

# A KAPSZAICIN-ÉRZÉKENY SZENZOROS IDEGVÉGZŐDÉSEK ÉS A TRPV1 RECEPTOR SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA SZKLERODERMA ÉS KRÓNIKUS ARTRITISZ ÁLLATMODELLEKBEN

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS



**Szabó Árpád**

Gyógyszertudományok Doktori Iskola  
Neurofarmakológia Program  
Programvezető: Dr. Pintér Erika, Dr. Szolcsányi János  
Témavezető: Dr. Helyes Zsuzsanna, Dr. Pintér Erika

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET

2011.

# **TARTALOMJEGYZÉK**

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>3</b>
<b>BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS, A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>4</b>
<b>I. FEJEZET: A TRPV1 RECEPTOR ÉS A CGRP SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA BLEOMYCIN-INDUKÁLTA SZKLERODERMA EGÉRMODELLBEN RECEPTOR GÉNHIÁNYOS EGEREK FELHASZNÁLÁSÁVAL .....</b>	<b>18</b>
<b>1. KÍSÉRLETEINK IRODALMI HÁTTERE .....</b>	<b>18</b>
<b>2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>	<b>25</b>
<b>3. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>32</b>
<b>4. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK .....</b>	<b>39</b>
<b>II. FEJEZET: A KAPSAICIN-ÉRZÉKENY IDEGVÉGZŐDÉSEK ÉS A TRPV1 RECEPTOR SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA ADJUVÁNS-INDUKÁLTA KRÓNIKUS ÍZÜLETI GYULLADÁS MODELLJÉBEN .....</b>	<b>42</b>
<b>1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS, A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI.....</b>	<b>42</b>
<b>2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>	<b>45</b>
<b>3. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>50</b>
<b>4. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK .....</b>	<b>65</b>
<b>ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA .....</b>	<b>71</b>
<b>IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>72</b>
<b>AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK .....</b>	<b>86</b>
<b>EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK.....</b>	<b>86</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>88</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

**12-HPETE:** 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav  
 **$\alpha$ -SMA:**  $\alpha$ -smooth muscle actin  
**AEA:** N-arachidonoil-etanolamin (anandamid)  
**ANOVA:** variancia analízis (analysis of variance)  
**cAMP:** ciklikus adenozin-monofoszfát  
**CFA:** complete Freund's adjuvant, komplett Freund-adjuváns  
**CGRP:** kalcitonin gén-rokon peptid  
**CRLR:** calcitonin receptor-like receptor, kalcitonin receptorszerű receptor  
**CTGF:** connective tissue growth factor  
**desArgHOE-140:** dezargininHOE-140, bradikinin B<sub>1</sub> receptor antagonist  
**EDTA:** etilén-diamin-tetraacetát  
**ELISA:** enzimhez kötött immunoszorbens eljárás (enzyme-linked immunosorbent assay)  
**EM:** endomorfín  
**GAPDH:** Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase  
**GH:** growth hormone, növekedési hormon  
**HE:** hematoxilin-eozin  
**HOE-140:** bradikinin B<sub>2</sub> receptor antagonist  
**IFN- $\gamma$ :** interferon- $\gamma$   
**IL:** interleukin  
**INDO:** indomethacin  
**KO:** knock out, génhiányos  
**LPS:** lipopoliszacharid  
**MCP-1:** monocyte chemoattractant protein-1  
**NADA:** N-arachidonoil-dopamin  
**NDGA:** nordihidroguarénsav (nordihydroguarenic acid), lipoxigenáz-gátló  
**NK:** neurokinin  
**PAC1:** PACAP receptora  
**PACAP:** pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid  
**PBS:** foszfát-pufferelt sóoldat (phosphate-buffered saline)  
**PDGF:** platelet-derived growth factor  
**PK:** protein kináz  
**RTX:** reziniferatoxin  
**SEM:** átlag standard hibája (standard error of mean)  
**SOM:** szomatosztatin  
**SP:** substance P, P-anyag  
**SRIF:** somatotropine release inhibitory factor, szomatotropin felszabadulást gátló hormon  
**SST:** szomatosztatin  
**TGF $\beta$ :** transforming growth factor beta  
**TNF- $\alpha$ :** tumor nekrosis faktor- $\alpha$   
**TRPV1:** tranziens receptor potenciál vanilloid 1  
**TRPA1:** tranziens receptor potenciál ankirin 1  
**VIP:** vazoaktív intesztinális peptid  
**VPAC:** VIP és PACAP közös receptora  
**VR1:** vanilloid receptor 1  
**VRL:** vanilloid-like receptor, vanilloidszerű receptor  
**WT:** vad típusú (wildtype)

# BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS, A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI

## 1. Általános bevezetés, előzmények, a kutatási téma irodalmi háttere

A klasszikus idegszabályozási elmélet szerint az érzőidegek a szenzoros stimulusokat és a fájdalmat közvetítik a test különféle részeiről (ízületek, bőr, belső szervek) a központi idegrendszer felé. A perifériás idegrendszer másik csoportja a befutó ingerekkel kiváltott reflexek útján efferens, azaz mozgató vagy vegetatív működéseket lát el. A kapszaicin-érzékeny érzőidegek az idegszabályozás elvi szempontjából különleges és érdekes harmadik csoportot képviselnek, ezek perifériás végződése nemcsak a klasszikus afferens működéssel rendelkeznek, hanem egyben efferens funkciót is ellátnak. Közvetlenül, reflex nélkül, olyan neuropeptid szabadul fel belőlük, amelyek a beidegzési területen *neurogén gyulladásos* folyamatokat indítanak el. A neurogén gyulladást és az ezt közvetítő gyulladáskeltő neuropeptideket a 70-es évek végén fedezték fel, és ezzel új korszak kezdődött a kapszaicin-kutatások történetében, a „kapszaicin” kulcsszóval szereplő közlemények száma robbanásszerű emelkedésnek indult. A 80-as évek végén Szolcsányi professzor és munkacsoportja megfigyelték, hogy a kapszaicin-érzékeny érzőidegekből a gyulladáskeltő neuropeptiden kívül –amelyeket addigra már viszonylag részletesen feltérképeztek- gátló hatású anyag, a szomatosztatin is felszabadul, a keringésbe kerül és a test távolabbi pontjain jelentősen csökkenti a neurogén gyulladás mértékét. Ezzel a felfedezéssel a kapszaicin-érzékeny idegek működése, gyulladásban, fájdalomban betöltött szerepe kissé bonyolultabbá, de egyben még érdekesebbé vált. 1997-ben molekuláris biológiai módszerekkel klónozták a kapszaicin receptorát és 2000-ben receptor génhiányos egereket állítottak elő. Ezek segítségével lehetővé vált a kapszaicin receptor működésének és jelentőségének vizsgálata neuropátiás és gyulladásos fájdalomállapotok állatkísérletes *in vivo* modelljeiben.

## 2. A kapszaicin rövid farmakológiai története

A kapszaicin, a paprika (*Capsicum annuum* és *Capsicum frutescens*) csípős anyaga, kémiai szerkezetét tekintve alkaloid, 8-metil-N-vanillil-transz-6-nonénamid. A gyógyszer-tudományának korai időszakában, az 1870-es években Hőgyes Endre volt az első, aki kísérletesen vizsgálta a kapszaicin hatásait és arra következtetett, hogy az elsősorban az érzőidegekre hat (Hőgyes 1878). A népi gyógyászatban tapasztalati alapon már régóta



használták ízületi gyulladások fájdalmas tüneteinek kezelésére az erős paprikás bedörzsölést, azonban a farmakológiai kutatásokban e témát több mint 7 évtizedig elhanyagolták.

A II. világháború után Jancsó Miklós szegedi farmakológus professzor gyulladásoz folyamatok vizsgálatával foglalkozott és ezzel kapcsolatban kezdte el használni a kapszaicint. Az ő véletlen megfigyelése volt, hogy ez a fájdalmat okozó csípős irritáns anyag egy teljesen új típusú fájdalomcsillapító hatással rendelkezik. Munkája alapján bizonyítást nyert, hogy a kapszaicin nagy dózisainak ismételt adása kísérleti állatokban az analgészia egy speciális formáját váltja ki. Az érzőideg-végződésér érzéketlenekké váltak a legerősebb fájdalomkeltő kémiai ingerekkel szemben anélkül, hogy fizikai (mechanikai vagy elektromos) ingerekkel szembeni válaszkészségük változott volna. Ez az ún. *kapszaicin-deszenzibilizáció* jelensége, amelynek háttérében álló folyamatok akkoriban tisztázatlanok maradtak. Ezekből az adatokból kiindulva a későbbiekben elektrofiziológiai vizsgálatokkal világossá vált, hogy a fájdalomérző idegvégzödések forró ingerekkel izgatható csoportja az, amely a kapszaicinnal szelektíven aktiválható, illetve nagy dózisok ismételt adása után ezek működése szelektíven károsítható (Jancsó 1960).

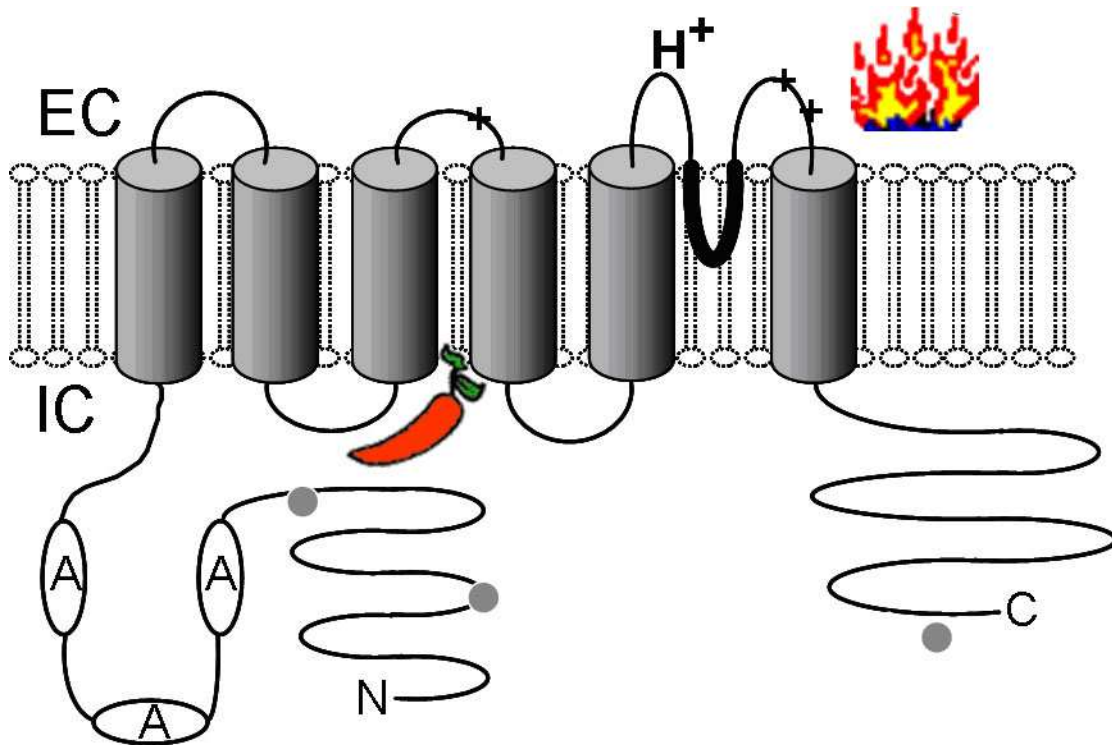
Jancsó professzor 1966-ban bekövetkezett korai halála után tanítványa, Szolcsányi János, aki később Pécsre került és jelenleg munkacsoportunk vezetője, folytatta a kapszaicinnal kapcsolatos kutatásokat a professzor feleségével, Jancsó-Gábor Arankával együttműködve. 1967-ben leírták, hogy patkány n. saphenus-ának és n. trigeminus-ának izgatása arteriolás vazodilatációt, vaszkuláris permeabilitás-növekedést és plazmaproteinek extravazációját eredményezi a bőrben a megfelelő beidegzési területeken. Nagy dózisú kapszaicinnal történő előkezelést követően ezen idegek sem ortodrómos kémiai, sem antidrómos elektromos ingerlése után nem alakult ki gyulladásoz reakció. E válaszok hiányának alapján feltételezték, hogy a gyulladáskeltő mediátorok a kapszaicin-érzékeny fájdalomérző idegvégzödésekben, a nociceptorokból szabadulnak fel (Jancsó és mtsai., 1967). Ez a közlemény és számos későbbi kapszaicinnal foglalkozó munka is azonban több mint 10 évig visszhang nélkül maradt a szakirodalomban. A kapszaicin, mint potenciális farmakológiai eszköz a perifériás idegrendszer kutatásában, elsősorban akkor került az érdeklődés középpontjába, amikor Jessell és munkatársai 1978-ban közölték, hogy a kapszaicin P-anyag (substance P: SP) kiáramlását okozza a primér szenzoros idegvégzödésekben anélkül, hogy befolyásolná e peptid felszabadulását az enterális és központi idegrendszeri neuronokból (Jessell és mtsai., 1978). Egy évvel később Lembeck és Holzer kimutatták, hogy a kapszaicin-érzékeny idegvégzödésekben felszabaduló SP közvetíti a neurogén plazmaprotein-extravazációt (Lembeck és Holzer 1979). E közlemények megjelenése után felélénkült az érdeklődés a

kapszaicin, a kapszaicin-érzékeny érző idegvégződés és a belőlük felszabaduló szenzoros neuropeptidek iránt. Napjainkban világszerte számos kutatócsoport és gyógyszergyár foglalkozik ezzel a témával (Szolcsányi 2008; Gunthorpe és Chizh 2009).

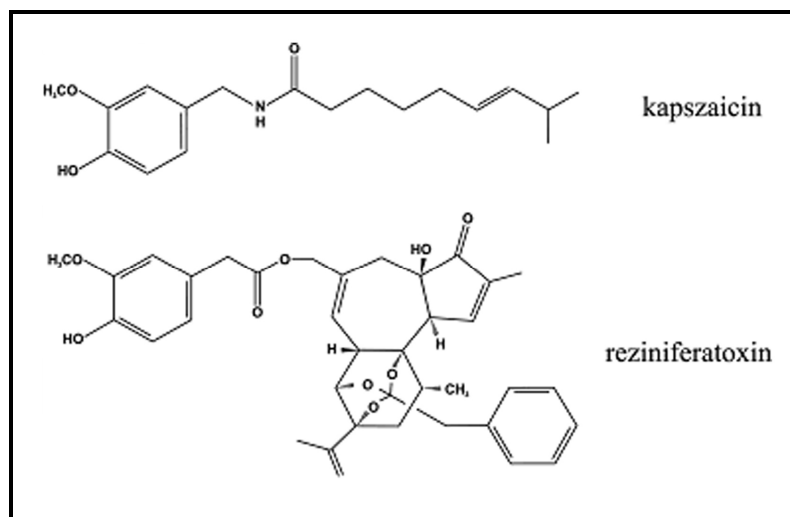
### **3. A kapszaicin receptora**

Azt az elméletet, hogy létezik „kapszaicin receptor”, azaz hogy ez a csípős anyag egy speciális molekulához kötötten fejt ki szelektív hatásait a szenzoros neuronokon, először Szolcsányi János és Jancsó-Gábor Aranka vetették fel egy 1975-ös közleményükben. Ebben a munkában a kapszaicin és más vanilloid struktúrájú vegyület nociceptív hatásait vizsgálták patkányban, és a szerkezet-hatás összefüggések alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a kapszaicin receptoriális úton hat. Már akkor megszerkesztették a receptor hipotetikus modelljét is (Szolcsányi és Jancsó-Gábor 1975, 1976). Később patch clamp vizsgálatokkal sikerült bizonyítani, hogy a kapszaicin és egy másik vanilloid struktúrájú növényi eredetű vegyület, a reziniferatoxin (RTX), ugyanazt a kationcsatornát nyitja az érzőneuronok membránján (Bevan és Szolcsányi 1990). A kapszaicin receptort expresszáló gén azonosítása és a receptor szerkezetének megismerése azonban még évekig váratott magára. Ez az áttörést jelentő eredmény 1997-ben David Julius és munkacsoportja nevéhez fűződik, akik klónozták a patkány Vanilloid 1 Receptort (VR1). Ezt az első elnevezést az indokolta, hogy nemcsak a kapszaicinnal, hanem más vanilloidokkal is aktiválható volt (Caterina és mtsai., 1997). Később a receptorok szerkezetén alapuló nemzetközi nomenklatúra szerint ezt a nevet megváltoztatták, e ligand-függő kationcsatornát a Tranziens Receptor Potenciál (TRP) nagycsaládba sorolták és a vanilloid család 1-es számú tagjaként Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1-nek (TRPV1) nevezték (Gunthorpe és mtsai., 2002). Érdekes, hogy a TRPV család többi receptorára (TRPV2-6) nem hatnak olyan vanilloid struktúrájú vegyületek, mint a kapszaicin és az RTX. Ezek ugyanis valójában csak vanilloid receptorszerű struktúrák és epitheliális  $Ca^{2+}$ -csatornák, melyeket a régebbi nomenklatúra vanilloid receptor-like (VRL), illetve epithelial  $Ca^{2+}$  channel (ECAC) névvel illetett (Gunthorpe és mtsai., 2002).

A később klónozott emberi TRPV1 receptor 92%-os hasonlóságot mutat a patkány receptor szerkezetével (Hayes és mtsai., 2000). Ez a receptor 838 aminosavból álló fehérje, amit 6  $\beta$ -redő szerkezetű transzmembrán domén épít fel. A csatornarégiót az 5. és 6. aleggység közötti intracelluláris, hidrofób hurok alkotja. Ezek a struktúrák a membránban négy egységből álló tetramerré rendeződve nem-szelektív kationcsatornát alkotnak (**1. ábra**).



**1. ábra. A TRPV1 receptor szerkezete.** A receptor aktiválására képes ingerek a fehérje eltérő pontjain hoznak létre konformációváltást, amely a kationcsatorna megnyílásához vezet. A szürke pontokkal jelölt helyek a protein kinázok támadáspontjai, amelyek foszforilációja a receptor érzékenységének fokozódásához vezet. (N:N-terminális, C:C-terminális, A:Ankyrin repeat domain, EC,IC: sejtén kívüli /extracelluláris/ és belüli /intracelluláris/ tér)



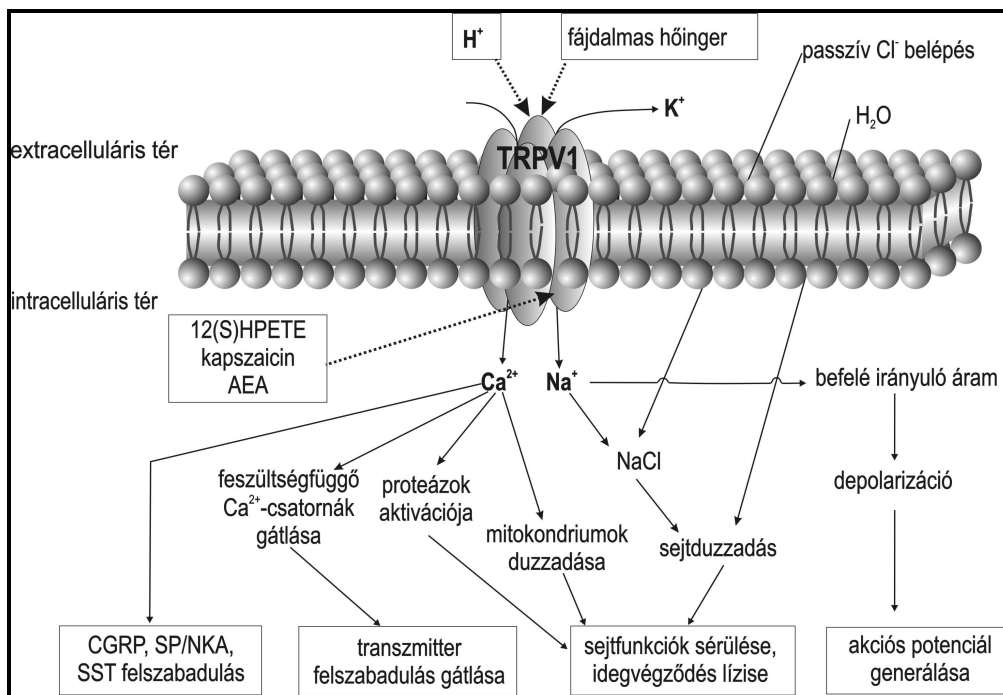
**2. ábra.** A TRPV1 receptort szelektíven izgatni képes kapszaicin és az RTX szerkezete

A TRPV1 polimodális szenzor funkciójú kationcsatorna, amely számos fizikai vagy kémiai ingerrel pl. fájdalmas, 43°C feletti hőmérséklettel és pH 6 alatti proton-koncentrációval aktiválható az intra- és extracelluláris oldalról is (Tominaga és mtsai., 1998). A kapszaicinen kívül többféle növényi eredetű vanilloid struktúrájú vegyület, mint a marokkói

kutyatejféleiben (*Euphorbia resinifera*) található reziniferatoxin (**2. ábra**), a feketeborsban (*Piper nigrum*) lévő piperin, a gyömbérből (*Zingiber officinale*) kivonható zingeron vagy a szegfűszeg (*Syzygium aromaticum*) egyik anyaga, az eugenol, is képes receptorstimulációt okozni. Érdekes módon a kapszaicin lipofil jellegéből adódóan átjut a sejtmembránon, az intracelluláris régióban kötődik a receptorhoz és így nyitja meg a csatornát (Oh és mtsai., 1996). Ezeken kívül léteznek endogén ligandok is, pl. az endokannabinoid N-arachidonoil-etanol-amin (AEA) vagy más néven anandamid (Gauldie és mtsai., 2001), lipoxigenáz enzim produktumok, mint például a 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav (12-HPETE) (Hwang és mtsai., 2000), vagy az N-arachidonoil-dopamin (NADA) (Huang és mtsai., 2002). Az ismert, hogy különböző gyulladásos és fájdalomkeltő mediátorok képesek befolyásolni a TRPV1 receptor érzékenységet, például az egyik legerősebb fájdalomkeltő mediátor, a bradikinin, a B<sub>2</sub> receptorokon hatva foszfolipáz A<sub>2</sub> aktiválása útján szenzitizálja a TRPV1-et (Shin és mtsai., 2002). Emellett a csatorna működését jelentősen fokozzák a prosztaglandinok, pl. a gyulladásos folyamatokban kulcsfontosságú prosztaglandin E<sub>2</sub>, vagy a prosztaciklin néven ismert prosztaglandin I<sub>2</sub> (Szállási és Blumberg 1999). A receptor valódi endogén ligandja azonban egyelőre nem ismert. A TRPV1 –a többi TRP receptorhoz hasonlóan- nem sorolható be egyértelműen a klasszikus ligandfüggő, de a feszültségfüggő ioncsatornák közé sem, hanem olyan integratív funkciójú termoszenzor, amely sokféle liganddal is aktiválható. Ennek alapján a TRP csatornák önálló receptor típust képviselnek (Szolcsányi 2008).

A TRPV1 receptor nagy mennyiségben megtalálható a hátsó gyöki és a trigeminus ganglionokban, specifikusan a kis és közepes átmérőjű szenzoros neuronokon (Caterina és mtsai., 1997; Tominaga és mtsai., 1998), vagyis a vékony mielinhüvelyes (A $\delta$ ) és a mielinhüvely nélküli (C-) rostokkal rendelkező neuronok sejttestjein és végződésein fordul elő (Holzer 1991).

A receptor aktiválódásakor a sejtbe Na<sup>+</sup>- és Ca<sup>2+</sup>-ionok áramlanak be, melyet K<sup>+</sup>-ionoknak a sejtől való kiáramlása követ. A Na<sup>+</sup>-ionok beáramlása elsősorban az akciós potenciál kialakulásáért felelős, melynek következményeképpen kialakul a nocicepció, fájdalomérzet. A Ca<sup>2+</sup>-influx a szenzoros neuropeptidek idegvégződésekből történő felszabadulásához vezet. Tartós vagy ismételt aktiváció hatására a sejtben felhalmozódó magas kation koncentráció a citoplazma és a mitokondriumok duzzadását okozza, ennek hosszú távú következményeként a sejtek energiaforgalma csökken, az idegvégződés működésképtelenné válik. Ez a folyamat adja a molekuláris hátterét a nagy dózisú kapszaicinnal történő előkezelés hatására kialakuló deszenzibilizációnak (**3. ábra**).



**3. ábra.** A TRPV1 receptor aktivációjának és a csatornanyitás sejszintű következményeinek vázlata

A TRPV1 receptort expresszáló polimodális nociceptorok funkcióinak vizsgálata a kapszaicin szelektív izgató és ezt követő blokkoló hatásának megfigyelésével kezdődött. A nagy dózisú kapszaicin- vagy RTX-előkezelés az egész végződés hosszantartó válaszképtelenségéhez vezet, a nociceptor semmilyen kémiai stimulusra nem reagál. Ezzel szemben a többi afferens rost működése nem változik és egyéb érzőfunkció, pl. mechanikai ingerek percepciója nem károsodik (Szolcsányi 1977). A kapszaicin-érzékeny afferensek fiziológiai/patofiziológiai folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatára tehát a TRPV1 agonistákkal történő deszenzibilizáció alkalmas, ezzel a módszerrel azonban a teljes idegvégződést inaktíváljuk (Bevan és Szolcsányi 1990), nemcsak izoláltan a TRPV1 csatorna funkcióját.

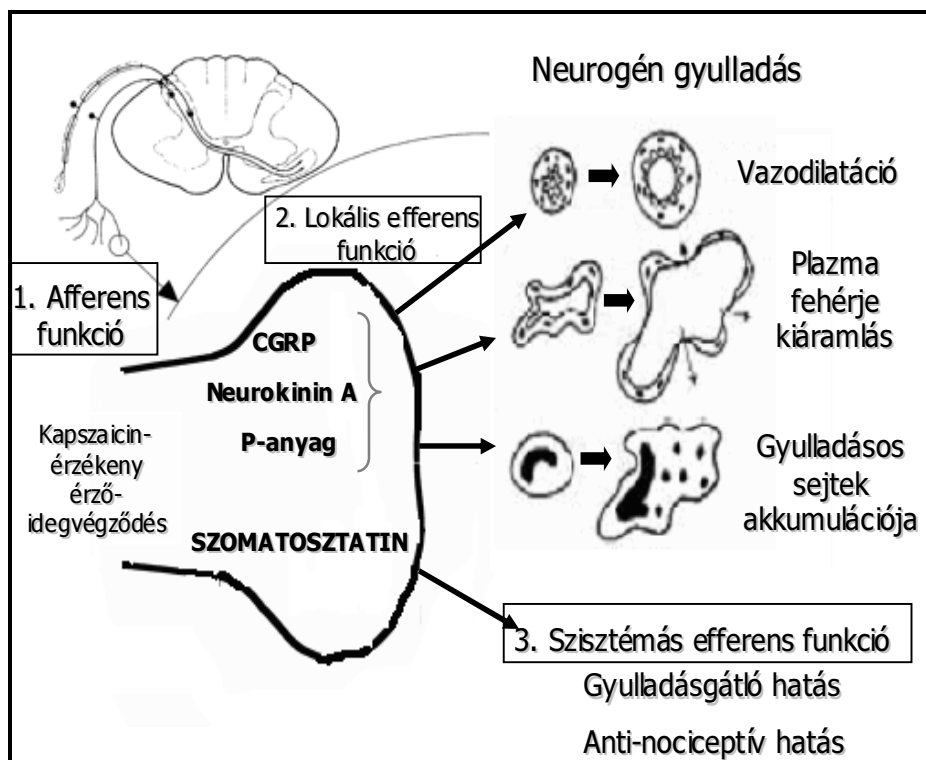
A TRPV1 receptor funkcióinak vizsgálatában új lehetőség nyílt, amikor 2000-ben két kutatócsoport egymástól függetlenül TRPV1 receptor génhányos egereket állított elő (Caterina és mtsai., 2000; Davis és mtsai., 2000). Ezek segítségével a TRPV1 ioncsatorna működése és jelentősége szelektíven vizsgálható *in vivo* modellekben. A kísérletsorozat előtt a TRPV1 receptor szerepét kizárólag akut gyulladásos és fájdalommodellekben vizsgálták. A szövetkárosító hő ártalommal kiváltott hiperalgémia mértéke nagyon jelentősen csökkent TRPV1 receptor hiányában (Davis és mtsai., 2000), a komplett Freund-adjuvánszal (CFA)

kiváltott akut ízületi gyulladás során 1 nap alatt kifejlődött mechanikai hiperalgéria mértéke nem változott a TRPV1 knockout (KO) egerekben (Caterina és mtsai., 2000).

#### **4. A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések hármaskörű funkciója**

A TRPV1 receptort expresszáló érzőideg-végződések különlegessége, hogy egyedülálló módon hármaskörű funkcióval rendelkeznek: afferens, valamint lokális és szisztémás efferens funkciójuk is van. A *klasszikus afferens működés* során a kapszaicinnal vagy más stimulussal izgatott szenzoros idegvégződések a központi idegrendszer felé közvetítenek idegaktivitást, ennek következtében alakul ki a fájdalomérzet, a nocicepció. Emellett az aktivált perifériás végződésekben olyan neuropeptidok szabadulnak fel, amelyek erőteljes értágulatot, plazmafehérje-kiáramlást és gyulladásszerű sejtaktivációt okoznak a beidegzési területen, ezt a jelenséget összefoglalva *neurogén gyulladás*nak nevezzük (Szolcsányi 1988). Ezek a gyulladáskeltő mediátorok a calcitonin gén-rokon peptid (CGRP), amely elsősorban vazodilatációt okoz, valamint a tachykininek, pl. a SP és a neurokinin A (NKA), melyek a plazmaprotein-extravazációért felelősek. Ezek a folyamatok közvetítik a kapszaicin-érzékeny afferensek *lokális efferens funkcióit* (Szolcsányi 1984a,b). A neurogén gyulladásnak jelentős szerepet tulajdonítanak számos betegség mint pl: bronchiális asztma (Barnes, 1990), allergiás rhinitis (Bertrand és mtsai., 1993), conjunctivitis és dermatitis (Gutwald és mtsai., 1991), ekzema (Naukkarinen és mtsai., 1996), psoriasis, rheumatoid arthritis (Levine és mtsai., 1985, Maggi 1995), gyulladásszerű bélbetegségek (Renzi és mtsai., 2000) és migrén (Buzzi és mtsai., 1990) patomechanizmusában. Jelenleg egyetlen olyan gyógyszercsoport sem áll rendelkezésre, amely hatékonyan gátolná e betegségek neurogén gyulladásszerű komponensét (Helyes és mtsai., 2003).

A Szolcsányi professzor vezette munkacsoport kutatásai derítették fényt arra, hogy ugyanezen aktivált szenzoros idegvégződésekben az előzőekben felsorolt gyulladáskeltő neuropeptideken kívül szomatosztatin is felszabadul, amely a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatásokkal rendelkezik. Ez az érzőideg-végződések harmadik, *szisztémás efferens funkciója* (Szolcsányi és mtsai., 1998a,b), amelyet a szomatosztatin endokrin és parakrin hatásainak mintájára Szolcsányi professzor *szenzokrin hatás*nak nevezett el (Szolcsányi és mtsai., 2004) (4. ábra).



4. ábra. A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések hármas funkciója

## 5. A kapszaicin-érzékeny rostokból felszabaduló szenzoros neuropeptidek

### A. Fájdalom- és gyulladáskeltő hatású neuropeptidek

a.) Az aktivált kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből felszabaduló neuropeptidek egyik csoportját a **tachykininek** alkotják. Ide sorolható a **SP**, valamint a **neurokinin A és B** (NKA és NKB). Hatásaikat három G-proteinhez kapcsolt tachykinin receptoron keresztül fejtik ki, amelyeket  $NK_1$ ,  $NK_2$  és  $NK_3$  receptornak nevezünk. A SP legnagyobb affinitással az  $NK_1$  receptorokhoz kötődik, amelyek a posztkapilláris venulák endothelsejtjein, a makrofágok és limfociták membránjában, a polimorfonukleáris sejteken és a hízósejteken található (Regoli és mtsai., 1994; Cao és mtsai., 1999). Ezek aktivációjával érpermeabilitás-fokozódást és plazmaprotein-kiáramlást vált ki, stimulálja a limfociták proliferációját, citokinek termelését, a hízósejtek aktivációját, a T-sejtek kemotaxisát, valamint a neutrofil granulociták akkumulációját (Grant 2002). A SP kationos peptid, így nem-receptor mediált interakcióba is lép a hízósejtek membránjával. A degranuláció következtében felszabaduló hisztamin a  $H_1$  receptorokon, a szerotonin 5-HT<sub>3</sub> receptorokon keresztül pozitív feedback útján fokozza a neuropeptidek felszabadulását a szenzoros idegvégződésekből (Holzer 1988; Szállási és

Blumberg 1999). A gyulladási érválasz korai fázisáért a felszabaduló neuropeptidek, míg a későbbi fázisáért a hízósejtekből felszabaduló mediátorok (hisztamin, szerotonin, prosztaglandinok, leukotriének stb.) felelősek (Holzer 1988).

Az NKA az NK<sub>2</sub> receptorokhoz mutatja a legnagyobb affinitást, a SP-hez hasonlóan erőteljes plazmafehérje-kiáramlást idéz elő, továbbá simaizom-kontrakciót vált ki és stimulálja a gyulladási sejteket (neutrofil granulocitákat, limfocitákat, makrofágokat) elsősorban a periférián, de a központi idegrendszerben is (de Swert és Joos 2006). Az NKB-t kötő NK<sub>3</sub> receptor főként a központi idegrendszerben található, de jelen van a perifériás idegvégződéseken is (Massi és mtsai., 2000), e mechanizmusoknak azonban kisebb jelentőséget tulajdonítanak a neurogén gyulladási folyamatokban.

b.) A 37 aminosavból álló **CGRP** felfedezése Amara és munkatársai nevéhez fűződik (Amara és mtsai., 1982). Egymástól kevéssé eltérő két formája az  $\alpha$ CGRP és a  $\beta$ CGRP, melyek biológiai hatásait a CGRP1 és CGRP2 receptorokon fejtik ki (van Rossum és mtsai., 1997). E receptorok szerkezeti egységéből (kalcitonin receptor-szerű receptor) és egy RAMP-1 egységéből (receptor-aktivitást módosító fehérje 1) épülnek fel (McLatchie és mtsai., 1998) és G<sub>s</sub>-fehérjéhez kapcsolódnak. A CGRP –ahogy azt a neve is mutatja– egy családba sorolható a kalcitoninnal, az amilinnal és az adrenomedullinnal (Poyner és mtsai., 2002). Erős vazodilatátor hatással rendelkezik, amely főképp a CGRP1 receptoron keresztül valósul meg. A CGRP fokozza az adenilát-cikláz aktivitást, amelynek következtében intracellulárisan megnő a cAMP mennyisége. Ez aktiválja a protein kináz A-t, a foszforiláció hatására megnyílnak az ATP-függő K<sup>+</sup>-csatornák. A folyamat eredménye az érfali simaizom relaxációja és erőteljes értágulat (Han és mtsai., 1990). A CGRP érpermeabilitást fokozó hatását nem közvetlenül, hanem a SP hatásának potencírozásával fejtik ki (Cao és mtsai., 2000), amelyben az játszik elsődleges szerepet, hogy gátolja a SP degradációjáért felelős neutrális endopeptidáz enzimet (Holzer 1988). Mindemellett a CGRP komplex immunmodulátor funkciókkal is rendelkezik. Csökkenti a proinflammatorikus citokinek termelődését és fokozza az antinociceptív interleukin-10 (IL-10) felszabadulását a makrofágból. Ezzel szemben a granulocita-akkumulációt stimulálja (Barnes 2001).



## *B. Fájdalom- és gyulladásgátló hatású neuropeptidek*

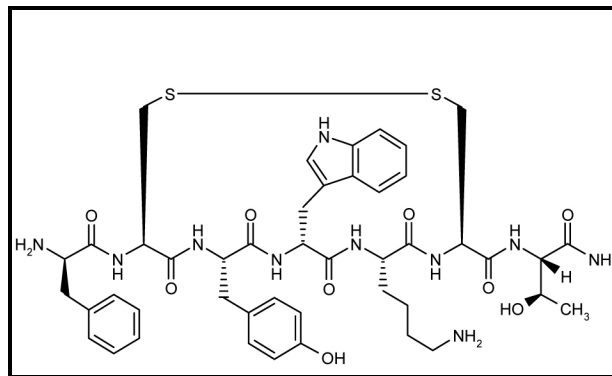
a.) A **szomatosztatin**, vagy más néven szomatotropin (growth hormone, GH) felszabadulását gátló faktor (somatotropine release inhibitory factor: SRIF; SOM), felfedezése Krulich és munkatársai nevéhez fűződik. 1968-ban bizonyították egy olyan „faktor” létezését a hipotalamusz extraktumban, amely gátolta a GH felszabadulását a hipofízis elülső lebenyéből (Krulich és mtsai., 1968). A szomatosztatin 14, illetve 28 aminosavból álló ciklikus peptid formában számos helyen előfordul a szervezetben (Brazeau 1986). Megtalálható a központi és a perifériás idegrendszerben (Parsons és mtsai., 1976), a gasztrointesztinális traktus neuroendokrin sejtjeiben, a hasnyálmirigyben, a vesében, a mellékvesében, a pajzsmirigyben, gyulladásgátló sejtekben, ivarszervekben (Hofland és Lamberts 1996; ten Bokum és mtsai., 2000). Az ízületekben az aktivált szinoviális sejtek és az immunsejtek is szekretálnak szomatosztatint, amely autokrin vagy parakrin módon fejti ki hatását (Pintér és mtsai., 2006). A szomatosztatin gátló hatást gyakorol számos hormon (pl. GH, glukagon, inzulin, gasztrin, szekretin, kolekisztokinin, motilin, pankreatikus polipeptid, prolaktin, pajzsmirigy stimuláló hormon: TSH) szekréciójára, a gasztrointesztinális motilitásra és az emésztőnedvek termelésére. Gátolja a tumorsejtek proliferációját, valamint erős immunmodulátor hatással rendelkezik. Csökkenti a B-limfociták IgA, IgM és IgE szekrécióját, gátolja a T-limfociták IL-2, IL-4, IL-10 és interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) termelését, a neutrofil granulociták kemotaxisát, a makrofágok fagocitát, és a természetes ölüsejtek (NK sejtek) killer aktivitását (ten Bokum és mtsai., 2000). A szomatosztatinnak a központi idegrendszerben neuromodulátor szerepe van, gátolja más neurotranszmitterek (glutamát, szerotonin, acetil-kolin) és neurohormonok (growth hormone releasing hormone, GHRH) felszabadulását. Befolyásolja a lokomotoros aktivitást és a kognitív funkciókat, jelentőségét számos pszichiátriai és neurológiai kórképben igazolták (Vécsei és Widerlöv 1988).

A szomatosztatin az idegelemek közül elsősorban a kapszaicin-érzékeny, TRPV1 receptort expresszáló szenzoros neuronokban szintetizálódik és tárolódik. Többféle állatkísérletes modellben és különböző fájdalomkórképekben kimutatták, hogy a kívülről beadott szomatosztatin csökkenti a fájdalmat (Chrubasik 1985; Karalis és mtsai., 1994; Fioravanti és mtsai., 1995). Munkacsoportunk akut kísérleti elrendezésekben számos bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok aktivált perifériás végződéseiből felszabaduló és a keringésbe jutó szomatosztatin szisztémás gyulladáscsökkentő és antinociceptív hatásokat fejt ki (Szolcsányi és mtsai., 1998a, b; Thán és mtsai., 2000; Helyes és mtsai., 2000, 2001).

A SOM szerteágazó hatásait saját receptorai közvetítik. Eddig öt G<sub>i</sub>-proteinhez kapcsolt szomatosztatin receptort klónoztak egérben, patkányban, illetve emberben, amelyeket sst<sub>1</sub>, sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub>, sst<sub>4</sub> és sst<sub>5</sub> névvel illették (Hoyer és mtsai., 1995; Patel 1999). Ez az öt sst receptor szintetikus szomatosztatin analóg-kötő képessége alapján két csoportra osztható. A SRIF1 csoportba tartoznak az sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> és sst<sub>5</sub> receptorok, amelyek nagy affinitással kötnek oktapeptid analógokat (pl. az oktreotidot), míg a SRIF2 csoportba sorolt sst<sub>1</sub> és sst<sub>4</sub> receptorok alacsony oktapeptid analóg-kötő képességgel rendelkeznek (Hoyer és mtsai., 1995; Pintér és mtsai., 2006). Számos irodalmi adat bizonyítja, hogy az endokrin hatást a SRIF1 csoportba tartozó receptorok közvetítik (Raynor és Reisine 1992). Elsősorban munkacsoportunk eredményei azt mutatják, hogy a fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatás a másik csoportba tartozó, vagyis az sst<sub>1</sub> és sst<sub>4</sub> receptorokhoz köthető (Helyes és mtsai., 2001; Pintér és mtsai., 2002; Szolcsányi és mtsai., 2004; Pintér és mtsai., 2006). Bár e receptorok klónozása elősegítette a szomatosztatin fiziológiai/patofiziológiai szerepével kapcsolatos kutatásokat, különösen nagy előrelépést a receptor génhiányos egerek előállítása jelentett.

A natív szomatosztatin terápiás alkalmazását rendkívül széles hatásspektruma és nagyon rövid (3 percnél kevesebb) plazma eliminációs féleletideje akadályozza (ten Bokum és mtsai., 2000). Stabil, szelektív sst<sub>4</sub>/sst<sub>1</sub> agonisták azonban új terápiás lehetőséget nyújthatnak a gyulladáscsökkentésben és a fájdalomcsillapításban. E vegyületek nagy előnye, hogy nem rendelkeznek a szomatosztatin sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> és sst<sub>5</sub> receptorai által közvetített endokrin hatásokkal. Az MTA Peptidbiokémiai Kutatócsoportja által szintetizált stabil ciklikus heptapeptid, a TT-232 (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>), legnagyobb affinitással az sst<sub>4</sub>/sst<sub>1</sub> receptorokhoz kötődik (Helyes és mtsai., 2005) (**5. ábra**). Az N-terminális végen található D-fenilalanin aromás oldallánca olyan konformációt eredményez, amely megvédi a diszulfidhidat az enzimatis degradációtól. A TT-232 nem befolyásolta a növekedési hormon és a gasztrin szekrécióját, azonban potens antiproliferatív hatással rendelkezett és akut nocicepció és gyulladásmodellekben jelentős gátló hatást fejtett ki (Kéri és mtsai., 1996; Helyes és mtsai., 2000, 2001). A TT-232 széles dózistartományban (5 mg/kg-ig) atoxikusnak bizonyult, LD<sub>50</sub> érték nem volt meghatározható. Egerekben a legmagasabb, 120 mg/kg dózis több héten keresztül történő ismételt adása sem okozott pusztulást, csupán 10%-ban tapasztaltak enyhe, átmeneti testsúlycsökkenést. A hematológiai paraméterek, a kvalitatív vérkép, különféle szervek szövettani képe és a gyomor-vékonybél nyálkahártya integritása nem változott a TT-232 e nagy dózisának tartós adagolását követően. Ez a dózis kb. 1000-szer magasabb, mint ami akut gyulladásmodellekben szignifikáns gátló hatást eredményezett (Helyes és mtsai., 2001; Pintér és mtsai., 2002). Patkányban teljes test autoradiográfias vizsgálatokkal nagyon

alacsony, mindössze 0.1 µg/g TT-232 koncentrációt detektáltak az agyban 30 perccel 2 mg/kg i.v. <sup>14</sup>C-TT-232 injekció után, ami a vér-agy gáton történő minimális penetrációs képességre utal. A legnagyobb, 5 mg/kg i.v. dózis beadását követően semmiféle központi idegrendszeri hatást nem tapasztaltak (nem közölt adatok, a vegyület preklinikai dokumentációjában megtalálhatók).



5. ábra. A TT-232 szerkezete

b.) A hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptidet, a **PACAP**-ot (pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide) birka hipotalamuszból izolálták (Miyata és mtsai., 1989). A szekretin-glukagon-vasoaktív intesztinális peptid (VIP) család tagja, 68%-os egyezést mutat a VIP szerkezetével, adenilát cikláz-aktiváló hatása azonban legalább 1000-szer erősebb a VIP-énél (Gottschall és mtsai., 1990). Két formája létezik: az emlős szervezetekben 90%-ban előforduló 38 aminosavból álló PACAP-38, és a 27 aminosavból álló PACAP-27. Bár számos szervben előfordul, szenzoros neuropeptidként is számon tartják, mivel megtalálható a gerincvelő hátsó szarvában (Dickinson és mtsai., 1999), a hátsó gyöki ganglionokban (Moller és mtsai., 1993), a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok perifériás végződéseiben, pl. az ízületi tokot ellátó afferensekben (Zhang és mtsai., 1997), de a központi idegrendszer számos területén is (Mulder és mtsai., 1994). A PACAP rendkívül sokféle hatást fejt ki, szabályozza a neurotranszmitterek felszabadulását (May és mtsai., 2000), értágulatot, illetve bronchodilatációt okoz, fokozza a bélmotilitást, növeli egyes hormonok koncentrációját a vérben (Hamelink és mtsai., 2002), szabályozza a sejtproliferációt és gátolja az apoptózist (Vaudry és mtsai., 2002).

c.) Régi megfigyelés, hogy a morfin és az enkefalinamid gátolja a neurogén gyulladást, azonban nem befolyásolja a nem-neurogén gyulladási folyamatokat (Barthó és Szolcsányi 1981). Későbbi vizsgálatok igazolták, hogy az **opioid peptid**ek megtalálhatók a kapszaicin-

ézőkeny érzőneuronokban, onnan stimuláció hatására felszabadulnak és a beidegzési területen fontos szabályozó szerepet játszanak különféle gyulladási válaszokban (Holzer 1988). Az opioidok gátolják az immunsejtek proliferációját, a kemotaxist, a szuperoxid- és citokin-termelést, valamint a hízósejtek degranulációját (Bryant és mtsai., 1990). Az opioid receptorok ( $\mu$ ,  $\delta$  és  $\kappa$ ) az sst receptorokhoz hasonlóan  $G_i$ -proteinhez kapcsolódnak, lokalizációjukat immunhisztokémiai, molekuláris biológiai és elektrofiziológiai adatok bizonyították a primér szenzoros neuronok sejttestjén és perifériás végződésein egyaránt. Ezen receptorok endogén ligandjai a gyulladási és immunsejtekből felszabaduló, de részben magukból az idegvégződésekben származó opioid peptidek (Schafer és mtsai., 1996). Az opioid peptidek a szenzoros idegvégződések ingerelhetőségének csökkentésével, valamint gyulladási- és fájdalomkeltő neuropeptidek felszabadulásának gátlásával antinociceptív hatást fejtenek ki elsősorban a  $\mu$  receptorokon keresztül (Schafer és mtsai., 1996). Emellett  $\kappa$  receptor agonista endogén opioid peptidek, mint a dinorfin A és a hemorfin-7, perifériás gyulladásgátló hatásait is leírták (Sanderson és mtsai., 1998).

## CÉLKITŰZÉSEK

A bőr és az ízület különösen gazdagon innervált kapszaicin-érzékeny szenzoros rostokkal, amelyek fontos modulátor funkciókkal rendelkeznek neurogén gyulladásos és fájdalommal járó folyamatokban. Kísérleteinkben ezért e peptiderg érzőideg-végződés, a rajtuk lokalizálódó TRPV1 ioncsatorna és a belőlük felszabaduló szenzoros neuropeptidok szerepének komplex vizsgálatát végeztük szkleroderma és ízületi gyulladás *in vivo* modelljeiben funkcionális, biokémiai, immunológiai és morfológiai módszerekkel.

1. Munkám első szakaszában a TRPV1 receptor jelentőségét és az aktivációjával felszabaduló vazóaktív szenzoros neuropeptid, a CGRP, szerepét vizsgáltuk bleomycinnel kiváltott fibrotikus és gyulladásos bőrelváltozás patomechanizmusában, TRPV1 receptor és CGRP génhiányos egértörzsek felhasználásával.

2. a) A kísérletek második része a kapszaicin-érzékeny afferensek és a szenzoros eredetű szomatosztatin krónikus artritiszben és következményes hiperalgéziában betöltött szerepének felderítésére irányult a reumatoid artritisz patkánymodelljében.

b) Ezen túlmenően a szintetikus heptapeptid sst<sub>4</sub> receptor agonista, a TT-232, hatásait is vizsgáltuk e modellben.

c) Célunk volt továbbá, az érzőrostokon lokalizálódó TRPV1 receptor szerepének és aktivációs/szenzitizációs mechanizmusainak vizsgálata krónikus ízületi gyulladásban génhiányos egereken enzimgátlók segítségével.

# **I. FEJEZET**

## **A TRPV1 RECEPTOR ÉS A CGRP SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA BLEOMYCIN-INDUKÁLTA SZKLERODERMA EGÉRMODELLBEN RECEPTOR GÉNHIÁNYOS EGEREK FELHASZNÁLÁSÁVAL**

### **1. Kísérleteink irodalmi háttere**

#### **1.1. A szkleroderma jellemzői**

##### *A. Epidemiológia*

A szklerodermában létrejövő elváltozásokat először Maurice Raynaud írta le 1862-ben. A kórképre jellemző elváltozások érinthetik csak a bőrt és a szubkután szöveteket, ilyenkor lokális szklerodermáról beszélünk, illetve érinthet különböző belső szerveket is, ekkor az elváltozást szisztémásnak nevezik, ennek megkülönböztetik diffúz és limitált formáját (Denton és mtsai., 2006). A szisztémás szklerózis prevalenciáját a nemzetközi vizsgálatok 3-11/10000 lakosra teszik, egy pécsi, a dél-dunántúli lakosságot vizsgáló felmérésben a prevalencia 9,1/10000 lakosnak bizonyult (Czirják és mtsai., 2005). A szkleroderma más szisztémás autoimmun betegséghez hasonlóan leggyakrabban Raynaud-jelenséggel kezdődik, ami az akrális területek szimmetrikus elfehéredését, cianózisát jelenti hideg vagy érzelmi stressz hatására. A Raynaud-jelenség prevalenciája 578,9/10000 lakosnak bizonyult az említett vizsgálatban (Czirják és mtsai., 2005).

##### *B. Etiológia, patogenezis*

A szisztémás szklerózis ismeretlen eredetű autoimmun betegség, leggyakrabban a 40-es életévben jelentkezik és nőkben tízszer gyakoribb. Létrejöttében bizonyított a fibroblasztok fokozott kollagén bioszintézise (Krieg és mtsai., 1988), de az nem világos, hogy mi indítja őket arra, hogy a szöveteket kollagénnel „megfojtsák”. Etiológiáját tekintve két fő hipotézis ismert. Az immunológiai hipotézis szerint a fibrózis az immunrendszer abnormális aktiválódására bekövetkező szekunder elváltozás. Feltételezik, hogy ismeretlen antigénre reagáló T-sejtek gyűlnek fel a bőrben és az általuk termelt citokinek hatásain keresztül eredményezik a fibrotikus elváltozásokat és a makrofágok aktiválódását. Ismert fibrogén citokinek, mint a transforming

growth factor beta (TGF $\beta$ ), interleukin-4 (IL-4), interleukin-6 (IL-6), platelet-derived growth factor (PDGF), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) és a connective tissue growth factor (CTGF) szaporodnak fel szisztémás szklerózisban (Trojanowska 2002).

A vaszkuláris hipotézis azon az észrevételen alapszik, hogy a szkleroderma korai szakaszában a vaszkuláris elváltozás (kapilláris mikroszkóp pozitivitás) mindig kimutatható, valamint a leggyakrabban a szklerodermát a Raynaud-jelenség vezeti be. Az elmélet szerint a mikrovaskulaturát visszatérő endotél károsodás éri primer etiológiai tényezőként. Feltételezik, hogy az ismételt endoteliális károsodás fibrotikus thrombocytá faktorok kibocsátását eredményezi, melyek periadventiciális fibrózist, és végül a mikrovaskulatura kiterjedt szűkítése révén ischaemiás károsodást hoznak létre, ami a szövetek obliteratív fibrózisát eredményezi. Ez a hipotézis azonban nem magyarázza meg az szklerodermában tapasztalt immunológiai abnormalitások mindegyikét (Abraham és mtsai., 2006).

Az szkleroderma első szövettani jele a mononukleáris sejtek: T-limfociták, monociták és hízósejtek perivaszkuláris infiltrációja a bőr lézióba diffúz ödémával és megnövekedett glükózaminoglikán jelenlétével (Fleishmajer és mtsai., 1977). Ezen sejtek mellett alkalmanként eosinofilek és plazmasejt infiltráció is megtalálható (Yamamoto és mtsai., 1999a). A gyulladáshoz sejt szerepet játszanak a mediátorok és fibrogén citokinek felszabadulásában, amelyek kulcsfontosságúak a fibroblaszt proliferációban és a kollagén szintézisben (Yamamoto és mtsai., 1999a). Legjelentősebbek az infiltráló T-limfociták, melyek főleg CD-4 pozitívak és a klónok többsége második típusú (Th2) citokin profilt mutat (Matucci-Cerinic és mtsai., 2004). Újabb vizsgálatok felhívták a figyelmet a B-sejtek szerepére is a szkleroderma patogenezisében. Szklerodermás betegekből származó B-sejtekben a CD19, CD20 és a CD22 antigének fokozott expressziója figyelhető meg (Sato és mtsai., 2000). A fokozott CD19 antigén expresszió fokozott B-sejt proliferációt és fibrogén citokinek (IL-6, TGF- $\beta$ ) termelését eredményezi. CD-19 ellenes antitestekkel való kezelés csökkentette a fibrózist állatkísérletekben (Hasegawa 2010). A hízósejtek immuneffektor sejtek, melyek sokfajta citokint és kémiai mediátort tartalmaznak: ezek közül a hisztamin és a triptáz mitogén hatással van a fibroblasztokra (Russel és mtsai., 1977) és serkenti azok kollagén termelését (Hatamochi és mtsai., 1991). Emellett a hízósejtek képesek extracelluláris mátrix komponenseket: laminint és IV. típusú kollagént szintetizálni és szekretálni (Thompson és mtsai., 1991). A monociták szuperoxid anionok, citokinek és egyéb anyagok felszabadulásán keresztül hozzájárulnak az endoteliális károsodáshoz, endoteliális sejtek proliferációjához és a fibroblasztok növekedésének a serkentéséhez, valamint antigén prezentáló sejtnek is működnek, ezáltal felerősíthetik az immunfolyamatokat (Matucci-Cerinic és mtsai., 2004). Az eosinofilek szétszórta található az

érintett szklerodermás bőrben. Egyes szerzők úgy gondolják, hogy major basic protein, IL-1 $\alpha$  és TGF- $\beta$  termelésén keresztül fontos faktorként vesznek részt a fibrotikus kötőszöveti átalakulásban (Yamamoto 2002).

A gyulladáshoz vezető sejtekből felszabaduló citokinek közül a legjelentősebb a TGF- $\beta$ , ez egy pleiotróp citokin, fontos szerepet játszik a kollagén termelésben és a tüdő fibrózis létrejöttében. Aktivált makrofágokból, vagy limfocitákból felszabadulva erős kemoattraktív hatást gyakorol a fibroblasztokra, növeli az I-es, III-as és V-ös típusú kollagén, proteoglikán és fibronectin szintézisét. E mellett képes serkenteni saját szintézisét is. Megnövekedett TGF $\beta$  termelés progresszív ECM lerakódáshoz vezethet, melynek fibrózis az eredménye. In vivo kísérletben anti-TGF- $\beta$  antitest szisztémás beadása csökkenti a bleomycin hatására létrejött bőr szklerózist és a tüdőfibrózist abban az esetben, ha az antitestet a bleomycinnel párhuzamosan kezdjük el adni. TGF- $\beta$  antitest adása a bőr szklerózis kifejlődését követően hatástalan volt (Yamamoto és mtsai., 1999b).

A fibroblasztok egy része a fokozott I-es és III-as típusú kollagén termelés mellett  $\alpha$ -smooth muscle actin-t ( $\alpha$ -SMA) is expresszál, ezáltal a sejt myofibroblasztá alakul és a myofibroblasztok száma és eloszlása nagyon jól korrelál a szklerózis lokalizációjával és súlyosságával (Sappino és mtsai., 1990).

### *C. Morfológia*

Gyakorlatilag bármely szerv érintett lehet szisztémás szklerózisban, de a legszembetűnőbb elváltozásokat a bőr, a muszkuloszkeletális rendszer, a gasztrointesztinális traktus, a tüdők, a vesék, valamint a szív mutatják. A bőrelváltozások csaknem mindig az ujjakon és a felső végtag disztális régióiban kezdődnek, majd proximális irányban terjedve elérik a felkart, vállat, nyakat és az arcot. Előrehaladott esetben az egész hát és has, valamint az alsó végtagok is részt vehetnek a folyamatban. A bőr vastagabbá, feszesebbé, nehezen elemelhetővé válik. Hisztológiailag a legkorábbi elváltozás az ödéma, de amint a betegség előrehalad jelentős kollagén szaporulat alakul ki a dermiszben, valamint epidermális atrófia és a bőrfüggelékek elsovadása jön létre. A dermisz kapillárisainak és arterioláinak a fala jelentősen megvastagszik és hyalinizálódik. Gócos és néha diffúz szubkután meszesedés alakulhat ki. A gasztrointesztinális traktus leggyakoribb elváltozása a nyelőcső submucosájának és muscularis rétegének progresszív atrófiája és fibrózisa. A muszkuloszkeletális rendszerben krónikus szinovitisz, a szinovium és a periartikuláris kötőszövet szklerózisa, valamint izomatrófia jöhet létre. A tüdőkben az alveoláris szeptumokat érintő diffúz intersticiális fibrózis fejlődhet ki. A vesékben a fő elváltozások a kisartériákban láthatók. A szívben gócos intersticiális fibrózis



jöhet létre, elsősorban a perivaszkuláris areákban, néha limfocitákból és makrofágokból álló perivaszkuláris beszűrődés is detektálható. Egyéb helyek is érintve lehetnek, főleg az idegtörzsek, valószínűleg a perineurium mikrovaszkuláris elváltozásait követő ischaemiás károsodás és fibrózis miatt (Kumar és mtsai., 1997).

#### *D. Klinikai kórlefolyás*

A betegek 90-95 %-ánál az első korai kórjelző tünet a Raynaud-jelenség (Czirják, 2003), mely a bőr háromfázisú színváltozását foglalja magába. Először vazospasmus következtében a bőr elfehéredik (pallor), majd hipoxia következtében cianózis jön létre, végül a hiperémiás reperfüzió miatt kipirul (rubor) (Kumar és mtsai., 1997). A Raynaud-jelenség patofiziológiája a mai napig ismeretlen, létrejöhet a szimpatikus idegrendszer fokozott működése, vagy az érfalak normál stimulusra bekövetkező megnövekedett érzékenysége miatt, de más patogenetikus mechanizmusok is szerepet játszhatnak. (Czirják, 2003). A bőr progresszív kollagenizációja a kezeken atrofíához, fokozódó merevséghez és végül az ízületek teljes immobilizációjához vezethet. A nyelőcső részvétele nyelési nehézségekkel a disztálisabb részek érintettsége gasztointesztinális tünetekkel, malabszorpcióval jár. A tüdőelváltozásokhoz diszpnóé és krónikus köhögés társul. A tüdőelváltozások előrehaladtával szekunder pulmonális hipertenzió keletkezik, mely jobbszívfél-túlterheléshez vezet. Gyakran kifejezett a vesefunkciók károsodása (Kumar és mtsai., 1997). A betegség kórlefolyása sok tényezőtől függ, sokváltozós elemzések alapján a belső szervi érintettség, az idősebb életkorban kialakuló szisztémás szklerózis rosszabb prognózist jelent (Nagy és Czirják, 2001).

#### *E. A szkleroderma terápiája*

Jelenleg nincs olyan szer, mely meggyógyítaná a szklerodermát, a kezelés elsősorban tüneti. Korai, ödémás stádiumban glükokortikoidokat adnak. Súlyos esetben, ha a belső szervek is érintettek immunszuppresszív szereket vagy D-penicillamint alkalmaznak. Kísérleti stádiumban van több potenciális jövőbeni terápiás lehetőség, mint a TGF- $\beta$  jelátviteli út gátlása, CTGF, PDGF, IL-4 és IL-6 elleni kezelések, a B-sejtek CD19 antigén ellenes antitestekkel való gátlása, illetve az intravénás immunglobulinokkal való kezelés (Asano 2010). Klinikai kipróbálás alatt áll az extrakorporális fotoforézis. Fotoszenzibilizáló 8-methoxypsoralen bevitelét követően a fehérvérsejteket extrakorporálisan UV-A fényel besugarazzák, majd visszajuttatják a szervezetbe, így gátolják a patogén T-limfocitákat. Fontos a tüneti kezelés. A kontraktúrákat fizikai módszerekkel pl. balneo-fototerápiával, a Raynaud-panaszokat nifedipinnel, nitroglicerinnel és hideg elleni védelemmel előzik meg (Herold és mtsai., 2000).

## **1.2. A szkleroderma vizsgálatára használt állatmodellek**

Az állatmodellek hasznos kulcsot adnak az szkleroderma patogenezisének megértéséhez, és segítséget nyújtanak terápiás beavatkozások kifejlesztésében. Számos kísérletes állatmodellt tanulmányoztak, de mindezidáig nem ismert olyan modell, amely a klinikai szkleroderma minden elváltozását magában hordozza. A legnagyobb különbség a szkleroderma modellek és az emberi szkleroderma között a diffúz szklerodermatikus elváltozások, (beleértve az akrális szklerózist) hiánya állatban (Yamamoto és mtsai., 2002). Bár az szkleroderma számos állatmodelljét leírták, a leginkább tanulmányozott az egérmodell. Ennek egyik előnye, hogy az egér génállományának nagy része ismert, míg más fajoknál ez nem áll rendelkezésre (Jimenez és mtsai., 2002). Az irodalomban leírt szkleroderma állatmodelleket két csoportra oszthatjuk aszerint, hogy az állatban a szklerotikus elváltozások spontán vagy valamilyen külső anyag adása révén jönnek létre.

### *A. Spontán szkleroderma-modellek*

Ezekben a modellekben az szklerodermaszerű elváltozásokat egy öröklődő gén mutációja okozza.

a, Tight skin (TSK) 1 egér: A TSK 1 spontán domináns mutáció, mely veleszületett a B10D2(58N)/Sn törzsből. A 2. kromoszómán a fibrillin-1 gén egy részének duplikációja következtében jön létre (Katsuri és mtsai., 1994).

b, Tight skin (TSK) 2 egér: A mutáció a 101/H egértörzsből alakult ki etilnitrózurea mutáns agens beadását követően (Christner és mtsai., 1995).

c, UCD 200 csirke: Ezen csirke modell, amely a fehér Leghorn törzs mutáns változata, hasonlít leginkább a szklerodermára (Gershwin és mtsai., 1981).

### *B. Indukált szkleroderma-modellek*

a, Graft versus host disease (GVHD) egérmodell: Ez az állatmodell BALB/ C állatban 7 Gy irradiációt követő B10D2 egér csontvelő és lépsejt transzplantációjával hozható létre (Zhang és mtsai., 2002).

b, Szerves oldószerek indukálta egérmodell: BALB/C egereknek 20 napig naponta i.p.-an adott vinil-klorid olyan elváltozásokat hoz létre, mely hasonlít az emberi szklerodermára (Jimenez és mtsai., 2002).

c, TGF- $\beta$  indukálta egérmodell: TGF- $\beta$  subcután beadása újszülött állatnak kezdetben granulációs szövet képződést, majd 3 nappal később nagy mennyiségű, de átmeneti fibrózist eredményez (Shinozaki és mtsai., 1997).

d, Bleomycin indukálta egérmodell: 1-4 héten keresztül bleomycin szubkután beadása szkleroderma szerű bőrelváltozások létrejöttéhez vezetett (Yamamoto és mtsai., 1999c).

### **1.3. Bleomycin-indukálta szkleroderma modell**

A bleomycin egy daganatellenes antibiotikum, melyet a *Str. verticillus* termel. A különböző lokalizációjú laphám rákokra igen jól hat. Főleg hererák, fej-nyak daganatok, tüdőrák és nyelőcsőrák kezelésére használják (Fürst, 2001). A bleomycin a sejtmag DNS-hez kötődve szabad gyököket képez és a dezoxiribóz komponens kiszakadását okozza a DNS-láncból (Grollman és mtsai., 1985), ezáltal a sejtek G2 fázisban rekednek a sejtciklus során (Twentyman 1983). A bleomycin lebontását egy specifikus hidroláz enzim végzi a szervezetben, de ennek az enzimnek az aktivitása kicsi a tüdőben és a bőrben (Sebti et al, 1991). A bleomycin kezelés jól ismert mellékhatása a tüdőfibrózis (Adamson és Bowden 1974), de ismertek olyan esetek, amikor a bleomycin kezelés hatására tumoros betegekben szkleroderma alakult ki (Finch és mtsai 1980).

Yamamoto és társai létrehoztak, egy egérmodellt melyben a szkleroderma a folyamatos helyi bleomycin kezelés következtében jött létre. Bleomycin 1 mg/ml, 100µg/ml és 10µg/ml koncentrációjú szubkután beadása is bőr szklerózist hozott létre 4 hét kezelés után, de az 1 µg/ml koncentrációjú bleomycin adagolás még 4 hét után sem okozott elváltozást. A bőrelváltozás még a kezelés befejezését követő hatodik héten is fennállt. A kontroll csoportot a bleomycin oldószerével, foszfát pufferes sóoldattal (PBS) kezelték. Bennük nem fejlődött ki sem szklerózis, sem fibrózis (Yamamoto és mtsai., 1999c).

Bleomycin hatására megvastagodott, homogén kollagénrostokat, a bőr és az érfalak megvastagodását, és gyulladással infiltrációt találtak, mely főleg CD4+ T sejtekből, hízósejtekből és makrofágokból állt. A bleomycin kezelés serkentette a keratinizációt, és csökkentette az epidermális turnover-t (Yamamoto és mtsai., 1999c). A hízósejtek száma a szklerotikus folyamat kifejlődésével párhuzamosan nőtt, és a 3.-4. héten érte el a maximumát. A megemelkedett hisztamin szintből a hízósejtek degranulálódására következtettek. A szérumban antinukleáris antitestet találtak. A bleomycin serkentette reaktív oxigén gyökök (szuperoxid és hidroxil gyök) felszabadulását is (Yamamoto és mtsai., 1999d). A bőr más részein, a beadás helyétől távol nem találtak szklerotikus elváltozásokat (Yamamoto és mtsai., 1999c).

A bleomycin kezelés fokozta a fibroblasztok I. és III. típusú kollagén és a fibronectin szintézisét. Direkt módon serkentette a perifériás makrofágokat, hogy növekedés stimuláló faktort termeljenek a tüdő és egyéb szervek fibroblasztjai számára. A szérumban található Th2 citokinek pl. IL4, IL6 mennyisége nőtt. TGFβ, TNFα mennyisége a korai szakaszban nőtt meg, PDGF pedig az egész folyamat alatt expresszáldott (Yamamoto és mtsai., 1999c).

Ezen eredmények rávilágítottak, hogy a bleomycin-indukálta bőr szklerózis szövettanilag és biokémiaiilag is nagyon hasonlít a szklerodermára.

#### **1.4. A CGRP szerepe a szkleroderma és a Raynaud-jelenség pathogenezisében**

A kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok aktivációja neuropeptid felszabadulást okoz. Az így felszabaduló CGRP vazodilatációt létrehozva hozzájárulhat több betegség pathogeneziséhez, pl. a migrénéhez (Verheggen és mtsai., 2002). Ismert, hogy a Raynaud-jelenséget mutató, és szklerodermás betegek bőrmintáiban a CGRP immunoreaktív neuronok száma jelentősen lecsökken az egészséges kontroll páciensekhez viszonyítva (Bunker és mtsai., 1990; Terenghi és mtsai., 1991). Az adatok alapján a CGRP vazodilatátor hatásának köszönhetően feltételezhetően protektív szerepet tölt be a szkleroderma kialakulásában.

## **2. Anyagok és módszerek**

### **2.1. Kísérleti állatok**

Kísérleteink megtervezésekor szem előtt tartottuk az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998. kormányrendelet előírásait (Az állatok védelméről és kíméléséről szóló 1998/XXVIII. Törvény 35.§). A TRPV 1 receptor hiányos transzgénikus egerek adományozója Dr. J. B. Davis, Neurology and GI Center of Excellence for Drug Discovery, GlaxoSmithKline, Research and Development Ltd., New Frontiers Science Park, Essex, Harlow, UK., a CGRP génhiányos egereket Prof. S. D. Brain adományozta. Az állatokat a PTE-ÁOK Állatházában tartottuk, klimatizált környezetben. Elláttuk őket hagyományos rágcsálóeledellel és vízzel *ad libitum*. Mindkét receptor hiányos egértörzs normális növekedési és magatartási jellemzőket mutatott.

A TRPV 1 receptor hiányos állatok létrehozása embrionális őssejtek (129ES) homológ rekombinációjával történt. Így olyan egereket nyertek, amelyekből hiányzott a receptornak az mTRPV1 gén által kódolt 2.-4. domainje. A genetikai változást ivarsejtjeikben hordozó kimérákat C57BL/6 nőtényekkel keresztezték, hogy heterozigóta utódokat nyerjenek. Ezeknek a heterozigótáknak egymással való keresztezése a várt mendeli arányban külsőre egészséges homozigóta mutáns utódokat eredményezett (Davis és mtsai., 2000). Polimeráz láncreakcióval (PCR) és Southern blot vizsgálattal ellenőriztük, hogy a mutáció a kívánt locuson jött-e létre, illetve az ivarsejtjeikkel örökítik-e az állatok. A PCR-ral történő genotipizálás után a homozigóta mutánsokat tenyésztettük tovább. A TRPV1 receptor hiányos genotípust (TRPV1<sup>-/-</sup>; knockout) és ezek kontroll csoportjául szolgáló TRPV1<sup>+/+</sup> genotípusú (vad típus) egereket használtuk kísérleteinkben.

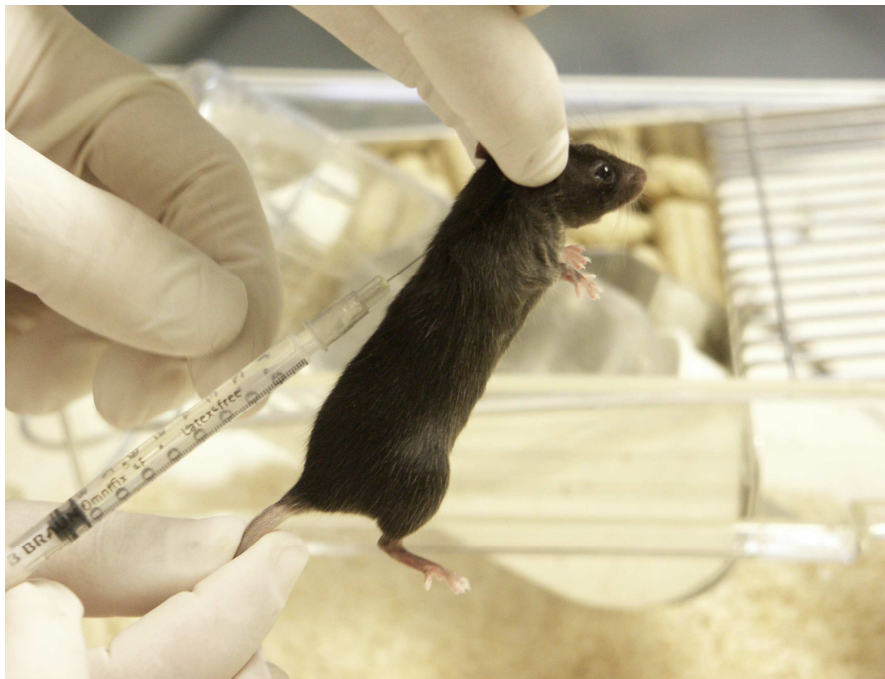
A CGRP génhiányos egereket a kalcitonin/ $\alpha$ CGRP gén 5. exonjának homológ rekombinációval való károsításával hozták létre. A beavatkozás sikerességét immunhisztokémiai módszerrel igazolták (Salmon és mtsai., 1999). A CGRP KO és vad állatokat az angliai King's College állatházában tenyésztették és tartották standard körülmények között.

### **2.2. Állatcsoportok, kísérleti protokollok**

Az egerek hátbőre alá 30 napon keresztül 0,1 ml 100  $\mu$ g/ml koncentrációjú bleomycint injektáltunk, a kontroll csoportban ugyanilyen térfogatban, szintén a hátbőr alá a bleomycin oldószerét, foszfát puffert (PBS) adtunk be (**6. ábra**). Az utolsó napi bleomycin injekció

beadását követő napon az egereket elaltattuk, anesztézia céljára ketamint (Calypsol, 100 mg/kg i.p., szükség szerint ismételve), és xylazint (Xylavet, 5 mg/kg i.m.) alkalmaztunk. Az állatok hátáról leborotváltuk a szőrt, majd 6 mm átmérőjű bőrdarabot távolítottunk el a tarkótáji területéről (Yamamoto és mtsai. 1999c). A nem azonnal feldolgozott mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Az állatokat négy-négy csoportba osztottuk. A TRPV1 receptor szerepének vizsgálat során bleomycin-kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> (vad), bleomycin-kezelt TRPV1<sup>-/-</sup> (KO) valamint PBS kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> (vad) és PBS kezelt TRPV1<sup>-/-</sup> (KO) csoportokat alkottunk, az egyedszám 10-12 állat volt minden egyes csoportban. A CGRP receptor szerepének tisztázására irányuló kísérletekben bleomycin-kezelt CGRP<sup>+/+</sup> (vad), bleomycin kezelt CGRP<sup>-/-</sup> (KO) valamint PBS kezelt CGRP<sup>+/+</sup> (vad) és PBS kezelt CGRP<sup>-/-</sup> (KO) csoportokat alkottunk, az egyedszám 8-10 állat volt minden egyes csoportban.



**6. ábra.** *Bleomycin, illetve PBS előkezelés*

### **2.3. Szövettani vizsgálatok**

A tarkóbőrdarabokat 4%-os paraformaldehidben fixáltuk. Paraffinos beágyazás után  $6\text{ }\mu\text{m}$  vastag metszeteket készítettünk. A metszetek egy részét hematoxin-eozinnal festettük, másik részénél a kollagént erős pirosan megjelenítő pikrinsziriusz festést alkalmaztunk. A pikrinsziriusz festék pikrinsavat és sziriszvöröset tartalmaz. A pikrinsav kisebb iont képezve a tömött rostos szöveteket (kollagénrost, rácrost, bazális membrán) piros színűre festi, a sziriuszvörös nagyobb iont képezve a laza rostos kötőszövetet sárgára festi. A kialakult

szklerózis mértékét szemikvantitatív szövettani pontozással határoztuk meg. Mindegyik mintán 0-4-ig pontoztuk a bőr vastagságát, a gyulladás intenzitását, a kollagén kötegek rendezettségét és mennyiségét. A gyulladás intenzitásának értékelése: 0: nincs gyulladás, 1: kicsi, 2: enyhe, 3: közepes, 4: súlyos gyulladás található a bőrben. A kollagén kötegek vastagságának értékelése: 0: normális, 1: kicsit, 2: enyhén, 3: közepesen, 4: nagyon megvastagodott. A bőr vastagságának vizsgálata a normál bőrhöz képest: 0: a bőr vastagságának növekedése kisebb, mint 125 %, 1: a bőr 125-150%-kal, 2: 150-170%-kal, 3: 175-200%-kal, 4: több mint 200%-kal vastagabb, mint a normál bőr (Yamamoto és mtsai., 1999d). Az eredményeket összegeztük, így az összpontszám 0 és 12 közötti értéket vehet fel. Az adatokat Mann-Whitney U teszt segítségével kiértékeljük. Így hasonlítottuk össze a TRPV<sup>1+/+</sup>, a CGRP<sup>+/+</sup>, a TRPV<sup>1-/-</sup> és a CGRP<sup>-/-</sup> egerekben a kezelések hatására létrejött elváltozásokat grafikusán ábrázolva.

#### **2.4. Bőrvastagság mérése**

A kimetszett bőr vastagságát Olympus BX-51 mikroszkóp alatt 40-szeres nagyításon Analysis Soft Imaging System szoftver segítségével határoztuk meg egy állatból származó 3 különböző metszeten. A vastagságot a metszeten a dermo-epidermális junkció és a dermo-szubkután junkció közötti távolság adta meg  $\mu\text{m}$ -ben kifejezve, a metszet több pontján mért értékeket átlagoltuk. Az egyes csoportokba tartozó állatok értékeiből egy a csoportra jellemző átlagértéket és a hozzá tartozó SEM értéket ábrázoltuk az ábrákon.

#### **2.5. Myofibroblasztok számának meghatározása**

A szklerodermás bőrben felszaporodó myofibroblasztok számának a meghatározása a myofibroblasztokra jellemző  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) immunhisztokémiai festésével történt. Az  $\alpha$ -SMA jelöléséhez a DAKOCytomation cég monoklonális antitestét használtuk a gyártó utasításainak megfelelően, a jelölt  $\alpha$ -SMA-antitest komplexumokat diaminobenzidinnel tettük láthatóvá. Minden metszeten 3 véletlenszerűen kiválasztott látómezőn számoltuk meg az  $\alpha$ -SMA pozitív sejteket, ezekből egy átlag értéket számoltunk és az egyes állatokra kapott értéket is átlagoltuk az egyes kezelési csoportokra vonatkoztatva (Distler és mtsai 2007).

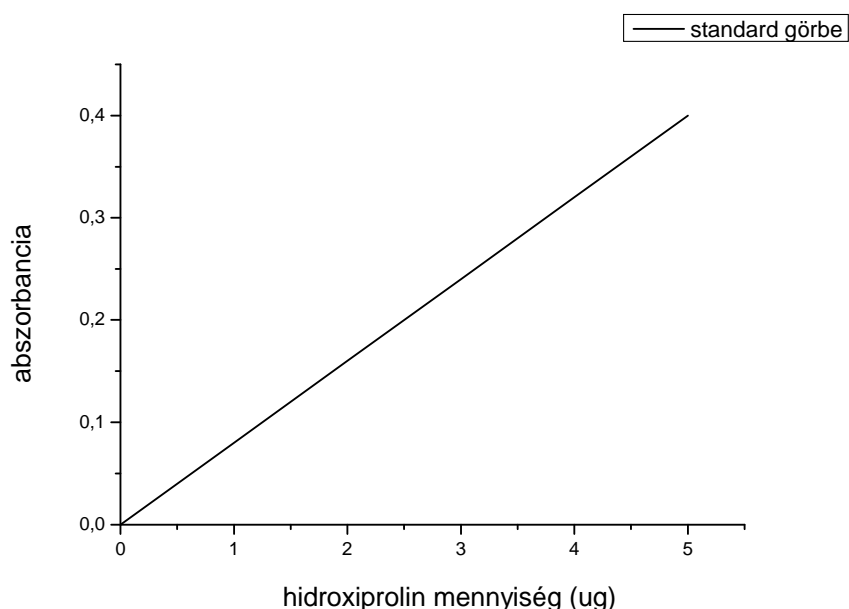
#### **2.6. A hidroxiprolin-tartalom meghatározása biokémiai vizsgálattal**

Irodalmi adatok alapján állati szervekben a hidroxiprolin szinte kizárólag a kötőszövet szkleroproteinjeiben, a kollagénben és az elasztinban található, emiatt széles körben használják a kollagén jelenlétének, és mennyiségének kimutatására (Woessner 1961).

A 4 hetes kezelést követően a 6 mm-es bőrlyukasztóval vett mintákat tömény savban hidrolizáltuk majd semlegesítettük, oxidáltuk és egy speciális hidroxiprolinhoz kötődő festékanyaggal megfestettük. A minták hidroxiprolin tartalmát 557nm-es hullámhosszon spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg, egy előzőleg felvett standard görbe segítségével, és az így kapott értéket  $\mu\text{g}$  hidroxiprolin-tartalomban kifejezve ábrázoltuk az egyes kezelési csoportokra vonatkoztatva.

A vizsgálat részletes menete:

Első lépésként a gyári hidroxiprolin segítségével meghatároztuk ismert 1, 2, 3, 4 és 5  $\mu\text{g/ml}$  hidroxiprolin koncentrációjú oldatok abszorbanciáját 557 nm-en. Az így kapott értékeket grafikonon ábrázoltuk és ezt tekintettük a standard görbének (**7. ábra**).



**7. ábra.** *Hidroxiprolin standard görbe*

Ezután a mintákat Pyrex testcsövekbe raktuk, hozzájuk 6 M-os sósavat adtunk, és 130 C-on előzetes tisztítás nélkül 3 órán keresztül hidrolizáltuk. Az idő letelte után a testcsöveket pár percig hűlni hagytuk, majd tartalmukat külön-külön mérőjelzéssel ellátott lombikokba töltöttük, majd a pyrex csöveket desztillált vízzel átmostuk, és ezt hozzáadtuk a hidrolizátumhoz. Pár csepp (20  $\mu\text{l}$ ) metilvörös indikátort adtunk az oldatokhoz egyenként. A metilvörös indikátor savas pH-n vörös, lúgos pH-n sárga, semleges (pH = 7) pH értéken pedig hagymasárga színű. A mi oldataink a 6 M-os sósavnak köszönhetően savasak voltak. Annyi 2,5 M-os nátrium-hidroxidot adtunk mindegyik oldathoz, hogy semleges pH-értéket kapjunk.



Az így keletkezett semleges oldatokhoz annyi desztillált vizet töltöttünk, hogy mindegyik egyenként 25 ml legyen. A keletkezett nátrium-klorid végső koncentrációja nem haladhatta meg a 0,4 M-t, mivel nagyobb koncentrációban gátolhatta volna az oldat színváltozását. Eredményeink pontosabbá tételére a minták 1 illetve 0,5 ml-es részleteit is vizsgáltuk. A mintákból 1ml-es részleteket pipettáztunk ki kémcsövekbe, ezekhez 1ml desztillált vizet adtunk, majd a másik kémcsősorozatba 0,5 ml-t mértünk a mintákból. Ezekhez 1,5 ml desztillált vizet töltöttünk. Így mindegyik kémcső 2 ml oldatot tartalmazott. Készítettünk egy kontroll oldatot is, mely 2 ml desztillált vizet tartalmazott, és a 0 számjelzéssel láttuk el.

Minden kémcsőhöz 1 ml chloramin T-t adtunk, mely oxidálta a hidroxiprolint, majd néhány percig rázogattuk, hogy jól összekeveredjen, szobahőmérsékleten 20 percig állni hagytuk. Minden kémcsőhöz az előző sorrendben 1 ml perklórsavat adtunk, ami semlegesítette a chloramin T-t. Ezt is összeráztuk, majd 5 perc várakozás után 1 ml p-dimetilaminobenzaldehid oldatot pipettáztunk a mintákhoz, és 20 percre 60 °C-os vízfürdőbe helyeztük őket, majd csapvízben hűtöttük 5 percig. Az így kialakult szín minimum 1 órán keresztül stabil maradt. Ezután minden mintából 3ml-t pipettáztunk küvetákba, az oldatok abszorbanciáját spektrofotométerrel 557nm-en meghatároztuk. Az abszorbanciákból, és a hidroxiprolin standardból készített grafikon alapján fejeztük ki a minták hidroxiprolin tartalmát.

A vizsgálat során használt reagensek:

Hydroxiprolin standard: A törzsoldatot úgy készítjük, hogy 25 mg vákuumszárított L-hydroxiprolint 250 ml 0,001N-os sósavban oldunk fel. Majd ezt az oldatot vízzel hígítjuk, úgy hogy 1-5 µg/ 3 ml koncentrációjú törzsoldatot nyerjünk.

Puffer: 50 g citromsav-monohidrátot, 12 ml jégecetet, 120 g nátrium-acetát-trihidrátot és 34 g nátrium-hidroxidot desztillált vízzel felhígítunk, úgy, hogy 1 l-es oldatot nyerjünk. A pH-t gondosan 6-ra állítjuk be, és a puffert hűtőben tároljuk.

Chloramin T (nátrium p-szulfokloramid): 1,41 g chloramin T- t feloldunk 20 ml vízben, hozzáadunk 30 ml metil-cellosolv oldatot és 50 ml puffert. Az oldatot üveg dugóval ellátott edénybe rakjuk. Minden alkalommal frissen készítjük.

Metil-cellosolv (etilén-glikol-monometil-éter): A szennyező anyagoktól mentes oldatot az Union Carbide Chemicals Co.-tól lehet beszerezni.

Perklórsav: A 3,15 M-os oldatot úgy készítjük, hogy 27 ml 70%-os perklórsavat feloldunk 100 ml vízben.

P-dimetilaminobenzaldehyd: A 20%-os oldatot röviddel a felhasználás előtt készítjük. 20 g p-dimetilaminobenzaldehydhez annyi metil-cellosolvot adunk, hogy az oldat 100 ml-es legyen. 100 C-os vízfürdőbe helyezzük, hogy serkentsük az anyag feloldódását. Ha az oldat sötétkékké, vagy lilává válik, a reagens rekrisztallizációja válhat szükségessé.

## **2.7. Az I-típusú kollagén $\alpha$ 1-lánc mRNS szintjének vizsgálata kvantitatív RT-PCR módszerrel**

Az előlt állatokból kivett bőrmintákat rögtön 1ml RNA-later oldatba helyeztük és további feldolgozásig  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten tároltuk. A minta teljes RNS tartalmát GenElute Mammalian Total RNA Kit (Sigma) segítségével izoláltuk, a gyártó utasításainak megfelelően. A kivont RNS tisztaságát, koncentrációját és épségét spektrofotometriás módszerrel (Nanodrop), valamint gélelektroforézissel ellenőriztük. A vizsgált specifikus mRNS szinteket LightCycler kvantitatív PCR szisztéma segítségével amplifikáltuk és határoztuk meg. Az amplifikációhoz az alábbi specifikus primereket használtuk: I-típusú kollagén  $\alpha$ 1-lánc mRNS (Genebank #NM007742.2) sense primer 5' TCTACTGCAACATGGAGACAG 3' (gén pozíció: 3932) és antisense primer 5' GCTGTTCTTGCAGTGATAGGTG 3' (gén pozíció 4185). Kontrollként háztartási gént a Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-t (GAPDH) használtunk, az amplifikálásához a következő primereket használtuk: sense primer 5' GCAGTGGCAAAGTGGAGATT 3' (gén pozíció: 122), és antisense primer 5' TCTCCATGGTGGTGAAGACA 3' (gén pozíció 370). A reakciós mixünk mennyisége 20  $\mu$ l volt és a következő összetevőket tartalmazta: 250 ng RNS (a mintából), 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5  $\mu$ M primer, reakció puffer. A LightCycler program beállításai a következők voltak: kezdeti bevezető reverz transzkripció lépés  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 20 percig, majd a denaturációs lépés  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 30 másodpercig és 45 ciklus amplifikáció: 10 másodperc  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 5 másodperc  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 15 másodperc  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A program végén melting-curve analízist futtatunk le, a képződött termékek ellenőrzése végett. A kapott eredményt csak akkor fogadtuk el, ha a melting görbén csak egy domináns csúcs volt látható. A felszaporított terméket gélelektroforézissel is ellenőriztük. A mennyiségi meghatározást LightCycler3 Data Analysis szoftverrel végeztük (3.5.28 verzió). A Ct érték adja meg azt az amplifikációs ciklusszámot, ami ahhoz szükséges, hogy a minta mért fluoreszcenciája (ami arányos a minta DNS koncentrációjával) egy előre meghatározott küszöbértéket elérjen. A Ct érték tehát fordítottan arányos a mintában mérhető DNS tartalommal (Radonic és mtsai., 2004). Minden esetben az I-típusú kollagén  $\alpha$ 1-lánc Ct értékéből kivontuk ugyanazon minta háztartási gén Ct értékét és az így kapott  $\Delta\text{Ct}$  értékeket hasonlítottuk össze ( $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{kollagén}}$ -

$Ct_{GAPDH}$ ). Méréseink során meghatároztuk standard mRNS oldatok segítségével, hogy 1 egység különbség a  $\Delta Ct$  tartalomban 2,7-szeres mRNS különbséget jelent a minták eredeti mRNS mennyiségei között. Az egyes kezelt csoportok  $\Delta Ct$  átlagértékeiből kivontuk a vad típusú PBS-sel kezelt csoport átlagos  $\Delta Ct$  értékét és ezt oszlopdiagramon ábráztuk.

## **2.8. Statisztikai módszerek**

A kapott eredményeket átlag  $\pm$  SEM formában fejeztük ki az adott csoportokra vonatkoztatva. A szövettani eredmények, a biokémiai és a molekuláris biológiai módszerek kiértékeléséhez a nem parametrikus Mann Whitney U-próbát alkalmaztunk. A 0,05 alatti p-értéket tekintettük szignifikáns különbségnek a vizsgált csoportok között.

### **3. Eredmények**

#### **3.1. A bleomycin-indukálta bőrszklerózis vizsgálata TRPV1<sup>+/+</sup> egérben**

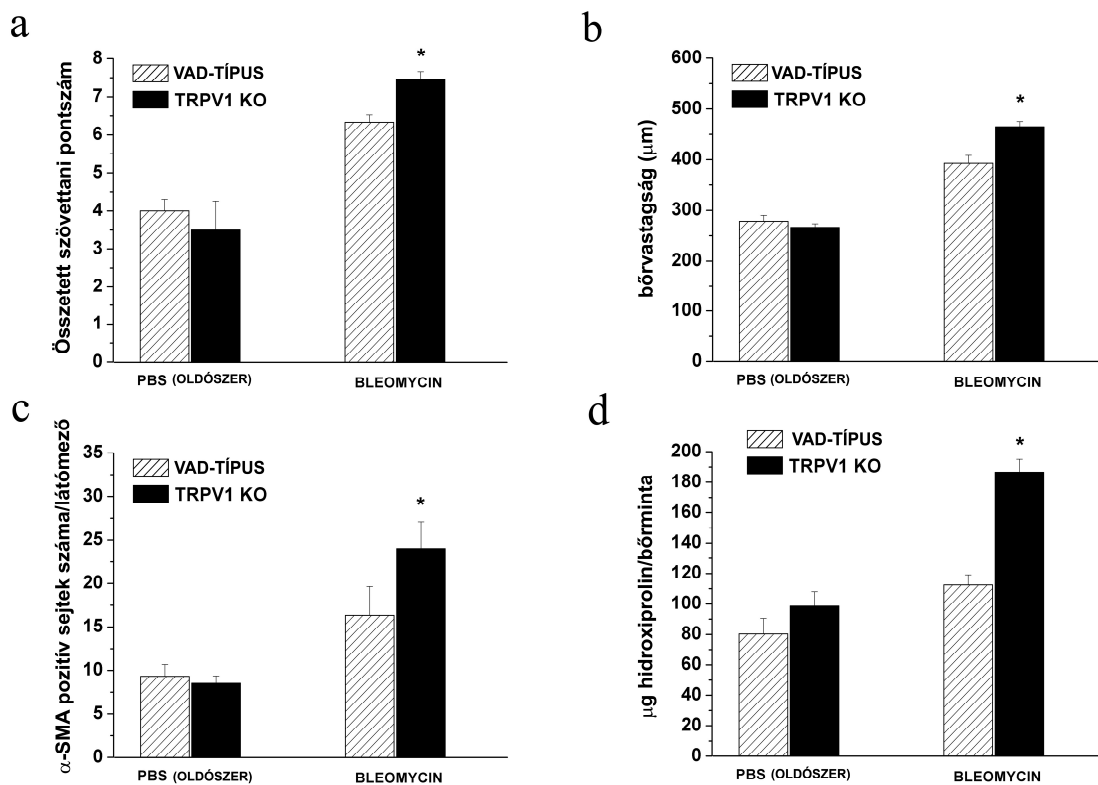
Yammamoto korábbi vizsgálataiban kimutatta, hogy 0.01-1 mg/ml bleomycin szubkután injektálása 18-24 napig markáns bőrszklerózist eredményez az injektált területen CH3 és BALB/c egértörzsekben, miközben a kontroll csoportban hasonló módon injektált PBS nem okoz hasonló elváltozásokat. Az általunk használt TRPV1 KO egereket a C57BL/6 egértörzsből hozták létre, ezért először a bleomycin kezelés szklerózist keltő hatását vizsgáltuk a TRPV1 receptort expresszáló vad egércsoportban. A szövettani vizsgálatok a bőr megvastagodását, a szubkután kötőszövet zsírrétegének kollagén kötegekkel való kitöltését, a kollagén kötegek megvastagodását és szubkután szövet kistökös gyulladással járó besűrűsödését mutatták a bleomycinnel kezelt egerekből származó bőrmintákban a PBS-el kezelt bőrmintákhoz viszonyítva (**8. a-b-c ábrák**). Az összesített szklerózis pontszám 58%-al volt magasabb ( $6.33 \pm 0.19$  ill.  $4.00 \pm 0.31$ ) a bleomycin-kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> csoportban a PBS-kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> csoporthoz viszonyítva (**8. a, 9. ábrák**). A bőrvastagság 42%-al volt magasabb ( $393.05 \pm 15.41 \mu\text{m}$  ill.  $278.62 \pm 11.38 \mu\text{m}$ ) a bleomycin-kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> csoportban mint a PBS-kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> állatcsoportban (**8. b ábra**). Az  $\alpha$ -SMA-pozitív sejtek száma 75%-al volt magasabb ( $16.33 \pm 3.31$  ill.  $9.3 \pm 1.34$  látómezőként) a bleomycin-kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> csoportban mint a PBS-kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> kontroll csoportban (**8. c ábra**). A szövettani elváltozásokhoz hasonlóan a minták spektrofotometriásan meghatározott kollagén specifikus aminosav a hidroxiprolin tartalma is szignifikánsan 47.5 %-al magasabb volt ( $118.5 \pm 6.7$  ill.  $80.3 \pm 10.2 \mu\text{g/bőrminta}$ ) a bleomycin-kezelt csoportban a PBS-kezelt egércsoporthoz képest (**8. d ábra**).

A PBS kezelés önmagában nem okozott szignifikáns szövettani elváltozásokat a kezeletlen TRPV1<sup>+/+</sup> egerek bőrmintáihoz képest. Nem volt kimutatható különbség a kezeletlen TRPV1<sup>+/+</sup> és TRPV1<sup>-/-</sup> egerek bőrének szövettani struktúrája között.

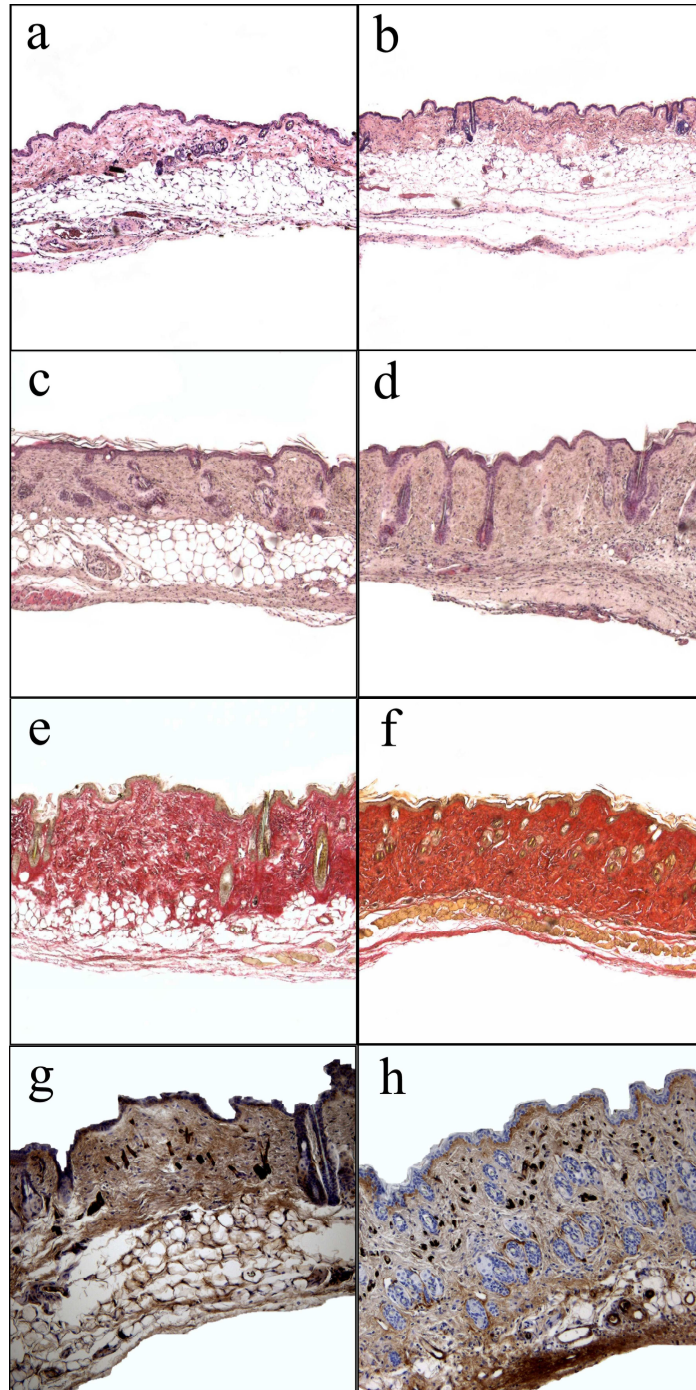
#### **3.2. A TRPV1 receptor szerepének vizsgálata bőrszklerózisban**

A bleomycin kezelés hatására a TRPV1<sup>-/-</sup> (KO) állatok szövettani elváltozásai kifejezettebbek voltak, az összetett szklerózis pontszám szignifikánsan magasabb volt ( $7.46 \pm 0.20$  ill.  $6.33 \pm 0.19$ ) a bleomycin-kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> (vad) csoporthoz képest (**8. a, 9. ábrák**). A bőr vastagság értéke is szignifikánsan nagyobb volt ( $464.86 \pm 10.15 \mu\text{m}$  ill.  $393.05 \pm 15.41 \mu\text{m}$ ) a

bleomycin-kezelt TRPV1<sup>-/-</sup> csoportban a hasonlóan kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> csoporthoz viszonyítva (8. b ábra). Az  $\alpha$ -SMA-pozitív sejtek száma is jelentősen emelkedett (24.03 $\pm$ 3.07 ill. 16.33 $\pm$ 3.31 látómezőként) a bleomycin-kezelt TRPV1<sup>-/-</sup> csoportban a szintén bleomycin-kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> csoporthoz képest (8. c ábra). A szövettani elváltozásokkal összhangban a minták hidroxiprolin tartalma is szignifikánsan 57 %-al magasabb volt (186.605 $\pm$ 8.4 ill. 118.5 $\pm$ 6.7  $\mu$ g/bőrminta) a bleomycin-kezelt TRPV1<sup>-/-</sup> csoportban a TRPV1<sup>+/+</sup> csoporthoz viszonyítva (8. d ábra). A PBS kezelt TRPV1<sup>-/-</sup> illetve a PBS kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> minták között nem volt szignifikáns különbség sem különböző szövettani módszerekkel sem a hidroxiprolin tartalom biokémiai meghatározásával (8. a-b-c-d, 9. ábrák).



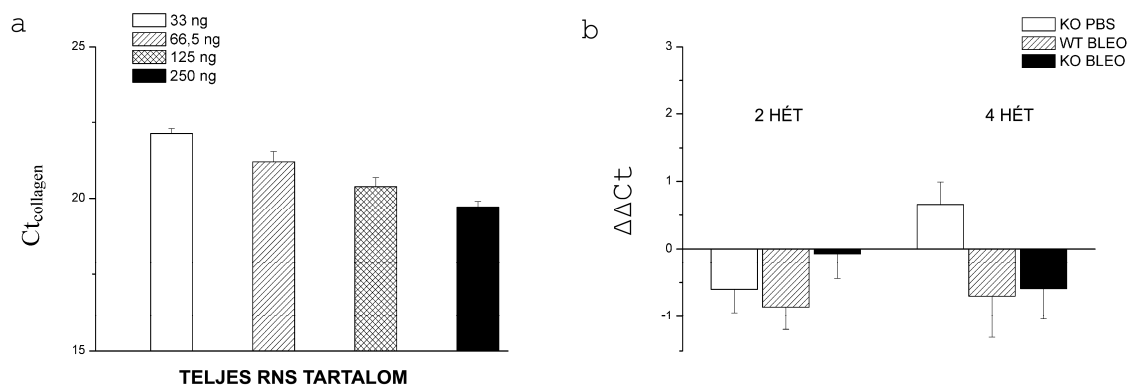
**8. ábra.** A bleomycin kezelés hatása TRPV1<sup>+/+</sup> és TRPV1<sup>-/-</sup> egerekben, (a) összesített szklerózis pontszám (b) bőrvastagság (c)  $\alpha$ -SMA-pozitív sejtek száma (d) hidroxiprolin tartalom (átlag $\pm$ SEM; \*p<0.05 vs. vad-típusú csoport).



**9. ábra** Szöveti elváltozások TRPV1<sup>+/+</sup> és TRPV1<sup>-/-</sup> egerekben. (a) PBS-kezelte TRPV1<sup>+/+</sup> csoport (40-szeres nagyítás HE-festés) (b) PBS-kezelte TRPV1<sup>-/-</sup> csoport (40-szeres nagyítás HE-festés) (c) bleomycin-kezelte TRPV1<sup>+/+</sup> csoport (40-szeres nagyítás HE-festés) (d) bleomycin-kezelte TRPV1<sup>-/-</sup> csoport (40-szeres nagyítás HE-festés) (e) bleomycin-kezelte TRPV1<sup>+/+</sup> csoport (40-szeres nagyítás pikroszirusz-festés) (f) bleomycin-kezelte TRPV1<sup>-/-</sup> csoport (40-szeres nagyítás pikroszirusz-festés) (g) bleomycin-kezelte TRPV1<sup>+/+</sup> csoport  $\alpha$ -SMA antitesttel jelölve (100-szoros nagyítás HE-festés) (h) bleomycin-kezelte TRPV1<sup>-/-</sup> csoport  $\alpha$ -SMA antitesttel jelölve (100-szoros nagyítás HE-festés).

### **3.3. A szklerotikus bőr I-es típusú kollagén $\alpha 1$ lánc mRNS expressziójának vizsgálata kvantitatív PCR technika alkalmazásával**

A kvantitatív PCR reakciót az RNS oldatok 2-szeres hígításával kalibráltuk (33ng, 66,5ng, 125ng, 250ng) és lineáris regressziós számítással a kapott Ct értékek jól illeszkedtek a kiindulási koncentrációkhoz ( $r=0,956$ ). A görbénk alapján 1 egység különbség a Ct értékekben 2,7-szeres koncentrációkülönbséget jelentett (**10. a ábra**). A különböző csoportoknak a vad PBS kezelt csoporthoz viszonyított  $\Delta Ct$  értékeit megvizsgálva nem figyelhető meg szignifikáns különbség a csoportok I-es típusú kollagén  $\alpha 1$  lánc mRNS expressziója között (**10. b ábra**). Az I-es típusú kollagén  $\alpha 1$  lánc mRNS szintjeiben a teljes 4 hetes kezelés végén nem találtunk jelentős különbséget, ezért megvizsgáltuk a kezelés egy korábbi szakaszában (2 hét után) elölt állatokban is az I-es típusú kollagén mRNS szint mértékét, de itt sem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a bleomycin kezelés hatására (**10. b ábra**). A kapott eredmények alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a bleomycin kezelés nem befolyásolja az I-es típusú kollagén  $\alpha 1$  lánc mRNS expresszióját.



**10. ábra.** Az I-es típusú kollagén  $\alpha 1$  lánc mRNS expressziójának vizsgálata kvantitatív PCR technika alkalmazásával. (a) a mérés kalibrációja 2-szeres hígítási sor segítségével (b) I-es típusú kollagén  $\alpha 1$  lánc mRNS szintjei a PBS-kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> csoporthoz viszonyítva.

### **3.4. A CGRP receptor szerepének vizsgálata a szkleroderma-modellben**

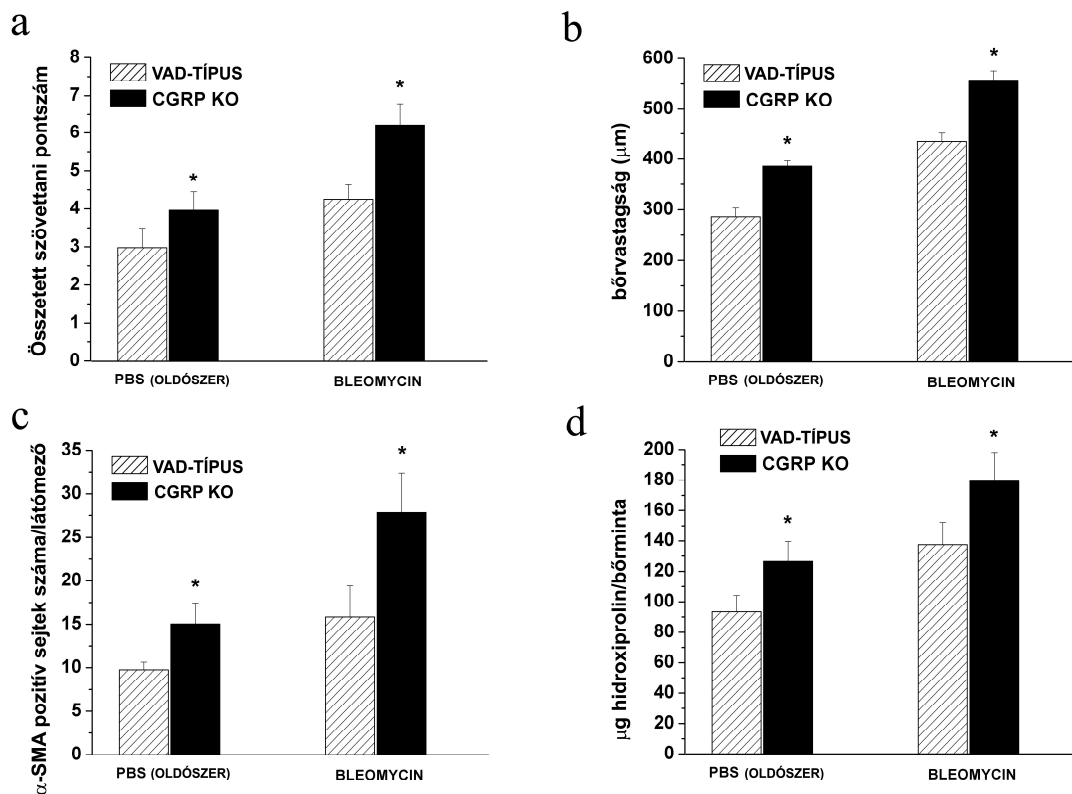
A bleomycin-indukálta szkleroderma modell validálása végett a szintén C57BL/6 törzsből létrehozott CGRP KO egérben is először a bleomycin kezelés eredményességét vizsgáltuk a

CGRP<sup>+/+</sup> egerekben a kontroll csoportul szolgáló PBS kezelt CGRP<sup>+/+</sup> csoporthoz viszonyítva. A szövettani vizsgálatok a bleomycin-kezelt CGRP<sup>+/+</sup> csoportban 42%-al magasabb összetett szklerózis pontszámot ( $4.25 \pm 0.38$  ill.  $2.98 \pm 0.51$ ), 52%-al magasabb bőrvastagság értéket ( $434.49 \pm 16.41$   $\mu\text{m}$  ill.  $285.85 \pm 17.36$   $\mu\text{m}$ ) és 62%-al több  $\alpha$ -SMA-pozitív sejtet ( $15.83 \pm 3.6$  ill.  $9.75 \pm 0.88$  látómezőként) mutattak ki a megfelelő PBS kezelt csoporthoz viszonyítva. A hidroxiprolin mennyisége is 47%-al megnőtt ( $137.6 \pm 14.58$  ill.  $93.4 \pm 10.65$   $\mu\text{g/bőrminta}$ ) a bleomycin kezelés eredményeképp a kontroll CGRP<sup>+/+</sup> PBS kezeléshez képest (**11. a-b-c-d ábrák**).

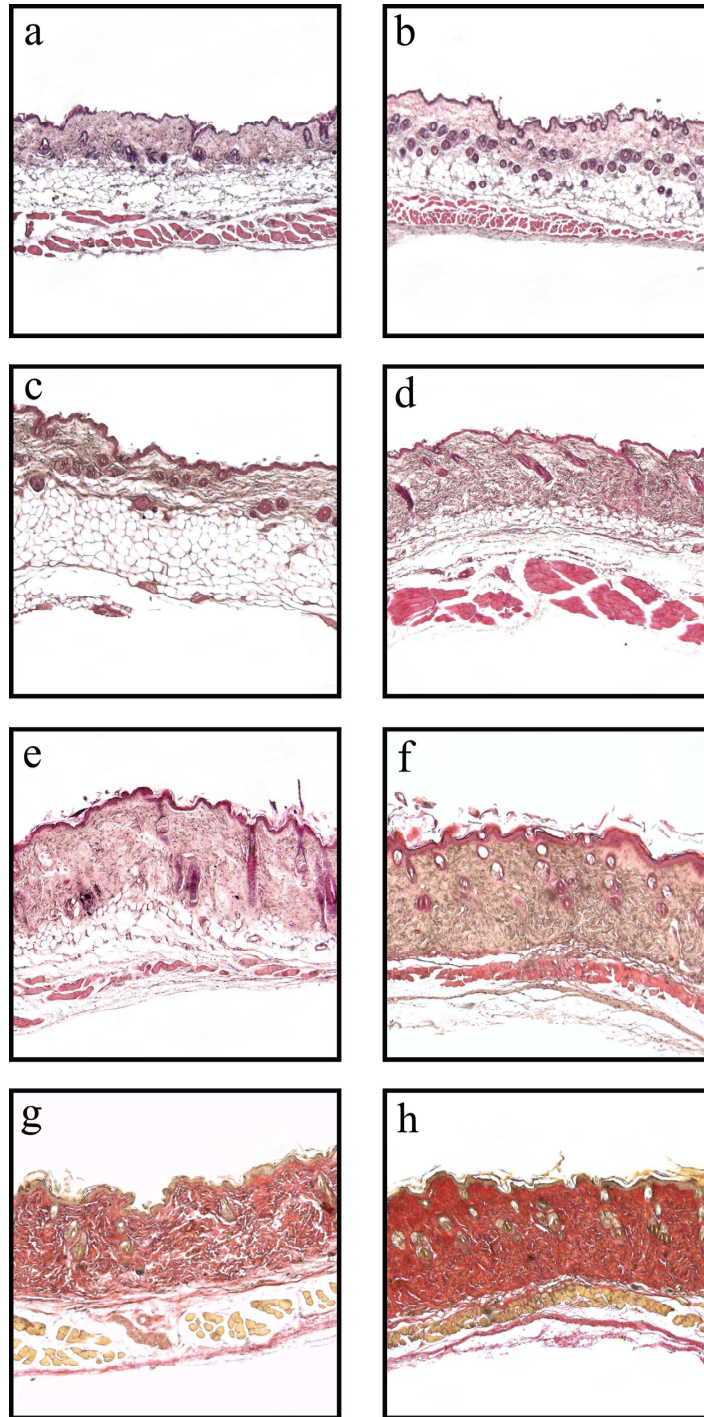
A CGRP receptor hiánya fokozott szklerotikus elváltozásokat eredményezett bleomycin kezelés hatására, az összetett szklerózis pontszám szignifikáns mértékben emelkedett ( $6.21 \pm 0.58$  ill.  $4.25 \pm 0.47$ ) a bleomycin kezelt CGRP<sup>-/-</sup> (KO) csoportban a bleomycin-kezelt CGRP<sup>+/+</sup> (vad) csoporthoz képest (**11. a, 12. ábra**). A bőrvastagság értéke 29%-os emelkedést mutatott ( $557.23 \pm 18.38$   $\mu\text{m}$  ill.  $434.49 \pm 16.41$   $\mu\text{m}$ ) a bleomycin-kezelt CGRP<sup>-/-</sup> csoportban a hasonlóan kezelt CGRP<sup>+/+</sup> csoporthoz viszonyítva (**11. b ábra**). Az  $\alpha$ -SMA-pozitív sejtek száma is szignifikánsan emelkedett ( $27.83 \pm 4.58$  ill.  $15.83 \pm 3.60$  látómezőként) a bleomycin-kezelt CGRP<sup>-/-</sup> csoportban a szintén bleomycin-kezelt CGRP<sup>+/+</sup> csoporthoz képest (**11. c ábra**). A szövettani elváltozásokkal jól egyezően a minták hidroxiprolin tartalma is szignifikánsan magasabb volt ( $179.30 \pm 18.90$  ill.  $137.60 \pm 14.58$   $\mu\text{g/bőrminta}$ ) a bleomycin-kezelt CGRP<sup>-/-</sup> csoportban a CGRP<sup>+/+</sup> csoporthoz viszonyítva (**11. d ábra**).

Meglepő módon a PBS kezelt CGRP<sup>-/-</sup> állatok bőrmintáin is fokozott szklerotikus elváltozások voltak észlelhetők, mint emelkedett összetett szklerózis pontszám ( $3.96 \pm 0.49$  ill.  $2.98 \pm 0.51$ ) nagyobb bőrvastagság érték ( $386.25 \pm 10.26$   $\mu\text{m}$  ill.  $285.85 \pm 17.36$   $\mu\text{m}$ ), emelkedett  $\alpha$ -SMA-pozitív sejt szám ( $15.04 \pm 2.39$  ill.  $9.75 \pm 0.88$  látómezőként) és megnövekedett hidroxiprolin tartalom ( $126.56 \pm 13.10$  ill.  $93.4 \pm 10.65$   $\mu\text{g/bőrminta}$ ) volt megfigyelhető a PBS kezelt CGRP<sup>+/+</sup> csoporthoz képest (**11. a-b-c-d, 12. ábrák**). A PBS kezelés hatására a CGRP<sup>-/-</sup> csoportban kialakult szklerotikus elváltozások hasonló mértékűek voltak a bleomycin-kezelt CGRP<sup>+/+</sup> csoportban kialakult elváltozásokhoz, ezért megvizsgáltuk a nem kezelt CGRP knockout és vad egerek bőrmintáit is, és azt tapasztaltuk, hogy sem a szövettani szerkezetben sem a hidroxiprolin tartalomban nincs szignifikáns különbség a kezeletlen állatok között.





**11. ábra** A bleomycin kezelés hatása CGRP<sup>+/+</sup> és CGRP<sup>-/-</sup> egerekben, (a) összesített szklerózis pontszám (b) bőrvastagság (c) α-SMA-pozitív sejtek száma (d) hidroxiprolin tartalom (átlag±SEM; \*p<0.05 vs. vad-típusú csoport).



**12. ábra** Szöveti elváltozások CGRP<sup>+/+</sup> és CGRP<sup>-/-</sup> egerekben. (a) PBS-kezelt CGRP<sup>+/+</sup> csoport (40-szeres nagyítás HE-festés) (b) PBS-kezelt CGRP<sup>-/-</sup> csoport (40-szeres nagyítás HE-festés) (c) bleomycin-kezelt CGRP<sup>+/+</sup> csoport (40-szeres nagyítás HE-festés) (d) bleomycin-kezelt CGRP<sup>-/-</sup> csoport (40-szeres nagyítás HE-festés) (e) bleomycin-kezelt CGRP<sup>+/+</sup> csoport (40-szeres nagyítás pikroszirusz-festés) (f) bleomycin-kezelt CGRP<sup>-/-</sup> csoport (40-szeres nagyítás pikroszirusz-festés) (g) bleomycin-kezelt CGRP<sup>+/+</sup> csoport  $\alpha$ -SMA antitestel jelölve (100-szoros nagyítás HE-festés) (h) bleomycin-kezelt CGRP<sup>-/-</sup> csoport  $\alpha$ -SMA antitestel jelölve (100-szoros nagyítás HE-festés)

## **4. Megbeszélés, következtetések**

Az általunk értékelt kísérletsorozatban a TRPV1 receptor és a CGRP szerepére fókuszáltunk krónikus fibrotikus-szklerotikus körülmények közt. Az általunk használt C57BL/6 törzsből létrehozott TRPV1<sup>+/+</sup> egerekben a 30 napos bleomycin kezelés körülbelül 150%-os bőrmegvastagodást, jelentős szövettanilag értékelhető bőrszklerózist, 75%-al megnövekedett számú  $\alpha$ -SMA-pozitív sejtet és 148,5%-al megemelkedett mennyiségű hidroxiprolint eredményezett a kontroll csoportul szolgáló PBS kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> csoporthoz képest, mely eredmények összhangban vannak a korábbi C57BL/6 törzsre vonatkozó eredményekkel. (Yamamoto és mtsai., 2000). A korábbi adatokkal szemben a bleomycin kezelés hatására az I-típusú kollagén  $\alpha$ 1-lánc mRNS szintjének emelkedését nem tudtuk kimutatni kvantitatív PCR módszerrel (Yammamoto és mtsai., 2005, Chan és mtsai., 2006). Ezen megfigyelés háttérében nem pontosan tisztázott mi állhat, de az emelkedett kollagén fehérje mennyiség normális mRNS szint mellett több okra is visszavezethető lehet, például a kollagén lebomlási folyamatainak a csökkenésére, fokozott mértékű transzlációra, fokozott mértékű kollagén érési folyamatokra.

A TRPV1 receptor modulátor szerepét több tanulmány is vizsgálta különböző gyulladással járó betegségekben. Számos tanulmány kimutatta a TRPV1 receptor gyulladáskeltő és fájdalmat fokozó szerepét elsősorban akut, de több krónikus gyulladással járó modellben is. TRPV1 génhányos egerekkel végzett kísérletekben a receptor hiányos állatokban az értékelt tünetek szignifikánsan csökkentek adjuváns-indukált artritisz (Szabo és mtsai., 2005), formalin-indukált akut fájdalom, carrageenin-indukált mechanikus hiperalgésia és krónikus neuropátia (Bölcskei és mtsai., 2005) kísérletes állatmodellekben. Növekszik azonban azon tanulmányok száma, amelyek elsősorban krónikus immun-mediált gyulladással járó körülmények közt a TRPV1 receptor védelmező szerepét igazolják, mint az oxazolon-indukált allergiás dermatitisz (Bánvölgyi és mtsai., 2005), dinitrobenzoeszulfonsav-indukált colitis (Massa és mtsai., 2006), endotoxin-indukált sokk (Okajima és mtsai., 2006) kísérletes modellje.

A TRPV1 receptor hiánya az általunk vizsgált belomycin indukált szkleroderma modellben egyértelműen súlyosbította szklerotikus bőrváltozásokat szövettani és biokémiai vizsgálatokkal egyaránt. A bleomycin-kezelt TRPV1<sup>-/-</sup> (KO) állatokban szignifikáns mértékben magasabb összetett szklerotikus pontszámot, nagyobb bőrvastagság értéket, emelkedett számú  $\alpha$ -SMA-pozitív sejtet és magasabb hidroxiprolin mennyiséget mértünk a szintén belomycin kezelt TRPV1<sup>+/+</sup> (vad) állatokhoz képest. A kezeletlen knockout és vad állatok bőrének szerkezete között nincs detektálható különbség, vagyis a TRPV1 receptor

hiánya önmagában nem okoz fibrotikus-szklerotikus elváltozásokat. A szklerotikus elváltozások kialakulásához profibrotikus tényezők hatásaira van szükség, mint például a bleomycinre. Eredményeink alapján azonban kijelenthető, hogy a TRPV1 receptor jelenléte protektív hatást fejt ki profibrotikus ágensek által kiváltott szklerotikus elváltozásokkal szemben. Feltehetőleg a bleomycin által kiváltott gyulladásos folyamatokban keletkező gyulladásos mediátorok - elsősorban a bradykinin, prosztaglandin származékok, lipoxigenáz termékek (12-HPETE) – aktiválják és szenzibilizálják a TRPV1 receptort (Hwang és mtsai., 2000). A TRPV1 receptor gyulladásos mediátorok általi aktiválása szenzoros neuropeptidok felszabadulását eredményezi, melyek eredően védő hatást fejtenek ki a kóros elváltozásokkal szemben az általunk vizsgált modellben. A felszabaduló szenzoros neuropeptidok közül a tachykinin P-anyag plazma fehérje kilépést okoz (Lembeck F, Holzer P, 1979), a CGRP hosszú ideig fennmaradó vasodilatatív hatású (Brain és mtsai., 1985), a szomatosztatin pedig gátolja a többi neuropeptid felszabadulását, valamint közvetlenül gátolja a gyulladásos folyamatokat és az immunsejteket (Pintér és mtsai. 2006).

A TRPV1 receptor aktiválódása során felszabaduló szenzoros neuropeptidok közül az irodalomban kizárólag a CGRP-re található adat, mint egy potenciális protektív faktor a szkleroderma valamint a Raynaud's fenomén patomechanizmusában. Az emberi bőr sűrűn van innerválva CGRP tartalmú idegrostokkal (Dalsgaard és mtsai., 1989), és a CGRP immunoreaktív idegsejtek számának szignifikáns csökkenése figyelhető meg Raynaud's fenoménben szenvedő és szklerodermás betegekből vett bőrmintákban az egészséges bőrmintákhoz képest (Bunker és mtsai., 1990; Terenghi és mtsai., 1991; Bunker és mtsai., 1996). A Raynaud's fenomén patomechanizmusában szerepet tulajdonítanak a CGRP tartalmú idegrostok csökkent száma miatt a hideg hatására kialakuló kisebb mértékű vazodilatációnak (Cooke és mtsai., 2005). Ezen morfológiai megfigyelések alapján CGRP génhiányos egereket használtunk a CGRP szklerotikus folyamatokban játszott szerepének tisztázására az általunk használt in vivo bleomycin indukálta szkleroderma modellben. A C57BL/6 törzsből létrehozott CGRP<sup>+/+</sup> csoportban a bleomycin kezelés jól vizsgálható jelentős mértékű morfológiai, biokémiai, szövettani és immunhisztokémiai ( $\alpha$ -SMA) elváltozást okoz. CGRP hiányában a bleomycin kezelés egyértelműen fokozott szklerózist eredményezett, mind a bőrvastagság, szövettani összpontszám, hidroxiprolin és  $\alpha$ -SMA vonatkozásában. A vizsgálataink az első in vivo bizonyítékot szolgáltatták a CGRP hiányában kialakuló szklerotikus elváltozásokra. Ennek hátterében feltehetőleg a CGRP vasodilatatív hatásának a kiesésének eredményeképp létrejött vazospazmus és következményes ischémia állhat. A fokozott vazospazmus és ischémia vazopátiát és obliteratív fibrózist okozhat.

Előre nem várt módon szignifikáns szklerotikus elváltozás volt megfigyelhető a CGRP génhányos állatokban a PBS kezelés hatására is a vad-típusú PBS kezelt csoporthoz viszonyítva, miközben nem volt detektálható különbség a kezeletlen CGRP<sup>+/+</sup> és CGRP<sup>-/-</sup> állatokból vett bőrminták szerkezete között. Feltételezhetően a 4 hétig naponta történő PBS injekció során a tűszúrások okozta fizikai sérülésre reagáltak érzékenyebben a CGRP knockout állatok. Az irodalomban vannak adatok arra vonatkozóan, hogy fizikai károsító ágensek, mint pl. vibráció, trauma, besugárzás okozhatnak szklerodermát (Komocsi és mtsai., 2000), bár a CGRP-nek a jelenségben betöltött szerepére nincs adat. A bleomycin kezelés azonban szignifikáns mértékben tovább fokozta a szklerotikus elváltozásokat a CGRP<sup>-/-</sup> állatokban a PBS kezelt CGRP<sup>-/-</sup> csoporthoz képest.

Kísérleteink eredményeképp kijelenthetjük, hogy a TRPV1 receptor és a CGRP jelenléte egyértelmű protektív szerepet tölt be a szkleroderma patomechanizmusában. CGRP receptor agonisták pedig terápiás lehetőséget jelenthetnek a szkleroderma kezelésében a jövőben, de természetesen a lehetséges mellékhatásokkal is számolni kell.

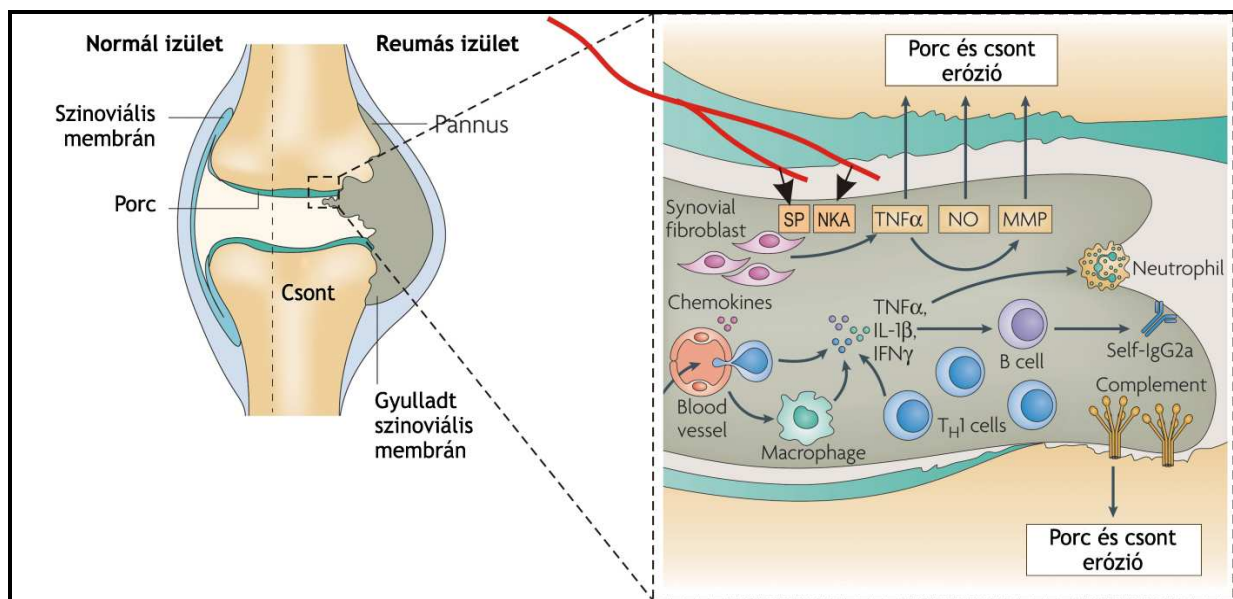
## **II. FEJEZET**

# **A KAPSAICIN-ÉRZÉKENY IDEGVÉGZŐDÉSEK ÉS A TRPV1 RECEPTOR SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA ADJUVÁNS-INDUKÁLTA KRÓNIKUS ÍZÜLETI GYULLADÁS MODELLJÉBEN**

### **1. Kísérleteink irodalmi háttere**

A reumatoid arthritisz elsősorban a fiatal, középkorú nőket érinti, hazánkban mintegy 70-80 ezer pácienssel számolhatunk. Ez a kórkép egy autoimmun hátterű, krónikus, progresszív sokízületi gyulladás, mely az ízületek destrukciója és deformitása révén a betegek fájdalmát, mozgáskorlátozottságát, rokkantságát és életminőségük jelentős romlását idézi elő (Harris 2005). A gyulladt ízületre a szinoviális szövet megvastagodása, a mononukleáris sejtek infiltrációja, valamint porc- és szubkondrális csontdestrukció jellemző. A gyulladással citokinek fontos szerepet játszanak az arthritisz kialakulásában és progressziójában. Az IL-1 $\alpha$  aktiválja a T-sejteket és az oszteoklasztokat (Kagari és mtsai., 2002). Az IL-6 és a TNF- $\beta$  a T- és B-sejtek proliferációját, differenciációját és csontabszorpciót okoznak. A TNF- $\alpha$  központi szerepet játszik az autoimmun gyulladás kialakulásában más proinflammatorikus citokinek és kemokinek termelődésének fokozásával, a leukocita-adhézió, migráció, az angiogenezis, valamint a porc- és csontdestrukció serkentésével. Ezek a citokinek az elmúlt 15 évben biológiai terápiás célmolekulákká váltak. Az ízületi tok és a szinovium gazdagon innervált kapszaicin-érzékeny szenzoros rostokkal. Ezen idegvégződések a feszülést és a fájdalmat közvetítik, valamint számos irodalmi adat igazolja, hogy az általuk közvetített neurogén gyulladás jelentős szerepet játszik a napjainkban népbetegségnek számító, egyre növekvő számú beteget érintő krónikus ízületi gyulladással megbetegedések, mint pl. a reumatoid arthritisz, kialakulásában és súlyosbodásában (Jorgenson és Sany 1994). Mindemellett több irodalmi adat is felhívja a figyelmet a neuro-immun interakciók jelentőségére a reumatoid arthritisz patomechanizmusában (Niissalo és mtsai., 2002). Arthritiszben szenvedő betegektől (Marabini és mtsai., 1991), illetve kísérleti állatoktól (Bileviciute és mtsai., 1993) származó szinoviális folyadékban a gyulladáskeltő szenzoros neuropeptidok emelkedett szintjét mutatták ki. A tachykininek és CGRP magukon az idegvégződéseken, az ereken, a szinoviális

sejteken, valamint az ízületi gyulladással történő hatással jelentősen hozzájárulnak a gyulladással és a következményes fájdalom kialakulásához (Levine és mtsai., 1985; Ferrel és Lam 1996). A SP a hízósejtekből gyulladáskeltő mediátorokat szabadít fel, stimulálja továbbá a makrofágok IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  és interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) termelését, valamint a szinoviociták prosztaglandin E<sub>2</sub>, kollagenáz, nitrogén monoxid (NO), és mátrix metalloproteináz (MMP) szekrécióját. A T- és B-limfociták aktivációja a makrofágokból származó gyulladással citokineknek köszönhető (Lam és Ferrell 1991) (13. ábra). A CGRP elsősorban a szinoviális értágulat, ödéma képződés és az artritiszhez kapcsolódó fájdalom, hiperalgéria (fájdalom küszöb csökkenés) kialakulásában játszik szerepet (Fernihough és mtsai., 2005). A spontán fájdalom, az allodynia, azaz a nem fájdalmas ingerekre kialakuló fájdalomérzet, valamint a hiperalgéria az emberi ízületi gyulladással betegségek minden fajtájának jellemző tünetei. A nociceptorok aktivációját és/vagy szenzitizációját a felszabaduló gyulladással mediátorok, mint pl. protonok, lipoxigenáz termékek, prosztaglandinok és a bradykinin idézhetik elő. A SP és a CGRP a periférián és szenzoros neuronok gerincvelői centrális végződésein hatva egyaránt szerepet játszanak a nocicepcióban is. A krónikus ízületi gyulladással és a következményes fájdalom tehát nagyon komplex, sokrétű folyamat eredménye, amelyben a szenzoros-immun interakciók rendkívül fontosak: a tachykininek stimulálják a gyulladással sejteket, a belőlük felszabaduló mediátorok viszont különféle mechanizmusokkal aktiválják, szenzitizálják a nociceptorokat.



13. ábra. Krónikus ízületi gyulladással és a szerepet játszó mediátorok sematikus vázlatja

Arra is van azonban irodalmi adat, hogy más, ugyancsak az aktivált szenzoros idegvégződésekből felszabaduló neuropeptidek kísérleti körülmények között gátolják a krónikus ízületi gyulladás kialakulását. Ilyenek például az opioid peptidok (Parsons és mtsai., 1990), a galanin (Heppelmann és mtsai., 2000), és a PACAP (Delgado és mtsai., 2003). Saját kísérleteink más modellekben, a bőrben és a légutakban elsősorban a kapszaicin-érzékeny rostokból felszabaduló szomatosztatin gyulladásgátló és antinociceptív hatásaira irányultak (Helyes és mtsai., 2003). Számos bizonyíték van arra, hogy az ízületbe adott SOM fájdalomcsillapító hatással rendelkezik és hatékonyan csökkenti a gyulladásos folyamatokat artritiszben szenvedő betegekben (Fioravanti és mtsai., 1995). Ízületi gyulladás vonatkozásában tehát a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből felszabaduló mind gyulladáskeltő, mind gyulladásgátló hatású neuropeptidek patofiziológiai jelentőségére is vannak irodalmi adatok.

A krónikus ízületi gyulladásos betegségek jelenlegi terápiája elsősorban a tünetek enyhítésére szolgál. Így kezdetben nem-szteroid típusú gyulladáscsökkentők/fájdalomcsillapítók javasolhatók, míg előrehaladottabb betegségben szteroidok, később az immunszuppresszív hatású bázisterápiás gyógyszerek (methotrexát, leflunomid) adandók. Ezen gyógyszerek viszont súlyos gasztrointesztinális, renális és hematológiai mellékhatásaik miatt óvatosságra intik a kezelőorvost, továbbá nem minden beteg reagál kielégítően ezekre a farmakoterápiás beavatkozásokra. Napjainkra egyre elterjedtebb a biológiai terápia, melynek célja, hogy megakadályozza specifikus citokinek (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) termelődését, hatásait, a gyulladásos sejtek proliferációját, működését, és így visszaszorítsa a gyulladásos folyamat progresszióját, az ízület további károsodását (Disease Modifying Anti-Rheumatoid Drugs: DMARDs). Bár ezek a szerek valóban jelentősen csökkentik a progressziót, alkalmazásuk során az immunrendszer gyengülése miatt fokozott fertőződések veszéllyel és fakultatív patogén kórokozókkal történő infekciókkal kell számolni, valamint hosszútávon a másodlagos malignitások kialakulásának magasabb kockázata sem zárható ki (Feldmann és mtsai., 2005). E betegcsoport kezelése tehát korántsem megoldott, és egyetlen olyan gyógyszer sincs forgalomban, amely hatékonyan tudná gátolni a gyulladásos folyamat neurogén komponensét (Helyes és mtsai., 2003).



## **2. Anyagok és módszerek:**

### **2.1. Kísérleti állatok**

#### **A. Patkánykísérletek**

A kísérleteket hím Lewis patkányokon (Charles Rivers Ltd., Budapest, Magyarország), tenyésztésük intézetünk állatházában történt 24-25 °C-on, standard rágcsálótáppal és vízzel *ad libitum* ellátva.

#### **B. Egérkísérletek**

Kísérleteinket az előző fejezetben ismertetett hím 20-25 g súlyú, C57BL/6 törzsből kifejlesztett TRPV1 receptor génhíányos egereken, kontrollként pedig ezek vad típusú megfelelőin végeztük.

Mindkét alkalmazott kísérleti eljárás eleget tett az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998 (XII. 31.) számú kormányrendelet előírásainak, és megfelelt a fájdalom tanulmányozására létrehozott nemzetközi tanács javaslatainak (Zimmermann, 1983). A kísérleti protokollokat a Pécsi Tudományegyetem állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága is jóváhagyta.

### **2.2. A krónikus ízületi gyulladásmodell**

A krónikus ízületi gyulladást komplett Freund adjuvánssal (elölt Mycobacterium paraffinolajos szuszpenziója, 1 mg/ml) váltottuk ki (patkányban 100 µl, egérben 50 µl s.c. a bal talpba és a faroktöbe). A szisztémás tünetek elősegítésére a faroktöbe adott injekciót a következő napon megismételtük, ezt tekintettük a kísérlet első napjának. A CFA hatására az injekció oldalán sokkal kifejezettebb, de az ellenoldalon is megfigyelhető gyulladós reakció alakul ki a tibiotarzális ízületekben, amelyet szisztémás gyulladós tünetek (testhőmérséklet-emelkedés, étvágytalanság, testsúlycsökkenés, bágyadtság) kísérnek. A CFA adásával a szervezet immunválasz-készsége stimulálható, a baktérium sejtfalában található muramil-dipeptid aktiválja a makrofágokat és a dendritikus sejteket, amely IL-12, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  fokozódó termeléséhez vezet. Ennek hatására poliklonális T-limfociták aktiválódnak, elsősorban T-helper1 (Th<sub>1</sub>, CD4+) irányba differenciálódnak és limfokineket termelnek. Az adjuváns alkalmazásának helyén a sajtos granulóma képződéséért a makrofágok fokozott mértékű antigén-feldolgozása felelős, a krónikus poliarthritis kialakulásában CD4+ T-sejt klónok aktiválódása játszik szerepet (Joe és Wilder 1999).

## **2.3. Állatcsoportok, kísérleti protokollok**

### **A. Patkánykísérletek**

A kísérleteinkben 4 állatcsoportot képeztünk, mind a négy állatcsoportban a fent leírt módon váltottuk ki az ízületi gyulladást.

A kapszaicin-érzékeny afferens szenzoros rostok szerepének vizsgálata céljából a patkányok egy csoportját a TRPV1 agonista RTX-szel kezeltük elő, amely ezen érzőideg-végződések hosszantartó károsodását okozza. Az előkezelés során 3 egymást követő napon 30, 70 és 100 µg/kg RTX-et adtunk az állatoknak s.c. a nyakbőr alá, az akut hatásból adódó szövődmények kivédésére minden alkalommal az RTX előtt 20 perccel i.p. terbutalin-teofillin-atropin koktélt is injektáltunk. Az ízületi gyulladást 7 nappal később váltottuk ki. Az RTX deszenzibilizáció sikerességének ellenőrzésére a kísérlet megkezdése előtt elvégeztük kapszaicin szembe cseppentésével (50 µl 0.1%-os kapszaicint) a wiping (szemtörlési) tesztet (Welk és mtsai., 1984), az elhárító reakció minden általunk előkezelt állatban hiányzott.

A patkányok másik csoportjának a kapszaicin-érzékeny idegvégződés aktivációjával felszabaduló szomatosztatin szerepének vizsgálatára az sst receptor antagonistá ciklo-szomatosztatinnal (C-SOM) kezeltük az állatokat naponta 21 napon keresztül (20 µg/kg i.p.).

A következő kísérletsorozatban a patkányokat a szintetikus heptapeptid sst<sub>4</sub>/sst<sub>1</sub> agonista TT-232-vel kezeltük a teljes kísérlet alatt (2x50-400 µg/kg/nap i.p.), a kontroll csoportban oldószert alkalmaztunk. Az alkalmazott dózistartományt előzetes *in vitro* és *in vivo* kísérleteink alapján választottuk (Helyes és mtsai., 2001; Pintér és mtsai., 2002)

### **B. Egérkísérletek**

A krónikus ízületi gyulladással körülmények között a TRPV1 receptor lehetséges aktiválódásának vizsgálatára mind a TRPV1 receptor génhiányos mind a vad-típusú állatok egy-egy csoportját (n=8-12/csoport) az adjuváns kezelés napjától fogva minden nap a teljes kísérleti periódus alatt az alábbi anyagok valamelyikével kezeltük. A vizsgált vegyületeket azért választottuk, hogy a TRPV1 receptor aktivációjában szerepet játszó lehetséges mediátorokat azonosítsuk.

A lipoxigenáz enzim termékek TRPV1 aktiválásában betöltött szerepének vizsgálatára egy állatcsoportot nor-dihidro-guarénsavval (nor-dihydro-guaretic acid, NDGA), egy nem-szelektív lipoxigenáz-inhibitorral kezeltünk 25 mg/kg/nap dózisban intraperitoneálisan (ip.) (Chacur és mtsai., 2001).

A második állatcsoportot a bradykinin lehetséges szenzitivizáló hatásának kimutatására bradykinin B1 receptor antagonistá desArgHOE-140-nel (Ferreira és mtsai., 2001), a harmadikat pedig a bradykinin B2 receptorát blokkoló HOE-140-nel kezeltük (Wirth és mtsai., 1999) (mindkettő esetben 250 µg/kg/nap ip.).

A negyedik csoport egerei indometacint (1 mg/kg ip.), egy nem-szelektív ciklooxygenáz enzim gátlót (Gauldie és mtsai., 2004) kaptak a ciklooxygenáz enzim termékek lehetséges TRPV1 receptor aktiváló és szenzitivizáló hatásának vizsgálatára.

Az egyes kezelt csoportok kontrolljául naponta fiziológiás sóval i.p. kezelt csoport szolgált.

A CFA-t, desArgHOE-140-et, HOE-140-et, NDGA-t, indometacint a Sigmától (St. Louis, MO, USA), az altatás során használt Nembutalt (Na-pentobarbital) a Servatól (Heidelberg, Németország) szereztük be. Az indometacint 5%-os NaHCO<sub>3</sub>-ban oldottuk fel, majd fiziológiás sóoldattal hígítottuk tovább. A desArgHOE-140, a HOE-140 és az NDGA törzsoldata 96%-os etanollal készült, a végső oldat 10% törzsoldatból, 85% fiziológiás sóoldatból és 5% Tween 80-ból állt.

## **2.4. Vizsgálati módszerek**

### **A. A lábterfogat mérése**

A lábak térfogatát Ugo Basile 7140 pletizmométerrel mértük, amely a közlekedőedények elve alapján működő készülék. Az állat hátsó lábát a bokaízület felett előre meghatározott jelig egy folyadékkal teli hengerbe merítettük. Ehhez a hengerhez csatlakozik egy másik folyadékkal teli henger, amelyben egy transzducer a láb bemerítésekor bekövetkező folyadék-kiszorítást érzékeli. A térfogatot cm<sup>3</sup>-ben olvastuk le a digitális kijelzőről, a kísérlet 2.,5.,8.,12.,15.,18., 21-adik napján, a mérési adatokat a kezdeti értékekhez viszonyítottuk és az ödémát százalékban fejeztük ki (**14. ábra**).



**14. ábra.** Lábtérfogat mérése Ugo Basile pletizmométerrel

**B. A talp érintési érzékenységének mérése**

A talp mechanoczeptív küszöbének meghatározását Ugo Basile dinamikus plantáris eszteziométerrel végeztük, amely a klasszikus von Frey módszer digitalizált változata. A vizsgálat alatt az állatok szabadon mozogtak egy fémrácsra helyezett kamrában, amelyben a méréseket egy 10-15 perces szoktatási periódus után végeztük. A mozgatható stimulátor egységhez csatlakoztatott tükör segítségével a talp középső régiója egy rozsdamentes acélból készült tompa tűskével alulról ingerelhető előzetesen beállított dinamikai paraméterekkel. Patkányok mérésekor a maximális erő kifejtést 50 g-ra, az erő kifejtés növelésének sebességét (ramp) 10 g/s-ra, egerek esetében a maximális erőhatást 10 grammra, az erőhatás növekedési dinamikáját 2 g/s-ra állítottuk be. A készülék digitális kijelzőjén grammban leolvasható az a küszöbérték, amelynél az állat felemeli a lábát (**15. ábra**).

Ép patkánylábban ez a stimulus alapvetően nem fájdalmas, a küszöbérték érintési érzékenységi küszöbnek tekinthető. Egérben ezzel szemben ez intakt állapotban is enyhén fájdalmas ingert jelent, tehát az elhárító reakció a mechanoczeptív küszöböt jelzi. Minden eredményt 3 egymás utáni mérés átlagából számoltunk, a mechanikai küszöb változását (patkányban allodynia, egérben hiperalgécia) a saját kezdeti értékhez viszonyított százalékban fejeztük ki.



**15. ábra.** Talp érintési érzékenységének meghatározása Ugo Basile dinamikus plantáris eszteziométerrel

### C. Szövetteni metszetek készítése és értékelése

Az állatok pentobarbitállal (Nembutal) történő altatását követően cervikális diszlokációt végeztünk, majd a tibiotarzális ízületeket kimetszettük. A mintákat ezután formalinban fixáltuk, majd 8 órán keresztül  $\text{AlCl}_3$ -ot, hangyasavat és sósavat tartalmazó oldatban dekalcináltuk  $4^\circ\text{C}$ -on (Schwab és mtsai., 1997). Amikor az ízületek megfelelően felpuhultak, Sörensen-féle foszfát-pufferben 8 órán át mostuk, majd megint 8-8 óráig  $4^\circ\text{C}$ -on szacharóz-oldatokban dehidráltuk. Végül a mintákat paraffinba ágyasztuk, majd mikrotómmal  $5-7\ \mu\text{m}$ -es szeletekre vágtuk és hematoxilin-eozin eljárással megfestettük. Az egyes ízületek 4-5 különböző rétegeből készült metszet, hogy átfogóbb képet kapjunk az ízületben lezajlott elváltozásokról.

A gyulladós elváltozásokat egy kísérleteinktől független tapasztalt patológus kolléga értékelte. A szemikvantitatív pontozás a *szinoviális kötőszövet megvastagodása*, *leukocitás infiltrációjának mértéke*, valamint külön a *porc* és a *csontkárosodás* mértéke alapján történt. Mind a négy paramétert 0-tól 3-ig terjedő skálán pontoztunk, ahol 0=normális, 1=enyhe, 2=mérsékelt, 3=súlyos mértékű elváltozás az intakt mintákhoz viszonyítva. Az egyes pontokat összeadtuk, így minden mintára, ezáltal minden csoportra, egy összetett artritisz pontszámot kaptunk mely érték 0 és 12 közé eshetett és az egyes csoportok megfelelő értékeit oszlopdiagramon ábrázoltuk (Weinberg és mtsai., 2003).

### D. A plazma szomatosztatin koncentrációjának meghatározása

A plazma szomatosztatin-szerű immunreaktivitását RIA módszerrel határoztuk meg (Németh és mtsai, 1996, 1998). A kísérlet végén, 21 nappal a CFA-injekció után, 12 órás éheztetést követően patkányonként 4 ml vérmintát vettünk szív punkcióval mély altatásban EDTA-t és

aprotinint tartalmazó jégbehűtött csövekbe. Centrifugálást követően a plazmák peptidtartalmát abszolút alkohollal extraháltuk, majd második a centrifugálás után a felülúszót nitrogén áram alatt beszárítottuk és RIA-pufferben visszaoldottuk.

#### E. Statisztikai értékelés

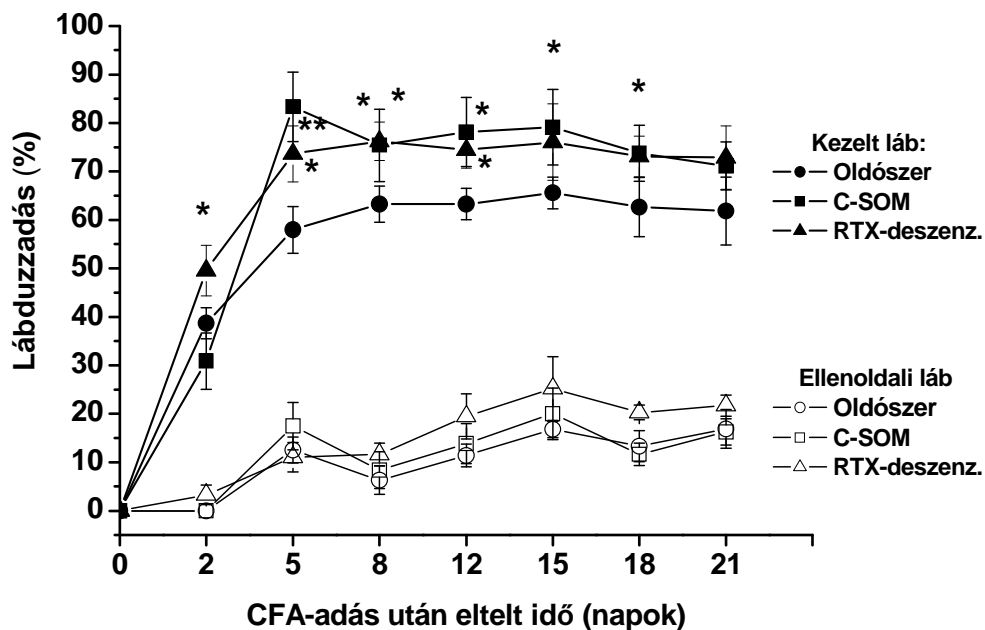
Az ödéma, allodinia/hiperalgésia eredmények értékelésekor csoportonként  $n=6-12$  állat átlag $\pm$ SEM értékeit ábrázoltuk. A statisztikai elemzésre két utas ANOVA-t követően Bonferroni-féle módosított t-tesztet használtunk. Az összetett artritisz score ábrázolása oszlopdiagram módszerrel történt. A statisztikai elemzést ebben az esetben és a peptid-koncentrációk összehasonlításakor nem-parametrikus, Mann-Whitney U teszttel, végeztük. Minden esetben  $*p<0.05$  és  $**p<0.01$ .

### 3. Eredmények

#### 3.1. A KAPSAICIN-ÉRZÉKENY ROSTOK ÉS A BELŐLÜK FELSZABADULÓ SZOMATOSZTATIN SZEREPE, ÉS A TT-232 HEPTAPEPTID HATÁSA KRÓNIKUS ÍZÜLETI GYULLADÁSOS PATKÁNYMODELLBEN

##### A. RTX-előkezelés és C-SOM hatása a lábduzzadásra

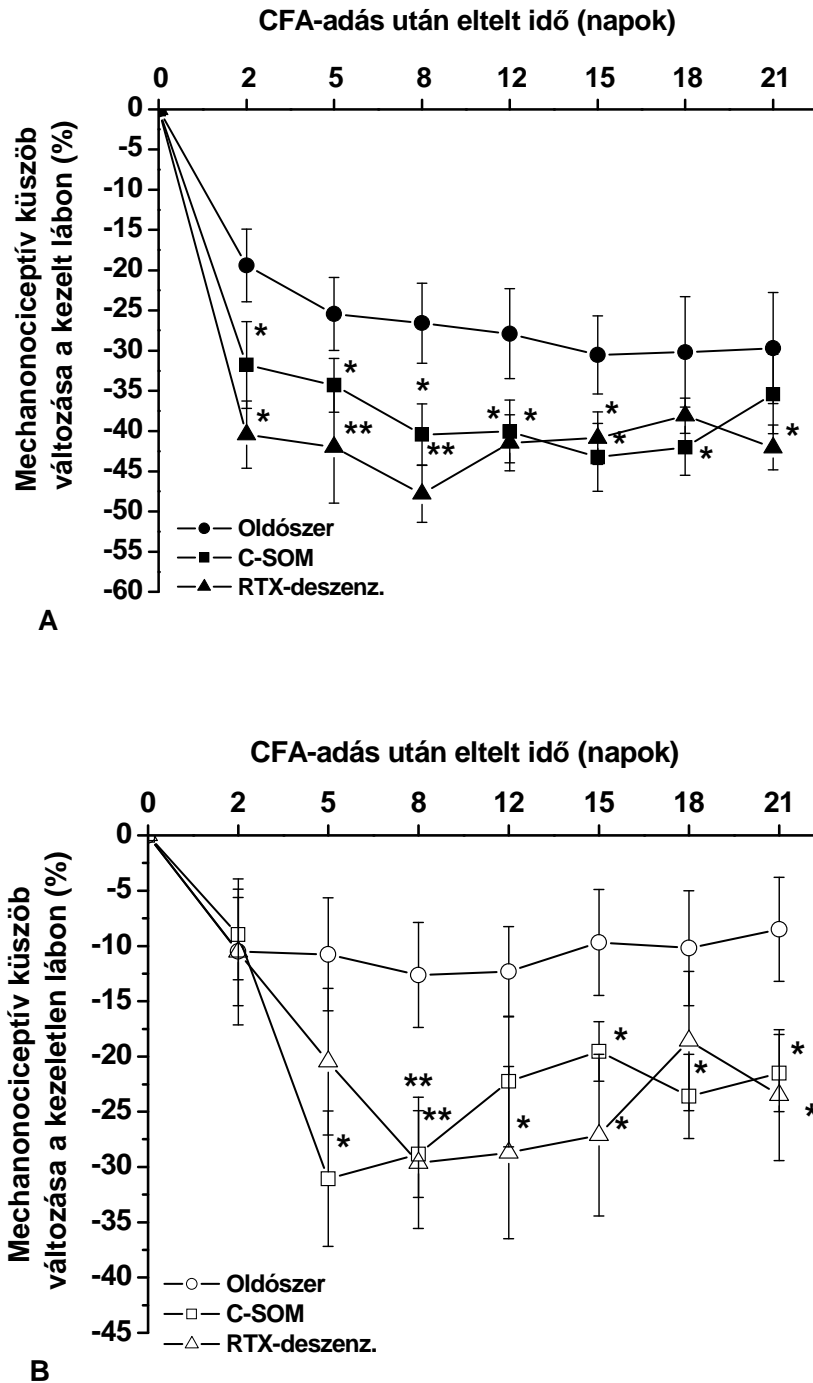
Kontroll, előkezeletlen állatokban a CFA-val kezelt láb fokozatosan duzzadt, a 8. napon elérte a maximális 60%-ot, a térfogat  $0.73 \pm 0.02 \text{ cm}^3$ -ról  $1.18 \pm 0.13 \text{ cm}^3$ -re növekedett. Az ellenoldali lábon kisebb mértékű, csupán 16-18% ödéma volt tapasztalható. A kapszaicin-érzékeny afferens rostok RTX-előkezeléssel történő inaktivációja után az ödéma a teljes 21 napos kísérleti periódus alatt nagyobb volt, bár a különbség a második hét után már nem volt minden mérési pontban szignifikáns. A duzzadást fokozó tendencia az ellenoldalon is látható, de ott a kis ödéma értékek miatt szignifikáns eltérés nem tapasztalható. A naponta alkalmazott C-SOM injekció, amely a szomatosztatin hatásait mind az öt sst receptoron gátolja, az RTX-előkezeléshez hasonló mértékben fokozta a lábduzzadást (16. ábra).



16. ábra. RTX-előkezelés és C-SOM kezelés hatása a CFA-val kiváltott lábduzzadásra (átlag $\pm$ SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $< 0.01$  vs. kontroll).

## **B. RTX-előkezelés és C-SOM hatása a mechanikai allodiniára**

Az oldószerrel kezelt kontroll csoport esetén a mechanonociceptív küszöb a CFA-val kezelt lábón jelentősen, mintegy 25-30%-kal csökkent, míg az ellenoldali lábón csupán 5-7%-kal. Az RTX-előkezelés és a C-SOM-kezelés egyaránt mindkét lábón szignifikánsan növelte az allodiniát a teljes 21 napos kísérleti periódus alatt (17. ábra).



**17. ábra.** RTX-előkezelés és C-SOM kezelés hatása mechanikai allodiniára (A) a CFA-val kezelt és (B) az ellenoldali lábón (átlag±SEM; \*p<0.05, \*\*<0.01 vs. kontroll).

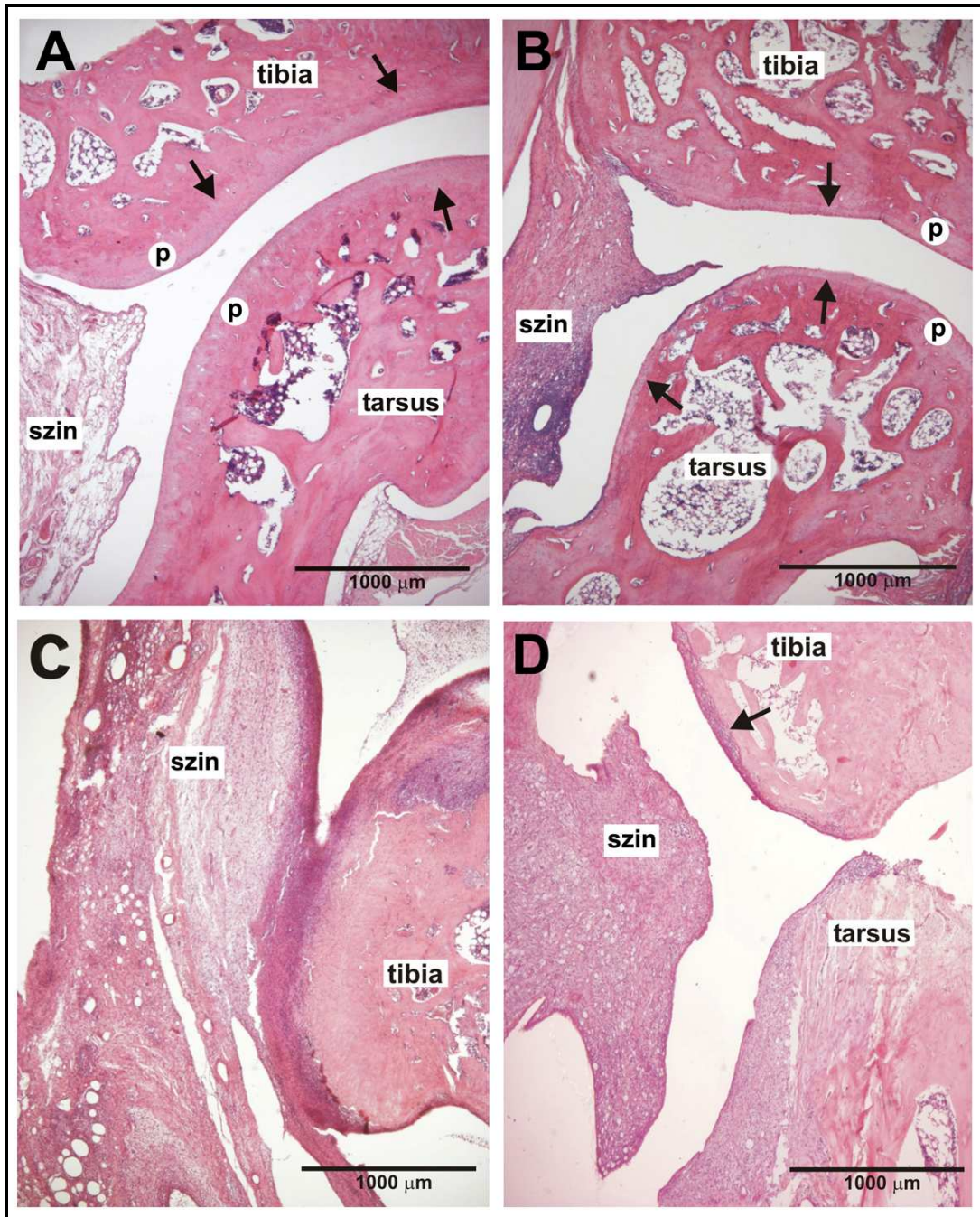


### **C. RTX-előkezelés és C-SOM-kezelés hatása a CFA-val kiváltott szövettani elváltozásokra**

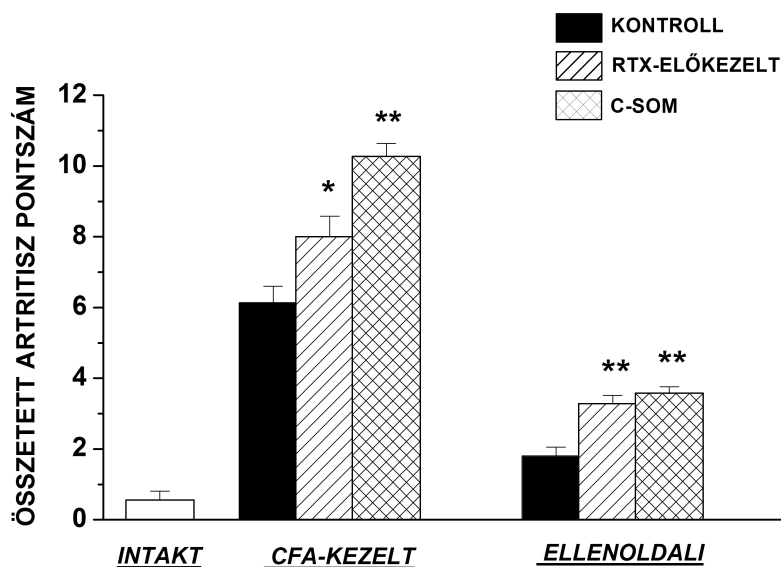
A szövettani metszeteken a normál ízületi struktúrával (**18 a. ábra**) összehasonlítva látható, hogy a CFA-val kezelt patkányok baloldali ízületét roncsolja az egyre növekvő szinoviális pannusz. Az ízületi üreg kiszélesedett, a szinoviális kötőszövet mononukleáris sejtekkel sűrűn infiltrált, a porcszövet nagymértékben lepusztult és erőteljes, masszív csontkárosodás figyelhető meg (**18 b. ábra**). Az ellenoldali ízületekben kisebb mértékű gyulladással elváltozások láthatók, porc-és csontkárosodások ritkán jelentkeztek, a mononukleáris sejt-infiltráció jelentősen enyhébb, néhol a szinoviális szövet megvastagodott.

Az RTX-szel előkezelt és C-SOM-kezelt patkányok bal tibiotarzáli ízületében a CFA hatására sokkal kifejezettebb szinoviális hiperplázia, erőteljesebb megvastagodás és mononukleáris sejt-infiltráció, valamint nagyobb mértékű porckárosodás és előrehaladt csontpusztulás látható (**18 c-d. ábrák**). Mindkét csoportban az ellenoldali ízületekben tapasztalt gyulladással károsodások is sokkal intenzívebbek.

A független patológus segítségével történő szemikvantitatív elemzés és az ez alapján készített artritisz pontszám eredményei is alátámasztották, hogy mind az RTX-előkezelés, mind a C-SOM-kezelés szignifikánsan súlyosbította az ízületi gyulladást (**19. ábra**).



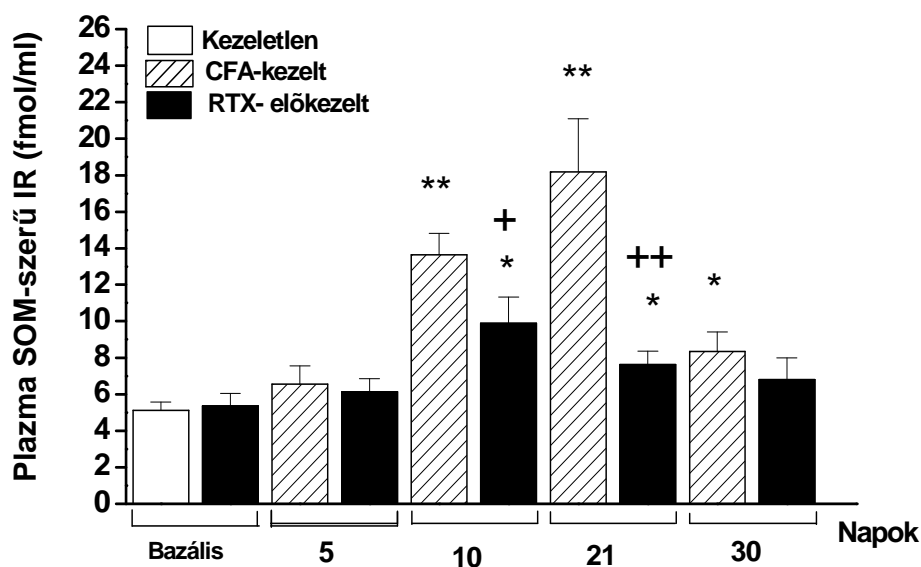
**18. ábra.** Szöveti metszetek, melyek bemutatják (A) egy ép tibiotarzáli patkányízület szerkezetét, (B) egy gyulladt tibiotarzáli ízület képét 21 nappal az i.pl. és a faroktöbbe történő CFA-injekció után, (C) egy CFA-val kiváltott artritisz képét RTX-előkezelés után, és (D) egy C-SOM-kezelt patkány gyulladt ízületét. HE festés, 200x-os nagyítás; [szin]: szinovium, [p]: porc.



**19. ábra.** A tibiotarzáris ízületek szemikvantitatív szövettani értékelése (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. kontroll, Mann-Whitney U-teszt).

#### **D. A plazma SOM koncentrációjának változása CFA-val kiváltott ízületi gyulladásban**

A plazma SOM-szerű immunreaktivitása a CFA-injekciót követően folyamatosan emelkedett, a 21. napra elérte a négyszeres, maximális értéket. Ezt követően csökkenni kezdett és a 30. napra a maximális érték felére esett vissza. Az RTX-előkezelés a gyulladás során történő SOM felszabadulást szignifikánsan csökkentette, a bazális szint nem változott (**20. ábra**).

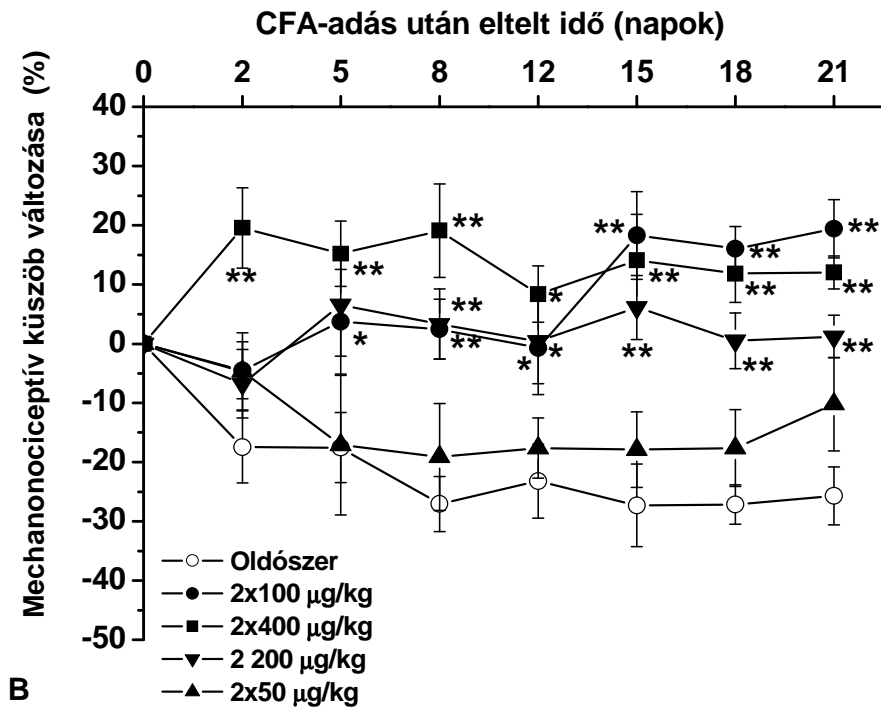
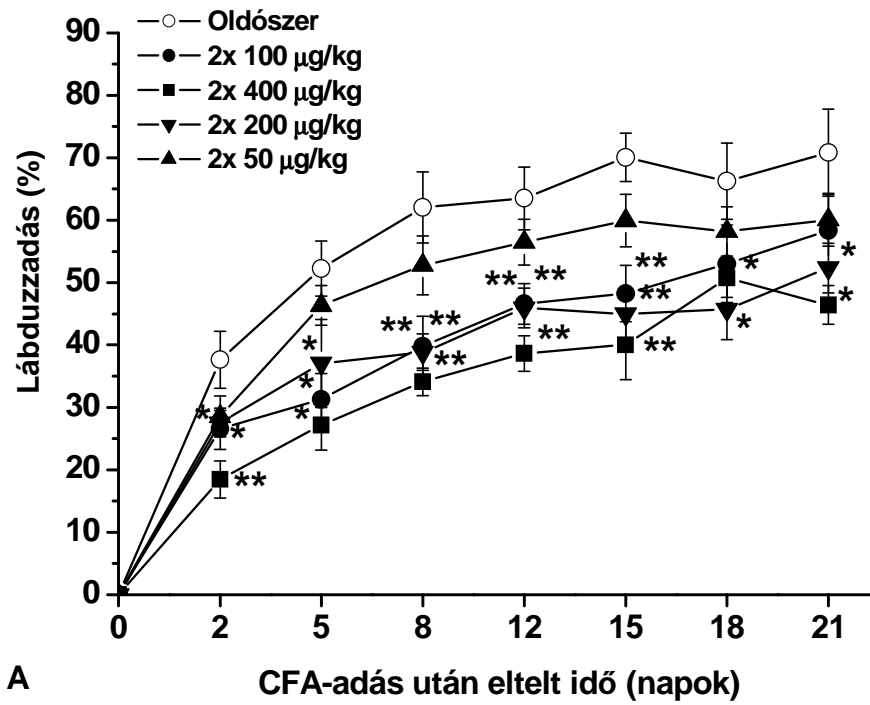


**20. ábra.** Plazma szomatosztatin-szerű immunreaktivitásának (IR) változása krónikus artritiszben (átlag $\pm$ SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. bazális; + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$  vs. CFA-kezelt; Mann-Whitney U-teszt).

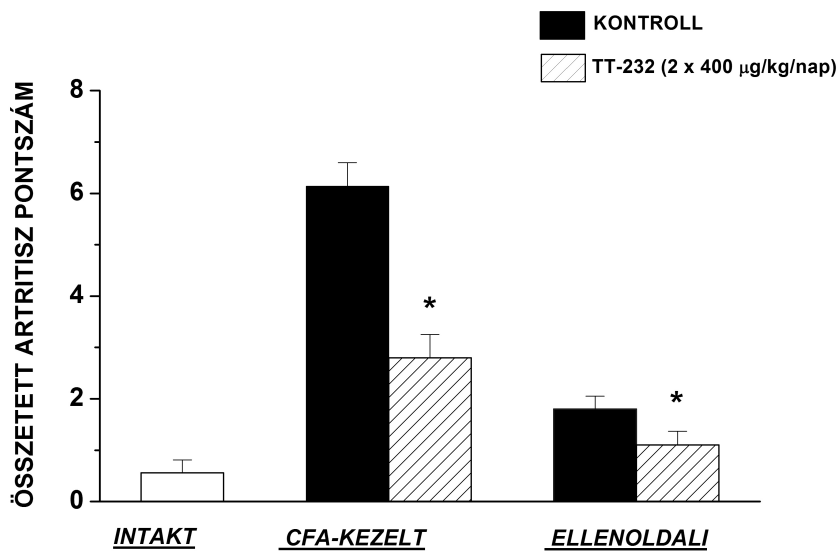
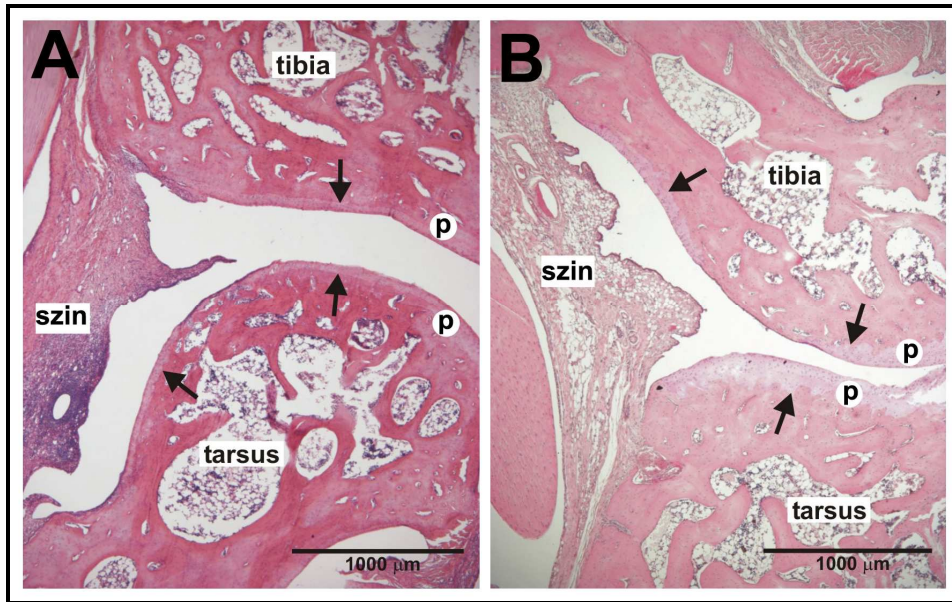
### **E. TT-232-kezelés hatása a CFA-val kiváltott lábduzzadásra, a gyulladásoos mechanikai allodiniára és az izületi szövetteni elváltozásokra**

A TT-232 (2x50-400 µg/kg/nap i.p.) dóziszfüggő módon csökkentette a CFA-val kiváltott lábödémát, a legnagyobb dózis 50%-os gátlást okozott a CFA-val kezelt lábon (**21a. ábra**). A kontroll csoportban mért kb. 30%-os mechanikai allodiniát a nagyobb TT-232 dózisok kivédtek, sőt, meglepő módon küszöbemelkedést okoztak (**21b. ábra**). Az ellenoldalon a duzzadás és a hiperalgèzia teljesen megszűnt a napi kétszeri 200 és 400 µg/kg kezelés hatására, a 100 µg/kg is a legtöbb mérési pontban szignifikáns gátlást eredményezett.

A napi 2x400 µg/kg i.p. TT-232-vel kezelt patkányok tibiotarzális izülete jelentősen enyhébb gyulladásoos jeleket mutatott. A szinoviális duzzanat, a limfocita-akkumuláció és a porcdestrukció csökkent, csontkárosodás egyáltalán nem jött létre (**22 a-b. ábra**). Mindezt alátámasztja az összetett artritisz pontszám is, amely mindkét lábon szignifikánsan kisebb volt, mint az oldószerral kezelt kontroll csoportban (**22 c. ábra**). A kisebb dózisok is csökkent szinoviális megvastagodást és mononukleáris sejtes infiltrációt eredményeztek.



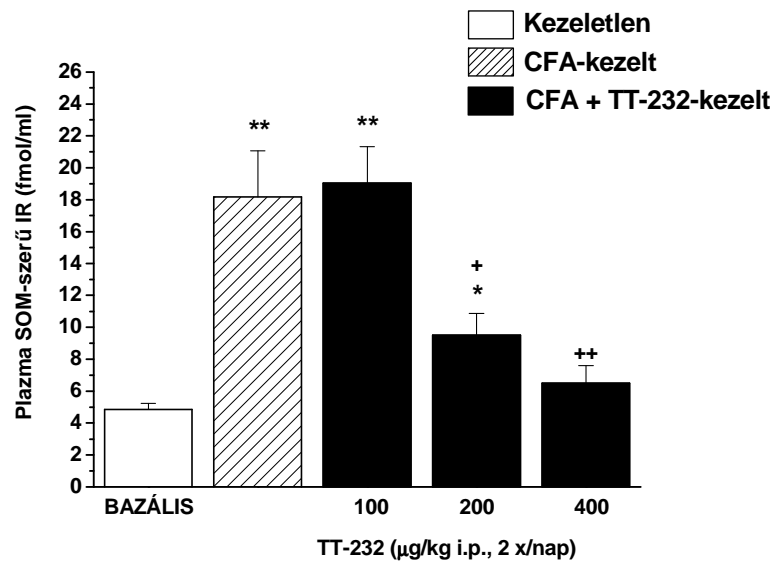
**21. ábra.** A TT-232 hatása a CFA-val kiváltott (A) lábduzzadásra és (B) gyulladósos mechanikai allodiniára a CFA-kezelt oldalon (átlag±SEM; \*p<0.05 vs. sst4<sup>+/+</sup> csoport).



**22. ábra.** (A) Oldószerrel és (B) napi 2x400 μg/kg i.p. TT-232-vel kezelt patkány gyulladt tibiotarzális ízületeinek szövettani képe 21 nappal az i.pl. és a faroktöbbe történő CFA-injekció után (HE festés, 200x-os nagyítás; [szin]: szinóvium, [p]: porc). (C) Szemikvantitatív szövettani értékelés (\* p<0.05, \*\*p<0.01 vs. oldószer).

### **F. TT-232-kezelés hatása a plazma szomatosztatin koncentrációjának emelkedésére**

A teljes kísérleti periódus alatt napi kétszer i.p. injektált TT-232 dózisfüggő módon gátolta a plazma szomatosztatin-szerű immunreaktivitásának CFA-val kiváltott emelkedését. A legnagyobb dózis a bazális értékre csökkentette a szomatosztatin koncentrációt (**23. ábra**).



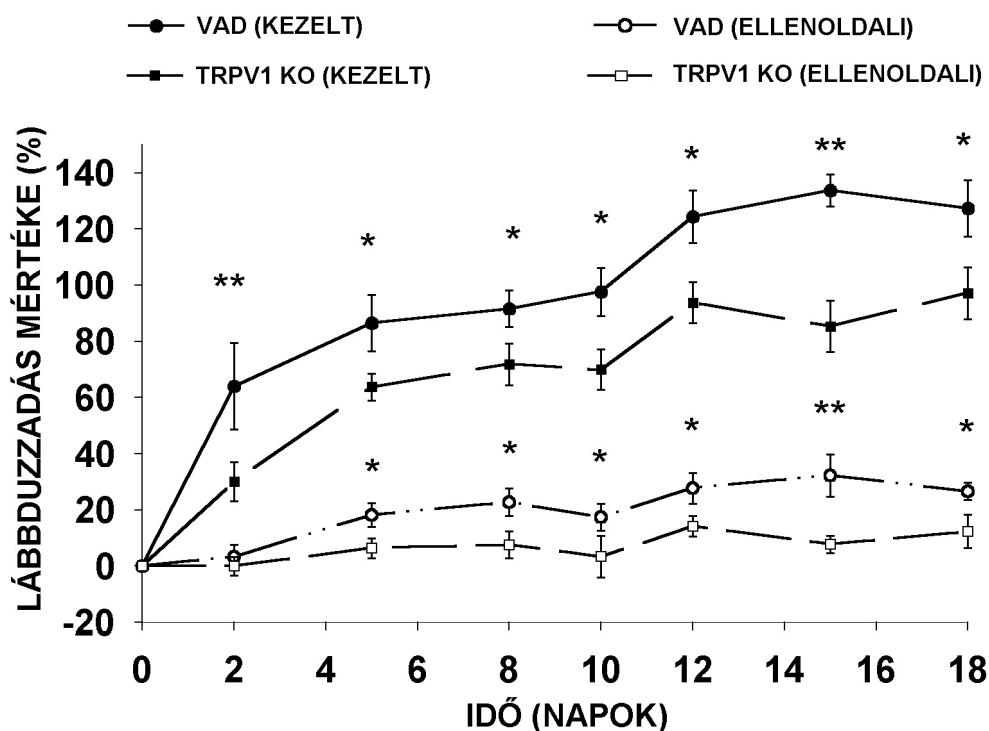
**23. ábra.** A plazma CFA-val kiváltott szomatosztatin-szerű immunreaktivitásának (SOM-IR) változása tartós TT-232-kezelés hatására (átlag±SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $< 0.01$  vs. kezeletlen csoport, + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$  vs. CFA-kezelt csoport).



## 3.2. A TRPV1 RECEPTOR SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA KRÓNIKUS ARTRITISZ EGÉRMODELLJÉBEN

### A. CFA-val kiváltott lábduzzadás, mechanikai hiperalgéria és szövettani elváltozások TRPV1<sup>+/+</sup> és TRPV1<sup>-/-</sup> egerekben

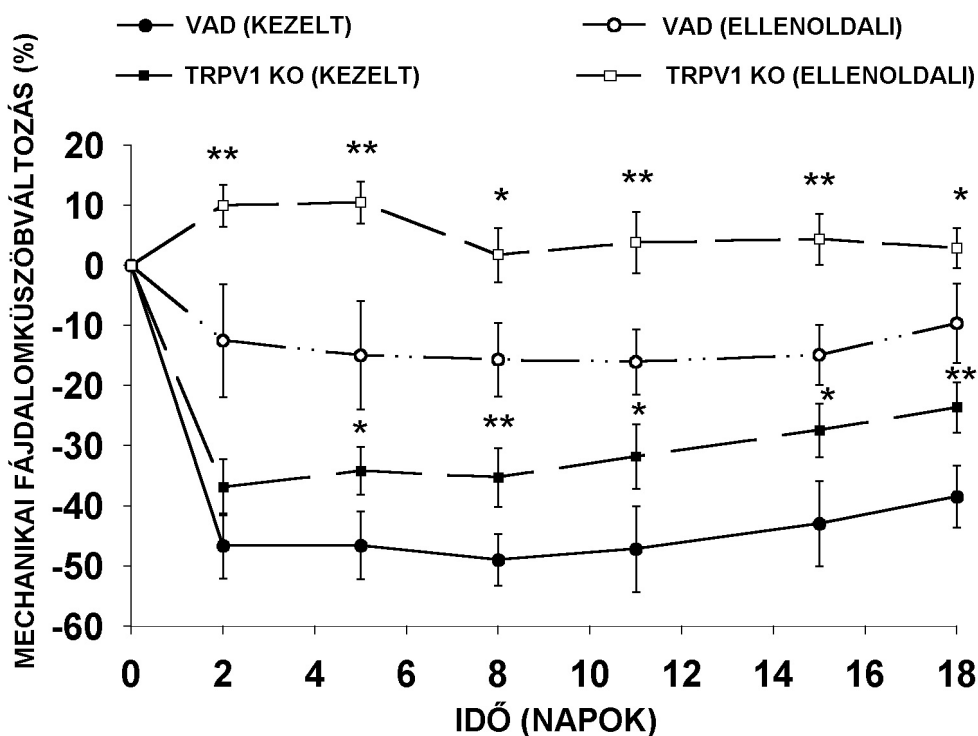
C57Bl/6 TRPV1<sup>+/+</sup> egerekben a kezelt oldalon a lábduzzadás folyamatosan növekedett, a 16. napon elérte a maximális duzzadást (130%-os duzzanat a kiindulási értékhez képest), az ellenoldali lábón kisebb ödéma alakult ki (30%). A TRPV1<sup>-/-</sup> egerek esetében mindkét oldalon az első mérési naptól kezdődően mindvégig szignifikánsan kisebb duzzadás alakult ki a teljes kísérleti periódus alatt (maximum 80%-os duzzanat a kezelt és 15% az ellenoldali lábón) (24. ábra).



24. ábra. CFA-val kiváltott lábduzzadás vad és TRPV1<sup>-/-</sup> egerekben (átlag±SEM; \*p<0.05, \*\*<0.01 vs. TRPV1<sup>+/+</sup> (vad) csoport).

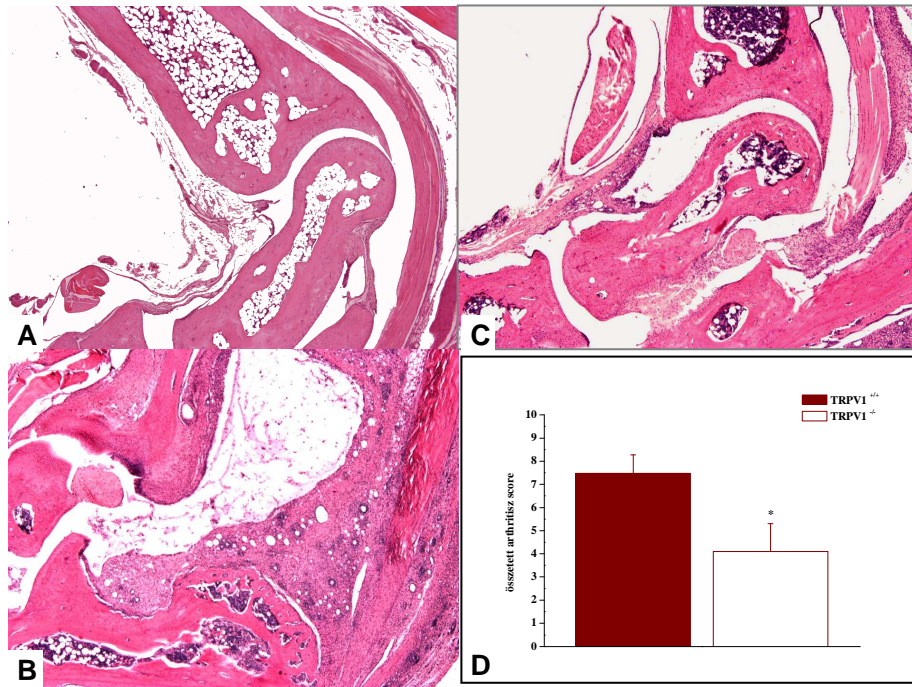
A mechanonociceptív küszöb a vad-típusú állatoknál a CFA-val kezelt lábón 45-50%-kal csökkent, míg az ellenoldalon csupán 10-15%-os hiperalgéria alakult ki. Ezzel szemben a TRPV1<sup>-/-</sup> egerek küszöbe csak 30-35%-os csökkenést mutatott a kezelt lábón, míg az ellenoldalon nem jött létre hiperalgéria (25. ábra).





**25. ábra.** CFA-val kiváltott mechanikai hiperalgázia mértéke vad és TRPV1<sup>-/-</sup> egerekben (átlag±SEM; \*p<0.05, \*\*<0.01 vs. TRPV1<sup>+/+</sup> (vad) csoport.)

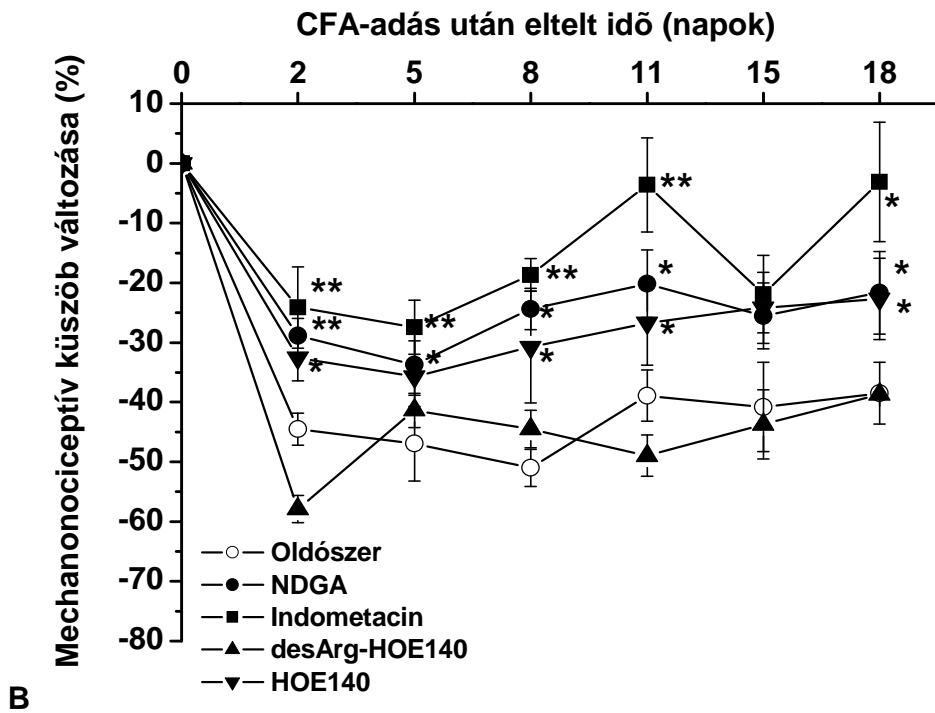
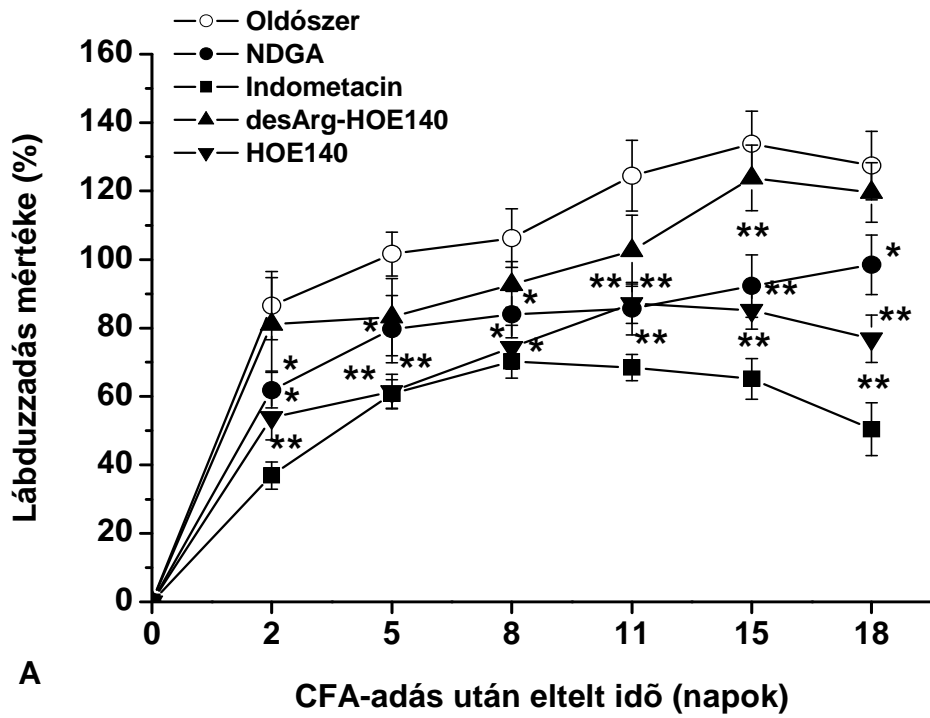
A szövettani metszeteken az ép ízületi szerkezettel (**26 a. ábra**) összehasonlítva a vad egerek CFA-val kezelt tibiotarzális ízületeiben nagymértékű szöveti károsodás és pannuszképződés figyelhető meg. Az ízületi üreg kiszélesedett, a szinoviális kötőszövet mononukleáris sejtekkel sűrűn infiltrált, a porcszövet nagymértékben lepusztult és jelentős csontdestrukció látható (**26 b. ábra**). A TRPV1<sup>-/-</sup> egerekben jelentősen kisebb mértékű porcdestrukció volt tapasztalható csontkárosodás nélkül, valamint a szinoviális szövet megvastagodása és mononukleáris sejtekkel történő infiltráltsága is valamivel enyhébb volt, ebből adódóan az összetett arthritisz pontszám szignifikánsan alacsonyabb volt a TRPV1 receptor génhiányos egércsoportban ( $7,8 \pm 1,1$  vs.  $4,6 \pm 1,2$ ) (**26 c-d. ábrák**).



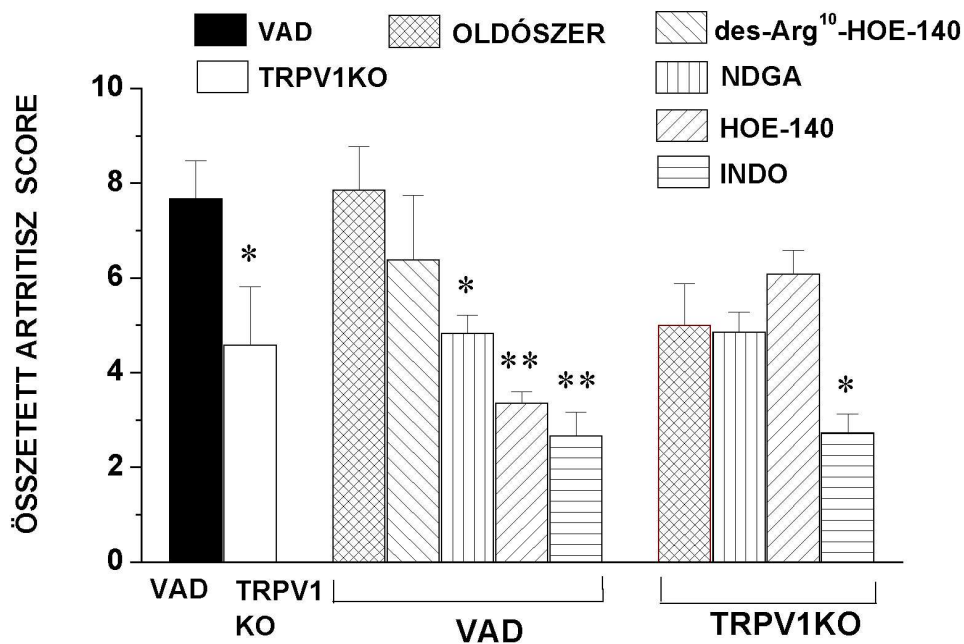
**26. ábra.** (A) Intakt és (B) CFA-val kezelt vad és (C) TRPV1<sup>-/-</sup> egerek bal (kezelt) tibiotarzális ízületeinek szövettani metszete (HE festés, 200x-os nagyítás) és (D) a szemikvantitatív pontozás (\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. vad).

**B. A desArgHOE-140, HOE-140, az NDGA és az indometacin hatása a CFA-val kiváltott lábduzzadásra, hiperalgéziára és szöveti elváltozásokra vad-típusú és TRPV1<sup>-/-</sup> egerekben**

Vad egerekben a bradykinin B<sub>1</sub> receptor antagonistája desArgHOE-140 nem volt szignifikáns hatással sem a CFA-indukált ödémára, sem a mechanikai hiperalgéziára, és nem befolyásolta jelentős mértékben az összetett artritisz pontszámot sem. A bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonistája HOE-140 ezzel szemben 30-40%-os gátlást okozott az ödémában és a hiperalgéziában is a teljes kísérleti periódus alatt, a szövettani összpontszámot pedig 55%-kal csökkentette. A nem-szelektív lipoxigenáz gátló NDGA 40-50%-os, míg a ciklooxygenáz-gátló indometacin 60-80%-os gátlást okozott a gyulladáshoz kapcsolódó hiperalgéziában. Az ödémát az NDGA 25-30%-kal, az indometacin 40-55%-kal csökkentette (**27 a-b.ábrák**), az artritisz pontszámot mindkét anyag szignifikánsan, 40%-kal és 65%-kal gátolta (**28. ábra**).

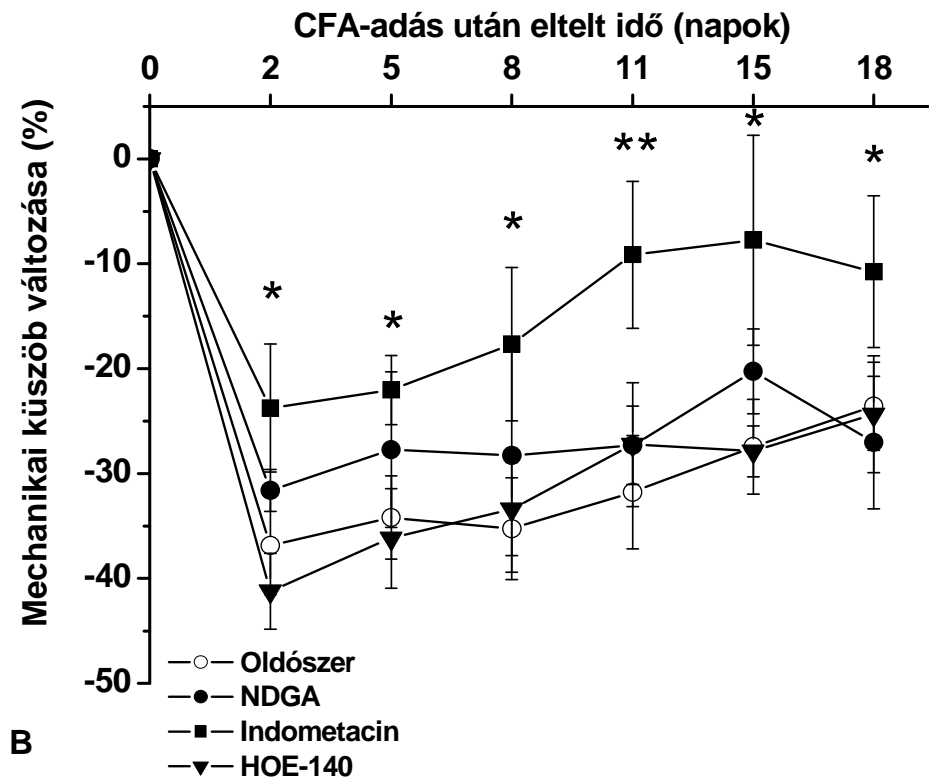
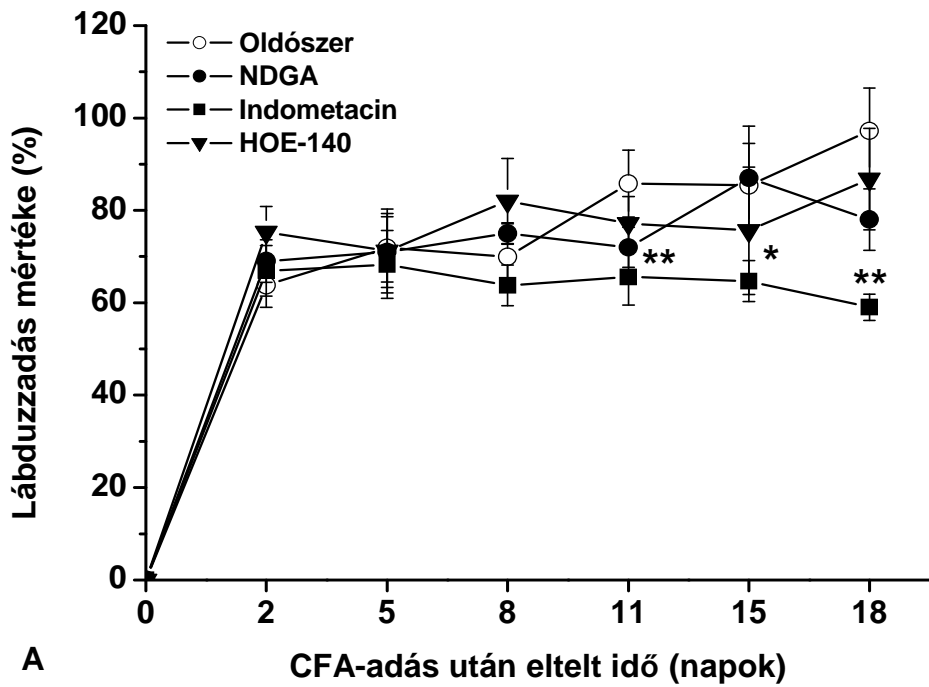


**27. ábra.** Lipoxigenáz- és ciklooxygenáz-gátló vegyületek, valamint bradykinin B<sub>1</sub> és B<sub>2</sub> receptor antagonisták hatása a CFA-val kiváltott (A) lábduzzadásra és (B) hiperalgéziára vad egerekben (átlag±SEM; \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. vad oldószerrel kezelt csoport).



**28. ábra.** A vizsgált anyagok hatása az összetett artritisz pontszámra egerekben (átlag±SEM; \*p<0.05, \*\*p<0.01)

A TRPV1<sup>-/-</sup> csoportban az NDGA és a HOE-140 nem befolyásolta egyik gyulladási tünetet sem. A bradykinin B1 receptor antagonist desArgHOE-140 kezelést elhagytuk a knockout csoportban miután a vad állatokban sem fejtett ki semmilyen statisztikailag mérhető hatást. Az indometacin viszont itt is 50-60%-kal csökkentette a hiperalgéziát, 20-30%-kal az ödémát. A vad állatokkal ellentétben az indometacin a TRPV1<sup>-/-</sup> egereknél nem csökkentette az ödémát a kezelés kezdeti szakaszában, az első jelentős gátlás a CFA-adást követő 11. napon (30.07%) volt megfigyelhető. Később mind a duzzadás gátló, mind az antihiperalgétiás hatások kisebbek voltak, mint a vad típusú csoportban (**29 a-b. ábrák**). Gyulladásos szövettani elváltozást nem tapasztaltunk TRPV1<sup>-/-</sup> egerekben az NDGA és a HOE-140 kezelt csoportokban az oldószerrel kezelt knockout egerekhez képest, míg az indometacin kezelés 40%-os összetett artritisz pontszám csökkenést eredményezett (**28. ábra**).



**29. ábra.** Lipoxigenáz- és ciklooxygenáz-gátló vegyületek, valamint bradykinin B<sub>1</sub> és B<sub>2</sub> receptor antagonisták hatása a CFA-val kiváltott (A) lábduzzadásra és (B) hiperalgéziára knockout egerekben (átlag±SEM; \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. vad oldószerrel kezelt csoport).

## **4. Megbeszélés, következtetések**

Krónikus arthritisz patkánymodelljében a szérum szomatosztatin szintjének mérésével közvetlen bizonyítékot szolgáltatunk, hogy a kapszaicin-érzékeny primér szenzoros neuronok gyulladásszerű stimulusokkal aktiválódó perifériás végződéseiből szomatosztatin szabadul fel (4 szerez koncentráció mérhető a kiindulási értékhez képest) és a szisztémás keringésbe jut. Heteken keresztül kimutatható a plazmában a többszörösére emelkedett szomatosztatin koncentráció (**20 ábra**), amely a kapszaicin-érzékeny afferensek RTX-előkezeléssel történő inaktivációja után nagymértékben csökken. Az RTX előkezelés mellett is fennmaradó 43%-os szomatosztatin szint emelkedés nem-neurális eredetű, valószínűleg az immunsejtekből, szinoviális sejtekből és/vagy az épen maradt szenzoros rostokból történő felszabadulásnak köszönhető. Krónikus arthritiszben valószínűleg a különböző gyulladáskeltő mediátorok aktiválják az ízületek kapszaicin-érzékeny afferensein lévő receptorokat, ioncsatornákat. Ennek következtében SOM szabadul fel, mely a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatást fejt ki. A felszabaduló SOM funkcionális jelentőségét, azaz szisztémás gyulladásgátló és antinociceptív hatását igazolja, hogy a nem-szelektív sst receptor antagonistá C-SOM-kezelés a krónikus arthritisz tüneteit az RTX-előkezeléshez hasonlóan súlyosbítja. Ezen eredményeink krónikus ízületi gyulladásban is bizonyítják tehát a kapszaicin-érzékeny afferensek protektív szerepét és a neurális eredetű SOM által közvetített endogén ellenregulációs mechanizmust.

Gyulladáscsökkentő hatásait valószínűleg (a) az afferens idegvégződésekből történő gyulladáskeltő neuropeptidok felszabadulásának gátlásán (Helyes és mtsai., 2001), (b) közvetlenül az érfali endothelsejteken a vazodilatáció és a plazmaprotein kiáramlás csökkentésén, valamint (c) a monocita/makrofág rendszer (Krantic 2000), a B- és T-limfociták proliferációjának, citokin és immunglobulin termelésének (Kolasinski és mtsai., 1992) gátlásán keresztül fejt ki. A SOM antihiperalgikus hatásában szerepet játszhat még az is, hogy gyulladásszerű körülmények között közvetlenül is gátolja a nociceptorok aktivációját és szenzitivizációját (Heppelmann és Pawlak 1997; Carlton és mtsai., 2001).

A SP és a CGRP jelenlétét a bokaízületben és a szinoviális folyadékban irodalmi adatok igazolják (Kar és mtsai., 1990). Gyulladás hatására e peptidok felszaporodnak az ízületben és a megfelelő hátsó gyöki ganglionban is (Ahmed és mtsai., 1995a). A legtöbb SP és CGRP a hátsó gyöki ganglionok B-típusú kis neuronjaiból eredő, vékonyan mielinizált A $\delta$  és mielinhüvely nélküli C-típusú rostjaiból származik (Gamse és mtsai., 1981) Ahmed és

munkatársai pedig beszámoltak arról, hogy a tibiotarzális ízület kémiai vagy sebészi denervációja után a CFA-val kiváltott SP- és CGRP-emelkedés elmarad (Ahmed és mtsai., 1995b). A szomatosztatint ugyancsak kimutatták a térdízület kapszaicin-érzékeny afferenseiben (Elhassan és mtsai., 1998), valamint ízületi koncentrációjának emelkedését is leírták artritiszben (Elhassan és mtsai., 2001). Amikor RTX-előkezeléssel a teljes szenzoros idegvégződést inaktíváljuk, akkor nyilvánvalóan nemcsak a SOM szisztémás felszabadulásának kiesésével kell számolnunk, hanem a lokálisan kiáramló gyulladáskeltő neuropeptidekével is. Bár krónikus artritiszben mind az antiinflammatorikus SOM, mind a proinflammatorikus SP és CGRP szerepet játszanak, eredményeink alapján ebben a modellben a szomatosztatinnak van nagyobb jelentősége. A korábban leírt akut neurogén gyulladást modellhező kísérletekhez hasonlóan (Szolcsányi és mtsai., 1998a,b; Pintér és mtsai., 2006) krónikus ízületi gyulladásban is igazoltuk, hogy a kapszaicin-érzékeny afferensekből SOM szabadul fel és a keringésbe jutva gátló hatásokat fejt ki.

Szomatosztatin kötőhelyet kimutattak az ízületben lévő szinoviális sejteken, limfocitákon és a szenzoros idegvégződéseken is (Carlton és mtsai., 2003). Az sst receptorok autoradiográfias vizsgálata igazolta e kötőhelyek felszaporodását reumatoid artritiszben és más immunológiai betegségekben (ten Bokum és mtsai., 1999 és 2000), azonban mindössze egy receptor altípusra vonatkozó irodalmi adat áll rendelkezésre. Az sst<sub>3</sub> és sst<sub>4</sub> receptorok számának jelentős növekedését találták az immunsejteken adjuváns artritiszes patkányokban (ten Bokum és mtsai., 1999). Eredményeinkkel összhangban más munkacsoportok is azt találták, hogy a szisztémás vagy intraartikuláris SOM-injekció az ízületi gyulladás azonnali mérséklődéséhez vezet mind a CFA-val kiváltott kísérletes artritiszben (Matucci-Cerinic és mtsai., 1995; Corsi és mtsai., 1997), mind reumatoid artritiszben szenvedő betegek esetén (Fioravanti és mtsai., 1995). Mindezek alapján a SOM ígéretes lehet a krónikus artritisz kezelésében, néhány perces plazma felezési ideje és mind az öt sst receptorhoz való kötődése következtében kifejtett széles mellékhatás-spektruma miatt azonban nem lehet potenciális gyógyszerjelölt. Stabil szintetikus szomatosztatin analógok, elsősorban nem-peptid származékok, amelyek gyulladáscsökkentő és analgetikus hatásokkal rendelkeznek, azonban a hormonszekréciókat gátló mellékhatásokkal nem, új antireumatikum-csoport kifejlesztésére is lehetőséget nyújthatnak.

Ezekre az eredményekre alapozva a továbbiakban az sst<sub>1</sub>/sst<sub>4</sub> receptor agonista, endokrin mellékhatásoktól mentes TT-232 hatását vizsgáltuk a krónikus ízületi gyulladás patkánymodelljében. A lábduzzadás kb. felére csökkent, a hiperalgécia pedig hipoalgéziává változott napi 2x400 µg/kg i.p. TT-232 hatására. Ezzel az analóggal kezelt állatokban a

gyulladásos szövettani elváltozások is számottevően mérséklődtek, csupán kismértékű pannuszképződés, gyulladásos sejtes infiltráció és minimális porckárosodás volt megfigyelhető, de csontszöveti pusztulás jelei egyáltalán nem mutatkoztak. A plazma SOM koncentrációjának emelkedését, melyet a krónikus gyulladás idézett elő, a TT-232-kezelés dózisfüggő módon csökkentette. Ennek magyarázata az lehet, hogy a gyulladásos folyamat exogén szomatosztatin agonistával történő gátlása csökkenti a szenzoros idegvégződések aktivációját, így az endogén ellenregulációs mechanizmus gyengülését eredményezi.

Második ízületi gyulladás vizsgálatára irányuló kísérletsorozatunkban az eredetileg Lewis patkányban kidolgozott CFA-indukálta krónikus artritisz modellt egérre adaptáltuk. Bizonyítottuk, hogy e modell jól működik ebben a fajban is, hiszen a CFA kezelés oldalán 130%-os lábduzzadást és 50%-os mechanikai ingerküszöb csökkenést (hiperalgéziát) tapasztaltunk a kezelés előtti értékekhez viszonyítva. Az irodalomban, egerekben széles körben használt krónikus ízületi gyulladás-modell, a kollagén-indukálta artritisz, nem működik C57BL/6 egértörzsben a törzsek közötti immunológiai eltérések miatt (Lariviere és mtsai., 2001). Mivel a TRPV1<sup>-/-</sup> egerek ezzel a háttérrel rendelkeznek, kísérleteinkhez szükség volt ebben a törzsben is létrehozható krónikus artritisz modell validálására.

A TRPV1<sup>-/-</sup> egércsoportokban vizsgálva a CFA-indukálta krónikus ízületi gyulladásos elváltozásokat és a következményes hiperalgéziát, egyértelműen megállapítható, hogy a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekre lokalizálódó TRPV1 receptor hiánya mind a kezelt, mind a kezeletlen oldalon jelentősen csökkentette ezeket a paramétereket.

Eredményeink szolgáltatták az első bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy a TRPV1 receptor fontos szabályozó szerepet játszik krónikus ízületi gyulladásban és mechanikai hiperalgéziában is. Ezt az eredményt alátámasztják Carlton és Coggeshall adatai, akik patkányban CFA-val kiváltott krónikus gyulladás során a TRPV1 receptorok számának nagymértékű növekedését találták a velőshüvely nélküli idegrostokon (Carlton és Coggeshall, 2001). A TRPV1 receptor aktivációja során felszabaduló neuropeptidek eredően fokozzák a krónikus ízületi gyulladás súlyosságát.

A CFA hatására képződő gyulladásos szövetekben nagy mennyiségben termelődő mediátorok (pl. bradykinin, prosztaglandinok, lipoxigenáz termékek, hisztamin, protonok, nerve growth factor (NGF) stb. (Ferrel és Lam, 1996)) által aktivált TRPV1 receptorok P-anyag és CGRP felszabadulásán keresztül tovább aktiválják a krónikus gyulladásos folyamatot. Ezek a gyulladásokeltő neuropeptidek fokozzák a plazma protein kiáramlást, értágulatot, valamint a gyulladásos sejtek stimulációját és citokinek felszabadulását (Levite



és Chowers, 2001). Serkentik továbbá a monociták TNF- $\alpha$  termelését (Brunelleschi és mtsai., 1998), a makrofágokban az IL-1 képződést, és a gyulladós és kötőszöveti sejtek adhézióját (Lambert és mtsai., 1998). Krónikus gyulladás során e neuropeptidek tehát közvetítő szerepet játszanak az immun- és idegrendszer között (Lambert és mtsai., 1998).

A kísérlet második részében azt vizsgáltuk, hogy a TRPV1 receptort potenciálisan aktiváló gyulladós mediátorok közül melyeknek van leginkább szerepe a krónikus ízületi gyulladás tüneteinek ezúton való súlyosbításában. Előzetes irodalmi adatok tanulmányozása alapján a gyulladásban felszabaduló bradykinin, lipoxigenáz és ciklooxygenáz enzimtermékek hatásait vizsgáltuk. Fontos hangsúlyozni, hogy nem arra voltunk kíváncsiak, hogy melyik gyulladós mediátor kiiktatása csökkenti legnagyobb mértékben a vizsgált tüneteket, hanem, hogy a szer vad csoportban kiváltott gyulladás és fájdalomcsökkentő hatásához hogyan viszonyul a knockout állatokban kiváltott tüneteket enyhítő hatása.

A lipoxigenáz enzim gátló nordihidroguarénsavval (NDGA) kezelt vad-típusú állatoknál szignifikáns csökkenés alakult ki az ízületi gyulladás és fájdalomküszöb tekintetében már a 2. naptól (30-40%-al csökkentette a kialakuló ödéma illetve 20%-al a hiperalgémia értékét). Ezzel szemben a TRPV1 KO egereknél azonban a gyulladáscsökkentő és antinociceptív hatás szinte teljesen hiányzott. Sejttenyészetekből származó *in vitro* adatok ezzel az eredménnyel összhangban igazolták, hogy a lipoxigenáz enzim termékei, mint például a 12-(S)-HPETE, a TRPV1 receptor citoszolikus részét aktiválják, amely arra enged következtetni, hogy ezen lipidek lehetnek e receptornak természetes ligandjai (Hwang és mtsai., 2000). Jelen *in vivo* funkcionális eredményeink alátámasztják ezt a feltevést krónikus ízületi gyulladás egérmodelljében.

Vad típusú állatok esetében a bradykinin B2 receptor antagonistája HOE-140-nel naponta történő kezelés gátolta az ödéma és a mechanikai hiperalgémia kialakulását, de a TRPV1 receptor KO egerek esetében nem váltotta ki ugyanezt a hatást. Ezek a megfigyelések összhangban az *in vitro* irodalmi adatokkal azt mutatják, hogy az ízületi gyulladás során felszabaduló bradykinin B2 receptorokon hatva szenzitizálja a perifériás szenzoros idegvégződéseken lévő TRPV1 receptorokat (Shin és mtsai., 2002). Több irodalmi adat is alátámasztja, hogy ez a receptor altípus szerepet játszik a TRPV1 receptor PKC által történő foszforilációjában és következményes szenzitizációjában (Sugiura és mtsai., 2002). Ismert továbbá, hogy a bradykinin B2 receptor felhalmozódik ízületi betegségekben, humán mintákban (Cassim és mtsai., 1997)

A bradykinin B1 receptor antagonistája desArgHOE-140-nel való napi kezelés nem okozott statisztikailag szignifikáns gátlást a vad csoportban sem az ödéma kialakulásában, a

szöveti változásokban sem a hiperalgégiában. Ezért levonhatjuk azt a következtetést, hogy a B1 receptorok nem játszanak jelentős krónikus ízületi gyulladási körülmények között egérmódelben.

A ciklooxygenáz enzim gátló indometacin jelentősen csökkentette (a vizsgált anyagok közül a legnagyobb mértékben) az ízületi gyulladást és a vele járó hiperalgégiát mind a vad típusú, mind a TRPV1 KO egereknél az oldószerrel kezelt csoporthoz viszonyítva, de a gátlás mértéke kisebb volt a TRPV1 receptor génhiányos egerek esetében, különösen a krónikus gyulladás kezdeti fázisában. Nagy mennyiségű adat áll rendelkezésre a prosztaglandinok ízületi gyulladásban betöltött szerepével kapcsolatban, megnövekedett mennyiségű prosztaglandin és tromboxán  $A_2$  termelődése volt mérhető a gyulladt ízületek ízületi folyadékában (Sabata és mtsai., 1986). A prosztaglandin szintet csökkentő nem-szteroid típusú gyulladásgátló hatóanyagok gátolják az értágulást, a plazma protein kiáramlást és a leukocita funkciókat, elsősorban a Th1 és kisebb mértékben a Th2 limfociták által közvetített immunválaszokat (Botting, 1999). Másrészt, a prosztaglandin  $E_2$  és  $I_2$  közvetlenül szenzitizálja a kapszaicin-érzékeny nociceptorokat, továbbá magas koncentrációban közvetlenül kiváltják a P-anyag és a CGRP felszabadulását ezekből a neuronokból (Hingtgen és Vasko, 1994). Jelen eredményeink alapján elmondható, hogy a gyulladt szövetből felszabaduló prosztaglandinok a TRPV1 receptor aktiválásán/szenzitizálásán keresztül is hozzájárulnak a gyulladásos ödéma fokozódásához.

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekre lokalizálódó TRPV1 receptor hiánya tehát a teljes idegvégződés inaktiválásával ellentétben nem fokozta, hanem jelentősen csökkentette a krónikus ízületi gyulladást és a következményes hiperalgégiát. Ennek a látszólagos ellentmondásnak a magyarázata lehet az, hogy az ízületi afferensekből a gyulladáskeltő tachikinin és CGRP, valamint a gyulladásgátló szomatosztatin más receptorok/ioncsatornák aktivációjával szabadulnak fel. A gyulladáskeltő neuropeptidek felszabadulása valószínűleg elsősorban a TRPV1 receptor aktivációja következtében történik. E folyamatok hiánya TRPV1<sup>-/-</sup> egerekben jelentősen gátolja a gyulladást és következményes hiperalgégiát. A SOM felszabadulásában ezzel szemben eredményeink alapján valószínűleg más mechanizmusok játszanak szerepet. Ezt az elképzelést alátámasztja az a tény, hogy e szenzoros neuropeptidek csak részben lokalizáltak fordulnak elő a kapszaicin-érzékeny afferensekben (Höckfelt és mtsai., 1976), a szomatosztatin tartalmú végződésekben lehetséges, hogy nem a TRPV1, hanem pl. TRPA1, bradykinin receptorok, purinoceptorok stb. expressziója dominál.

A krónikus artritisz kialakulásában jelentős szerepet játszó neurogén gyulladásos komponens egyetlen jelenleg forgalomban lévő gyógyszer csoport sem tudja megbízhatóan és hatékonyan

gátolni. Régóta folynak vizsgálatok az ismert nem-szteroid gyulladásgátlókkal, sőt az újabb szelektív ciklooxygenáz-2 gátlókkal (pl. coxibok) kapcsolatban, amelyek a kezdeti elvárások ellenére nem hoztak terápiás áttörést. A szteroidok csak olyan nagy dózisban képesek gátló hatást kifejteni a neurogén gyulladási folyamatokra, amelyben a számos mellékhatás veszélye miatt nem lehet tartós alkalmazásukkal számolni. Az utóbbi években a reumatoid arthritis kezelésében a gyulladás sejtes komponenseire ható erélyes immunszuppresszív és citosztatikus hatású szerek, valamint a biológiai terápiás lehetőségek (TNF- $\alpha$  ellenes monoklonális antitest, szolubilis receptor) is bekerültek kezelési lehetőségek közé, a súlyos mellékhatások és a toxicitás azonban gátat szab alkalmazhatóságuknak (Bingham 2008). Rendkívül nagy szükség van ezért új mechanizmussal ható gyulladásgátló/fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztésére, melyek lokálisan és/vagy szisztémásan is alkalmazhatók. Eredményeink alapján két célmolekulát is azonosítottunk, a TRPV1 ioncsatornát, valamint a szomatosztatin sst<sub>4</sub>/sst<sub>1</sub> receptort. Szelektív TRPV1 antagonisták, illetve sst<sub>4</sub>/sst<sub>1</sub> agonista vegyületek új perspektívákat jelenthetnek a krónikus ízületi gyulladás farmakoterápiájában.

## ÚJ EREDMÉNYEINK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Kísérleteink eredményeképp kijelenthetjük, hogy a TRPV1 receptor és a CGRP jelenléte egyértelmű protektív szerepet tölt be a szkleroderma patomechanizmusában. CGRP receptor agonisták pedig terápiás lehetőséget jelenthetnek a szkleroderma kezelésében a jövőben, de természetesen a lehetséges mellékhatásokkal is számolni kell.

2. Elsőként bizonyítottuk, hogy a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések krónikus ízületi gyulladásban protektív szerepet játszanak a belőlük felszabaduló és keringésbe jutó szomatosztatin közvetítésével.

3. A stabil, szintetikus heptapeptid sst<sub>4</sub>/sst<sub>1</sub> receptor agonista TT-232 hatékonyan gátolja a krónikus ízületi gyulladást (duzzadást és szövettani károsodást egyaránt), valamint a gyulladásos mechanikai allodiniát, ezért ígéretes új perspektívát jelenthet gyógyszerfejlesztési szempontból is.

4. Bizonyítékokat szolgáltatunk, hogy a kapszaicin-érzékeny afferenseken expresszáldó TRPV1 ioncsatorna elősorban bradykininnel és prosztaglandinokkal történő szenzitizációja és lipoxigenáz-termékekkel történő aktivációja következményeképpen -az idegvégződés egészével ellentétben- fokozza a krónikus ízületi gyulladást és allodiniát. Ennek alapján szelektív TRPV1 receptor antagonisták ugyancsak hatékony, új farmakoterápiás lehetőséget nyújthatnak artritisz kezelésére.

## **IRODALOMJEGYZÉK**

- Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol* 2005;26: 587-95.
- Adamson IVR, Bowden DH. The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 1974;77: 185-98.
- Ahmed M, Bjurholm A, Schultzberg M, Theodorsson E, Kreicbergs A. Increased levels of substance P and CGRP in rat adjuvant arthritis. A combined immunohistochemical radioimmunoassay analysis. *Arthritis Rheum.* 1995a;38: 699-709.
- Ahmed M, Srinivasan GR, Theodorsson E, Schultzberg M, Kreicbergs A. Effects of surgical denervation on substance P and calcitonin gene-related peptide in adjuvant arthritis. *Peptides* 1995b;16: 569-579.
- Asano Y. Future treatments in systemic sclerosis. *J. Dermatol.* 2010;37: 54-70.
- Banvolgyi A, Palinkas L, Berki T, Clark N, Grant AD, Helyes Z, Pozsgai G, Szolcsanyi J, Brain SD, Pinter E. Evidence for a novel protective role of the vanilloid TRPV1 receptor in a cutaneous contact allergic dermatitis model. *J. Neuroimmunol.* 2005;169:86-96.
- Barnes PJ. Neurogenic inflammation in airways and its modulation. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1990; 303: 67-82.
- Barnes PJ. Potential novel therapies for chronic obstructive pulmonary disease. *Novartis Found. Symp.* 2001;234: 255-267.
- Barthó L, Szolcsányi J. Opiate agonists inhibit neurogenic plasma extravasation in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 1981;73: 101-104.
- Bertrand C, Geppetti P, Baker J, Yamawaki I, Nadel JA. Role of neurogenic inflammation in antigen-induced vascular extravasation in guinea pig trachea. *J Immunol.* 1993;150:1479-1485.
- Bevan S, Szolcsányi J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol. Sci.* 1990;11: 330-333.
- Bileviciute I, Lundberg T, Ekblom A, Theodorsson E. Bilateral changes of substance P-, neurokinin A-, calcitonin gene-related peptide- and neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat knee joint synovial fluid during acute monoarthritis. *Neurosci. Lett.* 1993;153: 37-44.
- Bingham CO. Emerging therapeutics for rheumatoid arthritis. *Bull. NY Hosp. Jt. Disp.* 2008;66: 210-215.
- Botting JH. Nonsteroidal antiinflammatory agents. *Drugs Today (Barc.)* 1999;35: 225-235.

Bölcseki K, Helyes Zs, Szabó Á, Sándor K, Elekes K, Németh J, Almasi R, Pintér E, Pethő G, Szolcsányi J. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 2005;117: 368-76.

Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HJ, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 1985;313: 54-6.

Brazeau P. Somatostatin: a peptide with unexpected physiologic activities. *Am. J. Med.* 1986;81: 8-13.

Brunelleschelli S, Bordin G, Colangelo D, Viano I. Tachykinin receptors on human monocytes: their involvement in rheumatoid arthritis. *Neuropeptides* 1998;32: 215-223.

Bryant HU, Bernton EW, Holaday JW. Immunomodulatory effects of chronic morphine treatment: pharmacologic and mechanistic studies. *NIDA Res. Monogr.* 1990;96: 131-149.

Bunker CB, Terenghi G, Springall DR, Polak JM, Dowd PM. Deficiency of calcitonin gene-related peptide in Raynaud's phenomenon. *Lancet* 1990;336: 1530-3.

Bunker CB, Goldsmith PC, Leslie TA, Hayes N, Foreman JC, Dowd PM. Calcitonin gene-related peptide, endothelin-1, the cutaneous microvasculature and Raynaud's phenomenon. *Br J. Dermatol.* 1996;134: 339-406.

Buzzi MG, Moskowitz MA. The antimigraine drug, sumatriptan (GR43175), selectively blocks neurogenic plasma extravasation from blood vessels in dura mater. *Br J Pharmacol* 1990;99: 202-6.

Cao T, Gerard NP, Brain SD. Use of NK1 knockout mice to analyze substance P-induced edema formation. *Am. J. Physiol.* 1999;277: 476-481.

Cao T, Pintér E, Al-Rashed S, Gerard NP, Houlst R, Brain S. Neurokinin-1 receptor agonists are involved in mediating neutrophil accumulation in the inflamed, but not normal, cutaneous microvasculature: an in vivo study using neurokinin-1 receptor knockout mice. *J. Immunol.* 2000;164: 5424-5429.

Carlton SM, Coggeshall RE. Peripheral capsaicin receptors increase in the inflamed rat hindpaw: a possible mechanism for peripheral sensitization. *Neurosci.Lett.* 2001;310: 210-223.

Carlton SM, Du J, Davidson E, Zhou S, Coggeshall RE. Somatostatin receptors on peripheral primary afferent terminals: inhibition of sensitized nociceptors. *Pain* 2001;90: 233-244

Carlton SM, Zhou S, Kraemer B, Coggeshall RE. A role for peripheral somatostatin receptors in counter-irritation-induced analgesia. *Neuroscience* 2003;120: 499-508.

Cassim B, Naidoo S, Ramsaroop R, Bhoola KD: Immunolocalization of bradykinin receptors on human synovial tissue. *Immunopharmacology* 1997;36: 121-125.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389: 816-824.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000;288: 306-313.

Chacur M, Picolo G, Gutierrez JM, Teixeira CF, Cury Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 2001;39: 1173-1181.

Chan ES, Fernandez P, Merchant AA, Montesinos MC, Trzaska S, Desai A, Tung CF, Khoa DM, Pillinger MH, Reiss AB, Tomic-Canic M, Chen JF, Schwarzschild MA, Cronstein BN. Adenosine A2A receptors in diffuse dermal fibrosis: pathogenic role in human dermal fibroblasts and in a murine model of scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2006;54: 2632-42.

Christner PJ, Peters J, Hawkins D, Siracusa LD, Jiménez SA. The tight skin 2 mouse. An animal model of scleroderma displaying cutaneous fibrosis and mononuclear cell infiltration. *Arthritis Rheum.* 1995;38: 1791-1798.

Chrubasik J, Meynadier J, Scherpereel P, Wunsch E. The effect of epidural somatostatin on postoperative pain. *Anesth. Analg.* 1985;64: 1085-1088.

Cooke JP, Marshall JM. Mechanisms of Raynaud's disease. *Vasc Med* 2005;10:293-307.

Corsi MM, Ticozzi C, Netti C, Fulgenzi A, Tiengo M, Gaja G, Guidobono F, Ferrero ME. The effect of somatostatin on experimental inflammation in rats. *Anesth. Analg.* 1997;85: 1112-1115.

Czirják L. A kötőszöveti betegségek (szisztémás autoimmun kórképek) diagnosztikájának és kezelésének gyakorlati vonatkozásai. Pécs 2003; 92-108.

Czirják L, Kiss CG, Lövei C, Süto G, Varjú C, Füzesi Z, Illés T, Nagy Z. Survey of Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis based on a representative study of 10,000 south-Transdanubian Hungarian inhabitants. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23: 801-8.

Dalsgaard CJ, Jembeck J, Stains W, Kjøatansson J, Haegerstrand A, Hokfelt T, Brodin E, Cuello AC, Brown IC. Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in nerve fibers in the human skin. Relation to fibers containing substance P-, somatostatin- and vasocactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity. *Histochemistry* 1989;91: 35-8.

Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper A, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 2000;405: 183-187.

Delgado M, Leceta J, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. *J. Leukoc. Biol.* 2003;73: 155-164.

Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2:134-44.

De Swert KO, Joos GF. Extending the understanding of sensory neuropeptides. *Eur. J. Pharmacol.* 2006;533: 171-181.

Dickinson T, Mitchell R, Robberecht P, Fleetwood-Walker SM. The role of VIP/PACAP receptor subtypes in spinal somatosensory processing in rats with an experimental peripheral mononeuropathy. *Neuropharmacology* 1999;38: 167-180.

Distler JHW, Jungel A, Huber LC, Schulze-Horsel U, Zwerina J, Gay RE, Michel BA, Hauser T, Schett G, Gay S, Distler O. Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arth. Rheum.* 2007;56: 311-22.

Elhassan AM, Adem A, Hultenby K, Lindgren JU. Somatostatin immunoreactivity in bone and joint tissues. *Neuroreport* 1998;9: 2573-75.

Elhassan AM, Lindgren JU, Hultenby K, Adem A. Increased levels of somatostatin in rat ankles with adjuvant arthritis. *Rheum. Int.* 2001;20: 186-91.

Feldmann M, Brennan FM, Foxwell BM, Taylor PC, Williams RO, Maini RN. Anti-TNF therapy: where have we got to in 2005? *J. Autoimmun.* 2005;25: 26-28.

Fernihough J, Gentry C, Bevan S, Winter J. Regulation of calcitonin gene-related peptide and TRPV1 in a rat model of osteoarthritis. *Neurosci. Lett.* 2005;388:75-80.

Ferreira J, Campos MM, Pesquero JB, Araujo RC, Bader M, Calixto JB. Evidence for the participation of kinins in Freud's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 2001;41: 1006-1012.

Ferrel WR, Lam FY. Sensory neuropeptides in arthritis. In: *Neurogenic Inflammation* (eds: Geppetti P, Holzer P), 1996; pp. 211-27, CRC Press, Boca Raton.

Finch WR, Rodnan GP, Buckingham RB, Prince RK, Winkelstein A. Bleomycin-induced scleroderma. *J. Rheumatol.* 1980;7: 651-9.

Fioravanti A, Govoni M, La Montagna G, Perpignano G, Tirri G, Trotta F, Bogliolo A, Ciocci A, Mauceri MT, Marcolongo R. Somatostatin 14 and joint inflammation: evidence for intraarticular efficacy of prolonged administration in rheumatoid arthritis. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1995;21: 97-103.

Fleischmajer R., Perlish J.S., Reeves J.R.T. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis Rheum.* 1977; 20: 975-84.

Fürst Zs. *Farmakológia. Medicina*, Budapest, 2001; 1073-1074.

Gauldie SD, McQueen DS, Pertwee R, Chessell IP. Anandamide activates peripheral nociceptors in normal and arthritic rat knee joints. *Br. J. Pharmacol.* 2001; 132: 617-621.

Gauldie SD, McQueen DS, Clarke CJ, Chessell IP. A robust model of adjuvant-induced chronic unilateral arthritis in two mouse strains. *J. Neurosci. Methods* 2004;139: 281-291.



Gerschwin M.E., Abplanalp H., and Castles JJ. Characterization of spontaneous disease of white leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis. *J. Exp. Med.* 1981;153: 1640-1659.

Gottschall PE, Tatsuno I, Miyata A, Arimura A. Characterization and distribution of binding sites for the hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocrinology* 1990;127: 272-277.

Grant A. Leukocytes and neurogenic inflammation. *Inflammopharmacology* 2002;9: 403-420.

Grollman AP, Takeshita M, Pillai KM, Johnson F. Origin and cytotoxic properties of base proenkephalins derived from DNA. *Cancer Res.* 1985;45: 1127-31.

Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002;23: 183-191.

Gunthorpe MJ, Chizh BA. Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway. *Drug Discovery Today* 2009;14: 56-67.

Gutwald J, Goebeler M, Sorg CJ. Neuropeptides enhance irritant and allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 1991;96: 695-8.

Hamelink C, Tjurmina O, Damadzic R, Young WS, Weihe E, Lee HW, Eiden LE. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99: 461-466.

Han SP, Naes L, Westfall TC. Calcitonin gene-related peptide is the endogenous mediator of nonadrenergic-noncholinergic vasodilation in rat mesentery. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1990;255: 423-428.

Harris ED. Prednisolone in early rheumatoid arthritis: an antiinvasive effect. *Arthritis Rheum.* 2005;52: 3324-3325.

Hasegawa M. B lymphocytes: shedding new light on the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermatol.* 2010;37: 3-10.

Hatamochi A., Ueki H., Mauch C., Krieg T. Effect of histamine of collagen and non-collagen mRNA production in human skin fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 1991;2: 407-12.

Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MH, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Gloger IS, Davis JB. Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* 2000;88: 205-215.

Helyes Zs, Thán M, Oroszi G, Pintér E, Németh J, Kéri Gy, Szolcsányi J. Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogues in the rat. *Neurosci. Lett.* 2000;278: 185-188.

- Helyes Zs, Pintér E, Németh J, Kéri Gy, Thán M, Oroszi G, Horváth A, Szolcsányi J. Anti-inflammatory effect of synthetic somatostatin analogues in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 2001;134: 1571-1579.
- Helyes Zs, Pintér E, Németh J, Szolcsányi J. Pharmacological targets for the inhibition of neurogenic inflammation. *Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents in Curr. Med. Chem.* 2003;2: 191-218.
- Helyes Zs, Pintér E, Szolcsányi J. TT-232. Somatostatin sst1/sst4 Agonist. Treatment of Neuropathic Pain. Treatment of Inflammation. *Drugs Future* 2005;30(6): 558
- Heppelmann B, Pawlak M. Inhibitory effect of somatostatin on the mechanosensitivity of articular afferents in normal and inflamed knee joints of the rat. *Pain* 1997;73: 377-82.
- Herold G., Erdmann D., Gross J., Löffler K., Oette M.A. *Belgyógyászat. B+V (medical & technical)*, Köln, 2000; 566-568.
- Hingtgen CM, Vasko MR. Prostacyclin enhances the evoked-release of substance P and calcitonin gene-related peptide from rat sensory neurons. *Brain Res.* 1994;655: 51-60.
- Hofland LJ, Lamberts SW. Somatostatin receptors and disease: role of receptor subtypes. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 1996;10: 163-176.
- Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins and other neuropeptides. *Neuroscience* 1988;86: 389-98.
- Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.* 1991;43: 143-201.
- Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 1995;16: 86-88.
- Hőgyes A. Beitrage zur physiologischen Wirkung der Bestandteile des Capsicum annum. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 1878;9: 117-130.
- Hökfelt T, Elde R, Johansson O, Luft R, Nilsson G, Arimura A. Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat. *Neuroscience* 1976;1: 131-136.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Gepetti P, Walker JM, Di Marzo V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99: 8400-8405.
- Hwang SW, Cho H, Kwak JY, Lee SY, Kang CJ, Jung JY, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000;97: 6155-6160.

Jancsó N. Role of nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. *Bull. Millard Fillmore Hosp. Buffalo N.Y.* 1960;7: 53-77.

Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 1967;31: 138-151.

Jessell TM, Iversen LL, Cuello AC. Capsaicin-induced depletion of substance P from primary sensory neurones. *Brain Res.* 1978;152: 183-188.

Jimenez SA, Christner PJ. Murine animal models of systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2002;14: 671-80.

Joe B, Wilder RL. Animal models of rheumatoid arthritis. *Mol. Med. Today* 1999;5: 367-369.

Jorgenson C, Sany J. Modulation of the immune response by the neuro-endocrine axis in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1994;12: 435-41.

Kagari T, Doi H, Shimoizato T. The importance of IL-1 beta and TNF-alpha, and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *J. Immunol.* 2002;169: 1459-1466.

Kar S, Gibson SJ, Rees RG, Jura WGZO, Brewerton DA, Polak JM. Increased calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P, and enkephalin immunoreactivities in dorsal spinal cord and loss of CGRP-immunoreactive motor neurons in arthritic rats depend on intact peripheral nerve supply. *J. Mol. Neurosci.* 1990;3: 7-18.

Karalis K, Mastokaros G, Chrousos GP, Tolis G. Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo. *J. Clin. Invest.* 1994;93: 2000-6.

Katsuri K.N., Shibata S., Muryoi T., and Bona C.A. Tight-skin mouse. An experimental model for scleroderma. *Intern. Rev. Immunol.* 1994;11: 253-271.

Kéri Gy, Érchegeyi J, Horváth A, Mező I, Idei M, Vántus T, Balogh Á, Vadász Zs, Bökönyi Gy, Sepródi J, Teplán I, Csuka O, Tejada M, Gaál D, Szegedi Zs, Szende B, Roze C, Kalthoff H, Ullrich A. A tumor-selective somatostatin analog (TT-232) with strong in vitro and in vivo antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93: 12513-12518.

Kolasinski SL, Haines KA, Siegel EL, Cronstein BN, Abramson SB. Neuropeptides and inflammation. A somatostatin analog as a selective antagonist of neutrophil activation by substance P. *Arthritis Rheum.* 1992;35: 369-375.

Komocsi A, Tovari E, Kovacs J, Czirjak L. Physical injury as provoking factor in three patients with scleroderma. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2000;18: 622-24.

Krantic S. Peptides as regulators of the immune system: emphasis on somatostatin. *Peptides* 2000;21: 1941-1964.

Krieg T, Meurer M. Systemic scleroderma. Clinical and pathophysiologic aspect. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1988;18: 457-81.

Krulich L, Dhariwal AP, McCann SM. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology* 1968;83: 783-790.

Kumar V., Cotran R.S., and Robbins S.L. *A pathologia alapjai*. 1997; Medicina, Budapest, 150-153.

Lam FY, Ferrel WR. Neurogenic component of different models of acute inflammation in the rat knee joint. *Ann. Rheum. Dis.* 1991;50: 747-54.

Lambert N, Lescoulie PL, Yassine-Diab B, Enault G, Mazieres B, De Preval C, Cantagrel A. Substance P enhances cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression on cultured rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clin.Exp.Immunol.* 1998;113: 269-275.

Lariviere WR, Chesler EJ, Mogil JS. Transgenic studies of pain and analgesia: mutation of background genotype? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001;297: 467-473.

Lembeck F, Holzer P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1979;310: 175-183.

Levine JD, Moskowitz MA, Basbaum AI. The contribution of neurogenic inflammation in experimental arthritis. *J. Immunol.* 1985;135: 843-847.

Levite M, Chowder Y. Nerve-driven immunity: neuropeptides regulate cytokine secretion of T cells and intestinal epithelial cells in a direct, powerful and contextual manner. *Ann.Oncol.* 2001; 12: S19-S25.

Maggi CA (1995). Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog. Neurobiol.* 45: 1-98.

Marabini S, Matucci-Cerinic M, Geppetti P, Del Bianco E, Marchesoni A, Tosi S, Cagnoni M, Partsch G. Substance P and somatostatin levels in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and psoriatic arthritis synovial fluid. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1991;632: 435-42.

Massa F, Sibae A, Marsicano G, Blaudzun H, Storr M, Lutz B. Vanilloid receptor (TRPV1)-deficient mice show increased susceptibility to dinitrobenzene sulfonic acid induced colitis. *J. Mol. Med.* 2006;84: 142-6.

Massi M, Panocka I, de Garo G. The psychopharmacology of tachykinin NK-3 receptors in laboratory animals. *Peptides* 2000;21: 1597-1609.

Matucci-Cerinic M, Borrelli F, Generini S, Cantelmo A, Marcucci I, Martelli F, Romagnoli P, Bacci S, Conz A, Marinelli P, Marabini S. Somatostatin-induced modulation of inflammation in experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38: 1687-1693.

Matucci-Cerinic M., Bashar-Kahaleh M., and Carwile Leroy E. Vascular involvement in systemic sclerosis. *Systemic sclerosis*. 2004; Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 153-167.

May V, Beaudet MM, Parsons RL, Braas KM. PACAP modulates rat sympathetic neuron depolarization through IP3. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 2000;921: 186-194.

McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998;393: 333-339.

Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989;164: 567-574.

Moller K, Zhang YZ, Hakanson R, Luts A, Sjölund B, Uddman R, Sundler F. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide is a sensory neuropeptide: Immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neuroscience* 57: 725–732.

Mulder H, Uddman R, Moller K, Zhang YZ, Ekblad E, Alumets J, Sundler F. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide expression in sensory neurons. *Neuroscience* 1994;63: 307–312.

Nagy Z, Czirják L. Túlélési adatok vizsgálata szisztémás sclerosisban. *Magyar Reumatológia* 2001; 42:5-8.

Naukkarinen A, Jarvikallio A, Lakkaporpi J, Harvima IT, Harvima RJ, Horsmanheimo M. Quantitative histochemical analysis of mast cells and sensory nerves in psoriatic skin. *J. Pathol.* 1996;180: 200-5.

Németh J, Helyes Zs, Görcs T, Gardi J, Pintér E, Szolcsányi J. Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone. *Acta Physiol. Hung.* 1996;84: 313-315.

Németh J, Görcs T, Helyes Zs, Oroszi G, Kocsy T, Pintér E, Szolcsányi J. Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research. *Neurobiology (Bp)* 1998;6: 473-475.

Niissalo S, Hukkanen M, Imai S, Törnwall J, Konttinen YT. Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Ann. NY Acad. Sci.* 2002;966: 384-399.

Oh U, Hwang SW, Kim D. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 1996;16: 1659-1667.

Okajima K, Harada M. Regulation of inflammatory responses by sensory neurons: molecular mechanism(s) and possible therapeutic applications. *Curr. Med. Chem.* 2006;13: 2241-51.

Parsons JA, Erlandsen SL, Hegre OD, McEvoy RC, Elde RP. Central and peripheral localization of somatostatin. Immunoenzyme immunocytochemical studies. *J. Histochem. Cytochem.* 1976;24: 872-882.

Parsons CG, Czlonkowski A, Stein C, Herz A. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Activation by endogenous opioids and role of the pituitary-adrenal axis. *Pain* 1990;41: 81-93.

Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol.* 1999;20: 157-198.

Pintér E, Helyes Zs, Németh J, Pórszász R, Pethő G, Thán M, Kéri Gy, Horváth A, Jakab B, Szolcsányi J. Pharmacological characterisation of the somatostatin analogue TT-232: effects on neurogenic and non-neurogenic inflammation and neuropathic hyperalgesia. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2002;366: 142-150.

Pintér E, Helyes Zs, Szolcsányi J. Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol. Ther.* 2006;112: 440-456.

Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol. Rev.* 2002;54: 233-246.

Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;313: 856-62.

Raynor K, Reisine T. Somatostatin receptors. *Crit. Rev. Neurobiol.* 1992;6: 273-289.

Regoli D, Boudon A, Fauchere JL. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol. Rev.* 1994;46: 551-599.

Renzi D, Pellegrini B, Tonelli F, Surrenti C, Calabrò A. Substance P (neurokinin-1) and neurokinin A (neurokinin-2) receptor gene and protein expression in the healthy and inflamed human intestine. *Am J Pathol.* 2000;157: 1511-22.

Russel J.D., Russel S.B., and Truplin K.M. The effect of histamine on the growth of cultured fibroblasts isolated from normal and keloid tissue. *J. Cell. Physiol.* 1977;93: 389-94.

Sabata S, Moshonov S, Zor U, Floman Y, Naor Z. Lipoxygenase inhibitor and colchicine as anti-arthritic agents in the rat. *Prostaglandins Leukot.Med.* 1986;23: 95-102.

Salmon AM, Damaj I, Sekine S, Picciotto MR, Marubio L, Changeux JP. Modulation of morphine analgesia in alphaCGRP mutant mice. *Neuroreport* 1999;10: 849-54.

Sanderson K, Nyberg F, Khalil Z. Modulation of peripheral inflammation by locally administered hemorphin-7. *Inflamm. Res.* 1998;47: 49-55.

Sappino AP, Masouye I, Saurat JH, Gabbiani G. Smooth muscle differentiation in scleroderma fibroblastic cells. *Am J Pathol* 1990;137: 585-591.

Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol.* 2000;165: 6635-43.

Schafer M, Mousa SA, Zhang Q, Carter L, Stein C. Expression of corticotropin-releasing factor in inflamed tissue is required for intrinsic peripheral opioid analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996;93: 6096-6100.

Schwab W, Bilgicyldirim A, Funk RHW. Microtopography of the autonomic nerves in the rat knee: a fluorescence microscopic study. *Anat. Rec.* 1997;247: 109-18.

Sebti SM, Jani JP, Mistry JS, Gorelic E, Lazo JS. Metabolic inactivation: a mechanism of human tumor resistance to bleomycin. *Cancer Res.* 1991;51: 227-32.

Shin J, Cho H, Hwang SW, Jung JY, Shin CY, Lee SY, Kim SH, Lee MG, Choi YH, Kim J, Haber NA, Reichling DB, Khasar S, Levine JD, Oh U. Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99: 10150-10155.

Shinozaki M, Kawara S, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takehara K. Induction of subcutaneous tissue fibrosis in newborn mice by transforming growth factor beta-simultaneous application with basic fibroblast growth factor causes persistent fibrosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;240: 292-297.

Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H, Mizumura K. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J. Neurophysiol.* 2002;88: 544-548.

Szállási Á, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 1999;51: 159-212.

Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A. Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung* 1975; 25: 1877-1881.

Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A: Sensory effects of capsaicin congeners II. Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. *Arzneimittelforschung* 1976; 26: 33-37.

Szolcsányi J. A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. *J. Physiol. (Paris)* 1977;73: 251-259.

Szolcsányi J (1984a). Capsaicin and neurogenic inflammation: history and early findings. In: *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation* (eds: Chahl LA, Szolcsányi J, Lembeck F), pp. 7-26, Akadémiai Kiadó, Budapest.

Szolcsányi J (1984b). Capsaicin-sensitive chemoceptive neural system with dual sensory-efferent function. In: *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation* (eds: Chahl LA, Szolcsányi J, Lembeck F), pp. 27-53, Akadémiai Kiadó, Budapest.

Szolcsányi J. Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. *Agents Actions* 1988;23: 4-11.

Szolcsányi J, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J, Pintér E. Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *Br. J. Pharmacol.* 1998a;123: 936-942.

Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J. Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br. J. Pharmacol.* 1998b;125: 916-922.

Szolcsányi J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides* 2004;38: 377-384.

Szolcsányi J. Hot target on nociceptors: perspectives, caveats and unique features. *Br. J. Pharmacol.* 2008;155: 1142-1144.

ten Bokum AMC, Lichtenauer-Kaligis EGR, Melief MJ, van Koetsveld PM, Bruns C, van Hagen PM, Hofland LJ, Lamberts SWJ, Hazenberg MP. Somatostatin receptor subtype expression in cells of the rat immune system during adjuvant arthritis. *J. Endocrinol.* 1999;161: 167-75.

ten Bokum AM, Hofland LJ, van Hagen PM. Somatostatin and somatostatin receptors in the immune system: a review. *Eur. Cytokine Netw.* 2000;11: 161-176.

Terenghi G, Bunker CB, Liu YF, Springall DR, Cowen T, Dowd PM, Polak JM. Image analysis quantification of peptide-immunoreactive nerves in the skin of patients with Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *J. Pathol.* 1991;164: 245-52.

Thán M, Németh J, Szilvássy Z, Pintér E, Helyes Zs, Szolcsányi J. Systemic anti-inflammatory effect of somatostatin released from capsaicin-sensitive vagal and sciatic sensory fibres of the rat and guinea-pig. *Eur. J. Pharmacol.* 2000;399: 251-258.

Thompson H.L., Bubelo P.D., Gabriel G., Yamada Y., and Metcalfe D.D. Murine mast cells synthesize basement membrane components: a possible role in early fibrosis. *J. Clin. Invest.* 1991;87: 619-23.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998;21: 531-543.

Trojanowska M. Molecular aspects of scleroderma. *Front Biosci* 2002;7: 608-18.

Twentyman PR. Bleomycin--mode of action with particular reference to the cell cycle. *Pharmacol. Ther.* 1983;23: 417-41.

van Rossum D, Hanisch U, Quirion R. Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1997;21: 649-678.

Vaudry D, Pamantung TF, Basille M, Rouselle C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC, Gonzalez BJ. PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 2002;15: 1451-1460.



Vécsei L, Widerlöv E. Brain and CSF somatostatin concentrations in patients with psychiatric or neurological illness. An overview. *Acta Psychiatr. Scand.* 1988;78: 657-667.

Weinberg A, Halpern M, Zahalka MA, Quintana F, Traub L, Moroz C. Placental immunomodulator ferritin, a novel immunoregulator, suppresses experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48: 846-853.

Welk E, Fleischer E, Petsche U, Handwerker HO. Afferent C-fibres in rats after neonatal capsaicin treatment. *Pflügers Arch.* 1984;400: 66-71.

Verheggen R., Bumann K., Kaumann A.J. BIBN4096BS is a potent competitive antagonist of relaxant effects of alpha-CGRP on human temporal artery: comparison with CGRP (8-37) Br. *J. Pharmacol.* 2002;136: 120-126.

Wirth K, Hock FJ, Albus U, Linz W, Alpermann HG, Anagnostopoulos H, Henk S, Breipohl G, König W, Knolle J. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. *Br. J. Pharmacol.* 1991;102: 774-777.

Woessener JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 1961;93: 440-7.

Yamamoto T., Katayama I., and Nishioka K. Fibroblast proliferation by bleomycin stimulated peripheral blood mononuclear cell factors. *J. Rheumatol.* 1999a;26: 609-15.

Yamamoto T., Takagawa S., Katayama I., and Nishioka K. Anti-sclerotic effect of transforming growth factor- $\beta$  antibody in a mouse model of bleomycin-induced scleroderma. *Clin. immunol.* 1999b; 92:6-13.

Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I. Animal model of sclerotic skin I: local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J. Invest. Dermatol.* 1999c;112: 456-62.

Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Mizushima Y, Nishioka K. Effect of superoxide dismutase on bleomycin-induced dermal sclerosis: Implications for the treatment of systemic sclerosis. *J. Invest. Dermatol.* 1999d;113: 843-7.

Yamamoto T, Kuroda M, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. III: Histopathological comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains *Arch. Dermatol. Res.* 2000;292: 535-41.

Yamamoto T. Animal model of sclerotic skin induced by bleomycin: A clue to the pathogenesis of and therapy for scleroderma? *Clin. Immunol.* 2002;102: 209-216.

Yamamoto T, Nishioka K. Increased expression of p53 and p21 (Waf1/Cip1) in the lesional skin of bleomycin-induced scleroderma. *Arch. Dermatol. Res.* 2005;296: 509-13.

Zhang Y, Malmberg AB, Yaksh TL, Sjölund B, Sundler F, Hakanson R. Capsaicin-evoked release of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) from rat spinal cord in vivo. *Regul. Pept.* 1997;69: 83-87.

Zhang Y, McCormick LL, Desai SR, Wu C, Gilliam AC. Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines, and immune cell activation. *J. Immunol.* 2002;168: 3088-98.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16: 109-110.

## **AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK**

Helyes Zs, **Szabó, Á**, Németh J, Jakab B, Pintér E, Bánvölgyi Á, Kereskai L, Szolcsányi J. Anti-inflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model of the rat. *Arthr. Rheum.*, 2004;50: 1677-1685. (IF: 7.41; FC: 29)

**Szabó, Á**, Helyes Zs, Sándor K, Bite A, Pintér E, Németh J, Bánvölgyi Á, Bölcskei K, Elekes K, Szolcsányi J. Role of TRPV1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005;314: 111-119. (IF: 4.1; FC: 26)

**Szabó Á**, Czirják L, Sándor Z, Helyes Zs, László T, Elekes K, Starr A, Brain S, Szolcsányi J, Cömpöly T, Pintér E. Investigation of sensory neurogenic components in bleomycin-induced scleroderma model using TRPV1 receptor and CGRP knockout mice. *Arthr. Rheum.* 2008;58: 292-301. (IF: 7.68; FC: 7)

**Az értekezés alapját képező publikációk összesített impact faktora: 19.19**

**Az értekezés alapját képező publikációkra kapott összes független citáció: 62**

## **EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK**

Szolcsányi J, Bölcskei K, **Szabó Á**, Pintér E, Pethő G, Elekes K, Börzsei R, Almási R, Szűts, T, Kéri Gy, Helyes Zs. Analgesic effect of TT-232, a heptapeptide somatostatin analogue, in acute pain models of the rat and the mouse and in streptozotocin-induced diabetic hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;498: 103-109. (IF: 2.43; FC: 13)

Bölcskei 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* 2005;117: 368-376. (IF: 4.31; FC: 44)

Varga A, Németh J, **Szabó Á**, McDougall JJ, Zhang C, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs. Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 in vitro and in vivo in the rat. *Neurosci. Lett.* 2005;385: 137-142. (IF: 1.9; FC: 33)

Jakab B, Helyes Zs, Varga, A, Bölcskei K, **Szabó Á**, Sándor K, Elekes K, Börzsei R, Pintér E, Pethő. G, Németh J, Szolcsányi J. Pharmacological characterization of the novel TRPV1 receptor antagonist JYL1421 (SC0030) in vitro and in vivo in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 2005;517: 35-44. (IF: 2.48; FC: 16)

Sándor K, Elekes K, **Szabó Á**, Pintér E, Engström M, Würster S, Szolcsányi J, Helyes Zs. Analgesic effects of the somatostatin sst<sub>4</sub> receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models.

Eur. J. Pharmacol. 2006;539: 71-75. (IF: 2.52; FC: 5)

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.

Br. J. Pharmacol. 2006;149: 405-15. (IF: 3.83; FC: 8)

Németh J, Reglodi D, Pozsgai G, **Szabó Á**, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs. Effect of PACAP-38 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rats and mice.

Neuroscience 2006;143: 223-30. (IF: 3.43; FC: 2)

Helyes Zs, Elekes K, Nemeth 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.

Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2007;292: L1173-81. (IF: 4.21; FC: 12)

Elekes K, Helyes Zs, Nemeth 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 2007;141: 44-54. (IF: 2.42; FC: 5)

Varecza Z, Elekes K, László T, Perkecz A, Pintér E, Sándor Z, Szolcsányi J, Keszthelyi D, **Szabó Á**, Sándor K, Molnár TF, Szántó Z, Pongrácz JE, Helyes Zs. Expression of the Somatostatin Receptor Subtype 4 in Intact and Inflamed Pulmonary Tissues.

J. Histochem. Cytochem. 2009;57: 1127-37. (IF: 2.81)

**Egyéb publikációk összesített impact faktora: 30.34**

**Egyéb publikációkra kapott összes független citáció: 138**

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönöm Dr. Helyes Zsuzsannának és Dr. Pintér Erikának, témavezetőimnek, hogy bevezettek a kutatómunka világába, példát mutatva szakmai ismeretből, szorgalomból, odaadásból, valamint a tudományos munkán túl emberileg is rengeteget köszönhetek nekik.

Köszönöm Dr. Szolcsányi János professzornak, a Neurofarmakológia program vezetőjének, hogy a képzésben részt vehettem, és hogy rendkívül jó szakmai észrevételeivel és hatalmas tudásával mindig tudott segíteni a munkámban.

Köszönöm Dr. Sándor Zoltánnak és a molekuláris biológiai részleg dolgozóinak, Dr. Szőke Évának és Tóth Dánielnek, hogy velük dolgozhattam és a munkacsoport tagja lehettem.

Köszönöm Dr. Czirják László professzornak, hogy támogatta a munkám és számos szakmai tanáccsal járult hozzá kutatómunkám eredményességéhez.

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

Köszönöm szobatársamnak Dr. Elekes Krisztiánnak, aki barátként még kellemesebbé tette a kutatással töltött időt.

Köszönöm közvetlen munkatársaimnak Dr. Pozsgai Gábornak, Dr. Sándor Katának, Dr. Kemény Ágnesnek, Dr. Bölcskei Katának továbbá a diákkörösöknek és az Intézet összes munkatársának a rengeteg segítséget, amit kaptam tőlük a munkám során.

Köszönöm Perkecz Anikónak a kiváló metszeteket, és Rabovszky Helgának az állatok előkészítését és a napi bleomycin injekció során nyújtott segítségét valamint Gáspár Attilának a számítógépes munkában kapott értékes tanácsokat.

Köszönöm a kísérletes munkában nyújtott nélkülözhetetlen segítséget az Intézet asszisztensnőinek, Zádor Csillának, Góglné Katinak, Zöldhegyiné Máriának, Buzásiné Annának, Bagoly Teréznek.

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

Köszönöm az Orvosi Genetikai Intézet munkatársainak, hogy lehetőséget biztosítottak a PCR kísérletek megvalósításához.

Köszönöm Dr. László Teréziának, Dr. Kereskai Lászlónak a szövettani metszetek értékelését.

Köszönöm Dr. Susan Brainnek és munkacsoportjának a bleomycin-indukálta szkleroderma modell témakörben végzett a CGRP szerepét tisztázó kiegészítő kísérleteit.

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