

BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS, A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés hármas funkciója

A kapszaicinre érzékeny, Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1-et (TRPV1) expresszáló érzőideg-végzések hármas funkcióval rendelkeznek: afferens, valamint lokális és szisztémás efferens funkciójuk is van. A klasszikus afferens működés során a kapszaicinnal vagy egyéb stimulánssal izgatott szenzoros idegvégzések a központi idegrendszer felé közvetítenek idegaktivitást, ennek következtében alakul ki a fájdalomérzet, a nocicepció. Emellett az aktivált perifériás idegvégződésből neurotranszmitterek szabadulnak fel, amelyek vazodilatációt okoznak. Ilyen mediátor a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), mely értágulatot vált ki, illetve a tachikininek, például a P-anyag (substance P, SP) vagy a neurokinin A (NKA), melyek plazmafehérje-kiáramlást idéznek elő és aktiválják a gyulladásos sejteket. Ez adja a lokális efferens funkciót [61,116], aminek következtében kialakul a neurogén gyulladás [39,115]. A neurogén gyulladásnak jelentős szerepet tulajdonítanak számos betegség patomechanizmusában, például a reumatoid arthritisz, asztma bronchiale, pszoriázis, ekcéma, kontakt dermatitisz, gyulladásos bélbetegségek és gyulladásos szembetegségek esetén [60,114]. Jelenleg nincs forgalomban egyetlen olyan gyógyszercsoport készítménye sem, ami hatékonyan tudná gátolni egy gyulladással járó betegség neurogén komponensét [39].

Az intézet kutatócsoportjának munkája során derült fény arra, hogy ugyanezen aktivált szenzoros idegvégzések közül az előzőekben felsorolt gyulladáskeltő neuropeptideken kívül szomatosztatin is felszabadul, amely a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatásokkal rendelkezik. Ez az érző idegvégzések harmadik, szisztémás efferens funkciója [38,41,111,112], amit az endokrin és parakrin hatás mintájára Szolcsányi professzor szenzokrin hatásnak nevezett el [110].

Szenzoros neuropeptidok

1. Fájdalom- és gyulladáskeltő hatású neuropeptidok

A kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronokból stimulálás hatására felszabaduló neuropeptidok egyik csoportja a **tachikininek**. Ide sorolható a neurokinin A, a neurokinin B (NKB), és a P-anyag. Élettani hatásukat G-proteinhez kapcsolt neurokinin receptorokon fejtik ki, amiket NK₁, NK₂ és NK₃ receptor névvel illetünk. A P-anyag érpermeabilitást fokozó hatását az NK₁ receptoron keresztül fejt ki, ami főként a posztkapilláris venulák falán, makrofágok és limfociták membránján, polimorfonukleáris sejteken, hízósejteken található meg [11,80,89]. Ezekből adódóan plazmaprotein-kiáramlást vált ki és hatással van a limfociták proliferációjára, a hízósejt aktivációjára, a T-sejt kemotaxisára, a neutrofil granulociták akkumulációjára is [29]. Az NKA főként simaizom-kontrakciót vált ki, erőteljes plazmafehérje-kiáramlást idéz elő, valamint gyulladásos sejteket – neutrofil granulocitákat, limfocitákat, makrofágokat - stimulál az NK₂ receptoron keresztül [17] főként a periférián, de a központi idegrendszerben is. Az NKB-t megkötő NK₃ receptor pedig főként a központi idegrendszerben, valamint perifériás idegvégzésekben fordul elő [27,63].

A 37 aminosavból álló **kalcitonin gén-rokon peptid** (CGRP) felfedezése Amara és munkatársai nevéhez fűződik [2]. Egymástól kevésbé eltérő két formája az α CGRP és a β CGRP, melyek biológiai hatásukat G_s-fehérjéhez kapcsoltnak működő CGRP₁ és CGRP₂ receptorokon fejtik ki [66,73,124]. A CGRP egy családba sorolható a kalcitoninnal, az amilinnal és az adrenomedullinnal [85]. Erős vazodilatátor hatással rendelkezik, ami főképp a CGRP₁ receptoron keresztül valósul meg. A CGRP fokozza ugyanis az adenilát-cikláz aktivitást, aminek következtében intracellulárisan megnő a cAMP mennyisége, ami aktiválja a protein kináz A-t, aminek hatására megnyílnak az ATP-függő K⁺-csatornák. A folyamat eredménye az érsimaizom relaxációja [23,32,46]. Neurogén gyulladásban az érpermeabilitás fokozását azonban nem közvetlenül, hanem a P-anyag működésének befolyásolásával fejt ki [10]. Emellett komplex immunmodulátor funkciója van, csökkenti a proinflammatorikus citokinek termelődését, fokozza az antinociceptív interleukin-10 (IL-10) felszabadulását makrofágból, stimulálja a granulocita akkumulációt [4].

2. Fájdalom- és gyulladásgátló hatású neuropeptidok

A **szomatosztatin**, vagy más néven szomatotropin (growth hormone, GH) felszabadulását gátló faktor (somatotropine release inhibitory factor, SRIF), 14 illetve 28 aminosavból álló ciklikus peptid formában fordul elő a szervezetben [9]. Megtalálható a központi és a perifériás idegrendszerben [79,90], a gasztrointesztinális traktusban, a hasnyálmirigyben, a vesében, a mellékvesében, a pajzsmirigyben, gyulladásosejtekben, ivarszervekben [42,91,122]. A szomatosztatin gátló hatást gyakorol számos endokrin hormon szekréciójára, a gasztrointesztinális motilitásra, az emésztőnedv termelésére, tumorsejtek proliferációjára. Szerepet játszik továbbá kognitív funkciókban, jelentőségét számos pszichiátriai és neurológiai kórképben igazolták [128].

Élettani hatásait saját receptoraihoz kötve fejti ki. Eddig öt G_i -proteinhez kapcsolt szomatosztatin receptor altípust klónoztak egérben, patkányban, illetve emberben, amiket rendre $ss1_1$, $ss2_2$, $ss3_3$, $ss4_4$ és $ss5_5$ névvel illették [81]. Ezt az öt sst receptor altípust két csoportra lehet osztani: a SRIF1 csoporthoz tartoznak az $ss2_2$, $ss3_3$ és $ss5_5$ receptorok, míg a SRIF2 csoportba soroljuk az $ss1_1$ és $ss4_4$ receptorokat [45,82]. Az irodalom szerint az endokrin hatást a SRIF1 csoportba tartozó receptor altípusok közvetítik [87]. Elsősorban munkacsoportunk eredményei azt mutatják, hogy a fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatás a másik csoporthoz, vagyis az $ss1_1$ és $ss4_4$ receptorokhoz köthető [40,82,83,110].

A hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptidet, a **PACAP**-ot (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) eredetileg birka hipotalamuszból izolálták [68]. A szekretin-glukagon-vasoaktív intesztinális peptid (VIP) család tagja [95,97,136]. Két formája létezik: a szervezetben 90%-ban előforduló 38 aminosavból álló PACAP-38, és a 27 aminosavból álló PACAP-27. Patkányban a legnagyobb koncentrációban a hipotalamuszban és a herében fordul elő [3], megtalálható ugyanakkor a központi idegrendszer többi területén és a perifériás idegrendszerben is, a hátsó gyöki ganglionok egyes szenzoros neuronjain [21,70,78]. Expresszálódik továbbá endokrin mirigyekben [67,129], az ivarszervekben [99,100], a gasztrointesztinális traktusban [33], a légzőrendszerben [69], a bőrön [75]. A PACAP rendkívül sokrétű feladatot lát el a szervezetben, szabályozza a neurotranszmitterek felszabadulását [64], értágulatot, illetve bronchodilatációt okoz, fokozza a bélmotilitást, növeli egyes hormonok koncentrációját a vérben [31], szabályozza a sejtproliférációt, az apoptózist gátolja [126]. Fiziológiai hatásait speciális receptorokhoz kötődve fejti ki. Két kötőhely típust mutattak ki PACAP- és VIP-kötő képességük alapján. Az I-es típusú kötőhelyhez a PACAP mindkét formája nagy affinitással kötődik, a VIP viszont csak alig [28,55,106]. A II-es típusú kötőhelyhez a PACAP és a vasoaktív intesztinális peptid is hasonló affinitással kötődik, ezen belül viszont két altípust is elkülönítenek, a szekretinhez való affinitás szerint [121,127]. A receptorokat később a kötőhelyek szerkezete alapján klónozták és rendre PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptornak nevezték el [34].

Nocicepció, hiperalgézia, allodinia, fájdalom

A Nemzetközi Fájdalom Társaság meghatározása szerint a nociceptív **fájdalom** olyan pszichofiziológiai jelenség, szubjektív érzéskvalitás, amelynek két jól definiálható komponense különíthető el. Neurobiológiai eleme a **nocicepció** (a fájdalmas stimulus percepciója, szenzoros tapasztalat), ami állatkísérletesen is vizsgálható, míg az affektív komponens (a fájdalom emocionális megélése) megítélésére csak az ember képes. A különféle állatkísérletes modellekben vizsgálható nocicepció mechanikai (érintési), termális (hővel kiváltott) vagy kémiai (kapszaicin, formalin, ecetsav, stb.) ingerek hatására keletkezik. Az interoceptív területekről (zsigerekből, savós hártálykból) eredő viscerális fájdalom vizsgálatára alkalmas egérben az ecetsavval, magnézium-szulfáttal vagy fenilkinonnal kiváltott vonaglási teszt. Az exteroceptív régiókból származó szomatikus fájdalom például egérben és patkányban is a formalin teszttel vizsgálható. Az alapvetően nem fájdalmas stimulus hatására kialakuló érzékenység-fokozódást **allodiniának**, míg az enyhe fájdalmat kiváltó inger hatására fokozódó fájdalomérzetet **hiperalgéziának** nevezzük. Mechanikai vagy termális allodinia és hiperalgézia is

jelentkezhet gyulladás vagy különféle eredetű (traumás, toxikus) centrális/perifériás idegi sérülés következtében, amely a spino-talamo-kortikális pályarendszer bármely szintjén kialakulhat [119]. A perifériás idegsérülésből, illetve működéscsökkenésből adódó traumás neuropátiás fájdalom kísérletesen a nervus ischiadicus részleges szoros lekötésével [96], az egész ideg laza lekötésével [5] vagy az L5 gerincvelői ideg lekötésével [50] modellezhető.

Új fájdalomcsillapító-gyulladáscsökkentő gyógyszerek kifejlesztésének szükségessége

Új fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztésének preklinikai fázisában a vegyületek hatásának, hatásosságának meghatározása nem könnyű feladat, mivel kizárólag a nocicepció vizsgálata lehetséges a nemzetközi irodalomban elfogadott állatmodellekben és vizsgálati módszerekkel. A neuropátiás fájdalom egyetlen forgalomban lévő gyógyszer-csoporttal (antiepileptikumok, opiátok, antidepresszánsok, lidokain) sem kezelhető kielégítő módon. Jellemző, hogy összehasonlítási értéknek azt a számot használják (number needed to treat: NNT), mely megadja, hogy hány beteget kell kezelni ahhoz, hogy az elsőben 50%-os fájdalomcsillapítás jöjjön létre [119]. A több száz éve ismert és széles körben használatos klasszikus nem-szteroid gyulladáscsökkentők, fájdalomcsillapítók, amelyek mind a ciklooxygenáz enzimet gátolják, így a prosztaglandin szintézist csökkentik, a neuropátiás fájdalmat és a gyulladás neurogén komponensét nem csökkentik. Az opioid származékok, amelyek áttörést jelentettek a tumoros fájdalom csillapításában, ugyancsak másodlagos terápiás szerepek neuropátiás állapotokban. A szteroidok nagy dózisban gátolják ugyan a neurogén gyulladást, de sokféle, súlyos mellékhatásuk (gasztrointesztinális vérzések, fekély, cukorbetegség, elhízás, stb.) miatt hosszabb távon nem lehet őket alkalmazni. Nagy szükség van ezért alapvetően új hatásmechanizmusú, elsősorban közvetlenül az érzőideg-végződések szintjén ható fájdalomcsillapítók, gyulladáscsökkentők kifejlesztésére. Ennek érdekében számos nocicepció modellt állítottunk be munkacsoportunkban, és vizsgálati módszerek széles skáláját sajátítottam el PhD-munkám során.

CÉLKITŰZÉSEK

PhD-munkám során a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből felszabaduló peptid mediátorok neurohumorális „szenzokrin” gyulladásgátló és antinociceptív hatásainak mechanizmusát és receptorális hátterét, illetve fizikai úton történő aktiválhatóságát vizsgáltam állatkísérletes modellekben, három konkrét kérdésfelvetés kapcsán.

I. Célunk volt a szomatosztatin 4 receptor ($ss4$) szerepének vizsgálata különböző *in vivo* gyulladás- és fájdalommodellekben. Az $ss4$ receptorra szelektíven ható agonistával, a J-2156 kódjelű nem-peptid szerkezetű vegyülettel végeztünk kísérleteket akut és krónikus kísérleti elrendezésekben, patkányban és egérben. Ezen vizsgálatok kapcsán feladatom volt olyan *in vitro* sejtenyésztési módszer kidolgozása az irodalmi adatok alapján, amely alkalmas izolált peritoneális makrofágok citokin termelésére ható vegyületek rutinvizsgálatára.

II. A PACAP-38 kimutatható a kapszaicinre érzékeny szenzoros neuronokban, és előzetes vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a perifériás végződésekből stimuláció hatására felszabadul. A nocicepcióban betöltött szerepére vonatkozóan a rendelkezésre álló ellentmondásos irodalmi adatok kizárólag a központi idegrendszerre fókuszálnak. Ebből kiindulva jelen kísérleteinkben a PACAP-38 perifériás hatásait vizsgáltuk különféle nocicepció modellekben.

III. Több állatkísérletes modellben vizsgáltam egy optimalizált paraméterekkel rendelkező sztatikus mágneses teret biztosító készülék segítségével, hogy ez a fizikai behatás kivált-e mérhető antinociceptív hatásokat. Vizsgáltam azt is, hogy a jelenségben lehet-e potenciális szerepe a kapszaicin-érzékeny peptiderg idegvégződéseknek.

I. A SZOMATOSZTATIN SST₄ RECEPTORON SZELEKTÍVEN HATÓ AGONISTA J-2156 ANALGETIKUS HATÁSA AKUT ÉS KRÓNIKUS GYULLADÁS- ÉS FÁJDALOMMODELLEKBEN

Az endogén szomatosztatin terápiás alkalmazását akadályozza annak rendkívül sokrétű előfordulása a szervezetben, széles hatásspektruma, és nagyon rövid (3 percnél kevesebb) plazma féléletideje [122]. Helyette viszont stabil, a szenzoros idegvégződések és számos gyulladáscsökkentésben és a fájdalomcsillapításban. Ezen agonisták nagy előnye, hogy nem rendelkeznek a szomatosztatin sst₂, sst₃ és sst₅ receptorai által közvetített endokrin hatásokkal.

Sst₄/sst₁ receptor agonista molekula a ciklikus heptapeptid szerkezetű TT-232, amelynek széleskörű antinociceptív hatását számos korábbi kísérletünk igazolta [37,38,41,83]. Jelen kísérleteinket egy sst₄ receptor-altípushoz szelektíven, nagy affinitással kötő szomatosztatin agonistával, a J-2156 kódjelű vegyülettel végeztük, amit a finn Juvantia Pharma gyárában szintetizáltak. A J-2156 nempeptid, szulfonamido-peptidomimetikum, pontos kémiai szerkezete (1'S,2S)-4-amino-N-(1'-karbamoil-2'-feniletil)-2-(4''-metil-1''-naftalén-szulfonilamino)-butánamid. Nagyságrendileg nanomoláris affinitással kötődik az emberi szomatosztatin sst₄ receptorhoz, ami a natív szomatosztatin kötődési affinitását is meghaladja, valamint közel 400-szoros szelektivitást mutat az sst₄-hez az emberben megtalálható másik négy szomatosztatin receptor-altípushoz viszonyítva [25]. A receptor-aktivációt jelző ciklikus AMP-tesztben a natív szomatosztatin-14-hez vagy szomatosztatin-28-hoz hasonlóan teljes agonistaként működött. Egy másik G-protein-aktivációs funkcionális tesztben 2,5-szer erősebb válaszokat adott, mint a natív szomatosztatin. Ezen tulajdonságai alapján e molekulát a „szuperagonista” jelzővel illették [25]. További *in vitro* vizsgálatok igazolták, hogy a J-2156 kódjelű vegyület ismételt alkalmazása sem okoz deszenzibilizációt, ami tovább növeli e molekula terápiás alkalmazásának lehetőségeit [24].

I.1. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Állatok

Kísérleteinket Balb/c, CD1 egereken, valamint Wistar, Lewis patkányokon végeztük el, amelyeket a Pécsi Tudományegyetem Központi Állatházában tenyésztettünk és tartottunk apatogén környezetben 24-25°C-on, normál étellel és vízzel *ad libitum* ellátva.

Formalinnal kiváltott akut szomatikus kemonocifenzív viselkedés vizsgálata

Balb/c egerek bal hátsó lábának talpi részébe 50 µl 2,5%-os formalin-oldatot injektáltunk, ami az állatban nocifenzív reakciót vált ki két fázisban. Az első fázis, ami 0-5. percig tart, a formalin közvetlen kemonociceptív hatására jön létre. A második fázis, ami a 20. percben kezdődik és körülbelül a 45. percig tart, főként akut gyulladáscsökkentéses reakciók következménye [123]. A nocicepciót a talpnyalogatással eltöltött idővel, másodpercben fejeztük ki mindkét fázisban. A J-2156-ot a formalin-adás előtt 20 perccel intraperitoneálisan injektáltuk három különböző dózisban (1, 10 és 100 µg/kg).

A talp mechanociceptív küszöbének mérése traumás mononeuropátia modellben

A nervus ischiadicus egyoldali részleges leköttetése a végtag mechanociceptív küszöbének csökkenését idézi elő [96]. Wistar patkányokat elaltattunk, az egyik oldali nervus ischiadicust a combon kipreparáltuk, majd az ideg 1/3-1/2-ed részét óvatosan elválasztottuk és leköttettük, végül a sebet bezártuk. A műtétet követően az állatokat 7 napig hagytuk felépülni. A Randall-Selitto-teszt méréseket Ugo Basile Analgesimeterrel végeztük a műtét előtt és a műtétet követő 7. napon, ami kiválóan alkalmas a mechanikai fájdalomküszöb-csökkenés (mechanikai hiperalgészia) meghatározására [83]. A J-2156-ot három különböző dózisban (1, 10 és 100 µg/kg i.p.) adtuk a mérés előtt 20 perccel.

Freund-adjuvánssal kiváltott krónikus gyulladás vizsgálata

A krónikus ízületi gyulladást komplett Freund-adjuváns (CFA: complete Freund's adjuvant; 1 mg/ml hővel előlt *Mycobacterium tuberculosis* paraffinolajos szuszpenziója) faroktőbe, valamint intraplantárisan történő adásával (100-100 µl) váltottuk ki Lewis patkányokban. A szisztémás hatás fokozása érdekében a faroktőbe történő CFA-adást a következő napon megismételtük, ezt a napot tekintjük a kísérlet első napjának. Funkcionális méréseinket CFA adás előtt és azt követően 21 napon keresztül végeztük. A kísérlet végén a tibiotarzális ízületekből szövettani metszeteket készítettünk és morfológiai értékelés történt. A J-2156 két dózisát (1 és 10 µg/kg i.p.) napi háromszor injektáltuk az állatoknak a teljes kísérleti periódus alatt már a CFA-adás megkezdésével egyidőben.

A talp érintési érzékenységeinek mérése

A talp érintési érzékenységét Ugo Basile Dynamic Plantar Aesthesiometerrel mértük. Ez valójában egy módosított, digitalizált von Frey-készülék. A mért adatokat a kezdeti kontroll értékekhez viszonyítottuk, a gyulladás hatására kialakuló küszöbcsökkenést (allodinia) százalékban fejeztük ki.

A lábduzzadás mérése

A lábtérfogat mérésére alkalmas műszerünk az Ugo Basile Plethysmometer volt. A mérési adatokat a kezdeti értékekhez viszonyítottuk, a lábtérfogatnövekedést (ödémaképződést) százalékban fejeztük ki.

Szövettani metszetek készítése és értékelése

A kísérlet végén a tibiotarzális ízületeket kimetszettük, megfelelő eljárással dekalcináltuk, dehidráltuk őket. Ezek után a mintákat paraffinba ágyasztuk, majd mikrotómmal 5-7 µm-es szeletekre vágtuk és végül hematoxin-eozin eljárással megfestettük [38].

A metszeteken látható gyulladásos elváltozásokat egy kísérleteinktől független patológus értékelte, előre megadott paraméterek alapján pontozva az egyes mintákat. Minden esetben egy 0-3-ig terjedő skálán történt a pontozás, ahol a legjelentősebb elváltozást jellemeztük 3-assal. Az egyes mintákra adott pontokat összeadtuk, így minden mintára, ezáltal pedig minden kezelési csoportra egy-egy összetett artritisz pontszámot kaptunk [132].

Carrageeninnel kiváltott akut lábduzzadás vizsgálata

Wistar patkányok hátsó lábának talpába injektáltunk 100 µl 3%-os carrageenin-oldatot, amellyel kevert típusú, neurogén és nem-neurogén komponensekből álló gyulladásos reakciót idéztünk elő lokálisan [20,84]. A lábduzzadás a harmadik órában éri el maximumát [8], ezért a méréseket anyagadás előtt és anyagadás után 60, 120 és 180 perccel végeztük. A carrageenin-adás előtt 15 perccel az állatok egy-egy csoportját oldószerrel, valamint 1, 10 és 100 µg/kg i.p. J-2156-oldattal kezeltük.

Mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladás vizsgálata patkány talpbőrében

Wistar patkányok mindkét hátsó végtagját akutan denerváltuk, vagyis a nervus saphenust és a nervus ischiadicust átvágtuk 30 perccel a kísérletet megelőzően, megakadályozva ezzel a mustárolaj nociceptív hatásából adódó központi idegrendszeri reflexválaszokat. A lábháti bőrt 1%-os, paraffinolajban oldott mustárolajjal bekentük. Az ennek következtében kialakuló plazmafehérje-kiáramlás mértékét Evans kék akkumuláció módszerével határoztuk meg. Tíz perccel a mustárolajjal történő kenés előtt 50 mg/kg Evans kék festéket adtunk intravénásan. Húsz perccel a gyulladás kiváltását követően az állatokat elvéreztettük, a kékült lábháti bőrterületeket kimetszettük, tömegüket megmértük, festéktartalmukat formamidban extraháltuk. A kioldódott festék mennyiségét 620 nm-en spektrofotométerrel határoztuk meg, amely a plazmafehérje-kiáramlás, vagyis a gyulladás mértékével egyenesen arányos. A kapott értékeket µg festék/g nedves szövet formában fejeztük ki. A kontroll állatcsoportnak a J-2156 oldószerét, a kezeltnek J-2156-ot adtunk több dózisban (0,5-100 µg/kg)

intraperitoneálisan 20 perccel a gyulladás kiváltása előtt. A hatásidőtartam megállapításához a mustárolaj-kenés előtt 2 és 6 órával is adtuk i.p. a J-2156 10 µg/kg dózisát.

Mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladás vizsgálata egérfülön

Balb/c egereket elaltattunk, majd 10-10 µl 1%-os, paraffinolajban oldott mustárolajat kentünk ecsettel fülük mindkét oldalára. A mustárolaj akut neurogén gyulladást idéz elő a kezelt felületen. A fülek vastagságát mikrométerrel mértük meg anyagadás előtt és négy alkalommal a három órás mérés során. A kialakult fülödémát a kezdeti értékekhez viszonyított százalékban fejeztük ki. A J-2156 három dózisát (10, 50 és 100 µg/kg), illetve oldószerét intraperitoneálisan adtuk az állatoknak 15 perccel a mustárolaj-kezelés előtt.

Peritoneális makrofágok *in vitro* stimulálásával felszabaduló IL-1β mennyiségének mérése

CD1 egereket kezeltünk lipopoliszachariddal, LPS-sel (300 µl i.p., 300 µg/ml). Négy órával az injektálás után az állatokat dekaptáltuk és kivérettük. A hasüreget ezután átmostuk 2,5 ml jéghideg tápoldattal, majd a hasüregi folyadékot begyűjtöttük. A sejtenyészítő lemez minden lyukába 800 µl RPMI-t (benne 80 µl BSA) és 100 µl hasúri folyadékot pipettáztunk. Kétféle tenyésztést állítottunk össze a gyulladással sejt stimulálására: az egyik esetben 1-1 µl 1 µg/ml LPS-oldatot, a másik esetben 1-1 µl 25 ng/ml-es forbol-12-mirisztát-13-acetát-oldatot (PMA) és 1-1 µl 1 µg/ml ionomicin-oldatot mértünk a lyukakba. Ezután mindkét összeállítás egyik felében 100 µl fiziológiás sóoldat, másik felében 100 µl J-2156 négyféle koncentrációjú oldatának (0,1, 1, 10 és 100 µg/ml) hozzáadásával vizsgáltuk a citokin-felszabadulás változását. A mintáinkban termelt IL-1β mennyiségét szendvics ELISA módszerrel és spektrofotométerrel (450 nm-en) határoztuk meg.

Statisztika

A formalin tesztben, a mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladásban, és a két mechanonocicepciót vizsgáló modellben eredményeink értékeléséhez nem-parametrikus Mann-Witney U-tesztet, a szövettani eredmények értékeléséhez Kruskal-Wallis tesztet, az *in vitro* modellben Student-féle t-próbát, a lábduzzadás eredmények értékeléséhez pedig módosított Bonferroni t-teszttel kiegészített egyutas ANOVA-tesztet használtunk. Minden esetben a különböző csoportok közötti eredmények összehasonlításakor a *p<0,05, **p<0,01 és ***p<0,001 értékeket határoztuk meg szignifikánsnak.

I.2. EREDMÉNYEK

A J-2156 hatása a formalinnal kiváltott akut nocifenzív reakcióra

A formalin teszt első fázisában a J-2156 hatástalannak bizonyult. Az akut gyulladással járó folyamatok következtében kialakuló második szakaszban közel háromszorosára emelkedett a nocifenzív viselkedés időtartama az oldószerrel kezelt kontroll csoportban, amelyre azonban a J-2156 szignifikáns és dózisfüggő gátló hatást gyakorolt.

A J-2156 hatása a mechanikai hiperalgériára traumás mononeuropátia modellben

A nervus ischiadicus részleges lekötésével kialakult neuropátiás hiperalgériát a legkisebb dózissal (1 µg/kg i.p.) J-2156-kezelés az oldószerhez hasonlóan nem befolyásolta. A két nagyobb (10 és 100 µg/kg i.p.) J-2156-dózis a hiperalgériát szignifikánsan csökkentette, azonban dózis-hatás összefüggés nem volt megfigyelhető.

A J-2156 hatása a komplett Freund-adjuvánssal kiváltott gyulladással járó mechanikai allodiniára

A kontroll csoportban a CFA-injekció érintési érzékenységet fokozódást okozott, ami szinte változatlanul fennmaradt a 21 napos kísérlet ideje alatt. Ezzel szemben a J-2156-tal kezelt állatcsoportok mindkét vizsgált dózissal (1 és 10 µg/kg i.p.) esetén jelentősen kisebb mértékű mechanikai allodiniát mutattak.

A J-2156 hatása a komplett Freund-adjuvánssal kiváltott lábduzzadásra

A lábak térfogata az oldószerral kezelt csoportban jelentős ödémaképződést mutatott, ami a teljes 21 napos kísérlet alatt végig fennmaradt. A J-2156 szinte az összes mérési napon mindkét dózisban (1 és 10 µg/kg i.p.) szignifikánsan csökkentette az ödémát, dózis-hatás összefüggést nem tapasztaltunk.

A J-2156 hatása az ízületi szövettani elváltozásokra

Az összetett szövettani pontszám a kontroll csoportban $6,6 \pm 0,7$. A teljes kísérlet alatt a napi háromszori J-2156-kezelés jelentősen csökkentette az elváltozásokat, az 1 µg/kg-os dózisonál az összetett artritisz pontszám $2,86 \pm 0,86$, a 10 µg/kg-os dózisonál $4,5 \pm 0,56$ értékre csökkent.

A J-2156 hatása a carrageeninnel kiváltott lábduzzadásra

A kontroll csoportban a carrageenin intraplantáris adása után egy órával 32%, két órával 30%, három órával pedig 27% lábduzzadást tapasztaltunk. Ezt mindhárom dózisú (1, 10 és 100 µg/kg i.p.) J-2156 szignifikánsan csökkentette, a gátló hatás azonban ebben a modellben sem dózisfüggő.

A J-2156 hatása mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladás vizsgálata patkány talpbőrében

A J-2156 hat különböző i.p. dózisa (0,5 és 100 µg/kg között) 20 perccel a gyulladás kiváltása előtt beadva szignifikáns, de nem dózisfüggő módon gátolta a mustárolajjal előidézett gyulladást patkány lábháti bőrében. A 10 µg/kg J-2156 gátló hatása 2 és 6 óra múlva is szignifikánsnak bizonyult.

A J-2156 hatása mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladás vizsgálata egérfülön

A kontroll csoportban a fül nagy mértékben megduzzadt 3 órával a mustárolajjal történő kenés után. A J-2156 mindhárom dózisával (10, 50, 100 µg/kg i.p.) történő előkezelés két, illetve három órával a kenés után szignifikánsan csökkentette a mustárolajjal kiváltott fülduzzadást. A 20. percben szignifikáns gátlást csak az 50 µg/kg dózisú J-2156 adásakor tapasztaltunk. Dózis-hatás összefüggés ebben a modellben sem volt kimutatható.

A J-2156 hatása peritoneális makrofágok *in vitro* stimulálásával felszabaduló IL-1β-mennyiségre

A sejtenyészítés eredményeképpen kapott IL-1β mennyiségében az LPS- és a PMA-stimulálás között semmilyen eltérést nem tapasztaltunk. A kontrollhoz képest a J-2156-tal való kezelés csökkentette a citokin-termelést az 1 és 10 µg/ml-es oldatok esetében, a 0,1 µg/ml-es oldatnak nem volt hatása, a 100 µg/ml-es oldat hatására pedig megemelkedett az IL-1β mennyisége.

I.3. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Jelen eredményeink azt igazolják, hogy a peptidomimetikus J-2156, ami a szomatosztatin sst₄ receptorhoz nagyfokú specifitással és nagy affinitással kötődő agonista, képes hatékonyan gátolni a nocifenzív reakciót klasszikus akut kemonocicepció modellben (formalin teszt) egérben, valamint két különböző krónikus fájdalommodellben (adjuváns-indukálta fájdalom és traumás mononeuropátia) patkányban. Hatékonyan gátolta továbbá az akut gyulladást patkánytalpban és egérfülön. A vegyület antiinflammatorikus hatása az *in vitro* sejtenyésztesben is megmutatkozott, koncentrációfüggő módon gátolta a stimulált peritoneális makrofágok IL-1 β -termelését.

A J-2156-tal végzett egyéb kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy ez az agonista hatékonyan gátolt különböző gyulladásos folyamatokat is patkányban, valószínűleg részben a neurogén komponensért felelős P-anyag és CGRP szenzoros idegvégződésekből történő felszabadulásának gátlásán keresztül. E peptidfelszabadulást gátló mechanizmust izolált tracheán korábban egyértelműen bizonyítottuk [36]. Mivel szelektíven csak az sst₄ receptoron fejti ki hatását, így adásakor elmaradnak a szomatosztatin agonistáknál tapasztalt gyakori endokrin mellékhatások, mint a növekedési hormon, a glukagon, az inzulin felszabadulásának gátlása, ezek ugyanis főként az sst₂, sst₃ és sst₅ receptor-altípusokhoz (SRIF2 receptorcsalád) kapcsolhatók [131].

Kísérleteinkben bebizonyítottuk tehát, hogy ez a molekula több modellben antinociceptív, antiallodiniás és gyulladásgátló hatásokkal rendelkezik. Bár az sst₄ receptor pontos lokalizációjára vonatkozóan kevés irodalmi adat áll rendelkezésre [82], ezen agonistával nyert funkcionális adatok alapján valószínű, hogy e gátló hatások magukon az érzőideg-végződéseken, valamint az érfali endotélsejteken és a gyulladásos sejteken lévő sst₄ receptor-aktiváción keresztül valósulnak meg. Ez utóbbira direkt *in vitro* bizonyítékot a peritoneális makrofágok IL-1 β -termelésének gátlásával szolgáltattunk az általam kidolgozott kísérleti elrendezésben.

Eredményeink alapján a szomatosztatin sst₄ receptor gyógyszerfejlesztési szempontból kiváló target lehet, és stabil, szelektív sst₄ agonisták új, ígértes utakat nyithatnak meg a fájdalomcsillapítás és a gyulladásos folyamatok neurogén komponensének kezelése terén.

II. A HIPOFÍZIS ADENILÁT CIKLÁZ-AKTIVÁLÓ POLIPEPTID-38 (PACAP-38) ELTÉRŐ PERIFÉRIÁS HATÁSAI PATKÁNY ÉS EGÉR FÁJDALOMMODELLEKBEN

A 38 aminosavból álló hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide, PACAP-38) a vazóaktív intesztinális peptid (VIP), szekretin és glukagon család tagja. Először birka hipotalamuszából izolálták [68]. Nagy mennyiségben fordul elő a központi idegrendszerben és az endokrin szervekben. Szenzoros neuropeptidként tartják számon, mivel megtalálható a gerincvelő hátsó szarvában [18,19], a hátsó gyöki ganglionokban [69,70], a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok perifériás végződéseiben [26,139], például az ízületi tokot ellátó érző rostokban [125]. E morfológiai és molekuláris biológiai adatokon túl előzetes saját eredményeink azt is igazolták, hogy a kapszaicin-érzékeny rostokból a PACAP-38 stimuláció hatására *in vitro* és *in vivo* is felszabadul [35,72]. Ezen eredmények alapján feltételezhető volt, hogy a PACAP részt vesz a nociceptív folyamatokban, azonban ezt az elképzelést rendkívül kevés funkcionális adat támasztotta alá. Az összes erre irányuló *in vivo* kísérletben a PACAP központi idegrendszeri hatásait vizsgálták, és meglehetősen ellentmondásos eredményekre jutottak [98]. Az intratekálisan adott PACAP gátolta a nociceptív reflexműködést [140] és a gyulladás következtében kialakuló nocicepciót [77,137,139]. Intracerebroventrikulárisan adva a PACAP a formalin teszt korai fázisában analgetikus hatásúnak, míg a késői fázisban pronociceptívnek bizonyult [98]. Másrésztől azonban a központi idegrendszerbe adott PACAP dózisfüggő módon csökkentette a hőküszöböt a talpban, és szerepet játszott a nociceptív stimulus hátsó szarvba történő közvetítésében, elsősorban N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorokon keresztül [76]. A PACAP $G_{s/q}$ -proteinhez kötött receptorokon fejt ki hatásait. A PAC1 receptor specifikusan a PACAP-ot köti, míg a VPAC1/VPAC2 receptorok azonos affinitással rendelkeznek a VIP és a PACAP iránt. Mindhárom receptortípust leírták neuronokon, simaizomsejteken és számos gyulladásos sejten [18,104,127,142].

Korábbi vizsgálataink igazolták, hogy a PACAP-38 gátolja proinflammatorikus és pronociceptív szenzoros neuropeptidok, P-anyag és CGRP, kapszaicin-érzékeny érzőidegek végződéseiből kémiai és elektromos téringerléssel kiváltott felszabadulását *in vitro* [72]. *In vivo* gátolta továbbá az akut neurogén és nem-neurogén gyulladásos folyamatokat patkányban és egérben egyaránt [38,72]. Ezen eredményeink erősítik azt a feltevést, hogy a PACAP-nak szerepe lehet a nocicepció perifériás folyamataiban. Mivel a PACAP-38 perifériás nociceptív folyamatokban betöltött hatásaira vonatkozóan nem állt rendelkezésre adat, jelen kísérletsorozatunkban azt vizsgáltuk, hogyan hat a lokálisan/szisztémásan adott PACAP akut viscerális és szomatikus nocifenzív viselkedésben, gyulladásos és neuropátiás mechanikai hiperalgéziában, valamint enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgéziában.

II.1. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Állatok

A kísérleteket Wistar patkányokon, valamint CD1 egereken végeztük, amiket rendre a Pécsi Tudományegyetem Központi Állatházában, illetve a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet állatházában tartottuk standard, apatogén környezetben 24-25°C-on, normál étellel és vízzel *ad libitum* ellátva.

Formalinnal kiváltotta akut szomatikus nocicepció vizsgálata

Wistar patkányok egyik hátsó lábának talpába 50 μ l 2,5%-os formalin-oldatot injektáltunk. Patkányok e tesztben az egerektől eltérő mintázatú elhárító viselkedést mutatnak, nemcsak lábnyalásokat, hanem jellegzetes emelgetéseket is végeznek. Ezért ebben a modellben a nocifenzív reakció mértékét a kezelt láb emelgetésének számából és nyalogatásának időtartamából számított összetett fájdalompontszám segítségével határoztuk meg a következő módon: összetett fájdalompontszám=(lábemelések száma+lábnyalogatás időtartamának kétszerese)/vizsgálati időtartam [130]. Formalin-adás előtt 5

perccel az állatokat intraplantárisan kezeltük 100-100 µl fiziológiás sóval, illetve 2 µM PACAP-38-al. A PAC1 és VPAC receptorok szerepének vizsgálatára külön állatcsoportokban a PACAP-38 (50 µl, 4 µM) adása előtt 5 perccel tízszeres mennyiségben (50 µl, 40 µM) két különböző antagonistát injektáltunk intraplantárisan: a PAC1 receptor-szelektív M65 kódjelű vegyületet [1], illetve a VPAC1/VPAC2 receptorokon ható [D-p-Cl-Phe⁶,Leu¹⁷]-VIP-et [104]. Kontrollként itt is fiziológiás sóoldatot használtunk.

Enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgéria vizsgálata

Wistar patkányok fájdalmas hőküszöbét emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel határoztuk meg [7]. A készülék a fájdalmas hőküszöb meghatározására alkalmas. Az állatokat elaltattuk, és egyik hátsó lábukat konstans hőmérsékletű, 51°C-os, tehát már enyhe hőtraumát kiváltó hőmérsékletű vízfürdőbe merítettük 20 másodpercre. A kezelés után 10 és 20 perccel az állatok hőküszöbét újra meghatároztuk, hogy meggyőződjünk a termális hiperalgéria kialakulásáról. A 20 perces mérés után 100-100 µl fiziológiás só, illetve 2 µM PACAP-38-at injektáltunk intraplantárisan az állatoknak. Az anyag hatását a hőküszöb-értékekre 10 percenként mértük. A termális hiperalgériát az adott időpontban mért küszöbértékek hőtrauma előtti kontroll értékeihez viszonyított százalékban adtuk meg. Ebben a modellben is vizsgáltuk a PACAP-hatásban a receptorok szerepét. Öt perccel a PACAP-38 (50 µl, 4 µM) adása előtt egy állatcsoport 50 µl 40 µM PAC1 receptor-szelektív antagonistá M65-oldatot, egy másik állatcsoport olyanekora dózisú VPAC1/VPAC2 receptorokon ható antagonistá [D-p-Cl-Phe⁶,Leu¹⁷]-VIP-oldatot kapott intraplantárisan. Kontrollként oldószert, fiziológiás sóoldatot adtunk.

Carrageeninnel kiváltott gyulladásos mechanikai allodinia vizsgálata

Wistar patkányok egyik hátsó lábának talpába 50 µl 3%-os carrageenin-oldatot injektáltunk. A carrageenin kevert típusú akut gyulladásos reakciót vált ki a talpban, ami maximumát anyagadás után 3 órával éri el [8]. A méréseket ezért anyagadás előtt, valamint 120 és 180 perccel utána végeztük. A mechanikai érzékenységet ennél a modellenél szintén Ugo Basile Dynamic Plantar Aesthesiometerrel mértük. A PACAP-38 2 µM koncentrációjú oldatából (fiziológiás sóoldatban oldva), illetve oldószereből 100-100 µl-t az egyes mérések előtt 5 perccel adtuk intraplantárisan. Az eredményeket a carrageenin-adás előtti kontroll küszöbökhez viszonyítva százalékban fejeztük ki.

A PACAP-38 hatásának vizsgálata a mechano-és termonociceptív küszöbökre

Patkányban a PACAP-38 intraplantáris adása (100 µl, 2 µM) előtt és 10 perccel utána a mechanociceptív küszöböt Ugo Basile Dynamic Plantar Aesthesiometerrel, a termonociceptív küszöböt pedig emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mértük.

Ecetsavval kiváltott akut viscerális nocicepció vizsgálata vonaglási teszttel

A viscerális kemonocicepciót CD1 egereken váltottuk ki 200 µl 3%-os ecetsav-oldat intraperitoneális adásával. A peritoneum kémiai izgatásának hatására alhasi izomösszehúzódnások, úgynevezett vonaglások következnek be, amelyek tipikus nocifenzív viselkedésnek tekinthetők [22,52,57]. A vonaglásokat az anyagadást követően 20 percig számoltuk. A PACAP-38-at (100 µg/kg), illetve a fiziológiás sóoldatot 30 perccel az ecetsavval való kezelés előtt szubkután adtuk az egereknek.

Mechanikai hiperalgéria vizsgálata traumás mononeuropátiában

A műtéthez az egereket elaltattuk. Az egyik oldali nervus ischiadicust az állat combján kiproparáltuk, majd az ideg 1/3-1/2-ed részét óvatosan elválasztottuk, szorosan lekötöttük, majd a sebet bezártuk. A nervus ischiadicus egyoldali részleges lekötése a végtag spontán fájdalmát és mechanociceptív küszöbének csökkenését idézi elő [96]. A műtétet követően az állatokat 7 napig hagytuk felépülni. A mechanikai hiperalgéria értékét újra Ugo Basile Dynamic Plantar Aesthesiometerrel mértük a műtétet követő 7. napon. A mérési eredményeket a kontrollhoz viszonyítva, százalékosan fejeztük ki. A PACAP-

38 két dózist (10 és 100 µg/kg), illetve oldószerét intraperitoneálisan adtuk 30 perccel a mérések előtt az állatoknak.

A térdízület primér afferenseinek elektrofiziológiai vizsgálata

Ez a kísérletsorozat nem munkacsoportunkban, hanem egy kollaboráció keretein belül a Calgary Egyetem Élettani és Biofizikai Intézetében történt. Wistar patkányok térdízületében 100-100 µl 2-2% kaolin- és carrageenin-injekcióval akut szinoviális gyulladást váltottak ki. A femur középső részére illesztett sztereotaxikus kerethez csatlakozó rögzítő segítségével a csípőízületet immobilizálták, a lábat standard rotációt kiváltó készülékhez csatlakoztatták. Végül a végtag közepén hosszanti metszést ejtettek, a térdízület feletti bőrlebenszöveteket egy „O” alakú keretre felvarrták és a keletkezett medencét meleg paraffinolajjal töltötték ki. A nervus saphenust átvágták, a proximális idegcsonk axonkötegeiről platina elektróddal vezették el az elektromos aktivitásokat. A vezetési sebességet a beidegzett terület elektromos ingerlését követő latencia mérésével határozták meg. A három, egyenként 10 másodperces mozgásciklus alatt mért idegaktivitások átlaga adta a kontrollt. A PACAP-38 lokális alkalmazása a saphenus artériába történő bolus-injekcióval történt két dózisban (100 µl 0,2 és 2 µM). Ezt követően vizsgálták az afferens idegaktivitást, az egyes rotációk hatására létrejövő akciós potenciálok számát mérték, és a PACAP-38-kezelés mellett kialakuló afferens aktivitást a kontroll értékekhez viszonyított százalékban adták meg.

Statiztika

A termális és mechanikai hiperalgéria/allodinia adatait Dunnett-féle poszt tesztel kiegészített egyutas ANOVA-tesztel értékeltük. Az elektrofiziológiával nyert adatokat kétutas ANOVA-tesztel értékeltük ki. A formalin és vonaglasi tesztek értékelését Student-féle t-próbával végeztük. Minden esetben a különböző csoportok közötti eredmények összehasonlításakor * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ értékeket határoztuk meg szignifikánsnak.

II.2. EREDMÉNYEK

Intraplantáris PACAP-38 hatása a formalinnal kiváltott akut nocifenzív viselkedésre

Az első fázisban a nocifenzív viselkedést jelző összetett fájdalompontszám a kontroll csoporthoz képest az intraplantáris PACAP-38-kezelést kapott csoportban szignifikánsan kisebb volt. A második fázisban az akut gyulladós folyamatok következtében kialakuló nocifenzív viselkedést szintén szignifikánsan gátolta a lokálisan alkalmazott PACAP-38. A PAC1 receptor-szelektív antagonistá M65-előkezelés nem befolyásolta a PACAP-38 gátló hatását egyik fázisban sem. A VPAC1/VPAC2 receptor antagonistá [D-p-Cl-Phe⁶,Leu¹⁷]-VIP sem csökkentette a PACAP-38 gátló hatását a direkt kemonoczeptív fázisban, ezzel szemben szinte teljesen megszüntette az antinoczeptív hatást az akut gyulladás fázisában.

Intraplantáris PACAP-38 hatása enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgériára

Az 51°C-os enyhe hőtrauma utáni 10. és 20. percben mért hőküszöbök jelentősen lecsökkentek és a 60 perces kísérleti periódus alatt végig szinte változatlanul fennmaradtak. A PACAP-38 talpba történő adása az utolsó kivéve minden mérési időpontban szignifikánsan gátolta a hőtraumával kiváltott hiperalgériát. A PAC1 receptor antagonistá M65 kódjelű vegyülettel történő előkezelés hatására nem változott a PACAP-38 antihiperalgériás hatása egyik mérési pontban sem, a VPAC1/VPAC2 receptor-antagonista [D-p-Cl-Phe⁶,Leu¹⁷]-VIP ezzel szemben minden mérési időpontban szignifikánsan nagyobb küszöbcsökkenést váltott ki.

Intraplantáris PACAP-38 hatása a carrageennel kiváltott mechanikai allodiniára

A carrageenin hatására az oldószerrel kezelt állatoknál a 2. és 3. órában is mechanonoczeptív küszöbcsökkenést tapasztaltunk. A PACAP-38-al kezelt állatokban azonban mindkét mérési időpontban szignifikánsan kisebb küszöbcsökkenés volt megfigyelhető.

Intraplantáris PACAP-38 hatása a mechano- és termonociceptív küszöbökre

A PACAP-38 önmagában nincs hatással sem a mechano-, sem a termonociceptív küszöbökre.

A PACAP-38 perifériás hatása az akut viscerális kemonociceptióra

Szubkután injektált PACAP-38 hatására a viscerális kemonociceptív viselkedés a kontroll csoporthoz képest kevesebb vonaglásban nyilvánult meg, tehát a PACAP e modellben egérben is antinociceptív hatást fejtett ki.

A PACAP-38 hatása neuropátiás mechanikai hiperalgéziára

A műtétet követő 7. napra jelentős mechanikai hiperalgézia alakult ki az egerek talpában, amelyet i.p. adott PACAP-38 egyik dózisa sem volt képes szignifikánsan csökkenteni, így ebben a modellben a PACAP hatástalannak bizonyult.

A PACAP-38 perifériás hatása a gyulladt térdízület afferens aktivitására

A kaolin-carrageenin-injekció hatására a térdízület átmérője szignifikánsan megnövekedett. A vizsgált rostokban a PACAP-38 lokális adása átmeneti, de szignifikáns aktivitás-fokozódást okozott. Ez a szenzitizáló hatás dóziszfüggő, mivel a kisebb dózis nem okozott mechanoszenzitív-változást az ízületi afferenseken.

II.3. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Bár a PACAP-38 jelenlétét a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronokban korábban több fajban is leírták [69,70], csupán néhány meglehetősen ellentmondó adat utal a nociceptív folyamatokban betöltött szerepére, kizárólag a központi idegrendszeri hatásokra fókuszálva. Jelen kísérletsorozatunk szolgáltatja az első eredményeket a PACAP hatásairól a perifériás nociceptióval kapcsolatban. Kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a perifériásan adott PACAP-38 gátolja az akut szomatikus és viscerális kemonociceptiót, a gyulladásos mechanikai allodiniát, és az enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgéziát mind patkányban, mind egérben. Ugyanakkor nem befolyásolja a mechanikai hiperalgéziát traumás neuropátia egérmodelljében, sőt fokozza a gyulladt térdízületben a mechanikai stimulációval kiváltott afferens aktivitást.

A PACAP $G_{s/q}$ -proteinhez kapcsolt receptorokon fejti ki hatását, a PAC1-hez a PACAP jelentősen nagyobb affinitással kötődik, mint a VIP, míg a VPAC1/VPAC2 iránt mindkét neuropeptid ugyanakkora affinitással rendelkezik [54,104,127]. Bár e receptorok számos szignáltranszdukciós mechanizmushoz kapcsoltak, mindegyik folyamat neuronális aktivációhoz vezet. Ez a direkt mechanizmus jól alátámasztja az ízületi afferenseken elektrofiziológiai vizsgálattal nyert direkt szenzitizáló hatást.

Az adjuvánssal kiváltott gyulladás hatására a hátsó gyöki ganglionban nagymértékben upregulálódó PACAP-nak potenciális szerepet tulajdonítottak a gyulladásos fájdalom folyamataiban [138]. A PACAP modulálja a gyulladásos és immunfolyamatokat is, a vizsgálatok jelentős része gyulladásgátló hatását igazolta és magyarázta azzal, hogy a PACAP képes gátolni gyulladásos citokinek ($TNF\alpha$, IL-6, IL-12), kemokinek, transzkripciós faktorok és egyéb mediátorok termelését [13,51,58,62]. A PACAP gátolja továbbá a T-sejtek proliferációját, számos makrofág-funkciót, például a cAMP-függő, VPAC1 receptor aktiválta kemotaxist [14,15]. Korábban a mi munkacsoportunk is kimutatta, hogy gyulladásos folyamatokban nem csak a nem-neurogén sejt, hanem az akut neurogén eseményeket is képes gátolni a PACAP szisztémás adása. Ezen kívül direkt *in vitro* bizonyítékokat szolgáltatunk arra, hogy a PACAP-38 gátolja proinflammatorikus szenzoros neuropeptid (P-anyag és CGRP) felszabadulását a kapszaicin-érzékeny szenzoros rostok perifériás végződéseiből, ami magyarázza kizárólag neurogén eredetű plazmaprotein-extravazációra gyakorolt gátló hatását [35].

A PACAP-38 kísérleteinkben tapasztalt antinociceptív és antihyperalgézikus hatásainak pontos celluláris mechanizmusa nem ismert, kísérleteinkben PAC1 és VPAC1/VPAC2 receptorokon ható

antagonistákkal egyértelműen kimutattuk, hogy a formalin teszt második fázisában, valamint a hőtraumával kiváltott termális hiperalgégiában tapasztalt gátló PACAP-hatások VPAC receptoron keresztül valósulnak meg. Valószínűleg nem a nociceptoron kifejtett direkt hatásról van szó, ezek a receptorok ugyanis G_s - és G_q -fehérjékhez kötötten működnek, vagyis különféle szignáltranszdukciós útvonalakhoz kapcsolódva növelik az intracelluláris cAMP-, valamint a Ca^{2+} -szintet [54,127], vagyis neuronális stimulációt okoznak [105,117,118]. Ugyanakkor hízósejtekben, makrofágokban és granulocitákban a megnövekedett cAMP-szint gátolja gyulladáshoz vezető mediátorok, citokinek felszabadulását [53,133]. A PACAP akut gyulladásmodellekben megfigyelt perifériás antinociceptív és antihiperalgézikus hatásait magyarázhatja a korábban már említett pronociceptív neuropeptidok, illetve egyéb fájdalomkeltő és szenzitizáló hatású molekulák (bradikinin, prosztaglandinok, leukotriének) sejtekből való felszabadulásának gátlása. Az a megfigyelésünk, hogy a lokálisan adott PACAP-38 önmagában nem befolyásolta sem a mechanikai, sem a termális nociceptív küszöböt, arra utal, hogy nincs hatással a feszültségfüggő Na^+ -csatornákra, vagyis az általa kifejtett perifériás antinocicepcióban helyi érzéstelenítő-szerű hatás nem játszik szerepet.

A formalin I. fázisában kiugróan nagy mértékű antinociceptív PACAP-hatást mértünk. Ezt a hatást nem szüntette meg sem a PAC1 receptorra szelektív, sem a VPAC receptorokon ható antagonistákkal történő előkezelés, tehát ebben az esetben nem ezeken a receptorokon keresztül megvalósuló gátló hatásról beszélhetünk. Nem zárható ki ugyanakkor más, eddig ismeretlen gátló PACAP receptor létezése, más receptorokon (kannabinoid, opioid, esetleg szomatosztatin) kifejtett hatás [71].

A PACAP-38 viscerális és szomatikus nocicepcióban megfigyelt gátló hatásával ellentétben patkány gyulladt térdízületi afferensein végzett elektrofiziológiai mérések szenzitizáló hatást bizonyítottak. A PACAP-38 aktiválja az ízületi tokban lévő szenzoros érzőideg-végződéseken található VPAC1/VPAC2 receptorokat is, ami az ízület mechanoszenzitivitásának fokozódásához vezet. A szenzitizáló hatás alapja a megemelkedett intracelluláris cAMP-szint, ami az adenilát cikláz, valamint a PKA aktiválásának következménye, de szerepe lehet a foszfolipáz C aktiválásának is e folyamatban [105,117,118]. Emberi mintákban kimutatták a VPAC receptort szinoviocitákon is [120], amik speciálisan az ízületben jelen lévő makrofág- és fibroblasztoszerű sejtek, és amelyek gyulladáshoz vezető mediátorok, prosztaglandin E_2 , IL-1 és $TNF\alpha$ szekréciójára képesek [141]. A szinoviális hízósejtekből felszabadul emellett hisztamin is, ami szintén fokozza az algogén hatást. Ismert tény, hogy a VIP képes hízósejt-degranulációt kiváltani [102], de nem zárható ki a PACAP szinoviocitákat és hízósejteket indirekt módon aktiváló hatása sem [65].

Nem találtunk eltérést a mechanikai hiperalgégiában a PACAP szisztémás adását követően egér mononeuropátiás modellben annak ellenére, hogy elektrofiziológiai bizonyítékok vannak arra vonatkozóan, hogy a PACAP és a VIP növeli a hátsó szarv neuronok aktivitását patkány mononeuropátiában [18]. Ezt a PACAP periférián adott válaszaival magyarázhatjuk, hiszen ez a 38 aminosavból álló polipeptid elég nagy ahhoz, hogy intraperitoneális adást követően ne tudjon bejutni a központi idegrendszerbe.

Összefoglalva tehát elmondható, hogy ezek a kísérletek igazolják elsőként a periférián a PACAP-38 jelentős szerepét a fájdalomérzet közvetítésében. Ezek a hatások azonban a nociceptív folyamatok patomechanizmusától függően eltérőek lehetnek: a nociceptorokon kifejtett közvetlen hatás stimuláló, szenzitizáló, bizonyos gyulladáshoz vezető folyamatokban azonban antinociceptív, antihiperalgézikus, antiallodiniás hatást tapasztaltunk, amelyet a VPAC receptorok közvetítenek. A PACAP perifériás nocicepcióban betöltött szerepének pontos molekuláris mechanizmusainak felderítéséhez további vizsgálatok szükségesek.

III. A SZTATIKUS MÁGNESES TÉR ANTINOCICEPTÍV HATÁSA ÉS A HÁTTÉRBE ÁLLÓ MECHANIZMUSOK VIZSGÁLATA

Számos korábbi eredmény igazolta a sztatikus mágneses tér (static magnetic field, SMF) hatásait különböző viselkedésmintázatokban és idegi működésekben, a lokomotoros aktivitás indukciójában [44], kondicionált ízaverzióban [74], vagy vesztibuláris aktivációban [103]. A sztatikus mágneses tér nociceptív folyamatokra gyakorolt hatásáról szóló kísérletek eredményei meglehetősen ellentmondásosak [12,16,43,49,86,88,101]. Az ellentmondó eredmények magyarázata lehet, hogy a kísérleteket különböző fajokon végezték, valamint hogy a kiváltott hatás függhet a mágneses tér eltérő tulajdonságaitól, másképpen beállított paramétereitől és a behatás időtartamától is.

Az általunk használt sztatikus mágneses teret létrehozó készüléket dr. László János és munkacsoportja készítette, optimalizálta és validálta egér vonaglasi tesztben [56]. A készülékben alul és felül elhelyezkedő mátrixok 5 mm sugarú, 10 mm magasságú, henger alakú neodímium-vas-bór (NdFeB) összetételű mágneseket tartalmaznak. Ezek a ritkaföldfém mágnesek rendelkeznek a legmagasabb indukció/tömeg aránnyal. Az egyedi mágnesek N50 fokúak, azaz jellemző értékük az 1.47 T remanens mágneses indukció. Minden egyes mágnes a szomszédaival ellentétes polaritású, továbbá a másik mátrixban vele szemben elhelyezkedő mágnessel egy tengelyű és megegyező irányú, ami a mágneses mező jellegzetes mintázatához vezet. Az így létrejött mágneses térre a továbbiakban az optimalizált sztatikus mágneses tér (oSMF) elnevezést használjuk [56].

A pontos mechanizmus, amellyel az SMF változatos hatásait kiváltja, egyelőre ismeretlen [59,94], bár felmerült az endogén opioiderg rendszer és egyes ioncsatornák vezetőképességének megváltoztatásának szerepe [48,92,93]. Számos eredmény alapján feltételezhető, hogy a gyenge sztatikus mágneses tér csökkenti az ideg ingerületvezetésének sebességét a Ca^{2+} - és Na^{+} -csatornák gátlásán keresztül [92,93,134].

A kapszaicin-érzékeny, TRPV1 receptort expresszáló szenzoros neuronok rendkívül fontos szerepet játszanak számos gyulladásos és fájdalommal járó folyamat kialakulásában. E neuronok aktivált végződéseiből olyan szenzoros neuropeptidok szabadulnak fel, mint a P-anyag vagy a CGRP, amelyek a központi idegrendszerben és a periférián is jelentős pronociceptív, proinflammatorikus hatásokkal rendelkeznek [60,109]. Ezzel szemben, az ugyanezen idegvégződésekből felszabaduló szomatostatin a szisztémás keringésbe jutva a test távolabbi pontjain képes gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatást kifejteni. A TRPV1 receptor olyan nem-szelektív kation-csatorna, amelyet számos inger, például exogén vanilloidok (kapszaicin vagy reziniferatoxin, RTX), fájdalmas hőmérséklet, protonok és endogén anyagok (bradikinin, leukotriének, lipoxigenáz termékek) képes aktiválni [107,109]. Ismételt, nagy dózisu TRPV1 receptor agonistával (kapszaicin vagy RTX) történő előkezeléssel a kapszaicin-érzékeny neuronok működése szelektíven gátolható, ez a deszenzibilizáció [6,39,113]. A TRPV1 receptor tartós aktivációja következtében jelentős mértékben megnövekedik az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció, ami a mitokondriumokban Ca^{2+} -felhalmozódáshoz és következményes duzzadáshoz vezet, a sejtműködés károsodását is okozva [108].

Kísérleteinkben az oSMF hatásait vizsgáltuk akut viscerális és szomatikus kemonocicepcióra, akut gyulladásos nocifenzív reakciókra és mechanikai hiperalgéziára. Vizsgálatsorozatunk másik része a megfigyelt antinociceptív, antihiperalgéziás hatás mechanizmusának és a kapszaicin-érzékeny szenzoros rostok ezen folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatára irányult.

III.1. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Állatok

A kísérleteket Balb/c, illetve C57BL/6 egereken végeztük. Előbbiket a Pécsi Tudományegyetem Központi Állatházában, utóbbiakat a Semmelweis Egyetem Állatházában standard, apatogén környezetben tartottuk 24-25°C-on, étellel és vízzel *ad libitum* ellátva.

Optimalizált sztatikus mágneses tér

A sztatikus mágneses teret létrehozó készüléket egy keret és egy abba illeszkedő műanyag ketrec alkotja, amelyben az egerek szabadon mozognak. A bevezetőben részletesen jellemzett mágneses mátrixok a keretben, a ketrec alatt és felett helyezkednek el.

Vonaglási teszt

A viszcerális nocicepciót CFLP egereken váltottuk ki 200 μ l 0,6%-os ecetsav-oldat, illetve 2%-os $MgSO_4$ -oldat intraperitoneális adásával [135]. A peritoneum kémiai izgatására adott tipikus nocifenzív reakció az alhasi izmok összehúzódása, az úgynevezett vonaglás. A vonaglásokat az anyagadástól számított 0-5, 5-20 és 20-30 perces intervallumokban külön-külön számoltuk. Az egereket a kísérlet előtt 5 perccel tettük a ketrecbe és ott is tartottunk végig a teljes kísérlet alatt. Az egyik ketrecet optimalizált mágneses térbe helyeztük, a másikat kontrollként használtuk.

Reziniferatoxinnal kiváltott mechanikai hiperalgémia vizsgálata

Balb/c egerek bal hátsó lábának talpába injektáltunk 20 μ l 0,1 μ g/ml TRPV1 receptor agonista RTX-oldatot. Méréseinket az RTX-injekció előtt és 30 perccel utána végeztük Ugo Basile Dynamic Plantar Aesthesiometerrel. A hiperalgémiaát a kezdeti kontroll értékekhez viszonyítva százalékban fejeztük ki. Az egyik csoport állatait RTX-adás előtt 5 perccel az oSMF-be helyeztük és mérésig ott is tartottuk, a másik csoport állatait nem tettük ki a sztatikus mágnes tér hatásainak.

Formalinnal kiváltott akut nocifenzív viselkedés vizsgálata

Balb/c egerek bal hátsó lábába intraplantárisan 50 μ l 2,5%-os formalin-oldatot injektáltunk. A formalin két fázisban vált ki nocifenzív reakciót az állatokban, elsőként egy direkt kemonoczeptív hatás jelentkezik, ami körülbelül 5 percig tart (I. fázis), utána pedig beindulnak a gyulladási folyamatok, amik a második fázist adják a 20-45. perces intervallumban [123]. A nocifenzív reakció mértékét mindkét fázisban a kezelt láb emelgetésének és nyalogatásának összesített ideje alapján határoztuk meg [8]. Anyagadás előtt 5 perccel az állatokat az oSMF-be helyeztük, és ott is tartottuk a kísérlet végéig. Az oSMF-mérések mellett párhuzamosan kontroll méréseket is végeztünk, azok az állatok nem voltak mágneses térben.

Carrageeninnel kiváltott gyulladási mechanikai hiperalgémia vizsgálata

Balb/c egerek egyik hátsó lábának talpába 50 μ l 3%-os carrageenin-oldatot injektáltunk. A carrageenin kevert típusú akut gyulladási reakciót vált ki a talpban, ami maximumát anyagadás után 3 órával éri el [8]. A méréseket ezért carrageenin-adás előtt és 3 órával utána végeztük. A mechanikai érzékenységet ennél a modellnél is Ugo Basile Dynamic Plantar Aesthesiometerrel határoztuk meg. A hiperalgémiaát a kezdeti kontroll értékekhez viszonyítva, százalékban fejeztük ki. Az egyik csoport állatait carrageenin-adás előtt 5 perccel az oSMF-be helyeztük és a mérés végéig ott tartottuk, a másik csoport állatait nem tettük ki a sztatikus mágneses tér hatásainak.

A kapszaicin-érzékeny afferensek inaktíválása reziniferatoxin-előkezeléssel

A kapszaicin-érzékeny primér szenzoros neuronok működését szelektíven blokkolhatjuk az ultrapotens TRPV1 receptor agonista RTX nagy dózisainak ismételt adásával. Öt nappal az utolsó kezelést követően, amikor már nem kellett számolnunk az RTX akut izgató hatásaival, az állatokkal elvégeztük a formalin tesztet, és vizsgáltuk a carrageeninnel kiváltott akut gyulladási mechanikai hiperalgémiaát.

Rotarod teszt

Ugo Basile Accelerating Rotarod készülékkel azt is megvizsgáltuk, hogy befolyással van-e az oSMF-expozíció az egerek koordinációjára és motoros működésére [47]. Az állatok a dob tetején kapaszkodnak a készülék indításakor és igyekeznek forgás közben is a dob tetején megkapaszkodni. A mérésnek akkor van vége, amikor az állat leesik a dobról a készülék alatt található pedálra. A rotarod

tesztet elvégeztük az oSMF-ben való tartózkodás előtt és 30 perccel utána is. Minden mérést háromszor ismételtünk meg és ezeknek az átlagait használtuk fel az eredmények értékeléséhez.

Statisztika

Mérési eredményeink értékeléséhez módosított Bonferroni t-teszttel kiegészített egyutas ANOVA-tesztet használtunk, ahol minden esetben a különböző csoportok közötti eredmények összehasonlításakor $*p < 0,05$ értékeket határoztuk meg szignifikánsnak.

III.2. EREDMÉNYEK

Az oSMF hatása az akut viszcerális kemonociceptióra

Az oSMF-ben lévő egerek vonaglászának száma a kontroll csoporthoz képest mindhárom periódusban szignifikáns csökkenést mutatott az ecetsavval kiváltott nocifenzív reakció esetében. A $MgSO_4$ -oldat i.p. injekciója ennél kisebb mértékű nocifenzív reakciót okozott. Az oSMF hatására a vonaglások száma ebben a modellben is csökkent, ami a második és harmadik intervallumban szignifikáns gátlást jelent a kontroll értékekhez képest.

Az oSMF hatása a reziniferatoxinnal kiváltott mechanikai hiperalgéziára

Az RTX intraplantáris injekciója kontroll állatokban fél órával a beadás után jelentős mértékben csökkentette a mechanonociceptív küszöböt. Ugyanez az RTX-adás az oSMF-ben tartott állatokban szignifikánsan gátolta a TRPV1 receptor aktivációjával kiváltott mechanikai hiperalgéziát a talpban.

Az oSMF hatása a formalinnal kiváltott akut szomatikus nociceptióra

A formalin teszt első fázisában a kontroll csoportban lévő egerek nocifenzív viselkedéséhez képest az oSMF-kezelés szignifikánsan alacsonyabb értékeket produkált. A második fázisban is jelentősen kisebb volt az oSMF-ben tartott állatoknál a nocifenzív viselkedés, mint a kontroll ketrecekben lévőknél.

Az oSMF hatása a carrageeninnel kiváltott akut nocifenzív viselkedésre RTX-előkezelt állatokban

A kontroll csoportban a carrageenin-adást követő harmadik órában jelentős hiperalgéziát mértünk. Azokban az egerekben, amiket a mérés előtt oSMF-ketrecbe helyeztünk, szignifikánsan kisebb küszöbcsökkenés volt tapasztalható. Az RTX-előkezelt állatcsoportban csökkent ugyan a mechanonociceptív küszöb, az eltérés azonban nem szignifikáns sem a kontroll, sem az oSMF-kezelt állatcsoportban.

Az oSMF hatása a formalinnal kiváltott akut nocifenzív viselkedésre RTX-előkezelt állatokban

Azoknál az állatoknál, amelyeknél RTX-előkezelést alkalmaztunk a kísérlet előtt 5 nappal, a kapszaicin-érzékeny afferensek működését inaktívtuk. A kontroll csoportban a korábbi kísérletsorozathoz hasonlóan alakul a nocifenzív viselkedés formalin hatására. Az oSMF előzőekben tapasztalt antinociceptív hatása a kapszaicin-érzékeny rostok inaktíválása után elmaradt mindkét fázisban.

Az oSMF hatása az egerek koordinációjára és motoros működésére

Az állatok egy részét 30 percig az oSMF hatásának tettük ki, míg egy másik csoportot kontroll ketrecekben tartottunk. A kezelés előtt és után is elvégeztük a rotarod tesztet mindkét csoporton. Sem a csoportok között, sem az egyes csoportok kezelés előtti és kezelés utáni értékei között nem tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket.

III.3. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Fenti eredményeink azt mutatják, hogy az oSMF antinociceptív, antihiperalgéziás hatásokkal rendelkezik többféle egérmódelben. Az oSMF gátolta mind az ecetsavval, mind a $MgSO_4$ -tal kiváltott akut viszcerális kemonocicepciót, amely hatás kifejezettebb volt az ecetsavval kiváltott vonaglási tesztben. Ez a különbség valószínűleg e kémiai anyagok eltérő fájdalomkeltő mechanizmusában keresendő: a $MgSO_4$ által okozott nocifenzív reakció elsősorban kemonociceptorok direkt stimulálásával jön létre, míg az ecetsav-indukálta vonaglás akut gyulladásos folyamatok eredménye [30].

A formalin tesztben az I. fázisban direkt kemonociceptív hatás jelentkezik, a másodikban már akut gyulladásos reakciók következményeképpen fellépő nocifenzív viselkedést láthatunk. A kontroll csoportokban az RTX-előkezelés az I. fázisban nem, de a II. fázisban jelentősen csökkent reakciókat eredményezett, amely azt igazolja, hogy a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből aktiváció hatására felszabaduló szenzoros neuropeptidok (például a P-anyag, CGRP) szerepet játszanak a formalinnal kiváltott akut gyulladásos reakció kialakulásában. Az oSMF formalinnal kiváltott nocifenzív reakciókat gátló hatása elmaradt a kapszaicin-érzékeny rostok reziniferatoxinnal történő inaktiválása után. Az I. fázisban az oSMF antinociceptív hatásának hátterében a kapszaicin-érzékeny idegvégzésekbe történő Na^+ -beáramlás és a következményes akciós potenciál kialakulásának gátlása állhat. A II. fázisban tapasztalt gátló hatásban azonban az oSMF hatására a kapszaicin-érzékeny afferensekbe történő csökkent Ca^{2+} -beáramlás és a neurogén gyulladásos reakciót kiváltó szenzoros neuropeptidok csökkent felszabadulása is szerepet játszhat. Ezt a teóriát alátámasztják azon irodalmi adatok, amelyek az SMF Ca^{2+} - és Na^+ -áramokat gátló és ezeken keresztül a neuronális excitabilitást csökkentő hatásaira vonatkoznak [92,93,134].

A carrageenin intraplantáris adást követően lábduzzadást és mechanikai hiperalgéziát okoz [8]. Ebben a folyamatban számos neurogén és nem-neurogén komponens vesz részt, amelyet gyulladásos neuropeptidok, citokinek és ciklooxygenáz termékek közvetítenek [20,84]. A neurogén komponensek e patomechanizmusban betöltött nem kitüntetett szerepére utal, hogy bár a carrageennel kiváltott mechanikai hiperalgézia kisebb volt az RTX-előkezelést kapott állatcsoportban, a különbség nem volt szignifikáns mértékű. Az oSMF ebben a módelben is jelentős mértékben gátolta a gyulladás következtében kialakuló mechanikai hiperalgéziát a kontroll csoportban, azonban szinte hatástalan volt az RTX-előkezelt állatokban.

Az oSMF csökkentette továbbá a TRPV1 receptor agonista RTX intraplantáris adása következtében kialakuló gyulladásos mechanikai hiperalgéziát. Az RTX proinflammációs neuropeptideket szabadít fel az érintett területen, amelyek lokális neurogén gyulladást és a mechanonociceptív küszöb csökkenését idézik elő az állat talpában. Az SMF jelentősen csökkenti a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégzésekbe történő kation-áramlást, amely gátolja a szenzoros proinflammatorikus és pronociceptív neuropeptidok felszabadulását. Mindemellett azonban az oSMF centrális szenzitizációt gátló hatása és csökkent szinaptikus transzmisszió sem zárható ki.

Kihangsúlyozandó, hogy a 30 percig tartó oSMF-expozíció nem befolyásolta a mozgáskoordinációt és a motoros aktivitást.

Mindezekből megállapíthatjuk, hogy az oSMF-expozíció több egérmódelben is jelentős gátló hatást gyakorolt a nociceptív reakciókra. Bár a pontos hatásmechanizmus egyelőre nem ismert, a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégzéseknek fontos szerepük van ezen antinociceptív és antihiperalgéziás hatások közvetítésében, hiszen e rostok inaktivációja után a tapasztalt gátló hatás elmaradt. Ennek hátterében a Ca^{2+} - és Na^+ -áramok blokkolása állhat, ami az akciós potenciál gátlását, valamint a mitokondriumok elégtelen működését eredményezi [92,93,134].

ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A szelektív sst₄ szomatosztatin receptor agonista J-2156 segítségével bizonyítékokat szolgáltatunk e receptor fájdalomcsillapító (antiallodiniás/antihiperalgéziás) és gyulladásgátló szerepére különféle egér- és patkánymodellekben. Külön kiemelendő, hogy e vegyület mindkét fajban hatékonyan gátolta a neurogén gyulladást is, amely szerepet játszik sokféle gyulladással járó kórkép kialakulásában és súlyosbodásában, és amelyre jelenleg egyetlen hatékony kezelési mód sem áll rendelkezésre. Nagy jelentőséggel bír továbbá, hogy ez az sst₄ receptor agonista csökkentette a mechanikai allodiniát traumás neuropátiában, amelyre a klasszikus nem-szteroid és opioid szerkezetű fájdalomcsillapítók hatástalanok. Bár bizonyos neuropátiás fájdalom-állapotok kezelésében az utóbbi években egyes antiepileptikumok és antidepresszánsok jelentős előrelépést jelentettek, e kórképek terápiája még mindig nem megoldott probléma. Jelen kísérleteinkkel tehát elsőként sikerült azonosítanunk egy szenzoros idegvégződéseken és gyulladásgátló sejteken egyaránt expresszálandó célmolekulát, az sst₄ receptort, amelyen szelektíven ható, stabil, elsősorban nempeptid szerkezetű agonisták alapvetően új hatásmechanizmusú, széles spektrumú gyulladásgátló és fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztésére nyújthatnak lehetőséget.
2. Jelen eredményeink az elsők a PACAP-38 nociceptív folyamatokra kifejtett perifériás hatásaira vonatkozóan. Bár térdízületben egyrost-elvezetéses elektrofiziológiai vizsgálatok a lokálisan alkalmazott PACAP-38 VIP-hez hasonló szenzitizáló hatását bizonyították, számos, elsősorban gyulladásgátló egér- és patkánymodellben perifériás antinociceptív és antihiperalgéziás hatást tapasztaltunk, amelyeket a VPAC receptorok közvetítenek. Ennek a látszólagos ellentmondásnak magyarázata lehet az a tény, hogy a PACAP receptorainak aktivációja következtében a megnövekedett intracelluláris cAMP-szint neuronokon excitációt okoz ugyan, de gyulladásgátló sejteken csökkenti a gyulladásgátló mediátorok, citokinek felszabadulását. Mindezek alapján a nocicepcióra kifejtett eredő gátló hatás nagy valószínűséggel nem az idegvégződéseken megvalósuló direkt hatás eredménye, hanem a gyulladásgátló mechanizmuson alapuló indirekt hatás. Ezen eredmények gyakorlati jelentőségének és a PACAP-ban rejlő gyógyszerfejlesztési perspektíváknak a felderítése még további vizsgálatokat igényel.
3. A dolgozat harmadik részében a farmakológiai megközelítéseken túl egy alternatív fájdalomcsillapító lehetőség, a sztatikus mágneses tér állatkísérletes vizsgálatának eredményeit foglaltam össze. A készülék paramétereinek előzetes optimalizálása után az ezzel előállított oSMF antinociceptív és antihiperalgéziás hatásának bizonyult különféle egér nocicepció modellben. A tapasztalt gátló hatás mechanizmusában egyértelműen igazoltuk a kapszaicin-érzékeny érzőrostok szerepét. Bár a pontos molekuláris folyamatok felderítése még további vizsgálatokat igényel, valószínűsíthető ezen afferenseken lévő feszültségfüggő ioncsatornák (Na⁺, Ca²⁺), esetleg a TRPV1 receptor/kationcsatorna működésének oSMF-kiváltotta gátlása. E mechanizmusokon keresztül az oSMF feltehetően akadályozza az akciós potenciál kialakulását és terjedését, valamint csökkenti a pronociceptív neuropeptidok felszabadulását. A mágneses tér ilyen irányú felhasználása érdekes új irányokat mutathat a fájdalomcsillapító terápiában.

- [1] Abad C, Gomariz RP, Waschek JA (2006). *Current Topics in Medicinal Chemistry* 6: 151-163.
- [2] Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM (1982). *Nature* 298: 240-244.
- [3] Arimura A, Somogyvári-Vígh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C (1991). *Endocrinology* 129: 2787-2789.
- [4] Barnes PJ (2001). *Allergy* 56: 928-936.
- [5] Bennett GJ (1993). *Muscle & Nerve* 16: 1040-1048.
- [6] Bevan S, Szolcsányi J (1990). *Trends in Pharmacological Sciences* 11: 330-333.
- [7] Bölcskei K, Horváth D, Szolcsányi J, Pethő G (2007). *European Journal of Pharmacology* 564: 80-87.
- [8] Bölcskei K, Helyes Zs, Szabó Á, Sándor K, Pethő G, Elekes K, Almási R, Pintér E, Szolcsányi J (2005). *Pain* 117: 368-376.
- [9] Brazeau P (1986). *American Journal of Medicine* 81: 8-13.
- [10] Cao T, Pintér E, Al-Rashed S, Gerard NP, Hoult R, Brain S (2000). *Journal of Immunology* 164: 5424-5429.
- [11] Cao T, Gerard NP, Brain SD (1999). *American Journal of Physiology* 277: 476-481.
- [12] Choleris E, Del Seppia C, Thomas AW, Luschi P, Ghione S, Moran GR, Prato FS (2002). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 269: 193-201.
- [13] Delgado M, Leceta J, Ganea D (2003). *Journal of Leukocyte Biology* 73: 155-164.
- [14] Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D (1999a). *Journal of Immunology* 162: 1707-1716.
- [15] Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D (1999b). *Journal of Immunology* 162: 4685-4696.
- [16] Del Seppia C, Mezzasalma L, Choleris E, Luschi P, Ghione S (2003). *Behavioural Brain Research* 144: 1-9.
- [17] de Swert KO, Joos GF (2006). *European Journal of Pharmacology* 533: 171-181.
- [18] Dickinson T, Fleetwood-Walker SM (1999). *Trends in Pharmacological Sciences* 20: 324-329.
- [19] Dickinson T, Mitchell R, Robberecht P, Fleetwood-Walker SM (1999). *Neuropharmacology* 38: 167-180.
- [20] Doi Y, Minami T, Nishizawa M, Mabuchi T, Mori H, Ito S (2002). *Neuroreport* 13: 93-96.
- [21] Dun EC, Huang RL, Dun SL, Dun NJ (1996). *Brain Research* 721: 233-237.
- [22] Eckhardt ET, Cheplovitz F, Lipo N, Govier WM (1958). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 98: 186-188.
- [23] Edvinsson L, Fredholm BB, Hamel E, Jansen I, Verrecchia C (1985). *Neuroscience Letters* 58: 213-217.
- [24] Engström M, Savola JM, Würster S (2006). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316: 1262-1268.
- [25] Engström M, Tomperi J, El Darwish K, Ahman M, Savola JM, Würster S (2005). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 312: 332-338.
- [26] Fahrenkrug J, Hannibal J (1998). *Neuroscience* 83: 1261-1272.
- [27] Frossard N, Advenier C (1991). *Life Sciences* 49: 1941-1953.
- [28] Gottschall PE, Tatsuno I, Miyata A, Arimura A (1990). *Endocrinology* 127: 272-277.
- [29] Grant A (2002). *Inflammopharmacology* 9: 403-420.
- [30] Gyires K, Torma Z (1984). *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie* 267: 131-140.
- [31] Hamelink C, Tjurmina O, Damadzic R, Young WS, Weihe E, Lee HW, Eiden LE (2002). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 461-466.
- [32] Han SP, Naes L, Westfall TC (1990). Calcitonin gene-related peptide is the endogenous mediator of nonadrenergic-noncholinergic vasodilation in rat mesentery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 255: 423-428.
- [33] Hannibal J, Ekblad E, Mulder H, Sundler F, Fahrenkrug J (1998). *Cell and Tissue Research* 291: 65-79.
- [34] Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA, Waschek JA (1998). *Pharmacological Reviews* 50: 265-270.
- [35] Helyes Zs, Pozsgai G, Börzsei R, Németh J, Bagoly T, Márk L, Pintér E, Tóth G, Elekes K, Szolcsányi J, Reglődi D (2007). *Peptides* 28: 1847-1855.
- [36] Helyes Zs, Pintér E, Németh J, Sándor K, Elekes K, Szabó Á, Pozsgai G, Keszthelyi D, Kereskai L, Engström M, Würster S, Szolcsányi J (2006). *British Journal of Pharmacology* 149: 405-415.
- [37] Helyes Zs, Pintér E, Szolcsányi J (2005). *Drugs of the Future* 30: 1-9.
- [38] Helyes Zs, Szabó Á, Németh J, Jakab B, Pintér E, Bánvölgyi Á, Kereskai L, Kéri Gy, Szolcsányi J (2004). *Arthritis & Rheumatism* 50: 1677-1685.
- [39] Helyes Zs, Pintér E, Németh J, Szolcsányi J (2003). *Current Medicinal Chemistry* 2: 191-218.
- [40] Helyes Zs, Pintér E, Németh J, Kéri Gy, Than M, Oroszi G, Horváth A, Szolcsányi J (2001). *British Journal of Pharmacology* 134: 1572-1579.
- [41] Helyes Zs, Than M, Oroszi G, Pintér E, Németh J, Kéri Gy, Szolcsányi J (2000). *Neuroscience Letters* 278: 185-188.
- [42] Hofland LJ, Lamberts SW (1996). *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 10: 163-176.
- [43] Hong CZ, Shellock FG (1990). *Magnetic Resonance Imaging* 8: 65-69.
- [44] Houpt TA, Pittmann DW, Barranco JM, Brooks Eh, Smith JC (2003). *Journal of Neurosciences* 23: 1489-1505.
- [45] Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE (1995). *Trends in Pharmacological Sciences* 16: 86-88.
- [46] Hughes SR, Brain SD (1994). *British Journal of Pharmacology* 111: 425-430.
- [47] Jones BJ, Roberts DJ (1968). *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für Experimentelle Pathologie & Pharmakologie* 259: 211.
- [48] Kavaliers M, Ossenkopp KP (1994). *Biological effects of electric and magnetic fields. Sources and mechanisms* 205-240. Editors: Carpenter DO, Ayrapetyan S. Academic Press, New York.

- [49] Kavaliers M, Ossenkopp KP, Hirst M (1984). *Physiology & Behavior* 32: 261-264.
- [50] Kim SH, Chung JM (1992). *Pain* 50: 355-363.
- [51] Kojima M, Ito T, Oono T, Hisano T, Igarashi H, Arita Y, Kawabe K, Coy DH, Jensen RT, Nawata H (2005). *Pancreas* 30: 62-70.
- [52] Koster R, Anderson M, de Beer EJ (1959). *Federation Proceedings* 18: 412.
- [53] Kuehl FA Jr, Zanetti ME, Soderman DD, Miller DK, Ham EA (1987). *American Review of Respiratory Disease* 36: 210-213.
- [54] Laburthe M, Couvineau A, Tan V (2007). *Peptides* 28: 1631-1639.
- [55] Lam HC, Takahashi K, Ghatei MA, Kanze SM, Polak JM, Bloom SR (1990). *European Journal of Biochemistry* 193: 725-729.
- [56] László J, Reiczigel J, Székely L, Gasparics A, Bogár I, Bors L, Rácz B, Gyires K (2007). *Bioelectromagnetics* 28: 615-627.
- [57] Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW (2001). *Pharmacological Reviews* 53: 597-652.
- [58] Leceta J, Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Ganea D, Delgado M (2000). *Annals of the New York Academy of Sciences* 921: 92-102.
- [59] Lockwood DR, Kwon B, Smith JC, Haupt TA (2003). *Physiology & Behavior* 78: 635-640.
- [60] Maggi CA (1995). Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Progress in Neurobiology* 45: 1-98.
- [61] Maggi CA, Meli A (1988). *General Pharmacology: The Vascular System* 19: 1-43.
- [62] Martinez C, Abad C, Delgado M, Arranz A, Juarranz MG, Rodriguez-Henche N, Brabet P, Leceta J, Gomariz RP (2002). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 1053-1058.
- [63] Massi M, Panocka I, de Garo G (2000). *Peptides* 21: 1597-1609.
- [64] May V, Beaudet MM, Parsons RL, Braas KM (2000). *Annals of the New York Academy of Sciences* 921: 186-194.
- [65] McDougall JJ, Barin AK (2005). *British Journal of Pharmacology* 145: 104-113.
- [66] McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM (1998). *Nature* 393: 333-339.
- [67] Mikkelsen JD, Hannibal J, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Olcese J, McArdle C (1995). *Journal of Neuroendocrinology* 7: 47-55.
- [68] Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 164: 567-574.
- [69] Moller K, Zhang YZ, Hakanson R, Luts A, Sjölund B, Uddman R, Sundler F (1993). *Neuroscience* 57: 725-732.
- [70] Mulder H, Uddman R, Moller K, Zhang YZ, Ekblad E, Alumets J, Sundler F (1994). *Neuroscience* 63: 307-312.
- [71] Muller JM, Debaigt C, Coursaud S, Montoni A, Pineau N, Meunier AC, Janet T (2007). *Peptides* 28: 1655-1666.
- [72] Németh J, Reglödi D, Pozsgai G, Szabó Á, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs (2006). *Neuroscience* 143: 223-230.
- [73] Nijuki F, Nicholl CG, Howard A, Mak JC, Barnes PJ, Girgis SI, Legon S (1993). *Clinical Science (London, England 1979)* 85: 385-388.
- [74] Nolte CM, Pittmann DW, Kalevitch B, Henderson R, Smith JC (1998). *Physiology & Behavior* 63: 683-688.
- [75] Odum L, Petersen LJ, Skov PS, Ebskov LB (1998). *Inflammation Research* 47: 488-492.
- [76] Ohsawa M, Brailoiu GC, Shiraki M, Dun NJ, Paul K, Tseng LF (2002). *Pain* 100: 27-34.
- [77] Onou T, Shimizu T, Sakamoto H, Higashi M, Kanmura Y, Miyata A (2007). *Journal of Molecular Neuroscience* 33: 339.
- [78] Parsons RL, Rossignol TM, Calupca MA, Hardwick JC, Brass KM (2000). *Annals of the New York Academy of Sciences* 921: 202-210.
- [79] Parsons JA, Erlandsen SL, Hegre OD, McEvoy RC, Elde RP (1976). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 24: 872-882.
- [80] Patacchini R, Maggi CA (2001). *European Journal of Pharmacology* 429: 13-21.
- [81] Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB (1995). *Life Sciences* 57: 1249-1265.
- [82] Pintér E, Helyes Zs, Szolcsányi J (2006). *Pharmacology & Therapeutics* 112: 440-456.
- [83] Pintér E, Helyes Zs, Németh J, Pórszász R, Pethő G, Than M, Kéri Gy, Horváth A, Jakab B, Szolcsányi J (2002). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 366: 142-150.
- [84] Poole S, Cunha FQ, Selkirk S, Lorenzetti BB, Ferreira SH (1995). *British Journal of Pharmacology* 115: 684-688.
- [85] Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM (2002). *Pharmacological Reviews* 54: 233-246.
- [86] Prato FS, Robertson JA, Desjardins D, Hensel J, Thomas AW (2005). *Bioelectromagnetics* 26: 109-117.
- [87] Raynor K, Reisine T (1992). *Critical Reviews in Neurobiology* 6: 273-289.
- [88] Reeser JC, Smith DT, Fischer V, Berg R, Liu K, Untiedt C, Kubista M (2005). *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 86: 565-570.
- [89] Regoli D, Boudon A, Fauchere JL (1994). *Pharmacological Reviews* 46: 551-599.
- [90] Reichlin S (1983). *New England Journal of Medicine* 309: 1495-1501.
- [91] Reubi JC, Laissue JA, Waser B, Steffen DL, Hipkin W, Schonbrunn A (1999). *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84: 2942-2950.

- [92] Rosen AD (2003). *Cell Biochemistry and Biophysics* 39: 163-173.
- [93] Rosen AD (1996). *Biochimica et Biophysica Acta* 1148: 149-155.
- [94] Saunders R (2005). *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 87: 225-239.
- [95] Segre GV, Goldring SR (1993). *Trends in Endocrinology and Metabolism* 4: 309-314.
- [96] Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990). *Pain* 43: 205-218.
- [97] Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE (2000). *Endocrine Reviews* 21: 619-670.
- [98] Shimizu T, Katahira M, Sugawara H, Inoue K, Miyata A (2004). *Regulatory Peptides* 123: 117-122.
- [99] Shioda S, Nakai Y, Nakajo S, Nakaya K, Arimura A (1996). *Annals of the New York Academy of Sciences* 805: 677-683.
- [100] Shioda S, Legradi G, Leung WC, Nakajo S, Nakaya K, Arimura A (1994). *Endocrinology* 135: 818-825.
- [101] Shupak NM, Hensel JM, Cross-Mellor SK, Kavaliers M, Prato FS, Thomas AW (2004). *Neuroscience Letters* 354: 30-33.
- [102] Skofitsch G, Donnerer J, Petronijevic S, Saria A, Lembeck F (1983). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 322: 153-157.
- [103] Snyder DJ, Jahng JW, Smith JC, Houpt TA (2000). *Neuroreport* 11: 2681-2685.
- [104] Somogyvári-Vígh A, Reglódi D (2004). *Current Pharmaceutical Design* 10: 2861-2889.
- [105] Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L (1993). *Nature* 365: 170-175.
- [106] Suda K, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR (1992). Investigation of the interaction of VIP binding sites with VIP and PACAP in human brain. *Neuroscience Letters* 137: 19-23.
- [107] Szállási Á, Cruz F, Gepetti P (2006). *Trends in Molecular Medicine* 12: 545-554.
- [108] Szállási Á, Joó F, Blumberg PM (1989). *Brain Research* 503: 68-72.
- [109] Szolcsányi J (2004). *Neuropeptides* 38: 377-384.
- [110] Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs (2004). *Hyperalgesia: molecular mechanisms and clinical implications* 113-128. Editors: Handwerker HO, Brune K. IASP Press, Seattle.
- [111] Szolcsányi J, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J, Pintér E (1998a). *British Journal of Pharmacology* 123: 936-942.
- [112] Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J (1998b). *British Journal of Pharmacology* 125: 916-922.
- [113] Szolcsányi J (1993). Capsaicin in the study of pain 1-26. Editor: Wood JN. Academic Press London.
- [114] Szolcsányi J (1996). *Progress in Brain Research* 113: 343-359.
- [115] Szolcsányi J (1988). *Agents and Actions* 23: 4-11.
- [116] Szolcsányi J (1984). *Antidromic Vasodilation and Neurogenic Inflammation* 27-53. Editors: Chahl LA, Szolcsányi J, Lembeck F. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- [117] Taiwo YO, Heller PH, Levine JD (1992). *Neuroscience* 48: 479-483.
- [118] Taiwo YO, Levine JD (1991). *Neuroscience* 44: 131-135.
- [119] Tajti J, Vécsei L (2006). *Magyar Tudomány* 167: 1191-1196.
- [120] Takeba Y, Suzuki N, Kaneko A, Asai T, Sakane T (1999). *Arthritis & Rheumatism* 42: 2418-2429.
- [121] Tatsuno I, Gottschall PE, Köves K, Arimura A (1990). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 168: 1027-1033.
- [122] ten Bokum AM, Hofland LJ, van Hagen PM (2000). *European Cytokine Network* 11: 161-176.
- [123] Tjolsen A, Berge OG, Hunnskaar S, Rosland JH, Hole K (1992). *Pain* 51: 5-17.
- [124] van Rossum D, Hanisch U, Quirion R (1997). *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 21: 649-678.
- [125] Uddman R, Grunditz T, Kato J, Sundler F (1998). *Anatomy and Embryology* 197: 273-282.
- [126] Vaudry D, Pamantung TF, Basille M, Rousellet C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC, Gonzalez BJ (2002). *European Journal of Neuroscience* 15: 1451-1460.
- [127] Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H (2000). *Pharmacological Reviews* 52: 269-324.
- [128] Vécsei L, Widerlöv E (1988). *Acta Psychiatrica Scandinavica* 78: 657-667.
- [129] Vígh S, Arimura A, Gottschall PE, Kitada C, Somogyvári-Vígh A, Childs GV (1993). *Peptides* 14: 59-65.
- [130] Watson GS, Sufka KJ, Coderre TJ (1997). *Pain* 70: 53-58.
- [131] Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns C (2003). *Nature Reviews, Drug Discovery* 2: 999-1017.
- [132] Weinberg A, Halpern M, Zahalka MA, Quintana F, Traub L, Moroz C (2003). *Arthritis & Rheumatism* 48: 846-853.
- [133] Weston MC, Peachell PT (1998). *General Pharmacology* 31: 715-719.
- [134] Wieraszko A (2000). *Bioelectromagnetics* 21: 175-182.
- [135] Witkin LB, Heuter CF, Galdi F, O'Keefe E, Spitaletta P, Plummer AJ (1961). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 133: 400-408.
- [136] Wray V, Kokoschke C, Nokihara K, Naruse S (1993). *Biochemistry* 32: 5832-5841.
- [137] Yamamoto T, Tatsuno I (1995). *Neuroscience Letters* 184: 32-35.
- [138] Zhang Y, Danielsen N, Sundler F, Mulder H (1998). *Neuroreport* 9: 2833-2836.
- [139] Zhang Y, Malmberg AB, Sjolund B, Yaksh TL (1996). *Neuroscience Letters* 207: 187-190.
- [140] Zhang Y, Sjolund B, Moller K, Hakanson R, Sundler F (1993). *Neuroscience* 57: 733-737.
- [141] Zheng YQ, Wei W, Dai M, Zhu L, Jia XY, Wang Y (2006). *Acta Pharmacologica Sinica* 27: 111-118.
- [142] Zhou CJ, Shioda S, Yada T, Inagaki N, Pleasure SJ, Kikuyama S (2002). *Current Protein & Peptide Science* 3: 423-439.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Sándor K., Elekes K., Szabó Á., Pintér E., Engström M., Würster S., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Analgesic effects of the somatostatin sst₄ receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models. *European Journal of Pharmacology* 539(1-2): 71-75. 2006 (IF: 2.522, SCI: 4)

Helyes Zs., Pintér E., Németh J., **Sándor K.**, Elekes K., Szabó Á., Pozsgai G., Keszthelyi D., Kereskai L., Engström M., Würster S., Szolcsányi J.: Effects of the somatostatin receptor subtype 4 selective agonist J-2156 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rodents. *British Journal of Pharmacology* 149(4): 405-415. 2006 (IF: 3.825, SCI: 6)

Sándor K., Helyes Zs., Gyires K., Szolcsányi J., László J.: Static magnetic field-induced anti-nociceptive effect and the involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in this mechanism. *Life Sciences* 81(2): 97-102. 2007 (IF: 2.257)

Sándor K., Bölcseki K., McDougall J.J., Schuelert N., Reglödi D., Elekes K., Pethő G., Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Divergent peripheral effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 on nociception in rats and mice. *Pain*, közlésre visszaküldve

EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK

1. Szabó Á., Helyes Zs., **Sándor K.**, Bite A., Pintér E., Németh J., Bánvölgyi Á., Bölcseki K., Elekes K., Szolcsányi J.: Role of TRPV1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: *in vivo* study using gene-deficient mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 314(1): 111-119. 2005 (IF: 4.098, SCI: 12)

2. Bölcseki K., Helyes Zs., Szabó Á., **Sándor K.**, Pethő G., Elekes K., Almási R., Pintér E., Szolcsányi J.: Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 117(3): 368-376. 2005 (IF: 4.309, SCI: 18)

3. Jakab B., Helyes Zs., Varga A., Bölcseki K., Szabó Á., **Sándor K.**, Elekes K., Börzsei R., Pintér E., Pethő G., Németh J., Szolcsányi J.: Examination of the novel TRPV1 receptor antagonist JYL1421 (SC0030) *in vitro* and *in vivo* in the rat. *European Journal of Pharmacology* 517(1-2): 35-44. 2005 (IF: 2.477, SCI: 9)

4. Bellis E., Hajba L., Kovács B., **Sándor K.**, Kollár L., Kokotos G.: Three generations of alpha,gamma-diaminobutyric acid modified poly(propyleneimine) dendrimers and their cisplatin-type platinum complexes. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 69(1-2): 151-161. 2006 (IF: 1.403, SCI: 1)

5. Helyes Zs., Elekes K., Németh J., Pozsgai G., **Sándor K.**, Kereskai L., Börzsei R., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J.: Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in endotoxin-induced airway inflammation in the mouse. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology* 292(5): 1173-1181. 2007 (IF: 4.25, SCI: 3)

6. Elekes K., Helyes Zs., Németh J., **Sándor K.**, Pozsgai G., Kereskai L., Börzsei R., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J.: Role of capsaicin-sensitive afferents and sensory neuropeptides in endotoxin-induced airway inflammation and consequent bronchial hyperreactivity in the mouse. *Regulatory Peptides* 141(1-3): 44-54. 2007 (IF: 2.422, SCI: 2)

7. Pozsgai G., **Sándor K.**, Perkecz A., Szolcsányi Zs., Helyes Zs., S.D. Brain, Pintér E.: Topical acetone treatment induces neurogenic oedema on the sensitized mouse ear: an *in vivo* study using transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor knockout mice. *Inflammation Research* 56: 459-467. 2007 (IF: 1.504)

8. Elekes K., Helyes Zs., Kereskai L., **Sándor K.**, Pintér E., Pozsgai G., Tékus V., Bánvölgyi Á., Németh J., Szűts T., Kéri Gy., Szolcsányi J.: Inhibitory effects of synthetic somatostatin receptor subtype 4 agonists on acute and chronic airway inflammation and hyperreactivity in the mouse. *European Journal of Pharmacology* 578(2-3): 313-322. 2008 (IF: 2.376, SCI: 1)

NEMZETKÖZI KONGRESSZUSON BEMUTATOTT PREZENTÁCIÓK LISTÁJA

1. Pozsgai G., Helyes Zs., Szabó Á., Keszthelyi D., Németh J., Elekes K., **Sándor K.**, Szolcsányi J., Pintér E.: Pharmacological investigation of a selective non-peptide somatostatin receptor type 4 agonist in vitro and in vivo. *European Neuropeptide Club, 15th Annual Meeting, Riga, Lettország, 2005 (absztrakt: Neuropeptides 39(6), p.619., 2005. (IF: 2.15))*
2. Pintér E., Helyes Zs., Pozsgai G., Szabó Á., Keszthelyi D., Németh J., Elekes K., **Sándor K.**, Szolcsányi J.: Characterization of anti-inflammatory actions of a novel selective non-peptide somatostatin 4 receptor agonist in rodents. *Summer Neuropeptide Conference, Miami Beach, Florida, USA, 2005 (absztrakt: Neuropeptides 40(2), p.156., 2005. (IF: 2.81))*
3. **Sándor K.**, Elekes K., Szabó Á., Pintér E., Engström M., Wurster S., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Inhibitory effect of the selective sst₄ receptor agonist J-2156 on nocifensive behaviour in acute and chronic pain models of mice and rats. *The 15th World Congress of Pharmacology, Beijing, China, 2006 (absztrakt: Acta Pharmacologica Sinica, 27(suppl 1), p.111., 2006. (IF: 1.12), SCI: 1)*
4. Pintér E., Helyes Zs., Németh J., **Sándor K.**, Elekes K., Szabó Á., Pozsgai G., Engström M., Würster S., Keszthelyi D., Szolcsányi J.: Anti-inflammatory effect of somatostatin receptor subtype 4 selective agonist J-2156 in rodents. *The 15th World Congress of Pharmacology, Beijing, China, 2006 (absztrakt: Acta Pharmacologica Sinica 27(suppl 1), p.277., 2006. (IF: 1.12))*
5. **Sándor K.**, Bölskei K., Elekes K., Pintér E., Pethő G., Reglődi D. Szolcsányi J., Helyes Zs.: Peripheral anti-nociceptive effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in rats and mice. *European Neuropeptide Club, 17th Annual Meeting, Santorini, Görögország, 2007*
6. Pintér E., **Sándor K.**, Helyes Zs., Pozsgai G., Szolcsányi J.: Somatostatin 4 (sst₄) receptor mediates inhibitory effects on carrageenan-induced paw inflammation in rodents. *European Neuropeptide Club, 17th Annual Meeting, Santorini, Görögország, 2007*
7. Helyes Zs., Elekes K., Pozsgai G., **Sándor K.**, Keszthelyi D., Kereskai L., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J.: Protective role of the somatostatin receptor subtype 4 (sst₄) in endotoxin-induced airway inflammation: in vivo studies on gene-deficient mice. *Second International Congress on Immune-Mediate Diseases: from Theory to Therapy, Moszkva, Oroszország, 2007 (absztrakt: Allergology and Immunology in Pediatrics 11 (suppl. 2), p.25., 2007)*
8. Reglődi D., Németh J., Pozsgai G., **Sándor K.**, Börzsei R., Bagoly T., Elekes K., Pintér E., Kiss P., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Effect of PACAP-38 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *7th International Conference of Neuroimmunology, Rio de Janeiro, Brazilia, 2008*

HAZAI KONGRESSZUSON BEMUTATOTT PREZENTÁCIÓK LISTÁJA

1. Helyes Zs., Szabó Á., Németh J., Jakab B., Bite A., **Sándor K.**, Pintér E., Bánvölgyi Á., Szolcsányi J.: Kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből felszabaduló szomatostatin gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatása krónikus ízületi gyulladással patkánymodellben. *Magyar Élettani Társaság LXVIII. Vándorgyűlése, Pécs, 2004*
2. Elekes K., Helyes Zs., **Sándor K.**, Beck A., Kereskai L., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J.: A heptapeptid szomatostatin analóg, TT-232, hatásának vizsgálata szubakut légúti gyulladással egérmodellben. *Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológus Társaság IV. Konferenciája, Debrecen, 2004*
3. Helyes Zs., Németh J., Elekes K., Keszthelyi D., Pozsgai G., Szabó Á., **Sándor K.**, Pintér E., Szolcsányi J.: A szelektív szomatostatin 4 (sst₄) agonista KD5621 farmakológiai vizsgálata *in vitro* és *in vivo*. *Magyar Idegtudományi Társaság Konferenciája, Pécs, 2005 Poszterdíj*
4. Pozsgai G., Helyes Zs., Szabó Á., Keszthelyi D., Németh J., Elekes K., **Sándor K.**, Szolcsányi J., Pintér E.: Investigation of a selective non-peptide somatostatin receptor type 4 agonist in different inflammatory models. *Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság, a Magyar Experimentális Farmakológia Tavaszi Szimpóziuma, Budapest, 2005*
5. Elekes K., Helyes Zs., **Sándor K.**, Bölskei K., Almási R., Pozsgai G., Pintér E., Keszthelyi D., Szabó Á., Szolcsányi J.: A szelektív szomatostatin 4 receptor (sst₄) agonista J-2156 hatásának vizsgálata állatkísérletes fájdalommodellekben. *Magyar Fájdalom Társaság Kongresszusa, Siófok, 2005*

6. Helyes Zs., **Sándor K.**, Pintér E., Szabó Á., Elekes K., Keszthelyi D., Pozsgai G., Kereskai L., Engström M., Wurster S., Szolcsányi J.: A szelektív szomatosztatin 4 receptor (sst₄) agonista J-2156 gyulladásgátló és antinociceptív hatásának vizsgálata akut és krónikus gyulladásmo­dellekben. *Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológus Társaság V. Konferenciája, Debrecen, 2005*

7. **Sándor K.**, Elekes K., Szabó Á., Pintér E., Engström M., Wurster S., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Az sst₄ receptor szelektív agonista j-2156 hatásainak vizsgálata krónikus gyulladás és neuropáthia mo­dellekben. *A Magyar Farmakológiai Társaság Experimentális Szekciójának II. vándorgyűlése, Pécs, 2006*

8. Helyes Zs., Pintér E., Németh J., **Sándor K.**, Elekes K., Szabó Á., Pozsgai G., Keszthelyi D., Engström M., Wurster S., Szolcsányi J.: Effects of the novel selective non-peptide somatostatin sst₄ receptor agonist J-2156 on sensory neuropeptide release and acute inflammatory reactions. *A Magyar Farmakológiai Társaság Experimentális Szekciójának II. vándorgyűlése, Pécs, 2006*

9. **Sándor K.**, Bölskei K., Elekes K., Pintér E., Pethő G., Reglődi D., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Peripheral anti-nociceptive effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in rats and mice. *Magyar Fájdalom Társaság Kongresszusa, Gyula, 2006*

10. Helyes Zs., Pintér E., **Sándor K.**, Pozsgai G., Szolcsányi J.: A szomatosztatin 4 receptor (sst₄) gátló szerepe rágszálókban carrageenin­nel kiváltott gyulladásmo­dellekben. *A Magyar Experimentális Farmakológia III. Szimpóziuma, Budapest, 2007*

11. Helyes Zs., **Sándor K.**, Elekes K., Bánvölgyi Á., Markovics A., Pintér E., Szolcsányi J.: A szomatosztatin sst₄ receptor szerepének vizsgálata akut és krónikus gyulladásmo­dellekben egérben. *Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológus Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése Debrecen, 2008 (absztrakt: Acta Physiologica Hungarica)*

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik segítettek a munkámat.

Elsősorban köszönöm Dr. Helyes Zsuzsannának, témavezetőmnek, hogy bevezetett a kutatómunka világába, példát mutatva szakmai ismeretből, szorgalomból, fáradhatatlan lelkesedésből és lankadatlan optimizmusból.

Köszönöm Dr. Pintér Erikának, hogy számos szakmai tanáccsal és baráti gesztussal járult hozzá kutatómunkám eredményességéhez.

Köszönöm Dr. Szolcsányi János professzornak, a Neurofarmakológia program vezetőjének, hogy a képzésben részt vehettem, és hogy rendkívül jó szakmai észrevételeivel mindig megmutatta a helyes irányt.

Köszönöm Dr. Barthó Loránd professzornak, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének, hogy PhD-kutatóként az intézetben dolgozhattam.

Külön köszönöm Perkecz Anikónak, aki évekig hűséges „padtársam” volt, elviselve ennek minden velejáróját, hogy baráti hozzáállásával és kiváló metszeteivel mindvégig segítette munkámat.

Köszönöm Dr. Bölskei Katának, aki tudományos szemléletével és a kísérletes munkában való jártasságával követendő példát mutatott, hogy bármikor fordulhattam hozzá segítségért, tanácsért.

Köszönöm a kísérletes munkában nyújtott nélkülözhetetlen segítséget Gógliné Katinak, Zádor Csillának, Ömböliné Dórinak, Zöldhegyi Máriának, Tékus Valériának, Dr. Pozsgai Gábornak, Dr. Elekes Krisztiánnak, Tóth Dánielnek, továbbá a diákkörösöknek: Markovics Adriennek, Borbély Évának, Keszthelyi Dánielnek.

Köszönöm Dr. Bánvölgyi Ágnesnek a kiváló minőségű fotók elkészítését.

Köszönöm az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet munkatársainak, hogy hasznos útmutatást és elengedhetetlen segítséget nyújtottak az *in vitro* kísérletek beállításában.

Köszönöm Dr. Kereskai Lászlónak a szövettani metszetek értékelését.

Köszönöm Dr. László Jánosnak a sztatikus mágneses térrel kapcsolatos kooperációt.

Köszönöm Dr. Reglődi Dórinak a PACAP-al kapcsolatos kísérletekben nyújtott szakmai segítséget.

Köszönöm Dr. Jason J. McDougall PACAP-os témakörben végzett kiegészítő kísérleteit.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, hogy szeretetükkel, türelmükkel, megértésükkel és töretlen bizalmukkal mindvégig támogattak.