott segítségét, ill. hasznos szakmai tanácsaikat. Köszönöm a kísérletekben nyújtott segítségét Bölcskei Katának, Kemény Ágnesnek, Borbély Évának, Tékus Valériának. ill. Hajna Zsófiának.

Köszönöm az asszisztensek és technikus munkatársak, így Perkecz Anikó, Ömböli Dóra, Szentes Nikolett, és Kiss Tamás a kísérletekben nyújtott hasznos segítségét.

Köszönet illeti kollaborátorainkat dr. Kereskai Lászlót, Dr. Reglődi Dórát, Dr. Mócsai Attilát, dr. Barbara Koflert, és Dr. Kollár Lászlót értékes tanácsaikért, ill. a kutatáshoz szükséges anyagok és génhiányos állattörzsek rendelkezésünkre bocsátásáért.

Szeretném hálámat kifejezni korábbi kollégáimnak (Elekes Krisztián) és egykori diákkörös társamnak (Imreh András) emlékezve jó hangulatban együtt töltött időkre.

Továbbá köszönettel tartozom Intézetünk valamennyi munkatársának.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni párom, szüleim, családom, ill. barátaim támogatását, bátorítását és szeretetét.



# IRODALOM

- Bánvölgyi Á**, és mtsai.. Evidence for a novel protective role of the vanilloid TRPV1 receptor in a cutaneous contact allergic dermatitis model. *J Neuroimmunol.* 2005;169:86-96.
- Bölcskei K**, és mtsai.. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain.* 2005 Oct;117:368-76.
- Brain SD.** Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology.* 1997;37:133-52.
- Caceres AI**, és mtsai. A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:9099-104.
- Caterina MJ**, és mtsai. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389:816-824.
- Delgado M**, és mtsai. PACAP in immunity and inflammation *Ann N Y Acad Sci.* 2003;992:141-57.
- Gross S**, és mtsai. Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo. *Nat Med.* 2009;15:455-61.
- Helyes Z**, és mtsai. 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 Rheum.* 2004;50:1677-85.
- Helyes Z**, és mtsai. Involvement of preprotachykinin A gene-encoded peptides and the neurokinin 1 receptor in endotoxin-induced murine airway inflammation. *Neuropeptides* 2010;44:399-406.
- Jancsó M.** Role of nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. *Bull. Millard Fillmore Hosp. Buffalo N.Y.* 1960. 7:53-77
- Jancsó M**, és mtsai. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother* 1967;31:138-151.
- Keeble JE**, és mtsai. A role for substance P in arthritis? *Neurosci Lett.* 2004;361:176-9.
- Kim DK**, és mtsai. Coevolution of the spexin/galanin/kisspeptin family: Spexin activates galanin receptor type II and III. *Endocrinology.* 2014. 155: 1864-1873.
- Kim Y**, és mtsai. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 27 is a functional ligand for formyl peptide receptor-like 1. *J Immunol.* 2006;176:2969-75.
- Kirchherr AK**, és mtsai. Stabilization of indocyanine green by encapsulation within micellar systems. *Mol Pharm.* 2009;6:480-91.
- Korganow AS**, és mtsai.. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity.* 1999;10:451-61.
- Laburthe M**, és mtsai.. Class II G-protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 2007;28:1631-9.
- Lang R**, és mtsai.. The galanin peptide family in inflammation. *Neuropeptides.* 2011. 45: 1-8.
- Lang R**, és mtsai. Physiology, Signaling, and Pharmacology of Galanin Peptides and Receptors: Three Decades of Emerging Diversity. *Pharmacol Rev.* 2015;67:118-175.
- Levine JD**, és mtsai. The contribution of neurogenic inflammation in experimental arthritis. *J Immunol.* 1985;135:843-847.
- Maggi CA**, és mtsai. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol.* 1988;19:1-43.
- Maggi CA.** The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol* 1995;26:911-44.
- Nilius B**, és mtsai. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 2011;12:218.
- Page NM.** New challenges in the study of the mammalian tachykinins. *Peptides* 2005;26:1356-68.
- Petersen TK.** In vivo pharmacological disease models for psoriasis and atopic dermatitis in drug discovery. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006. 99 :104-15.
- Pinto FM**, és mtsai. mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *Eur J Pharmacol* 2004;494:233-9.
- Pozsgai G**, és mtsai. Evidence for the pathophysiological relevance of TRPA1 receptors in the cardiovascular system in vivo. *Cardiovasc Res.* 2010;87:760-8.
- Schmidhuber SM**, és mtsai. Evidence that the modulatory effect of galanin on inflammatory edema formation is mediated by the galanin receptor 3 in the murine microvasculature. *J Mol Neurosci.* 2009. 37: 177-181.
- Seltzer Z**, és mtsai. A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990;43:205-18.
- Stangenberg L**, és mtsai. Denervation protects limbs from inflammatory arthritis via an impact on the microvasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:11419-24.
- Szallasi A**, és mtsai. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 1999;51:159-212.
- Szolcsányi J.** Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides* 2004;38:377-384.
- Tominaga M**, et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998;21:531-543.
- Vaudry D**, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 2009;61:283-357.
- Webling KE**, et al. Galanin receptors and ligands. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:146.

# PUBLIKÁCIÓS LISTA

## Az értekezés alapjául szolgáló eredeti közlemények:

*Role of Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide and Tac1 gene derived tachykinins in sensory, motor and vascular functions under normal and neuropathic conditions.* **Botz B**, Imreh A, Sándor K, Elekes K, Szolcsányi J, Reglődi D, Quinn JP, Stewart J, Zimmer A, Hashimoto H, Helyes Z. *Peptides*. 2013 13;43:105-112. **(IF: 2.614)**

*Differential regulatory role of Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide in the serum-transfer-induced arthritis model.* **Botz B**, Bölcskei K, Kereskai L, Kovács M, Németh T, Szigeti K, Horváth I, Máthé D, Kovács N, Hashimoto H, Reglődi D, Szolcsányi J, Pintér E, Mócsai A, Helyes Z. *Arthritis Rheumatol*. 2014 66;10:2739-2750. **(IF: 7.477\*)**

*A role for galanin receptor 3 in reducing murine autoimmune arthritis, but not contact dermatitis.* **Botz B**, Kemény Á, Brunner S, Janka C, Mócsai A, Pintér E, McDougall JJ, Kofler B, Helyes Z (manuscript under review)

*Capsaicin-sensitive sensory nerves exert important protective functions in the serum transfer arthritis model of the mouse.* Borbély É, **Botz B**, Bölcskei K, Kenyér T, Kereskai L, Kiss T, Szolcsányi J, Pintér E, Csepregi J, Mócsai A, Helyes Z. (co-first author) *Brain Behav. Immun*. 2014 Dec 15. doi: 10.1016/j.bbi.2014.12.012. [Epub ahead of print] **(IF: 5.813\*)** (A közlemény felerészben alapja a jelen munkának)

## Egyéb teljes közlemények:

*Hydrophobic cyanine dye-doped micelles for optical in vivo imaging of plasma leakage and vascular disruption.* **Botz B**, Bölcskei K, Kemény Á, Sándor Z, Tékus V, Sétáló G Jr, Csepregi J, Mócsai A, Pintér E, Kollár L, Helyes Z. *J Biomed Opt*. 2015;20(1):16022. **(IF: 2.945\*)**

*Role of Pituitary Adenylate-Cyclase-Activating Polypeptide in nociception and migraine.* Tuka B, Tajti J, **Botz B**, Helyes Z, Vécsei L. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. [article in press] **(IF: 3.298\*)**

*Hemokinin-1 is an important mediator of endotoxin-induced acute airway inflammation in the mouse.* Hajna Z, Borbély É, Kemény Á, **Botz B**, Kereskai L, Szolcsányi J, Pintér E, Paige CJ, Berger A, Helyes Z. *Peptides* 2014 Dec 22 [Epub ahead of print] **(IF: 2.552\*)**

*Hck, Fgr and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory milieu without a direct role in leukocyte recruitment.* Kovács M, Németh T, Jakus Z, Sitaru C, Simon E, Futosi K, **Botz B**, Helyes Z, Lowell CA, Mócsai A. *J Exp Med* 2014 211:1993-2011 **(IF: 14.1\*)**

*The selective PAC1 receptor agonist maxadilan inhibits neurogenic vasodilation and edema formation in the mouse skin.* Banki E, Hajna Z, Kemény A, **Botz B**, Nagy P, Bölcskei K, Toth G, Reglodi D, Helyes Z. *Neuropharmacology*. 2014 Oct;85:538-47. **(IF: 4.386\*)**

*Impaired nocifensive behaviours and mechanical hyperalgesia, but enhanced thermal allodynia in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice.* Sándor K, Kormos V, **Botz B**, Imreh A, Bölcskei K,

Gaszner B, Markovics A, Szolcsányi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D, Helyes Z. *Neuropeptides*. 2010 44:363-71. (IF: 1.917)

*Current approaches in the treatment of neuropathic and phantom limb pain*. Helyes Zs, **Botz B** (e-könyv fejezet)

(\*5 éves impakt faktor)

**A közlemények összesített impakt faktora idézhető absztraktok nélkül: 45.102**

**Hivatkozások száma: 30**

**Független hivatkozások száma: 13**

### **Az értekezés alapját képező konferencia-prezentációk:**

*A galanin 3 receptor szerepének vizsgálata reumatoid artritisz és atópiás kontakt dermatitisz egérmodelljeiben*. **Botz B**, Kemény Á, Csepregi J, Mócsai A, Locker F, Brunner S, Kofler B, Pintér E, Helyes Z A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának IX. szimpóziuma (March 26-28, 2015, Velence)

*A kapszaicin-érzékeny érző idegvégződések komplex szabályozó szerepe reumatoid artritisz egérmodelljében* **Botz B**, Borbély É, Kenyér T, Bölcskei K, Csepregi J, Mócsai A, Kereskai L, Z Helyes. (III. Pécs-Oklahoma Symposium (POS) December 18, 2014, Pécs)

*Peptidergic sensory nerves exert important regulatory role in experimental immune arthritis*. **Botz B**, Borbély É, Kenyér T, Bölcskei K, Csepregi J, Mócsai A, Kereskai L, Z Helyes. (The 11th International Medical Postgraduate Conference November 27–28, Hradec Králové, Czech Republic)

*Peptidergic sensory nerves are important regulators in experimental immune arthritis* **Botz B**, .Borbély É, Kenyér T, Bölcskei K, Kiss T, Németh T, Kovács M, Mócsai A, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z. (8th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection, September 24-26, 2014, Budapest)

*The immunoregulatory role of galanin receptor 3 in experimental arthritis* **Botz B**, Kovács M, Németh T, Mócsai A, Brunner S, Kofler B, Pintér E, Helyes Z (20th international Symposium on Regulatory Peptides (REGPEP 2014), September 7-10, 2014, Kyoto, Japan)

*Peptidergic sensory nerves play an important regulatory role in murine immune arthritis* **Botz B**, Borbély E, Kenyér T, Bölcskei K, Kiss T, Németh T, Kovács M, Mócsai A, Kereskai L, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z (20th international Symposium on Regulatory Peptides (REGPEP 2014), September 7-10, 2014, Kyoto, Japan)

*Evidence for the involvement of galanin receptor 3 in an inflammatory arthritis model of the mouse* **Botz B**, Kovács M, Németh T, Mócsai A, Brunner S, Kofler B, Pintér E, Helyes Z. (Joint meeting of FEPS and the Hungarian Physiological Society, Budapest, Hungary, August 27-30, 2014.)

*Neuro-immun interakciók szerepének vizsgálata reumatoid artritisz mechanizmus-modelljében* **Botz B** (Nemzeti Kiválóság Program a Pécsi Tudományegyetemen, March 20., 2014, Pécs)

*Divergent roles of PACAP in nociception and inflammation in the serum transfer arthritis model of the mouse*

**Botz B**, Kovács M, Horváth I, Szigeti K, Máthé D, Hashimoto H, Reglődi D, Németh T, Mócsai A, Helyes Z  
(*Semmelweis Symposium 2013, November 7-9. 2013, Budapest*)

*Role of capsaicin-sensitive peptidergic sensory nerves in collagen antibody-induced arthritis* **Botz B**, Borbély É, Szabadfi K, Kiss T, Szolcsányi J, Helyes Z (*Neuroinflammation Satellite Symposium of the FENS meeting Prague, Czech Republic, September 8-11., 2013*)

*Roles of Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) in nociception and inflammation in an immune mediated arthritis model* **Botz B**, Horvath I, Szigeti K, Veres D, Mathe D, Hashimoto H, Reglodi D, Nemeth T, Kovacs M, Mocsai A, Helyes Zs (*The 11th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, August 27-31. 2013, Pécs*)

*The role of PACAP and Tac1 gene derived tachykinins in a mouse model of traumatic mononeuropathy* **Botz B**, Imreh A, Sandor K, Elekes K, Reglodi D, Quinn JP, Stewart J, Zimmer A, Hashimoto H, Szolcsanyi J, Helyes Zs (*The 11th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, August 27-31. 2013, Pécs*)

*Investigation of the role of capsaicin-sensitive sensory nerves in a mouse polyarthritis model using in vivo imaging techniques* **Botz B**, Borbély É, Bölcskei K, Nagy P, Németh T, Kovács M, Mócsai A, Szolcsányi J, Helyes Z (*From Medicine to Bionics – 1st International PhD. conference, June 13-15. 2013, Budapest*)

*A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) gyulladá- és fájdalomkeltő szerepe K/BxN szérumsztransfer arthritis egérmodellben* **Botz B**, Horváth I, Szigeti K, Veres D, Máthé D, Hitoshi H, Reglődi D, Németh T, Mócsai A, Helyes Z (*A Magyar Élettani, Farmakológiai, és Mikrocirkulációs Társaságok 2013. évi közös kongresszusa, June 05-08. 2013, Budapest*)

*Pro-inflammatory and pro-nociceptive roles of Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) in a serum transfer arthritis mouse model* **Botz B**, Horváth I, Szigeti K, Veres D, Máthé D, Hashimoto H, Reglődi D, Németh T, Kovács M, Mócsai A, Helyes Z (*Neuropeptides 2013 conference May 29.- June 01. 2013, Gdynia, Poland*)

*Role of Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide and Tac1 gene derived tachykinins in sensory, motoric and vascular functions under normal and neuropathic conditions.* **Botz B**, Imreh A, Sándor K, Elekes K, Szolcsányi J, Reglődi D, Quinn JP, Stewart J, Zimmer A, Helyes Z. (*XIVth Conference of the Hungarian Neuroscience Society January 17-19. 2013, Budapest, Hungary*)

*Investigating the role of Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide in a mouse model of traumatic mononeuropathy* **Botz B**, Imreh A, Helyes Z (*8th international Biomedical Croatian Student Summit, May 28-31. 2012, Zagreb, Croatia*)

*Investigating the role of Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide in a mouse model of traumatic mononeuropathy – possible new therapeutic perspectives.* **Botz B**, Imreh A, Elekes K, Szőke É, Sándor K, Reglődi D, Pintér E, Szolcsányi J, Hashimoto H, Helyes Z (*Amerikai Magyar Orvosszövetség (HMAA Hungary Chapter) Balatonfüredi éves konferenciája August 19-20. 2011, Balatonfüred.*)

*Investigating the role of tachykinins in sensory, motor and vascular functions under normal and neuropathic conditions. Botz B, Imreh A, Elekes K, Quinn JP, Szolcsányi J, Helyes Z (A Farmakológus, Anatómus, Mikrocirkulációs, Élettani társaságok 2011. évi közös tudományos konferenciája, June 8-11. 2011, Pécs)*

*Hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) génhiányos egerek szenzoros és motoros funkcióinak vizsgálata normál és neuropátiás körülmények között. Botz B, Imreh A (A Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXXIV. Vándorgyűlése és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság (MFT) II. közös tudományos konferenciája, June 16-18. 2010, Szeged)*

*A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés komplex szabályozó szerepe szérumszintézis arthritisszerű egérmódeljében Helyes Z, Borbély É, Botz B, Mócsai A, Németh T, Kovács M, Kereskai L, Bölcskei K, Pintér E, Kenyér T, Szolcsányi J (Erdélyi Múzeum-Egyesület, Orvos- és Gyógyszerésztudományi Szakosztály, XXIV. Tudományos Ülésszak, Marosvásárhely, April 24-26. 2014, Marosvásárhely)*

*Complex regulatory role of capsaicin-sensitive peptidergic nerves in the serum-transfer arthritis model Helyes Z, Borbély É, Botz B, Kenyér T, Kiss T, Németh T, Mócsai A, Pintér E, Szolcsányi J (11th World Congress on Inflammation, September 21-25. 2013, Natal, Brazil)*

*Role of the capsaicin-sensitive sensory nerves in autoantibody-induced arthritis of the mouse Borbély É, Botz B, Kenyér T, Kiss T, Pintér E, Szolcsányi J, Kovács M, Németh T, Mócsai A, Helyes Z (Neuropeptides 2013 conference May 29.- June 01.2013 Gdynia, Poland)*

*A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés szerepének vizsgálata immunarthritisszerű egérmódeljében Borbély É, Botz B, Kiss T, Pintér E, Szolcsányi J, Németh T, Mócsai A, Helyes Z (A Magyar Élettani, Farmakológiai, és Mikrocirkulációs Társaságok 2013. évi közös kongresszusa, June 05-08. 2013, Budapest)*

### **Egyéb konferencia-prezentációk:**

*Development and characterization of a novel murine passive-transfer-trauma model for Complex Regional Pain Syndrome (CRPS). Tékus V, Botz B, Szentés N, Hajna Z, Borbély É, Scheich B, Szőke É, Thompson V, Goebel A, Helyes Z (15th Biannual Conference of the Hungarian Neuroscience Society, January 22-23, 2015, Budapest, Hungary)*

*Fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő gyógyszerek hatásának állatkísérletes vizsgálata Botz B (Agykutatás hete programsorozat, March 12. 2013, Pécs)*

*Role of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) ion channel in the acute and chronic inflammatory pain models using gene-deficient mice Tékus V, Horváth Á, Botz B, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z (Joint meeting of FEPS and the Hungarian Physiological Society, Budapest, Hungary, August 27-30., 2014.)*

*The influence of the neuropeptide galanin on the immune system Kofler B, Brunner S, Locker F, Koller A, Bianchini R, Lang A, Wiesmayr S, McDougall J, Botz B, Szitter I, Helyes Z (The 2nd International meeting on Nerve-driven immunity, Neurotransmitters and Neuropeptides In The Immune System and In Neuroimmune Dialogues, August 20-21., 2014. Nobel Forum, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden)*

*Src-family kinases in neutrophils are required for creating an inflammatory environment in autoimmune arthritis* Kovács M, Simon E, Németh T, Jakus Z, **Botz B**, Zs. Helyes, Lowell CA., Mócsai A (*Semmelweis Symposium 2013, November 7-9. 2013, Budapest*)

*Investigation of the role of capsaicin-sensitive sensory nerves in murine autoantibody-induced arthritis* Borbély É, **Botz B**, Kenyér T, Kiss T, Pintér E, Szolcsányi J, Kovács M, Németh T, Mócsai A, Helyes Z (*Semmelweis Symposium 2013, November 7-9. 2013, Budapest*)

*Capsaicin-sensitive sensory nerves play an important role in murine autoantibody-induced arthritis* Borbély É, **Botz B**, Kenyér T, Kiss T, Pintér E, Szolcsányi J, Németh T, Mócsai A, Helyes Z (*Neuroinflammation satellite symposium of the FENS meeting September 8-11., 2013, Prague, Czech Republic*)

*Role of capsaicin-sensitive afferents and sensory-immune interactions in arthritis* Helyes Z, Borbély É, **Botz B**, Tékus V, Hajna Z, Sándor K, Markovics A, Pintér E, Szolcsányi J, Quinn JP, Berger A, McDougall JJ (*Neuroinflammation satellite symposium of the FENS meeting September 8-11., 2013, Prague, Czech Republic*)

*A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerepének vizsgálata egér fájdalom-modellekben.* Helyes Z, Markovics A, Sándor K, Kormos V, Gaszner B, Szőke É, **Botz B**, Imreh A, Pintér E, Szolcsányi J, Hashimoto H, Reglődi D (*A Farmakológus, Anatómus, Mikrocirkulációs, Élettani társaságok 2011. évi közös tudományos konferenciája, Pécs June 08-11. 2011, Pécs*)

*Role of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the nitroglycerin-induced migraine model of the mouse.* Markovics A, Sandor K, Szoke E, Kormos V, **Botz B**, Imreh A, Gaszner B, Reglodi D, Baba A, Tajti J, Szolcsanyi J, Helyes Z (*16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology July 17-23. 2010, Copenhagen, Denmark*)

*Role of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in nocifensive behaviours, inflammatory and neuropathic hyperalgesia.* Sandor K, Kormos V, **Botz B**, Imreh A, Bölcskei K, Gaszner B, Reglodi D, Szolcsanyi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Helyes Z (*16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology July 17-23. 2010, Copenhagen, Denmark*)

*Role of Pituitary Adenylate Cyclase- Activating Polypeptide in nociceptive processes: behavioural and immunohistochemical studies.* Sándor K, Kormos V, Imreh A, **Botz B**, Bölcskei K, Gaszner B, Reglődi D, Szolcsányi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Helyes Z: (*IBRO International Workshop January 21-23. 2010, Pécs, Hungary*)

*Role of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide in mouse models of nocifensive behaviours and hyperalgesia.* Helyes Z, Sándor K, Kormos V, **Botz B**, Imreh A, Bölcskei K, Szolcsányi J, Norihito S, Hashimoto H, Baba A, Reglődi D (*Poster presentation at the 12th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society (HNS) January 22-24., 2009 - Budapest*)

*Impaired nocifensive behaviours and mechanical hyperalgesia, but enhanced thermal hyperalgesia in pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide deficient mice* Sándor K, Kormos V, **Botz B**, Imreh A, Bölcskei K, Reglődi D, Szolcsányi J, Hashimoto H, Baba A, Helyes Z (*Winter Neuropeptide Conference 2009, January 31. – February 3. 2009 Breckenridge, Colorado, USA*)