

**NEUROGÉN GYULLADÁS, VALAMINT SZENZOROS
NEUROPEPTID FELSZABADULÁS VIZSGÁLATA A CAPSAICIN-
ÉRZÉKENY IDEGVÉGZŐDÉSEKBŐL FIZIOLÓGIÁS ÉS KÓROS
ÁLLAPOTOKBAN**

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Dr. THÁN MÁRTA

PROGRAM ÉS TÉMAVEZETŐ: DR. SZOLCSÁNYI JÁNOS

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET

2000.

TARTALOMJEGYZEK

Általános bevezetés	3
Az értekezés célkitűzései	9
I.A. Nervus vagus, illetve nervus ischiadicus capsaicin érzékeny szenzoros idegvégződéseiből felszabaduló endogén szomatosztatin szisztémás gyulladásgátló hatásának vizsgálata patkányban és tengerimalacban	11
B. A szenzoros idegvégzések antidromos, valamint orthodromos ingerléssel kiváltott endogén anti-nociceptív hatás vizsgálata	21
II. A capsaicin-érzékeny szenzoros idegvégzések izgatásával kiváltott neuropeptid felszabadulás, illetve gyulladásgátló hatás károsodása kísérletes diabétesz állatokban	20
III.A. TT-232 szintetikus szomatosztatin analóg gyulladásgátló hatásának vizsgálata	33
B. Endogén neuropeptidok, illetve a TT-232 szomatosztatin analóg hatása neutrophil leukocyták akkumulációjára a bőrben	40
IV. SP, CGRP és szomatosztatin felszabadulásának vizsgálata a capsaicin-érzékeny primer afferens neuronok végződéseiből elektromos ingerlés, valamint capsaicin analógok hatására	46
V. Szomatosztatin és CGRP felszabadulásának vizsgálata szisztémás resiniferatoxin kezelés hatására. Nociceptin és anandamid hatása a capsaicin-érzékeny idegvégzésekben történő neuropeptid felszabadulásra	58
A legfontosabb új eredmények összefoglalása	67
Hivatkozott közlemények jegyzéke	68
Köszönetnyilvánítás	76
Saját közlemények jegyzéke	77

A CAPSAICIN-ÉRZÉKENY PRIMER AFFERENSEK JELLEMZÉSE

A klasszikus idegszabályozási elmélet szerint a szenzoros idegrendszer fő feladata a külső és belső környezet ingereinek felvétele, amely a perifériás idegvégződéseken keresztül valósul meg, és az ingerek érzőrostokon át történő továbbítása a központi idegrendszer felé. Ugyanakkor már a múlt században Stricker (1876) felfedezte a gerincvelői hátsó gyokok ingerlésével a bőrben kiváltható vazodilatáció jelenségét, amit Bayliss (1901) "antidrómos vazodilatáció"-nak nevezett el. A klasszikus elképzelés az axon reflex teórián alapulva az volt, hogy az antidrómos vazodilatációért felelős mediátorok egyes primer afferensek specializálódott effektor végződéseiből szabadulnak fel. Napjainkra már kísérletesen alátámasztott és általánosan elfogadott tény, hogy egyes szenzoros axonterminálisok kettős: afferens és efferens funkcióval is bírnak, azaz inger hatására képesek a vesztibuláris formájában raktározott neuropeptideket közvetlenül, axonális vezetés nélkül felszabadítani (Szolcsányi 1984, Maggi és Meli 1988). A gerincvelői érzőneuronok mai ismereteink szerint heterogén populációt képeznek, vannak tisztán afferens, kevert kettős funkciójú "szenzoros-efferens" neuronok, illetve újabban azt is feltételezik, hogy léteznek tisztán lokális effektor funkciót betöltő neuronok is az érződúcokban (Holzer és Maggi, 1998, Holzer 1998). Ez utóbbiak esetében azonban joggal megkérdőjelezhető a szenzoros jelző használata.

Az elsődleges érzőneuronok működésének kutatásában kiemelkedő jelentősége van a *capsaicin*nek, a paprika (*Capsicum annum*) csípőanyagának (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide), melynek első farmakológiai vizsgálata magyar kutatók munkásságának az eredménye (Högyes 1878, Jancsó 1955). A capsaicin szelektíven izgatja az érzőneuronok egy meghatározott populációját, melyre a *capsaicin-érzékeny primer afferens neuron* (Szolcsányi 1982) elnevezés napjainkra már általánosan elterjedt. A capsaicin szelektív hatása a polymodális nociceptorokon és a capsaicin farmakológiai receptorának létezése (Szolcsányi és Jancsó-Gábor, 1975) biokémiai bizonyítást nyert a capsaicin/vanilloid receptor (VR1) klónozása révén (Caterina és mtsai, 1997). Az elsődleges érzőneuronok 40-50 %-át kitevő capsaicin-érzékeny neuronpopulációba tartoznak exteroceptív területeken a C-polymodális nociceptorok, a meleg és forró receptorok, az A δ -polymodális nociceptorok, valamint az interoceptív területeken a nyálkahártyák és vizscerális szervek perivasculáris chemonociceptorai (Szolcsányi 1996b). A capsaicin és származékai ezeken a neuronokon

izgató, nagyobb dózisban alkalmazva deszenzitizáló, illetve neurotoxikus hatást fejtenek ki.

Ezeknek a nociceptív afférensnek közös tulajdonságuk, hogy klasszikus afférens funkciójukon kívül lokális effektor (Lembeck és Holzer, 1979, Holzer 1988, Szolcsányi 1984), illetve szisztémás neurohumorális (Szolcsányi 1996b, Szolcsányi és mtsai, 1998a,b) funkciót is betöltenek, vagyis megfelelő inger hatására perifériás idegvégződéseikből tachykininek (substance P (SP), neurokinin-A (NKA)), calcitonin gén-rokon peptid (CGRP), és szomatosztatin szabadulnak fel. Az aktiváció hatására felszabaduló gyulladáskeltő neuropeptidek (SP, CGRP) lokális választ, úgynevezett *neurogén gyulladást* (Jancsó és mtsai, 1967, Szolcsányi 1988) váltanak ki az ideg által innervált bőr és nyálkahártyaterületeken, ami helyi arteriolás és vénás vazodilatációval, érpermeabilitás fokozódással, plazma protein kiáramlással, majd nyálkahártyák esetén a sejt elemek (leukocyták, hízósejtek) aktivációjával jár (Gepetti és Holzer, 1996). Az SP a venulákon vazodilatációt, illetve plazma extravazációt vált ki az NK-1 receptorokon keresztül, a CGRP pedig elsősorban arteriolás vazodilatációt, mikrocirkulációfokozódást idéz elő a CGRP-1 típusú receptor közvetítésével. Bár önmagában a CGRP nem képes plazma extravazációt kiváltani, az SP hatását potenciozza, emellett vazodilatátoros hatások is egymást erősíti. Természetesen a lokális keringési hatásokon kívül mindkét peptid változatos, fajtól, valamint szervtől függő motoros, szekretoros, immunológiai, illetve egyéb effektor hatásokat képes kiváltani (Maggi 1995, Lundberg 1996, Szolcsányi 1996a). Így a capsaicin-érzékeny peptiderg érzőidegvégződések egyaránt ellátnak nociceptív afférens és lokális efférens funkciót. Ugyanakkor capsaicin előkezelés után, amely ezen neuropeptidek deplécióját eredményezi az idegvégződésekből, a capsaicin-érzékeny rostokat szelektíven izgató ingerre adott helyi válasz elmarad, a deszenzitizáció eredményeként.

Előzetes vizsgálatok intézetünkben fényt derítettek arra az érdekes jelenségre, hogy exteroceptív területek capsaicin-érzékeny rostjainak antidrómós elektromos, vagy orthodrómós kémiai ingerlésével kiváltott primer neurogén gyulladás szisztémás gyulladásgátló hatása révén gátolja a test távolabbi részén kiváltott szekunder akár neurogén, akár nem neurogén gyulladás kifejlődését (Szolcsányi 1996b, Pintér és Szolcsányi, 1988, 1996). Direkt biokémiai, illetve funkcionális módszerekkel sikerült bizonyítani az idegvégződésekből felszabaduló szomatosztatin döntő szerepét a hatás közvetítésében, mivel az endogén gyulladásgátló hatás szomatosztatin antiszérummal, illetve cysteamin előkezeléssel megelőzhető volt, emellett a plazma szomatosztatin szint jelentős emelkedése kísérte (Szolcsányi és mtsai, 1998a,b).

A CAPSAICIN RECEPTORA ÉS ANALÓG VEGYÜLETEI

A capsaicin által kiváltott csipő, égő fájdalomérzés a capsaicin-érzékeny szenzoros idegvégződéseken található specifikus receptor aktivációján keresztül jön létre. A capsaicin VR1 receptor egy ligand aktivált nem-szelektív kationcsatorna, melyet a vanilloid vegyületek mellett fájdalomcsillapító, valamint savas pH (magas protonkoncentráció) is képes aktiválni (Caterina és Mtsai, 1997). Lokalizációját tekintve a capsaicin-érzékeny szenzoros neuronok perifériás terminálisán, az axon teljes hosszában, a szomán, valamint a centrális végződésen is megtalálható. Szintézise az idegsejt citoplazmájában történik, ahol a Golgi-apparátushoz, valamint a plazmamembránhoz kötötten található, majd innen a ligand kötésre alkalmas receptor a centrális, illetve perifériás terminális felé transzportálódik, ahol preterminálisan ún. „small clear vesiculák” formájában, az idegvégződésben pedig membránhoz kötött formában található (Szállási és Blumberg, 1999). Capsaicin kezelés hatására észlelhető ezen „small clear vesiculák”, valamint a specifikus membrán RTX-kötőhelyek, azaz a capsaicin receptorok depléciója.

A kompetitív capsaicin receptor antagonistásként capsazepin specifikusan blokkolja mind a vanilloidvegyületekkel, mind a hőingerekkel kiváltott áramválaszokat, ami a közös hatáshelyre utal (Caterina és Mtsai, 1997). Szenzoros idegsejtkultúráján vizsgálva a protonok potenciózzák a capsaicin-kiváltotta válaszokat, magasabb koncentrációban pedig önmagukban képesek membránáramokat kiváltani a capsaicin VR1 receptor aktivációján keresztül (Tominaga és Mtsai, 1998). A gyulladásszerű, valamint ischémiás szöveti károsodások kapcsán kialakuló magas protonkoncentráció fájdalomérzetet vált ki, csökkenti a receptoraktiváció hőküszöbét, illetve potenciózza a capsaicinnal és hőingerekkel kiváltott válaszokat (Tominaga és Mtsai, 1998). Így a capsaicin VR1 receptor egyes fájdalom kémiai valamint fizikai ingerek integrátoraként működik a nociceptív neuronokon.

Napjainkban már több olyan szintetikus (olvanil, nuvanil, phorbol vanilloidok, terpenoidok, triprenyl phenol vegyületek), illetve a természetben is előforduló analóg (piperin, zingeron, eugenol, guajacol, resiniferatoxin) is ismerünk, melyek a capsaicin receptoron hatnak, de különböznek izgató, illetve deszenzitizáló hatásukban. Ezek közül az *Euphorbia resinifera* kaktusz vanilloid struktúrát tartalmazó irritáns anyaga, a *resiniferatoxin* (RTX) a capsaicinhez hasonló hatásokat hoz létre (Szállási és Blumberg, 1989, 1990, Blumberg és Mtsai, 1993), azonban különböző tesztekben annál több nagyságrenddel hatásosabbnak bizonyult. Ugyanakkor a hatás különbözőségére utal, hogy ellentétben a

capsaicinnel, az RTX képes a pulmonális chemoreceptorok deszenzitizációját a pulmonális chemoreflex előzetes aktivációja nélkül kiváltani patkányban (Szołcányi és mtsai, 1990). Ezekre a kísérleti adatokra alapult az a napjainkban megdőlni látszó feltételezés, miszerint a két vegyület hatása különböző, a capsaicin „C”, míg az RTX hatása „R” típusú receptoraltípusokon érvényesül, azonban valószínűbb az az elképzelés, hogy egyazon receptor külön kötőhellyel rendelkezik vanilloid, illetve resiniferanoid vegyületek számára. A *piperin*, a feketebors csipőanyaga szintén izgatja a capsaicin-érzékeny rostokat, és képes a neuropeptidek felszabadítására a capsaicin-érzékeny idegvégződésekből, illetve kereszt-deszenzitizációt mutat a capsaicinnel, ami a közös hatáshelyre utal (Patacchini és mtsai, 1990, Szołcányi 1983, Liu és Simon, 1996). Szerkezetileg a capsaicinhez részben hasonló elemet tartalmazó szintetikus vegyület az *undecenyl-2-amino-ethanol*, amely korábbi a capsaicin-analógokat összehasonlító kísérletekben fájdalomkeltő hatást tekintve a capsaicinnél megközelítőleg három nagyságrenddel bizonyult gyengébbnek (Szołcányi és Jancsó-Gábor, 1975). Ezek az adatok igazolták, hogy a capsaicin izgató hatásában az aromás gyűrűnek fontos szerepe van, azonban a vegyület akkor is hatásos ha a hidroxilsoport alkilánchoz kötődik.

Mind a mai napig nem ismert azonban a receptor endogén ligand vegyülete és nem teljesen tisztázott a szerepe fiziológiai körülmények között. Bizonyított ellenben, hogy szöveti sérüléskor, valamint gyulladáshoz és ischémiás kóros állapotokban jellemző savas pH érték, valamint az ilyenkor felszabaduló bradikinin, hisztamin és prosztaglandinok szerepet játszanak a capsaicin-érzékeny rostok szenzitizációjában, valamint aktiválásában, mely depolarizációhoz, akciós potenciál generálásához és tovaterjedéséhez vezetve, a fájdalomérzet mellett az effektor funkcióknak megfelelően a peptidek perifériás felszabadításán keresztül lokális választ hoz létre (Lundberg 1996). Ezekre az adatokra alapulva a hőinger, valamint a protonok tekinthetők a receptor természetes fizikai, illetve kémiai aktivátorainak. Az anandamiddel, mint endogén cannabinoiddal és capsaicin receptor agonistával kapcsolatos eredményekről a későbbiekben lesz szó.

SZENZOROS NEUROPEPTID FELSZABADULÁS KÓROS ÁLLAPOTOKBAN

A capsaicin-érzékeny idegvégzések jellemző tulajdonsága a nociceptív kémiai ingerekre való érzékenység. Perifériás végződéseinek tartós, endogén ingerlése, pl. krónikus gyulladások esetén, a hátsó gyöki érző ganglionok szenzoros, valamint efferens funkciójának megváltozását hozhatja létre. Kísérletes polyarthritissal kiváltása után a n. ischiadicus, hátsó gyöki

ganglion, hátsó gyök, valamint a gerincevelő SP/CGRP tartalma megnő. Bizonyított ezen kívül, hogy ilyenkor a hátsó gyöki ganglionok idegsejtjeinek SP- és CGRP-szintézise növekszik (preprotachykinin I- és α CGRP-génextpresszió nő) és ezzel párhuzamosan a gerincevelői peptidfelszabadulás is fokozódik (Donaldson és mtsai 1992), mely utóbbi részt vehet a kórállapotot kísérő krónikus fájdalom keletkezésében. A neuropeptidek mellett leírták a n. ischiadicus „nerve growth factor” (NGF) tartalmának növekedését is kísérletes arthritisben, valamint anti-NGF szérum védő hatását a gyulladáskor létrejövő SP/CGRP szint emelkedésre (Donnerer és mtsai, 1992).

A capsaicin-érzékeny elsődleges érzőrostok fokozott aktivációja, illetve a következményes perifériás neuropeptid felszabadulás eredményeként kialakuló neurogen gyulladáshoz számos betegség pathomechanizmusában játszik fontos szerepet. Ezek közé tartozik a légutak esetén az allergiás rhinitis, asthma bronchiale, chronicus bronchitis, az ízületekben a rheumatoid arthritis, a bőrbetegségek közül psoriasis, illetve az agyi ereknél a migraine (Ferreir és Lam, 1990, Szallasi és Blumberg, 1999).

Ugyanakkor a szisztémás anyagcserebetegségek közül a diabetes mellitus súlyos szövődménye a perifériás idegek először reverzibilis funkcionális, később irreverzibilis morfológiai károsodása, amely mind a szomatikus mind a vegetatív idegeket érinti. A diabeteses neuropathia pathomechanizmusában a tartósan emelkedett vércukorszintnek kiemelkedő jelentősége van, melynek eredménye a polyol anyagcsereút hiperaktivitása következményes sorbitol felhalmozódással az idegrostokban és a fehérjék nem enzimatis glikációja. Szerepet játszik a károsodott zsírsavmetabolizmus, az oxidatív stressz, a microangiopathiából eredő endoneurális hypoxia, valamint a trofikus, illetve a növekedési faktorok (NGF) csökkent szintézise is (Fedele és Giugliano, 1997). A károsodás jelei elsőként a legsérülékenyebb myelinhüvely nélküli, valamint vékony myelinhüvelyes szenzoros rostokon jelentkeznek (Fedele és Giugliano, 1997, Ralevic és mtsai, 1993). Kezeletlen kísérletes diabetesben kimutatták a n. ischiadicus, valamint a hátsó gyöki ganglionsejtek SP és CGRP tartalmának csökkenését. Ennek kialakulásában az NGF csökkent mennyiségén kívül a polyol anyagcsereút is szerepet játszik, mivel a neuropeptidek depléciónja mind NGF szubsztitúcióval, mind insulin-kezeléssel kivédhető, illetve javítható (Diemel és mtsai, 1992, Bennett és mtsai, 1998). A neuropeptidek anterográd, valamint retrográd axontranszportja is károsodik az NGF hiány, illetve a polyol anyagcsere-termékek felhalmozódása miatt, ami endoneurális ödémát és hypoxiát okozva közvetlenül rontja a neuropeptidek transzportját (Diemel és mtsai, 1992).

A kezeletlen, vagy nem megfelelően kezelt diabetes mellitus viszonylag korai klinikai

jelei a szenzoros zavarok, paraesthéziák, valamint csökkent fájdalomérzés a primer érzőrostok károsodásának, valamint a centrális neuropeptid felszabadulás (SP) érintettségének következtében jönnek létre. Azonban a neuropeptidok szintézisének, illetve transzportjának károsodása a szenzoros zavarokon túl a perifériás effektor funkciók romlásához is vezet.

ANANDAMID - A CANNABINOID ÉS A CAPSAICIN-ÉRZÉKENY RENDSZER KAPCSOLATA

Az endocannabinoidok a marihuana hatóanyagához, a D9-tetrahydrocannabinolhoz hasonló hatásokat képesek létrehozni hatásukat két receptor altípuson, a CB1 és CB2 G-protein-kapcsolt receptorokon kifejtve (DiMarzo és mtsai, 1998). Ezek közül a CB1 receptor elsősorban központi idegrendszeri struktúrákon található, azonban jelenléte igazolt a perifériás idegelemekben is, míg a CB2 receptor perifériásan elsősorban a gyulladási sejteken található. A CB1 receptor jelenlétét kimutatták a capsaicin-érzékeny peptiderg rostokon is, bár a kelts jelölés in situ hibridizációs technikával a CGRP, illetve SP pozitív sejteknek csak 10-13 %-a mutatott jelölődést (Hohmann és Herkenham, 1999). A CB1 receptor aktivációja az adenil-cikláz, valamint a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák gátlásához és inward K^+ áramok aktiválódásához vezet. Az endogén cannabinoidok mint neuromodulátorok fontos szerepet töltenek be a neurotranszmitterek felszabadulásának, illetve hatásainak befolyásolásán keresztül. A Ca^{2+} csatornák, illetve az adenil-cikláz gátlása preszinaptikusan a neurotranszmitter felszabadulás gátlásához vezet, míg a K^+ csatorna aktiváció képes csökkenteni, mintegy kivédeni a depolarizáció és akciós potenciál létrejöttét pre-, valamint post-szinaptikusan hatva (DiMarzo és mtsai, 1998). A cannabinoid és capsaicin-érzékeny rendszer kapcsolata az elmúlt évben került az érdeklődés középpontjába, miután igazolták, hogy [3H]anandamid akkumuláció humán astrocytoma sejtekben capsaicin analóg olvanillal kivédhető (Beltramo és Piomelli, 1999). Az *anandamid* (N-arachidonylethanolamide), mint endogén cannabinoid a CB1 receptor 1992-ben azonosított ligandja (Devane és mtsai, 1992) az egyik legtöbbet vizsgált cannabinoid vegyület. Egyes kísérleti adatok arra utalnak, hogy az anandamid a capsaicin VR1 receptort is képes aktiválni. Az anandamid a capsaicin-érzékeny afferenseket izgatva izolált artérián CGRP felszabadításán keresztül vazodilatációt hoz létre (Zygmunt és mtsai, 1999), emellett a VR1 receptoron kifejtett agonista hatását patch-clamp kísérletekben is igazolták (Zygmunt és mtsai, 1999, Smart és mtsai, 2000). Ugyanakkor ismeretes, hogy az anandamid a capsaicin-érzékeny primer afferenseken lévő CB1 receptoron

gátló hatást fejt ki (Richardson és mtsai, 1998). Az egymásnak részben ellentmondó eredmények miatt egyelőre nem tisztázott, tekinthető-e az anandamid a cannabinoid receptor mellett a capsaicin receptor endogén ligandjának is (Szolcsányi 2000a,b, Zygmont és mtsai, 2000).

AZ ÉRTEKEZÉS CÉLKITŰZÉSEI

Az értekezésben összefoglalt eredményeim a capsaicin-érzékeny szenzoros neuronok funkciójának felderítéséhez csatlakoznak és a munkacsoport korábbi munkáinak folytatását képezik. Elsősorban a szenzoros receptorokból felszabaduló szomatosztatin, valamint az anandamid, mint feltételezett endogén capsaicin receptor ligand szerepét vizsgáltam fiziológias és pathofiziológias (diabetes) körülmények között *in vivo* kísérletekben és *in vitro* peptidfelszabadulás közvetlen meghatározása révén radioimmunoassay (RIA) módszerekkel. Elsőként vizsgáltam az akut deszenzitizáció kialakulását három szenzoros neuropeptidre gyakorolt kvantitatív hatások összehasonlítása alapján.

I. Az első kísérletsorozatban arra kerestünk választ, hogy az exteroceptív területeken már igazolt szomatosztatin közvetítette szisztémás neurohumorális gyulladásgátló válasz kiváltható-e interoceptív területek felől is, a n. vagusok szenzoros rostjainak antidrómus ingerlésével patkányban, valamint egy másik állatfajban, a tengerimalacban. Vizsgáltuk továbbá, hogy a capsaicin-érzékeny idegvégződésekből antidrómus, illetve orthodrómus ingerlés hatására felszabaduló endogén szomatosztatin kivált-e anti-nociceptív hatást is.

II. Streptozotocinnal kiváltott kísérletes diabeteses neuropathiás modellben vizsgáltuk a capsaicin-érzékeny szenzoros rostok ingerlésével kiváltott neuropeptid felszabadulás, neurogén gyulladás, valamint az előbb említett endogén gyulladásgátló jelenség eltéréseit.

III. Az endogén szomatosztatin mint gyulladásgátló mediátor ígéretes lehetőséget rejt magában új típusú gyulladásgátló vegyületek kifejlesztésére. Ennek a kísérletsorozatnak célja az intézetünkben már előzetesen vizsgált heptapeptid szomatosztatin analóg TT-232 hatásának további tanulmányozása volt, különös tekintettel a krónikus gyulladásos folyamatokra, a szenzoros neuropeptid felszabadulásra, illetve a hatásmechanizmus felderítésére. Korábbi vizsgálatok nem tértek ki a gyulladás celluláris fázisára, ezért elemeztem az idegingerléssel felszabadított endogén neuropeptid, valamint a TT-232 szomatosztatin analóg leukocyták akkumulációjára kifejtett hatását.

IV. Tanulmányoztuk a capsaicin, illetve természetben előforduló capsaicin analóg vegyületek, mint az RTX és a piperin direkt izgató, illetve akut deszenzitiváló hatását *in vitro* körülmények között tracheapreparátumból felszabaduló szenzoros neuropeptidek (SP, CGRP, szomatosztatin) RIA meghatározása alapján.

V. A laboratóriumunkban korábban kifejlesztett specifikus RIA módszerek segítségével (Németh és mtsái, 1996, 1998a) szenzoros neuropeptid felszabadulás mérése alapján módszereket dolgoztunk ki capsaicin receptorokon ható agonista és moduláló-antagonista hatások követése céljából. Vizsgáltuk szisztémásan adott RTX, mint capsaicin receptor agonista által kiváltott CGRP, valamint szomatosztatin felszabadulás dózis és időfüggését *in vivo* a plazma peptid szintek mérése útján. Az anandamid, mint feltételezett capsaicin receptor agonista hatását a három szenzoros neuropeptid (SP, CGRP, szomatosztatin) felszabadulására gyakorolt *in vitro* és *in vivo* hatások alapján elemeztük.

I.A. NERVUS VAGUS, ILLETVE NERVUS ISCHIIADICUS CAPSAICIN-ERZEKENY SZENZOROS IDEGVÉGZŐDÉSEIBŐL FELSZABADULÓ ENDOGÉN SZOMATOSZTATIN SZISZTÉMÁS GYULLADÁSGÁTLÓ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PATKÁNYBAN ÉS TENGERIMALACBAN

A fejezethez kapcsolódó saját közlemények:

I.A./1. **Thán M.**, Németh J., Szilvássy Z., Pintér E., Helyes Zs., Szolcsányi J.: Anti-inflammatory effect of somatostatin released from capsaicin-sensitive vagal and sciatic sensory fibres of the rat and guinea-pig.

Eur. J. Pharmacol., (közlésre elfogadva) 2000.

I.A./2. **Thán M.**, Németh J., Helyes Zs., Szilvássy Z., Pintér E., Szolcsányi J.: Somatostatin mediated systemic anti-inflammatory effect induced by antidromic vagal and sciatic nerve stimulation.

Regul. Peptides, 80, 137, 1999. (előadáskivonat)

I.A./3. **Thán M.**, Németh J., Szilvássy Z., Oroszi G., Szolcsányi J.: Systemic anti-inflammatory effect mediated by somatostatin released from activated sensory vagal nerve terminals in rats and guinea-pigs.

Fundam. Clin. Pharmacol., 13, 328s, 1999. (előadáskivonat)

Bevezetés

Előzetes vizsgálataink igazolták, hogy a capsaicin-érzékeny rostok ingerlésével kiváltott primer neurogén gyulladás gátolja a test távolabbi részén kiváltott szekunder akár neurogén, akár nem neurogén gyulladás kifejlődését (Szolcsányi 1996, Pintér és Szolcsányi, 1996). Krónikusan denervált területeken kémiai anyagokkal (pl. dextrans, bradykinin) indukált nem neurogén gyulladás nem rendelkezett ilyen szisztémás gyulladáscsökkentő hatással, ugyanakkor alacsony frekvenciájú elektromos ingerlés (0.1 Hz) lokális plazma extravazáció kiváltása nélkül is képes volt ezt a hatást létrehozni. Ezek az adatok arra utaltak, hogy a szisztémás gyulladásgátló hatást közvetítő mediátorok közvetlenül az aktivált érzőidegvégződésekből szabadulnak fel és nem a gyulladásos szövetből (Szolcsányi és mtsai, 1998a). A capsaicin-érzékeny idegrostok végződéseiben a gyulladáskeltő peptidok (SP, NKA, CGRP) mellett kimutatható és ingerléssel felszabadítható neuropeptidok közül gyulladásgátló hatással rendelkeznek az opioid peptidok (Stein 1995), a szomatosztatin (Lembeck és mtsai, 1982) és a galanin (Xu és mtsai, 1991). Az eddigi kísérleti eredmények igazolták az idegvégződésekből felszabaduló szomatosztatin alapvető szerepét a gyulladáscsökkentő hatás közvetítésében (Pintér és mtsai, 1997, Szolcsányi és mtsai, 1998a,b), azonban teljes biztonsággal nem zárták ki egyéb gátló hatású peptidok részvételét sem.

Mivel a fenti kísérletekben a primer gyulladás kiváltása mindig exteroceptív területeken,

a bőrben történt, felmerült a kérdés, vajon ez az endogén szisztémás gyulladáscsökkentő hatás aktiválható-e viscerális interoceptorok területén kiváltott neurogén gyulladás során, így a n. vagus tracheát, oesophagust, mediastinális szöveteket ellátó capsaicin-érzékeny szenzoros rostjainak ingerlésével is. Ismert, hogy a craniális és extracraniális szenzoros ganglionok különböznek embriológiai eredetüket, valamint túlélésükhöz és differenciálódásukhoz szükséges trofikus faktor igényüket tekintve. Míg a capsaicin-érzékenységet a hatso gyöki ganglionok területén NGF-függő, a vagus ganglionsejtjei BDNF (brain derived neurotrophic factor) jelenlétét igénylik (Winter 1998).

Bizonyított, hogy a légutakban afferens funkciót mind a spinális afferensek, mind a n. vagus szenzoros rostjai betöltnek (Coleridge és Coleridge, 1984). A trachea SP-, illetve CGRP-immunoreaktív afferens rostjai a n. vagusból származnak, a főbronchusok, valamint az alsó légutak kevert afferens beidegzésében azonban mind a n. vagus, mind a thoracalis spinális afferensek részt vesznek (Lundberg és mtsai, 1983, McDonald és mtsai, 1988). Ezzel szemben mások adatai szerint patkányban a tudó szenzoros beidegzése döntően gerincevelői eredetű (Springall és mtsai, 1987). Ezen ellentmondásos eredmények mellett azonban igazolt, hogy a szenzoros vagus rostok fontos lokális effektor funkcióval is bírnak, mely egyes légúti gyulladási betegségek (asthma bronchiale) pathomechanizmusában játszik fontos szerepet (Lundberg és mtsai, 1983, McDonald és mtsai, 1988, Szolcsányi 1996a,b).

Vita tárgyát képezi az is, hogy a capsaicin-érzékenység ezen a területen is a VR1 típusú capsaicin receptor jelenlétéhez kötött-e (Holzer 1998). In situ hibridizációs kísérletek igazolták a VR1 jelenlétét a n. vagus afferens rostjain, de más receptor altípusok részvételét sem zárták ki (Helliwell és mtsai, 1998, Tominaga és mtsai, 1998).

Kísérleteink célja volt a szomatoszenzoros idegek esetén már leírt szisztémás gyulladásgátló hatás vizsgálata, a szomatosztatin mediátor szerepének elemzése a capsaicin-érzékeny szenzoros vagus rostok antidiromos elektromos ingerlése kapcsán. Mivel az eddigi kísérletek kivétel nélkül patkányon történtek, a szisztémás neurohumorális capsaicin-érzékeny gyulladásgátló jelenség vizsgálatát egy másik állatfajon, tengerimalacon is elvégeztem.

Módszerek

1. Nervus vagus bilaterális antitrómos elektromos ingerléssel kiváltott szisztémás gyulladásgátló hatás vizsgálata patkányon

Kísérleteinket 200-240 g súlyú nőstény Wistar patkányokon végeztük, melyeket patogénmentes környezetben, 24-25 °C-os hőmérsékleten a PTE állatházában neveltük. Altatáshoz nátrium thiopenthal (Trapanal, 100 mg/kg, i.p.) használtunk. A primer neurogén gyulladás kiváltására nyaki feltárásból végzett kétoldali n. vagus átmetszést követően, az idegek perifériás csomójának antitrómos irányú elektromos ingerlését (20 V, 1 ms, 8 Hz, 20 min) alkalmaztuk. A paraszimpatikus vegetatív hatások kivédésére az ingerlés megkezdése előtt 10 perccel atropin (2 mg/kg, i.v.) előkezelést alkalmaztunk, amely mellett a fenti vagusingerlés nem okozott szignifikáns vérnyomásváltozást.

Vizsgálatainkban a kétoldali vagusingerlés hatását vizsgáltuk egy távolabbi területen, a lábhátakon létrehozott második neurogen gyulladásra. Mindket oldali natio vegtagot akutan denerváltuk (n. saphenus és n. ischiadicus átvágása 30 perccel a kísérlet előtt) ezzel megakadályozva a nociceptív reflexválaszokat. A másodlagos gyulladást a lábhátak bőrében, paraffinolajban oldott 1 %-os mustárolaj helyi ecsetelésével váltottuk ki, ami a capsaicin-érzékeny C-polymodális nociceptorok orthodrómos irányú szelektív kémiai izgatásával vált ki vazodilatációt és plazma extravazációt (Jancsó és mtsai, 1967). A gyulladás okozta plazma extravazációt Evans kék akkumulációs módszerrel határoztuk meg. Az állatok a gyulladás kiváltása előtt 10 perccel vénás kanülön keresztül Evans kék festéket kaptak 50 mg/kg dózisban. Mivel ez a festék kötődik a plazma albuminhoz, a gyulladás helyén kilépve az érpályából a gyulladt szövetben történő akkumulációja arányos a plazma extravazáció mértékével. A mustárolajecsetelés után 20 perccel az állatokat elvéreztettük, a lábháti bőroket lemetsztük, majd 72 órás formamid extrakció után 620 nm-en fotométerrel meghatároztuk az extravazálódott festék mennyiségét. Az eredményeket µg/g egységben, nedves szövetsúlyra vonatkoztatva adtuk meg.

A vagusingerlést a lábháti gyulladáskeltő stimulus alkalmazásával egyidőben, illetve egy másik kísérleti csoportban 5 perccel korábban kezdtük. A kontroll csoportban a lábháti neurogén gyulladást megegyező módon váltottuk ki, de a n. vagusokat csak átmetsztük. Egy külön kísérleti csoportban a vagusingerlést 10 perccel megelőzően ganglionblokkoló hexamethonium (5 mg/kg, i.v.) előkezelést alkalmaztunk, azzal a céllal, hogy a n. vagusok paraszimpatikus rostjainak stimulációjára a gyomoronyákhártya, illetve a gastrointestinális

traktus egyéb szomatosztatin tartalmu D-sejtjeiből történő esetleges szomatosztatin felszabadulást biztosan kivédjük. A szomatosztatin szerepének vizsgálatára az egyik kísérleti csoportban a gyulladás kiváltása előtt 4 órával cysteamin (280 mg/kg, s.c.) előkezelést alkalmaztunk, amely mint szulfhidril vegyület a szomatosztatin molekula egy SH-csoportjához kapcsolódva, diszulfidhidat hoz létre, így azt immunológiailag és funkcionálisan szelektíven inaktívá teszi (Patel és Pierzchala, 1985) (csoportonként 6 állatot használtunk, n=6/csoport).

2. Nervus ischiadicus antidrómos elektromos ingerlésével kiváltott szisztémás gyulladásgátló hatás tengerimalacon

Kísérleteinket 350-500 g súlyú tengerimalacokon végeztük, natrium pentobarbital (Nembutal, 30 mg/kg, i.p.) narkózisban. Az ingerlés előtt 1 órával adrenerg neuronblokkoló guanethidin (8 mg/kg, i.p.) előkezelést alkalmaztunk, hogy kiküszöböljük a n. ischiadicusban futó szimpatikus rostok hatását. Az állatokat pipecuronium bromid (200 µg/kg, i.v.) segítségével relaxáltuk és tracheakanüllőn keresztül mesterségesen lélegeztettük. Mindkét oldali n. ischiadicust kipreparáltuk és az átmetszett idegek perifériás csomóit elektromosan ingereltük (30 V, 0.5 ms, 20 Hz, 20 min), 5 perces időközönként. Az utolsó gyulladáskeltő stimulus után 15 perccel az állatokat elvégeztettük, a n. ischiadicus innervációjának megfelelő bőrelvényekben a plazma extravazáció mértékét az Evans kék módszerrel meghatároztuk (n=8).

3. A plazma szomatosztatin koncentrációjának meghatározása patkányban és tengerimalacban bilaterális antidrómos vagusingerlést követően

Az idegingerlésre felszabaduló szomatosztatin mérésére plazma szomatosztatin meghatározást végeztünk 12 óras éheztetési periódust követően. Az artériás vérmintavétel céljából a jobb oldali arteria carotisba kanült helyeztünk be.

1. A kontroll állatokban nyaki feltárásból kétoldali vagusátmetszést végeztünk.
2. Az ingerelt csoportban a vagusok átvágása után 10 perccel a perifériás csomókat elektromosan ingereltük (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min).
3. A harmadik abdominális vagusátmetszett csoportban a gastrointestinalis traktusból történő szomatosztatin felszabadulás kivédésére az ingerlés kezdete előtt 30 perccel hasi feltárásból a n. vagusok törzsét a rekeszen való átlépés után átmetsztettük, a csomókat 2 %-os Lidocainnal és 96 %-os alkohollal beecseteltük. A nyaki szakaszon kipreparált és átmetszett ideget

megegyező paraméterekkel ingereltük.

4. Az áloperált ingerelt, illetve,

5. az áloperált kontroll csoport adatai arra a kérdésre adtak választ, hogy a műtéti beavatkozás befolyásolja-e az általunk mért szomatosztatin felszabadulást.

6. Patkányokon egy hatodik csoportban szisztémás capsaicin előkezelést végeztünk (1 %-os capsaicin s.c., három napig növekvő 30, 60, 90 mg/kg dózisban), majd a bilaterális nyaki vagusingerlést három nap után a fent leírt módon elvégeztük. Az előkezeléssel azt kívántuk bizonyítani, hogy a szisztémás keringésben mért emelkedett szomatosztatin valóban a n. vagus capsaicin-érzékeny érzőrostjainak terminálisaiból származik (n=6/csoport).

Az ingerlés befejezése után 2 perccel artériás kanülön keresztül 3 ml vért nyertünk Trasylolt (1000 IU) és EDTA-t (6 mg) tartalmazó jégben hűtött kémcsövekbe. A 4 °C-on végzett centrifugálást követően a peptidet háromszoros mennyiségű alkohollal extraháltuk. Precipitációt és újabb centrifugálást követően a mintákat nitrogén alatt bepároltuk, majd a száraz anyagot pufferben újra feloldva, a plazma szomatosztatin szinteket laboratóriumunkban kifejlesztett specifikus RIA módszerrel határoztuk meg (Németh és mtsai, 1996).

4. A plazma szomatosztatin szint változás meghatározása tengerimalacban n. ischiadicus antidrómos ingerlésének hatására

A tengerimalacokat a szomatosztatin szint mérésekor három csoportba osztottuk:

1. A kontroll állatokban az egyik oldali n. ischiadicust átmetsztük.

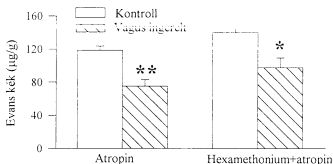
2. Az ingerelt csoportban az egyik oldalon átvágott ideg perifériás csonkját elektromosan ingereltük (30 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min).

3. A harmadik csoportba a capsaicin-előkezelt állatok kerültek, ezekben a jobb oldali n. ischiadicus köré 2 %-os capsaicinoldattal átitatott Spongostan szivacsot helyeztünk 30 percig, azután a sebet összevarrtuk. A perineurális előkezelés után 5-6 nappal az idegingerlést elvégeztük. Az ingerlés befejezése után 2 perccel artériás kanülön keresztül 5 ml vért nyertünk az állatoktól, majd a plazma szomatosztatin szinteket RIA módszer segítségével meghatároztuk (n=5-6/csoport)

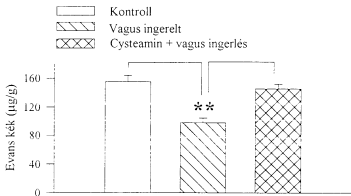
Az egyes csoportokban az adatok átlagait adtuk meg a standard hibával (átlag±S.E.M.). A plazma extravazációs értékeket nem-parametrikus Mann-Whitney próbával, a plazma szomatosztatin szinteket kétmintás Student t-tesztel elemeztük. Statisztikailag szignifikánsnak $P<0.05$ esetén értékeltük az adatokat (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

Eredmények

1. A n. vagusok perifériás csomkjainak antidrómós irányú elektromos ingerlése (20 V, 1 ms, 8 Hz, 20 min), szignifikáns mértékben gátolta a lábatakon kémiai ingerrel kiváltott második plazma extravazációt a kontroll csoport értékeihez viszonyítva. Az egyidőben kezdett ingerlés 36.45 ± 3.95 %-os ($P < 0.01$), míg az 5 perccel korábban kezdett stimuláció 50.21 ± 4.95 %-os ($P < 0.01$) gátlást eredményezett. A hexamethonium előkezelt csoportban szintén 30.39 ± 2.86 %-os ($P < 0.05$) csökkenést észleltünk (I/1.a. ábra). Mivel a hexamethonium előkezelés a gyulladáscsökkentő hatást nem befolyásolta, bizonyítást nyert, hogy a mediátor anyag az aktivált érzoidegvégződésekből szabadult fel.



I/1.a. ábra. Bilaterális vagusingerlés gátló hatása a lábháti neurogén plazma extravazációra



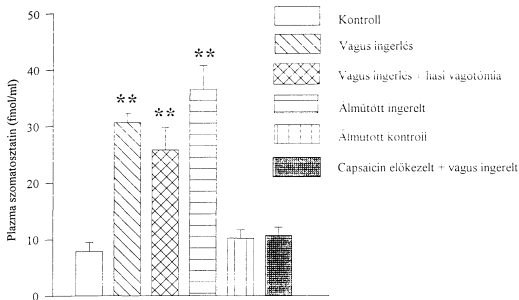
I/1.b. ábra. Cysteamin előkezelés hatása a bilaterális vagusingerléssel kiváltott gyulladásgátló válaszra

A cysteamin előkezelés a gyulladásgátló hatást szignifikáns mértékben 82.97 %-kal ($P<0.01$) csökkentette, de azt teljesen kivédeni nem tudta (I/1.b. ábra).

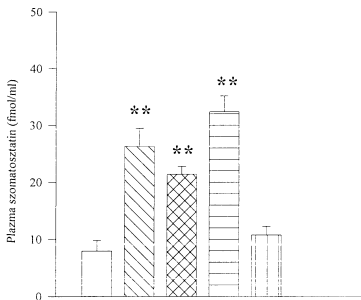
2. Tengerimalacban az egyik oldali n. ischiadicus perifériás csomójának antidrómus irányú elektromos ingerlésével (30 V, 0.5 ms, 20 Hz, 20 min) kiváltott első neurogén gyulladás 45.46 ± 5.08 %-kal ($P<0.05$), a patkányban tapasztalttal megegyező mértékben gátolta az ellenoldalon 5 perccel később létrehozott második neurogén plazma extravazációt

3. A n. vagusok perifériás csomójának kétoldali antidrómus elektromos ingerlése patkányban a plazma szomatosztatin szint 3.8-szeres (30.5 ± 1.65 fmol/ml, $P<0.01$), tengerimalacban 3.3-szeres (26.26 ± 3.16 fmol/ml, $P<0.01$) emelkedését eredményezte a kontrollokhoz viszonyítva (7.88 ± 1.56 fmol/ml), illetve (7.93 ± 1.88 fmol/ml). A gastrointestinális traktust ellátó idegtörzs átmetszése nem csökkentette szignifikáns mértékben a felszabaduló szomatosztatin mennyiségét, ebben a csoportban patkányban 3.3-szeres (25.73 ± 3.93 fmol/ml, $P<0.01$), illetve tengerimalacban 2.7-szeres (21.35 ± 1.38 fmol/ml, $P<0.01$) emelkedést tapasztaltunk. Ebből arra következtettünk, hogy a felszabaduló peptid jelentősebb mennyisége a thoracalis érzőidegvégződésekből és nem a gastrointestinális traktusból származik. A műtéti beavatkozás nem növelte szignifikánsan a plazma szomatosztatin szintet: (10.16 ± 1.51 fmol/ml) patkányban, illetve (10.75 ± 1.49 fmol/ml) tengerimalacban. Az álműtött ingerelt csoportban sem patkányban (36.3 ± 4.18 fmol/ml) sem tengerimalacban (32.27 ± 2.81 fmol/ml) nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a stimulált csoport értékeihez viszonyítva.

Patkányokon a szisztémás capsaicin előkezelés sikeresen kivédte a kétoldali vagusingerlésre bekövetkező plazma szomatosztatin szint emelkedést (10.66 ± 1.45 fmol/ml), ami bizonyítja, hogy az általunk mért peptidfelszabadulás valóban a capsaicin-érzékeny szenzoros rostok aktivációjának eredménye volt ($P<0.01$) (I/2.a. és b. ábra).

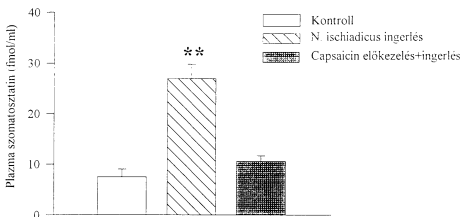


I/2.a. ábra. Plazma szomatoszatin szint változások patkányban n. vagus ingerlés hatására



I/2.b. ábra. Plazma szomatoszatin szint változások tengerimalacban n. vagus ingerlés hatására

4. A n. ischiadicus perifériás csomkjának egyoldali antidrómos elektromos ingerlése a plazma szomatosztatin szint 3,5-szeres (26.98 ± 2.97 fmol/ml, $P < 0.01$) emelkedését eredményezte tengerimalacban a kontrollhoz viszonyítva (7.45 ± 1.58 fmol/ml). Perineurális capsaicin előkezelés a plazma szomatosztatin szint idegingerlés hatására bekövetkező emelkedését kiverte (10.54 ± 1.12 fmol/ml) (I/3. ábra)



I/3. ábra. Plazma szomatosztatin szint változások tengerimalacban n. ischiadicus ingerlés hatására

Következtetések

Kísérleteinkben elsőként sikerült bizonyítani, hogy a n. vagus perifériás csomkjainak elektromos ingerlésével paraszimpatikus blokádnak jelenlétében a szomatoszenzoros idegek ingerléséhez hasonlóan szisztémás gyulladásgátló hatás jön létre.

Bizonyított, hogy a n. vagus szenzoros rostjai afferens funkciójukon kívül képesek perifériás végződéseikből neuropeptidek felszabadításán keresztül lokális neurogén gyulladáshoz választ kiváltani, mely vazodilatációt, a venulák területén permeabilitás fokozódást és plazma extravázációt, valamint bronchokonstriktiót hoz létre (Lundberg és mtsai, 1983, McDonald 1988, Szolcsányi 1984, 1996a,b). Ezen capsaicin-érzékeny szenzoros rostok ingerlésével

kiváltott lokális primer neurogén gyulladással együtt szisztémás gyulladásgátló hatás is létrejön, amely gátolja a test távoli részén létrehozott második neurogén gyulladást patkányban

A plazma szomatosztatin szint bilaterális vagusingerlés hatására bekövetkező jelentős növekedése, valamint a cysteamin előkezelés gyulladásgátlásra gyakorolt majdnem teljes blokkolása megerősítik azt a következtetést, hogy a hatást döntően az érőidegvegződésekből ingerlés hatására felszabaduló szomatosztatin közvetíti. Nem zárhatjuk ki azonban más gátló neuromediátorok részvételét sem, mivel a cysteamin előkezelés után a n. vagus ingerlésével kiváltott gyulladásgátló hatás 17 %-a megmaradt, ugyanakkor előzetes kísérleteinkben a n. ischiadicus antidrómos ingerlésével kiváltott plazma szomatosztatin szint emelkedés, illetve gyulladásgátló hatás megegyező dózisu cysteamin előkezeléssel teljesen kivédhető volt. Ezek az eredmények összhangban állnak azon immunohisztokémiai adatokkal, melyek igazolták, hogy míg a bőrt beidegző hátsó gyöki ganglionsejtek körülbelül 20 %-a mutat szomatosztatin immunoreaktivitást (Lawson 1996), addig ez az arány a ganglion nodosum, petrosum és jugulare területén jóval kisebb (Helke és Hill, 1988). Mindezek ismeretében nehezen volt magyarázható a n. vagusok érzőrostjainak antidrómos ingerlésével kiváltott igen jelentős (közel négyszeres) plazma szomatosztatin szint emelkedés. A capsaicin-előkezelés és vagus átmetszéses kísérlet eredményei azonban egyértelműen igazolják a felszabaduló szomatosztatin szenzoros eredetét és kizárják a gastrointestinális traktusból felszabaduló szomatosztatin részvételét.

A tengerimalacokon végzett kísérletek eredményeivel sikerült igazolnunk a patkányban már leírt endogén szisztémás neurogén gyulladásgátló jelenséget egy másik állatfajban is. A plazmaszint mérések eredményei ebben a fajban is megerősítették a capsaicin-érzékeny érőidegvégződésekből inger hatására felszabaduló idegi eredetű szomatosztatin mediátor szerepét. Az aktivált szenzoros idegvégzések tehát klasszikus afferens, illetve lokális efferens funkciójukon kívül egy új típusú neurohormonális választ is kiváltanak az interoceptorokból és exteroceptorokból felszabaduló és a keringésbe jutó szomatosztatin szisztémás hatása révén.

IB. A SZENZOROS IDEGVÉGZŐDÉSEK ANTIDRÓMOS, VALAMINT ORTHODRÓMOS INGERLÉSÉVEL KIVÁLTOTT ENDOGÉN ANTI-NOCICEPTÍV HATÁS VIZSGÁLATA

A fejezethez kapcsolódó közlemény:

IB./1. 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 analogs in the rat
Neurosci. Lett., 278, 185-188, 2000.

Bevezetés

Bizonyított, hogy a capsaicin-, hő-, valamint egyéb gyulladáshoz vezető mediátorokra érzékeny nociceptorok aktiválása a helyi fájdalomérzeten kívül neuropeptidek felszabadulásához vezet (Maggi 1995, Szállási és Blumberg, 1999). Ezek közül a CGRP, valamint az SP elsősorban a helyi neurogén gyulladáshoz vezet. Az előző fejezet, valamint korábbi kísérletek adatai (Szolcsányi és mtsai, 1998a,b) igazolták, hogy a capsaicin-érzékeny primer afferensek idegvégződéseiben tárolódó szomatosztatin inger hatására elegendő mennyiségben szabadul fel ahhoz, hogy szisztémás gyulladásgátló hatást váltson ki. Ismeretes emellett, hogy az exogén szomatosztatin gyulladásgátló (Lembeck és mtsai, 1982, Karalis és mtsai, 1994) hatásán kívül anti-nociceptív hatást is létrehoz (Chrubasik 1991).

Ezen eredmények ismeretében érdekesnek látszott megvizsgálni, hogy a capsaicin-érzékeny idegvégződések antidróm és orthodróm ingerlése a gyulladásgátláson kívül kivált-e anti-nociceptív hatást is. Kísérleteinkben az anti-nociceptív hatást chemonociceptív ingerrel kiváltott cardiorespirátoros reflexeken vizsgáltuk.

Módszerek

A kísérleteket 1 g/kg, i.p. urethannal altatott nőstény Wistar patkányokon végeztük, mely narkózis alkalmas chemonociceptív vegetatív reflexválaszok tesztelésére. Chemonociceptív inger (capsaicin) hatására urethan narkózisban szisztémás vérnyomásemelkedés (presszor válasz), szívfrekvencianövekedés és légzésszámfokozódás jön létre. A bal juguláris vénát és a jobb oldali arteria carotist megkanuláltuk a vénás anyagadás, illetve capsaicin injektálás céljából. T-tracheatubust alkalmaztunk a mesterséges lélegzetés (első csoport), illetve a légzésfrekvencia regisztrálása céljából. A vérnyomás, valamint

szívfrekvencia változásait a bal oldali artéria carotisba helyezett kanülön keresztül, számítógéphez kapcsolt poligráf segítségével folyamatosan monitoroztuk.

1. Antidrómos idegingerléssel kiváltott endogén anti-nociceptív hatás vizsgálata

Az első kísérleti csoportban n. ischiadicus antidrómos elektromos ingerlésének (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min) hatását vizsgáltuk intraarteriális capsaicin-kiváltotta nociceptív reflexválaszra. Az állatokat a kísérlet előtt 1 órával guanethidinnel (8 mg/kg, i.p.) előkezeltük. pipecuronium bromiddal (200 µg/kg, i.v.) relaxáltuk és mesterségesen lélegeztettük. Az ismételt capsaicin (1 µg/kg, i.a.) adások hatására bekövetkező vérnyomásválaszokat regisztráltuk (MAP) az ingerlés előtt, illetve 10, 20, 30, 40, 50, 60 perccel a n. ischiadicus ingerlése után. A változásokat az idegingerlés előtti capsaicin injekcióra adott vérnyomásemelkedéshez viszonyítottuk (n=5).

2. Orthodrómos kémiai ingerléssel kiváltott endogén anti-nociceptív hatás vizsgálata

A második csoportban orthodrómos kémiai ingerlés hatását vizsgáltuk hasonlóan intraarteriálisan adott capsaicinnel (1 µg/kg) kiváltott reflexválaszokra. Mindkét hátsó végtagot akutan denerváltuk (n. saphenust és n. ischiadicust 30 perccel a kísérlet előtt átvágtuk) ezzel megakadályozva a nociceptív reflexválaszokat. A lábátak bőrét paraffinolajban oldott 1 %-os mustárolajjal ecseteltük, ami a capsaicin-érzékeny nociceptorokat orthodrómosan izgatja, míg a kontroll csoportban a solvenst (paraffinolajat) alkalmaztuk. A vérnyomás, szívfrekvencia, illetve légzésfrekvencia változásait regisztráltuk a paraffin-, illetve mustárolajecsetelés előtt és 5, 10, 15 perccel utána az ismételt capsaicin adások hatására (n=10).

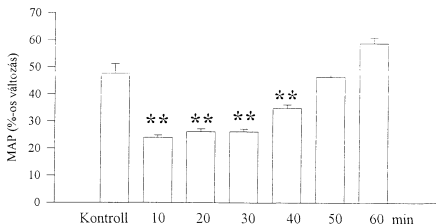
3. Plazma szomatosztatin szint meghatározás

Intraarteriális (1 µg/kg) capsaicin adás után 5 perccel, az ellenoldali artéria carotis kanülből vett arteriális vérből mértük a plazma szomatosztatin szint változását RIA-val annak kizárására, hogy az esetlegesen így felszabadított szomatosztatin hatására a reflexválaszok önmagukban csökkennének (n=4).

Statisztikai értékelésre nem-parametrikus Mann-Whitney (páratlan adatok), illetve Wilcoxon (páros adatok) tesztekkel használtunk. Statisztikailag szignifikánsnak $P < 0.05$ esetén értékeltük az adatokat (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

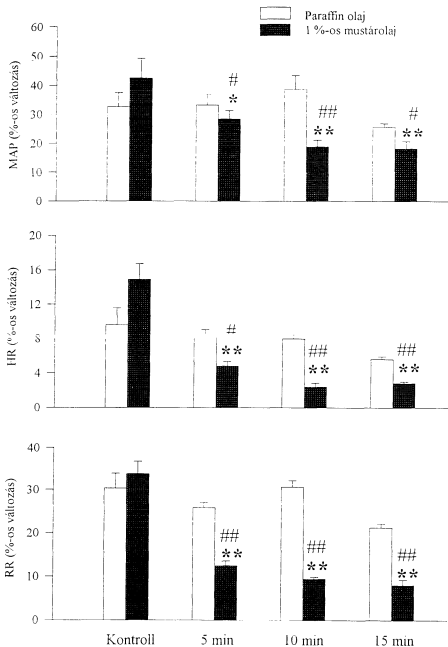
Eredmények

1. Kontroll esetben $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, i.a. capsaicin a vérnyomás reprodukálható emelkedését váltotta ki. Az átlagos artériás középnyomás (MAP) 47.7 ± 3.5 %-kal nőtt (74.5 ± 5.7 Hgmm-ről 110.1 ± 10.6 Hgmm-re). Nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést a válaszokban, amennyiben kontroll esetben 8-10 alkalommal megismételtük a capsaicin adását. Bilaterális n. ischiadicus ingerlés a capsaicin-kiváltotta reflexes vérnyomásemelkedést 49.78 ± 0.92 %-kal gátolta az ingerlés kezdete után 10 perccel ($P < 0.01$ Wilcoxon teszttel az ingerlés előtti kontroll válaszhoz viszonyítva). A válasz egy órán belül fokozatosan visszatert (I/4. ábra).



I/4. ábra. N. ischiadicus antidrómos ingerlésének gátló hatása capsaicinnel ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$, i.a.) kiváltott reflexes vérnyomásemelkedésre.

2. A bőr nociceptorainak orthodrómos kémiai ingerlése szintén gátló hatást fejtett ki a capsaicinnel kiváltott nociceptív cardiorespiratorikus reflexválaszokra. Ebben a csoportban kontroll esetben $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, i.a. capsaicin hatására a MAP 42.41 ± 6.9 %-kal nőtt (70.9 ± 6.5 Hgmm-ről 100.9 ± 11.58 Hgmm-re), a szívfrekvencia 14.9 ± 1.9 %-kal ($286 \pm 29/\text{min}$ -ről $329 \pm 34/\text{min}$ -re), a légzésszám pedig 33.7 ± 2.9 %-kal ($85 \pm 9/\text{min}$ -ről $114 \pm 15/\text{min}$ -re) növekedett. Ezek a válaszok szignifikáns mértékben csökkentek mustárolajecsetelés után 5, 10, 15 perccel, a kontroll csoportban azonban nem változtak (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Wilcoxon teszttel, a mustárolajkenés előtti kontroll válaszhoz viszonyítva, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, Mann-Whitney teszttel a paraffin olajjal kezelt kontroll csoport értékeihez viszonyítva) (I/5. ábra).



I/5. ábra. Lábháti bőr nociceptorainak orthodrómus ingerlésével (1 %-os mustárolajecsetelés) kiváltott gátló hatás capsaicinre (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i. a.) adott cardiorespiratórikus reflexválaszokra. (artériás középnyomás (mean arterial pressure: MAP); szívfrekvencia (heart rate: HR); légzési frekvencia (respiratory rate :RR))

3. Intraarteriálisan adott 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ capsaicin nem okozott szignifikáns plazma szomatosztatin szint emelkedést az oldószerral kezelt kontrollhoz viszonyítva 5 perccel az adás után (7.0 ± 0.54 fmol/ml, illetve 6.9 ± 0.08 fmol/ml). Capsaicin tehát ebben a kis dózisban alkalmazva mint nociceptív inger szerepel, de önmagában nem befolyásolja a plazma szomatosztatin szintet.

Következtetések

Eredményeink igazolják, hogy a szenzoros idegrostok antidiromos elektromos, valamint orthodromos kémiai ingerlése gátló hatást fejt ki a capsaicinnel, mint chemonociceptív ingerrel kiváltott nociceptív cardiorespiratórikus reflexválaszokra.

Az alkalmazott antidiromos n. ischiadicus ingerlés, megegyező paraméterekkel az előzetes kísérletekben a plazma szomatosztatin szint közel négyszeres emelkedését váltotta ki, mely jelentős (50 %) gyulladásgátló hatást eredményezett (Szolcsányi és mtsai, 1998a). A bőr capsaicin-érzékeny idegvégződéseinek 1 %-os mustárolajjal kiváltott szelektív orthodromos ingerlése szintén gyulladásgátló hatást és plazma szomatosztatin szint emelkedést hozott létre (Szolcsányi és mtsai, 1998b) és az intraperitoneálisan adott szomatosztatin gátló hatást fejtett ki a helyileg alkalmazott capsaicinnel vagy mustárolajjal kiváltott nociceptív reflexválaszokra.

Mivel az ingerlések előtt a központi idegrendszerhez befutó afferens pályákat megszakítottuk, az aktivált helyek felől kiváltott reflexek, illetve a központi idegrendszer részvétele ("diffuse noxious inhibitory control") kizárható (Villanueva és mtsai, 1986). Ezek alapján arra következtettünk, hogy az anti-nociceptív hatást az aktivált perifériás szenzoros idegvégzödésekből felszabaduló endogén peptidmediátor közvetíti. Feltételezésünk szerint ezért a hatásért is a capsaicin-érzékeny szenzoros idegvégzödésekből felszabaduló szomatosztatin a felelős, de ennek bizonyítására további kísérletek szükségesek.

A natív szomatosztatin terápiás alkalmazásának korlátokat szab széles hatásspektruma, és rövid plazma féléletideje. Endokrin hatással nem rendelkező, szelektíven az sst4 szomatosztatin receptoron ható analógok vizsgálatáról, mely jelenleg is folyik intézetünkben, a III. fejezetben még lesz szó.

II. A CAPSAICIN-ÉRZÉKENY SZENZOROS IDEGVÉGZŐDÉSEK IZGATÁSÁVAL KIVÁLTOTT NEUROPEPTID FELSZABADULÁS, ILLETVE GYULLADÁSGÁTLÓ HATÁS KÁROSODÁSA KÍSÉRLETES DIABETES MELLITUSBAN

A fejezethez kapcsolódó saját közlemények:

II./1. Németh J., Szilvássy Z., **Thán M.**, Oroszi G., Sári R., Szolcsányi J.: Decreased sensory neuropeptide release from trachea of the rat with streptozotocin-induced diabetes.

Eur. J. Pharmacol., 369, 221-224, 1999.

II./2. Németh J., **Thán M.**, Sári R., Peitl B., Oroszi G., Farkas B., Szolcsányi J., Szilvássy Z.: Impairment of neurogenic inflammatory and anti-inflammatory responses in diabetic rats.

Eur. J. Pharmacol., 386, 83-88, 1999.

II./3. Németh J., **Thán M.**, Peitl B., Oroszi G., Szolcsányi J., Szilvássy Z.: Impaired anti-inflammatory response and decreased sensory neuropeptide release in streptozotocin-induced diabetes.

J. Physiol. London, (közlésre elfogadva) 2000. (előadáskivonat)

Bevezetés

A szenzoros idegek funkciójában bekövetkező károsodás általában eltorzult jelenség a perifériás neuropáthiában szenvedő betegek esetében, ami a diabetes mellitus legsúlyosabb szövődményeinek egyike (Fedele és Giugliano, 1997, Ralevic és mtsai, 1993, Bennett és mtsai, 1998). Új aspektusa a szenzoros neuropáthiának az a korábban már bizonyított tény, hogy a capsaicin-érzékeny érzőrostok a szenzoros információk felvétele, valamint azok központi idegrendszer felé való továbbítása mellett biológiailag aktív mediátorok, neuropeptidok felszabadításán keresztül fontos lokális szabályozó funkciót is ellátnak. Így károsodásuk nemcsak szenzoros funkciócsökkenéshez vezet, hanem befolyásolja a gyulladást, sebgyógyulást, vascularis proliferatív folyamatokban szerepet játszó szenzoros-effektor funkciót is (Brain 1996, Lundberg 1996, Szolcsányi 1996).

Kísérletes insulin-hiányos diabetes mellitusban jellegzetes tünet a szenzoros neuropeptidok (CGRP, SP) insulin-szenzitív depléciója (Diemel és mtsai, 1992), valamint a neurogén gyulladástól való válasz csökkenése. Ez utóbbit azonban egyes szerzők (Gamse és Jancsó, 1985) a neuropeptidok depléciójával szemben azok csökkent hatásával magyarázzák és microvasculáris eredetűnek tartják. Sokkal valószínűbb és kísérletesen több oldalról megerősített ezzel szemben az az elmélet, hogy a pro-inflammatoros szenzoros neuropeptidok felszabadulásának csökkenése áll a háttérben a kísérletes diabetesben szenvedő laboratóriumi állatok, valamint a diabetes mellitusban szenvedő betegek esetében észlelhető csökkent neurogén gyulladástól való válasznak (Györfi és mtsai, 1996, Walmsley és Wiles, 1991). Ez a

károsodás részben visszavezethető a trofikus faktorok elsősorban NGF hiányára, továbbá a hyperglikémia következtében kialakuló endoneurális károsodásokra, mivel NGF-, illetve insulin-kezeléssel a neurogén microvasculáris válaszbán jelentős javulás érhető el (Diemel és mtsai, 1992, Bennett és mtsai, 1998).

Tudomásunk szerint eddig nem történtek vizsgálatok a szomatosztatin, CGRP, valamint SP szimultán felszabadulásának érintettségére streptozotocin-kiváltotta diabetes mellitusban, ezért kísérleteink *in vitro* része elsősorban erre irányult. Mivel voltak adatok a primér neurogén gyulladásoz folyamatok károsodására, megvizsgáltuk a capsaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből felszabaduló szomatosztatin által közvetített szisztémás gyulladásgátló hatás érintettségét is *in vivo* körülmények között.

Módszerek

Kísérleteinket 200-230 g súlyú hím Wistar patkányokon végeztük az állatokat három csoportba osztva: 1. kontroll, 2. i.v. 50 mg/kg streptozotocinnal kezelt, 4 hetes diabeteses csoport, 3. i.v. 50 mg/kg streptozotocinnal kezelt, 8 hetes diabeteses csoport. *In vitro* peptidfelszabadítási kísérletek az 1. és 2. csoportokban, *in vivo* kísérletek mindhárom csoportban történtek.

1. Neuropeptidek *in vitro* felszabadulásának vizsgálata tracheapreparátumon

A natrium pentobarbitallal (Nembutal, 40 mg/kg, i.p.) narkotizált patkányok tracheáit kimetsztük és szervfürdőként (1.8 ml) 2-2 szervet 37 °C-os oxigenizált (95 % O₂ és 5 % CO₂) Krebs oldattal 60 percen át perfundáltuk (1 ml/perc). Az átáramlás leállítását után a kamrákban lévő oldatot 8 percenként 3-szor lecserélve frakciókat gyűjtöttünk (ingerlés előtti - ingerelt - ingerlés utáni). A peptidfelszabadulást elektromos téringérésrel (40 V, 0.1 ms, 10 Hz, 120 s) váltottuk ki. A mintákat jégbe hűtött csövekbe gyűjtöttük és a kísérlet végén a légszódarabok nedves súlyát lemértük. A frakciók SP, CGRP és szomatosztatin koncentrációit intézetünkben kifejlesztett specifikus RIA módszerek segítségével határoztuk meg (Németh és mtsai, 1996, 1998a, 1999), melyek érzékenysége a CGRP esetében 1 fmol/cső, a szomatosztatin és az SP-mérésnél 2 fmol/cső. A peptidek mennyiségét fmol/mg egységben, nedves szövetsúlyra vonatkoztatva fejeztük ki (n=6/csoport).

2. Neurogén gyulladás valamint gyulladásgátló hatás vizsgálata *in vivo*

A kísérletet natrium thiopenthalal (Trapanal, 100 mg/kg, i.p.) altatott patkányokon végeztük. A guanethidin (8 mg/kg, i.p.) előkezelés után az állatokat pipecuronium bromiddal (200 µg/kg, i.v.) relaxáltuk és a kísérlet alatt tracheakantülön keresztül mesterségesen lélegeztettük. Mindkét oldali n. ischiadicust kipreparáltuk és az átmetszett idegek perifériás csomjait elektromosan ingereltük (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min) 5 perces időközönként a két oldal között. Az utolsó gyulladáskeltő stimulus után 15 perccel az állatokat elvégeztettük, a n. ischiadicus innervációjának megfelelő bőrlebenyeket lemetsztettük, majd a plazma extravazáció mértékét az Evans kék akkumulációs módszerrel meghatároztuk (n=5-6).

3. Diabetes mellitus hatása a bilaterális antidrómos n. ischiadicus ingerléssel kiváltott plazma szomatosztatin szint változásra

A plazma szomatosztatin szint meghatározásához 12 órás éheztetés után 3 ml artériás vérmintát nyertünk a jobb artéria carotisba kötött kanülön keresztül Trasylolt (1000 IU) és EDTA-t (6 mg) tartalmazó jégben hűtött kémcsövekbe. A kontroll állatokban az alap szomatosztatin szinteket mértük, a n. ischiadicusokat csak átmetsztettük. A stimulált csoportban mindkétoldali n. ischiadicus perifériás csomját antidrómosan ingereltük (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min). A vérmintákat az ingerlés befejezése után 2 perccel vettük le az állatoktól, majd a plazma szomatosztatin szinteket RIA módszer segítségével meghatároztuk (n=6).

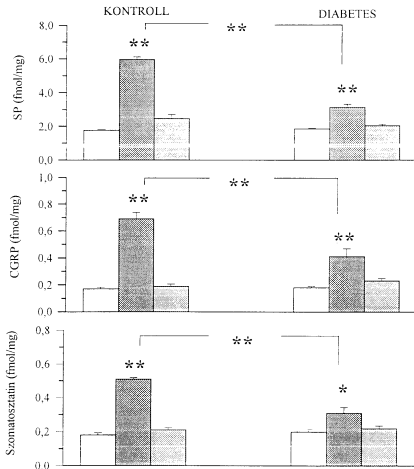
Mindezek mellett plazma insulin (RIA), illetve vércukormeghatározás (glucose oxidase-peroxidase módszerrel) is történt, valamint követtük az állatok súlygyarapodását mind a kontroll, mind a diabeteses csoportokban. A perifériás idegek érintettségének igazolására méréseket végeztünk az A- és C-rostok vezetési sebességének meghatározásával.

A plazma extravazációs értékeket nem-parametrikus Mann-Whitney próbával, a plazma szomatosztatin szinteket kétmintás Student t-tesztel elemeztük. Statisztikailag szignifikánsnak $P < 0.05$ esetén értékeltük az adatokat (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Eredmények

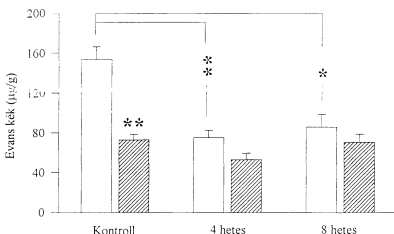
1. Az egészséges állatokból származó tracheapreparátumokból az elektromos téringerlés szignifikáns mértékű felszabadulást eredményezett a második frakcióban mindhárom peptid esetében. Szomatosztatin esetén 0.18 ± 0.03 -ról 0.51 ± 0.03 -re, CGRP-nél 0.17 ± 0.03 -ről 0.69 ± 0.12 -re, SP-nél 1.77 ± 0.09 -ről 5.96 ± 0.38 -ra, fmol/mg nőtt az ingerelt frakció

peptidtartalma ($P < 0.01$). Diabetesees állapotban ez a válasz szignifikáns mértékben ($P < 0.01$) csökkent (szomatosztatin 0.31 ± 0.09 , CGRP 0.41 ± 0.14 , SP 3.14 ± 0.44 fmol/mg). A gátlás 39.2 ± 2.8 , 40.5 ± 3.2 és 47.3 ± 2.9 %-ot ért el szomatosztatin, CGRP, illetve SP esetében. Eredményeink tehát igazolták a három vizsgált peptid (szomatosztatin, CGRP és SP) felszabadulásának parallel károsodását (II/1. ábra).



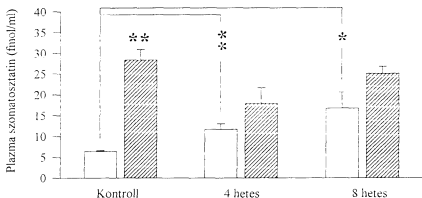
II/1. ábra. Szenzoros neuropeptid felszabadulás károsodása kísérletes diabetes mellitusban

2. Egészséges állatokhoz képest a primer plazma extravazációs értékek mindkét diabeteses csoportban szignifikáns mértékben csökkentek. A 4 hetes csoportban 51.27 %-os ($P<0.01$), a 8 hetesben 44.25 %-os ($P<0.05$) csökkenést tapasztaltunk. Míg normál állatokban a n. ischiadicus antidrómus elektromos ingerlésével kiváltott primér neurogén gyulladás 52.7 ± 3.1 %-kal ($P<0.01$) gátolta az 5 perccel később az ellenoldalon hasonló módon kiváltott másodlagos plazma extravazációt, ez a gátló hatás diabeteses állatokban nem ért el szignifikáns mértéket: a 4 heteseknél 29.6 ± 1.98 %-ra, a 8 hetes csoportban 18.12 ± 1.57 %-ra csökkent (II/2. ábra).



II/2. ábra. Neurogén gyulladás és általa kiváltott endogén gyulladásgátló hatás károsodása kísérletes diabetes mellitusban

3. Az éhgyomri plazma szomatosztatin szintek mindkét diabeteses csoportban megemelkedtek. A 4 hetes csoportban 83.64 %-os ($P<0.01$), a 8 hetesben 163.5 %-os ($P<0.05$) igen határozott emelkedés volt észlelhető, a normál kontrollokhoz viszonyítva. Ugyanakkor míg az egészséges állatokban a bilaterális n. ischiadicus ingerlés több mint négyszeres szomatosztatin szint emelkedést eredményezett (6.36 ± 0.30 -ról 28.30 ± 2.60 -ra, fmol/ml, $P<0.01$), diabeteses állatokban ez a válasz lecsökkent (11.68 ± 1.37 -ről 17.90 ± 3.74 -re, fmol/ml a 4 hetesekben, valamint 16.76 ± 3.85 -ről 25.06 ± 1.67 -ra, fmol/ml a 8 hetes diabeteses csoportban) és nem ért el szignifikáns mértéket (II/3. ábra).



II/3. ábra. Bazális plazma szomatosztatin szintek, valamint *n.* ischiadicus ingerlés hatására bekövetkező változások egészséges, illetve diabeteses patkányban.

4 Míg a kontroll állatokban a 4 hetes periódus alatt 42 ± 3.3 g súlygyarapodás volt észlelhető, mindkét diabeteses csoportban fogyást tapasztaltunk. Az éhgyomri vércukorszintek a következőképpen alakultak: 6.0 ± 0.3 (kontroll), 23.6 ± 3.1 (4 hetes; $P < 0.01$), és 18.4 ± 3.2 mmol/l (8 hetes; $P < 0.01$). A plazma insulin koncentrációk szignifikáns mértékben lecsökkentek 10.5 ± 2.7 -ről (kontroll) 2.5 ± 0.6 -re (4 hetes; $P < 0.05$), illetve 2.8 ± 0.9 -ra, $\mu\text{IU/ml}$ (8 hetes; $P < 0.05$). Az ingerületvezetési sebesség mérések (A-rostnál 0.5 V, 5 Hz, C-rostnál 3 V, 5 Hz) mindkét rostpopulációban a vezetési sebesség szignifikáns csökkenését igazolták, mely a diabeteses állapot fennállási idejével párhuzamosan romlott.

Következtetések

Tracheapreparátumon végzett *in vitro* neuropeptid felszabadításos kísérleteink igazolták a három vizsgált peptid, a szomatosztatin, CGRP és SP felszabadulásának parallel károsodását diabetes mellitusban. *In vivo* eredményeink alátámasztották az előzőekben már leírt bazális plazma szomatosztatin szint emelkedést (Fischer és mtsai, 1998), valamint a neurogén gyulladási válasz csökkenését insulin-hiányos kísérletes diabetes mellitusban (Gamse és Jancsó, 1985, Györfi és mtsai, 1996).

Streptozotocinnal kiváltott kísérletes diabetesben a primer neurogén plazma extravazáció csökkenése, a jelen vizsgálatok alapján egyértelműen az említett gyulladáskeltő neuropeptid (SP, CGRP) csökkent felszabadulásával magyarázható. A diabeteses perifériás

neuropathiát kísérő neuropeptid deplécióra, illetve károsodott axontranszportra is vannak már adatok (Fedele és Giugliano, 1997, Bennett 1998), bár a depléció tekintetében az eredmények ellentmondóak (Gamse és Jancsó, 1985). Figyelembe kell venni azt a tényt is, hogy önmagában a neuropeptidek depléciója nem bizonyíték a funkcionális károsodás mellett

A fenti eredményeken kívül elsőként vizsgáltuk a kísérletes diabetes hatását a szenzoros idegvégződésekből felszabaduló szomatosztatinra és az általa kiváltott gyulladásgátló funkcionális hatásra. Igazoltuk az egészséges állatokban leírt endogen gyulladásgátló válasz kiesését diabeteses patkányban, amelynek háttérében a hatást közvetítő idegi eredetű szomatosztatin felszabadulásának csökkenése áll. Mindezen adatok alapján a plazma szomatosztatin szint emelkedése felfogható egy kompenzatórikus változásként, az aktivációra csökkent mennyiségben felszabadítható idegi eredetű szomatosztatin pótlására. Az SP, illetve a CGRP depléciója és károsodott felszabadulása mellett az állandóan emelkedett bazális plazma szomatosztatin szint ugyanakkor járulékos faktorként szerepet játszhat az ingerlésre adott csökkent neurogén gyulladásgátló válaszban is.

III.A. TT-232 SZINTETIKUS SZOMATOSZTATIN ANALÓG GYULLADÁSGÁTLÓ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

A fejezethez kapcsolódó saját közlemények:

III.A./1. Szolcsányi J., Pintér E., Helyes Zs., Németh J., Oroszi G., **Thán M.**, Kéri Gy.: Anti-inflammatory effect induced by TT-232, a novel heptapeptide somatostatin analog.

Regul. Peptides, 80, 137, 1999 (előadáskivonat)

III.A./2. Pintér E., Helyes Zs., Németh J., Oroszi G., **Thán M.**, Kéri Gy., Szolcsányi J.: Pharmacological analysis of the anti-inflammatory effect induced by TT-232, a novel heptapeptide somatostatin analog.

Fundam. Clin. Pharmacol., 13, 36s, 1999. (előadáskivonat)

III.A./3. Helyes, Zs., **Thán, M.**, Németh, J., Oroszi, G., Pintér, E., Kéri, Gy., Szolcsányi, J.: Mechanism of the inhibitory effect induced by TT-232 and anandamide on sensory neuropeptide release

Neurobiology, (közlésre elfogadva) 2000. (előadáskivonat)

Bevezetés

A szomatosztatin a szervezetben a központi és a perifériás idegrendszerben, a gastrointestinalis traktusban és a belső elválasztású szervekben 14 és 28 aminosavból álló formában előforduló peptid, mely változatos endokrin hatásain túl gátolja a tumorsejtek osztódását, befolyásolja a kognitív és viselkedési folyamatokat, valamint a cardiovascularis rendszert. Hatásai 5 receptor altípuson keresztül valósulnak meg (sst1-5), amelyek a G-proteinhez kapcsolódó receptorcsalád tagjai (Reisine és mtsai, 1990, Patel és mtsai, 1990, Reisine 1995). A natív szomatosztatin terápiás alkalmazhatóságát jelentősen korlátozza széles hatásspektruma és rövid felezési ideje, azonban szelektíven ható, hosszú hatású analógok új terápiás lehetőségeket kínálnának. Az utóbbi években szintetizált új szomatosztatin analógokkal végzett vizsgálatok elsősorban endokrin és antitumor hatású molekulák előállítására irányultak.

Az irodalomból ismeretes az exogén szomatosztatin neurogén gyulladást és nocicepciót gátló hatása (Lembeck és mtsai, 1982, Karalis és mtsai, 1994). Az előző kísérleti eredményeink igazolták, hogy e peptid felszabadul az aktivált capsaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből és a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatással rendelkezik. Laboratóriumunkban már folytak előzetes vizsgálatok a szomatosztatin, octreotide, valamint 3 új, a Magyar Tudományos Akadémia, Központi Kémiai Kutató Intézetében Kéri György és mtsai által szintetizált, stabil, ciklikus analóg vegyület gyulladásgátló és anti-nociceptív hatásáról. Az említett vegyületek közül a leghatékonyabb gyulladásgátlónak a TT-232 bizonyult, mely heptapeptid az előzetes vizsgálatok alapján nem

rendelkezik endokrin hatással, viszont hatékony antitumor hatású (Kéri és mtsai, 1993, 1996), és a nem-szteroid gyulladásgátlóktól eltérően (Jancsó-Gábor és Szolcsányi, 1970) hatékonyan gátolta a neurogén gyulladást is. Az endokrin hatásokat kiváltó octreotide az sst2, 3 és 5 receptorokat izgatja és hatékony hormonszekréciógátló analóg, de gyulladásgátlásban nem bizonyult hatásosnak (Hofland és mtsai, 1995) és saját vizsgálataink szerint a neurogén gyulladást sem gátolta. Az általunk vizsgált hatások tehát valószínűleg az irodalmi adatok alapján külön csoportba sorolható sst1 és/vagy sst4 receptorokon (Reisine 1995) keresztül valósulnak meg. Ez annál is inkább nagy jelentőséggel bír, mivel az eddig vizsgált vegyületek elsősorban az sst2-3 receptorokon voltak hatásosak.

Jelen kísérleteink célja a TT-232 további vizsgálata volt akut neurogén, valamint krónikus kevert gyulladásban, különös tekintettel a hatás időtartamára, továbbá a TT-232 hatásmechanizmusára.

Módszerek

1. Neurogén gyulladást gátló hatás vizsgálata

Natrium pentobarbitallal (Nembutal, 40 mg/kg, i.p.) altatott 150-200 g-os nőstény Wistar patkányban a hátsó végtagok akut, bilaterális denerválását követően a lábhátak orthodrómos neurogén gyulladását 1 %-os mustárolaj ecsetelésével váltottuk ki. A plazma extravazációkat az Evans kék akkumulációs módszerrel határoztuk meg. A vizsgált anyagot (TT-232) s.c. alkalmaztuk 1, 2, 4, illetve 6 órával a gyulladáskeltő stimulus előtt 10, 20, 40, 80, 160, valamint 320 µg/kg dózisban, csoportonként 5-7 állatnál. A hosszú (16 órás) hatás vizsgálatára, egy külön csoportban az állatok a kísérletet megelőző napon 2x500 µg/kg dózisban kapták a TT-232-t (n=5-7/csoport).

A különböző időpontokban felvettük a dózis-hatás görbéket és regressziós egyenes segítségével meghatároztuk az ID₅₀ értékeket.

2. TT-232 tartós hatása Freund-adjuváns indukálta krónikus arthritisre

A krónikus izületi gyulladás kiváltására 0.1 ml komplett Freund-adjuvánst (előlt, száritott Mycobacteriumok paraffinban oldva) (Thesien-Popp és Müller-Peddinghaus, 1994) fecskendeztünk a bal talp bőrébe intraplantárisan, valamint a szisztémás hatás fokozása céljából az első két napon a faroktőbe. A térdizületi duzzanat mérése plethysmóméterrel történt a gyulladáskeltő anyag alkalmazását megelőzően, majd a 2., 5., 8., 12., 15. és 18. napon a

kezelés alatt. Az ízületi duzzadás mértékét a kontroll értékekhez viszonyítva százalékban adtuk meg. A TT-232-t szintén s.c. alkalmaztuk 2x100, 2x200, illetve 2x500 µg/kg/nap dózisban a 18 napos időszakban, a kontroll csoportot a TT-232 oldószerevel kezeltük (n=8/csoport).

Statisztikai értékelésre nem-parametrikus Mann-Whitney tesztet használtunk. Szignifikánsnak P<0.05 esetén értékeltük az adatokat (* P<0.05, ** P<0.01).

3. Neuropeptidok *in vitro* felszabadulásának vizsgálata tracheapreparátumon

A natrium pentobarbitallal (40 mg/kg, i.p.) narkotizált patkányok tracheáit kimetszettük és szervfűrdőnként (1.8 ml) 2-2 szervet 37 °C-os oxigenizált (95 % O₂ és 5 % CO₂) Krebs oldattal 60 percen át perfundáltuk (1 ml/perc). Az átáramlás leállítását után az előző fejezetben (II./1.) leírtaknak megfelelően 3 frakciót gyűjtöttünk (ingerlés előtti - ingerelt - ingerlés utáni). A peptidfelszabadulást elektromos téringlerléssel (40 V, 0.1 ms, 10 Hz, 120 s) váltottuk ki és a frakciók SP, CGRP és szomatosztatin koncentrációit intézetünkben kifejlesztett specifikus RIA módszerek segítségével határoztuk meg (Nemeti és mtsai, 1990, 1998a, 1999). A peptidok mennyiségét fmol/mg egységben, nedves szövetsúlyra vonatkoztatva fejeztük ki.

A szomatosztatint 10, 50, valamint 200 nM dózisban alkalmaztuk, ebben az esetben természetesen csak SP és CGRP felszabadulást mértünk.

A TT-232-t 200, 500, illetve 1500 nM dózisban alkalmazva meghatároztuk az IC₅₀ értékeket. A receptorális hatás igazolására elektromos téringlerlés esetében, egy külön csoportban az 500 nM TT-232 mellett pertussis-toxint (PTX) (100 ng/ml) is adtuk a szervfűrdőbe, mely G-protein gátlásán keresztül fejt ki hatását. A PTX hatását önmagában is megvizsgáltuk, valamint tirozin-kináz gátló genisteinnel (50 µM) is elvégeztük az elektromos téringlerlést annak eldöntésére, szerepet játszik-e a TT-232 tirozin-kináz gátló aktivitása (Kéri és mtsai, 1993, 1996) a gyulladásgátló hatásban (n=6/csoport).

A TT-232-ből Na-acetát-ecetsav pufferben (0.2 mol/l, pH:3.4) 5 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk és a további oldásokat ebből 5 % mannitol hozzáadásával végeztük. A kontroll csoportokban az állatokat a mannitolt tartalmazó Na-acetát-ecetsav pufferrel kezeltük.

Statisztikai értékelésre páros és páratlan Student t-próbákat használtunk. Szignifikánsnak P<0.05 esetén értékeltük az adatokat (* P<0.05, ** P<0.01).

Eredmények

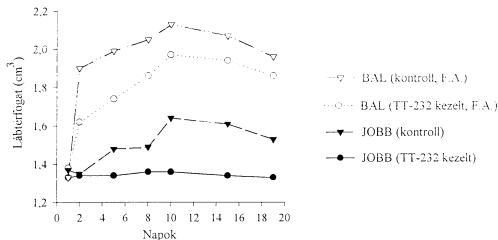
1. A s.c. alkalmazott TT-232 (10, 20, 40, 80, 160, 320 és 2x500 µg/kg) dózisfüggően gátolta a mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladást 1, 2, 4, 6 és 16 órával az előkezelés után. Az 1, 2, 4, 6 órás ID₅₀ értékek a következők: 20.26, 32.49, 39.86 és 78.22 µg/kg. A gyulladás kiváltását megelőző napon s.c. adott 2x500 µg/kg TT-232 a második injekció után 16 órával a mustárolajcseteléssel kiváltott neurogén gyulladást még 52.09±3.8 %-kal gátolta.

2. A krónikus ízületi gyulladást a TT-232 dózisfüggően gátolta (2x100, 2x200 és 2x500 µg/kg naponta, s.c.) (III/1. táblázat), mely jelentősebb mérteket a legnagyobb dózis esetében ért csak el (III/1. ábra). A kontroll állatokban a Freund-adjuvánssal kezelt bal lábak kifejezett, az ellenoldali lábak enyhébb duzzanata volt észlelhető, a szisztémás jelek (étvágytalanság, mozgás hiánya, gyengeség) mellett.

Napok	Kontroll		2x100 µg/kg		2x200 µg/kg		2x500 µg/kg	
	Jobb	Bal	Jobb	Bal	Jobb	Bal	Jobb	Bal
2.	-	45.19 ±5.63	-	33.92 ±2.98	0.79 ±1.31	36.82 ±4.79	1.47 ±3.12	19.66 ±3.06**
5.	12.14 ±3.33	62.36 ±3.61	14.88 ±2.81	58.99 ±6.37	8.82 ±2.22	48.97 ±4.31	6.50 ±2.74	33.08 ±4.75**
8.	15.69 ±3.11	69.79 ±3.90	17.01 ±3.74	62.22 ±4.01	11.54 ±3.23	53.08 ±4.21*	8.90 ±3.29	36.88 ±3.97**
12.	21.35 ±2.83	75.13 ±4.30	18.43 ±3.25	58.62 ±3.08**	16.11 ±2.24	54.83 ±4.08**	8.63 ±2.67*	46.01 ±4.33**
15.	25.34 ±3.28	70.87 ±4.19	26.38 ±4.22	61.06 ±3.72	15.72 ±2.20	55.51 ±3.01*	10.47 ±3.49**	44.15 ±3.27**
18.	24.16 ±3.41	71.62 ±6.30	25.88 ±3.13	60.64 ±3.31	20.34 ±2.14	59.96 ±1.23	10.76 ±4.39*	41.38 ±4.77**

III/1. táblázat. TT-232 s.c. kezelés hatása a hátsó lábak Freund-adjuvánssal kiváltott krónikus ízületi gyulladására plethyszométerrel mérve (%-os duzzadás az 1. napi értékhez viszonyítva.

* P<0.05, ** P<0.01).



III/1. ábra. TT-232 (2x500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{nap}$, s.c.) hatása Freund adjuvánnal kiváltott ízületi gyulladásra.

3. Szomatosztatin kis dózisokban nem fejtett ki szignifikáns hatást, azonban 200 nM SP, valamint CGRP elektomos téringlerlés hatására történő felszabadulását 16.77, illetve 23.2 %-kal gátolta.

SP, CGRP és szomatosztatin izolált tracheából elektomos téringlerlés hatására történő felszabadulását a TT-232 200 nM: 20.1 %-kal (SP), 23.2 %-kal (CGRP), 15.6 %-kal (szomatosztatin); 500 nM: 39.8 %-kal, 51.8 %-kal, illetve 40.6 %-kal; 1500 nM: 61.5 %-kal, 80.4 %-kal, illetve 62.5 %-kal gátolta. Az IC_{50} értékeket kiszámolva 1033.5, 607.4, valamint 922.4 nmol/l értéket kaptunk az SP, CGRP, illetve szomatosztatin esetén. A bazális, stimuláció nélküli peptidfelszabadulást a TT-232 nem befolyásolta. A PTX a TT-232 gátló hatását kivédte, a peptidfelszabadulást helyreállította, ami a G-protein függő receptorális hatást igazolja. Önmagában a PTX, valamint a genistein nem befolyásolta az elektromos téringlerléssel kiváltott peptidfelszabadulást (III/2. táblázat).

Frakciók	Kontroll	TT-232	PTX	PTX+TT-232	Genistein
1.SP (fmol/mg)	1.77 ± 0.08	1.79 ± 0.15	1.84 ± 0.08	1.79 ± 0.14	1.90 ± 0.12
2.	5.96 ± 0.15	4.47 ± 0.30 *	5.81 ± 0.32	5.90 ± 0.38	5.93 ± 0.38
3.	2.48 ± 0.22	2.11 ± 0.12	2.03 ± 0.13	1.97 ± 0.16	2.11 ± 0.16
1.CGRP (fmol/mg)	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02
2.	0.69 ± 0.05	0.43 ± 0.05 *	0.70 ± 0.06	0.72 ± 0.04	0.66 ± 0.04
3.	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.27 ± 0.02
1.SOM (fmol/mg)	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01
2.	0.51 ± 0.01	0.38 ± 0.02 *	0.48 ± 0.03	0.50 ± 0.01	0.46 ± 0.02
3.	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.03	0.19 ± 0.01

III/2. táblázat. Elektromos téringerléssel (40 V, 0.1 ms, 10 Hz, 120 s) kiváltott neuropeptid felszabadulás izolált patkány tracheapreparátumon. TT-232 (500 nM), PTX (100 ng/ml), PTX+TT-232, valamint genistein (50 µM) hatása. (1. frakció: alapérték, 2. frakció: ingerelt periódus, 3. frakció: kimosás utáni érték, * P<0.05)

Következtetés

A TT-232 stabil, ciklikus, szintetikus heptapeptid szomatosztatin analóg rendkívül hatékonyan bizonyult mind az akut neurogén plazma extravazáció, mind a krónikus kevert ízületi gyulladásos folyamat gátlásában. Kísérleteink alapján hatása subcután alkalmazás esetén dózistól függően hosszan tart. Hatását döntően az idegvégződéseken, specifikusan a szomatosztatin receptorokon hatva a neuropeptid felszabadulás gátlásán keresztül fejti ki, hatékonysága ebben a tekintetben az *in vitro* kísérleti adatok alapján megközelítőleg megegyezik a szomatosztatinnal. Bizonyított azonban a nem neurogén gyulladásra gyakorolt gátlása is, mivel a TT-232 denervált lábón kiváltott dextrán-ödémát is képes volt szignifikáns mértékben gátolni. Következésképpen a Freund-adjuvánssal kiváltott krónikus gyulladás csökkentésében feltehetően mind a neurogén, mind a nem neurogén gyulladást gátló hatása

szerepet játszik.

Az sst2, 3 és 5 receptorokon ható octreotide hatástalansága, továbbá az, hogy a patkány tracheán, illetve légutaiban ismereteink szerint csak sst4 receptor található (Hoyer és mtsai, 1994) arra utal, hogy a TT-232 hatását nagy valószínűséggel ezen a receptoraltípuson fejtí ki hatékonyan, dóziszfüggően gátolva *in vitro* a tracheából a peptidfelszabadulást, mely gátló hatást a G-protein gátló PTX kivédte. Irodalmi forrásokból ismerünk szelektíven az sst4 receptoron ható agonistát (Ankersen és mtsai, 1998), azonban olyan sst4 antagonistát, aminek segítségével a kérdés biztonsággal megválaszolható lenne sajnos nem állt rendelkezésünkre.

A TT-232 tirozin-kináz gátló aktivitása (Kéri és mtsai, 1993, 1996) a gyulladásgátló hatásában valószínűleg nem játszik szerepet, mivel a potens tirozin-kináz gátló genistein nem fejtett ki hasonló hatást a neuropeptid felszabadulásra.

Ezen eredmények jelentőségét az is hangsúlyozza, hogy bár régóta folynak vizsgálatok az ismert nem-szteroid gyulladásgátlókkal kapcsolatban is, jelenleg egyetlen olyan gyógyszer sincs, amely a neurogén gyulladáscsökkentő reakciókat megbízhatóan gátolni tudná (Janosi Gábor és Szolcsányi, 1970, Geppetti és Holzer 1996). A TT-232 *in vivo* tesztekben hatékonyabbnak bizonyult mint a szomatosztatin, lebomlása lassúbb, ezáltal hatása tartósabb és szelektívebb is, mert endokrin hatásoktól mentes. Mivel e heptapeptid gátolta *in vitro* a szenzoros neuropeptid felszabadulását, feltételezhetjük, hogy a gyulladáscsökkentő és az anti-nociceptív hatás az afferens idegvégződés gátlásán keresztül valósul meg, hasonlóan az endogén szomatosztatinhoz.

III.B. ENDOGÉN NEUROPEPTIDEK, ILLETVE TT-232 SZOMATOSZTATIN ANALÓG HATÁSA NEUTROPHIL LEUKOCYTÁK AKKUMULACIOJARA A BÖRZEN

A fejezethez kapcsolódó saját közlemény:

III.B/1. **Thán M.**, Pintér E., Brain S.D., Rawlingson A., Szolcsányi J.: Local and systemic effect of sciatic nerve stimulation on cutaneous neutrophil accumulation in the rat hindpaw. Regul. Peptides, 89, 84, 2000. (előadáskivonat)

Bevezetés

A neutrophil leukocyták akkumulációja az akut gyulladásos reakciók lényeges kísérője. Ismert, hogy a neurogén gyulladásban szerepet játszó gyulladáskeltő neuropeptidek (SP, CGRP) fokozzák a neutrophil leukocyták akkumulációját (McGillis és Fernandez, 1999), *in vitro* körülmények között az SP a neutrophil leukocytákra hatékony kemoattraktív, a szomatosztatin viszont gátló hatást fejt ki (Kolasinski és mtsai, 1992). Bizonyított az SP fontos szerepe a neutrophil leukocyták akkumuláció kiváltásában a légutak nyálkahártyájában *in vivo*, melyet tachykinin NK1 receptorok közvetítésével (Baluk és mtsai, 1995), illetve nagyobb koncentrációban egy nem-receptor függő, hiszósajt közvetítette úton, feltehetőleg részben interleukin-1 felszabadításán keresztül vált ki (Matsuda és mtsai, 1989, Suzuki és mtsai, 1995).

Exogén SP képes a hiszósajtekből gyulladásos mediátorokat felszabadítani (Tausk és Udem, 1995), ugyanakkor a bőrben endogén neuropeptidek által kiváltott neutrophil sejttakkumulációt eddig nem igazoltak.

Előzetes kísérleteinkben igazolódott, hogy n. ischiadicus perifériás csomójának antidrómos elektromos ingerlésével felszabadított szomatosztatin a bőr nociceptorainak orthodrómos, vagy antidrómos stimulációjával kiváltott neurogén plazma extravazációra gátló hatást fejtett ki (Szolcsányi és mtsai, 1998a).

Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a n. ischiadicus elektromos ingerlésével felszabadított endogén neuropeptidekkel kiváltható-e a bőrben leukocyták akkumuláció, képes-e az így felszabadított szomatosztatin, valamint a TT-232 szomatosztatin analóg gátolni carrageenin gyulladás sejtés fázisát. A carrageenin növényi polysacharid, amely a gyulladás részben neurogén úton az afferens idegvégződés aktivációjával, részben pedig a hiszósajtek degranulálásán keresztül hozza létre (Pintér és Szolcsányi, 1996), gyors polymorphonuclearis leukocyták akkumulációs sejtés fázist kiváltva.

Módszerek

A kísérletet natrium thiopenthalal altatott (Trapanal, 100 mg/kg, i.p.) 200-220 g súlyú him Wistar patkányokon végeztük.

1. Antidrómos idegingerléssel felszabeditott endogén neuropeptidek hatása a neutrophil leukocyták akkumulációjára a bőrben

Az első kísérletsorozatban a n. ischiadicus elektromos ingerlésével felszabeditott endogén neuropeptidek hatását vizsgáltuk a bőrben létrehozható leukocyta akkumulációra. Guanethidín (20 mg/kg, s.c., 24 h) előkezelés után az állatokat pipecuronium bromiddal (200 µg/kg, i.v.) relaxáltuk és a kísérlet alatt tracheakanülön keresztül mesterségesen lélegeztettük. A n. ischiadicust jobb oldalon kipreparáltuk és az átmetszett ideg perifériás csomját elektromosan ingereltük (20 V, 0.5 ms) a következő paraméterekkel: 1. csoport: 1 Hz, 4 h, 2. csoport: 2 Hz, 4 h és 3. csoport: 10 Hz, 5 h (szakaszos ingerlés, 24 min ingerlés/h). A bal oldali ideg érintetlen maradt, és ehhez viszonyítottuk az ingerlés hatását, mint kontroll értékhez (n=5-6/csoport)

2. Antidrómos idegingerlés hatása carrageeninnel a bőrben kiváltott leukocyta akkumulációra

Ebben a kísérletsorozatban idegingerlés hatását vizsgáltuk az ellenoldali lábón carrageeninnel kiváltott gyulladás neutrophil akkumulációs fázisára. A jobb oldali n. ischiadicus átmetszett perifériás csomját elektromosan ingereltük (20 V, 0.5 ms, 0.5 Hz, 5 h). Az ingerlés megkezdése után 5 perccel az ellenoldali talp bőrébe 100 µl, 1 %-os carrageenin oldatot fecskendeztünk intradermálisan, majd a neutrophil akkumulációt 5 h elteltével mértük. Kontroll állatokban, a jobb oldali ideget csak átmetsztettük, a bal oldali talpbőrbe 100 µl, 1 %-os carrageenint adtunk (n=10).

3. TT-232 hatása carrageeninnel a bőrben kiváltott leukocyta akkumulációra

Az utolsó kísérletsorozatban a TT-232 hatását vizsgáltuk a carrageenin-kiváltotta gyulladás neutrophil leukocyta akkumulációs fázisára. A jobb oldali láb hát bőrébe 100 µl, 1 %-os carrageenin oldatot, ellenoldalra kontrollként a carrageenin oldószerét, 100 µl Tyrode oldatot fecskendeztünk intradermálisan. Az állatokat TT-232-vel kezeltük (20 µg/kg, i.v.) a carrageenin adás előtt 5 perccel, ezt követően az 55. és 115. percben, vagyis óránként. A neutrophil akkumulációt 3 h után mértük. A Tyrode oldattal kiváltott neutrophil akkumulációt levontuk a carrageeninnel kezelt lábón kapott értékből, és így vetettük össze a TT-232 kezelt, illetve az oldószerrel kezelt kontroll csoport értékeit (n=10).

4. Myeloperoxidáz mérésen alapuló leukocyta szám meghatározás

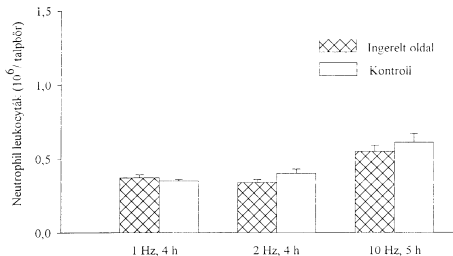
Az akkumulációs idő letelte után az állatokat elvéreztettük, a talp, illetve lábháti bőrök megegyező felületű darabját kimetszettük, feldaraboltuk és 2 ml, detergenst (0.5 % hexadecyl triethylammonium bromide) tartalmazó foszfát-pufferben homogenizáltuk. Ezután a homogenizátumot lecentrifugáltuk (10000 g 5 min, 4 °C) hogy a szövetdarabokat valamint lipidfázist eltávolítsuk. A szupernatans 1 ml-ét használtuk a myeloperoxidáz vizsgálathoz.

A bőrben akkumulálódott neutrophilek számát a minták myeloperoxidáz tartalmának fotometriás mérésén keresztül kaptuk meg (Schierwagen és mtsai, 1990). A bőrminták myeloperoxidáz aktivitását "3,3',5,5'tetra-methylbenzidine (TMB) liquid substrate system" (Sigma) hozzáadásával határoztuk meg (25 µl minta + 25 µl puffer + 100 µl szubsztrát). A kékülsi reakció szobahőmérsékleten megy végbe, 30 perc alatt. Az optikai denzitást (OD) 620 nm-en mértük microplate reader-rel, 5 percenként. Az ismert neutrophiltartalmú standard oldatot patkány hasüregi mosófolyadékából nyertük, osztrigaglikogén (p. kezelés után 2 nappal (Moroney és mtsai, 1988). A standard hígítási sor OD értékeinek változása alapján felvett görbe kezdeti (első 5 perces) szakaszának segítségével határoztuk meg az ismeretlen minták neutrophil leukocyta tartalmát.

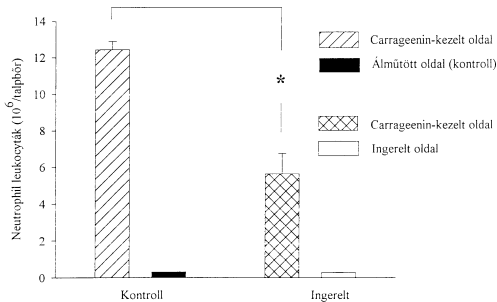
Statistikai elemzéshez nem-parametrikus Mann-Withney tesztet használtunk, statisztikailag szignifikánsnak $P < 0.05$ esetén értékeltük az eredményeket (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Eredmények

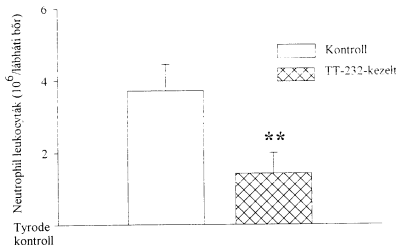
1. N. ischiadicus perifériás csonkjának különböző paraméterekkel végzett antidrómós ingerlése nem váltott ki leukocyta akkumulációt a bőrben, sem az alacsony frekvenciával (1 Hz, 2 Hz) végzett folyamatos, sem a 10 Hz-es megszakított ingerlés esetén (III/2. ábra).
2. N. ischiadicus egyoldali antidrómós ingerlésével felszabadított szomatosztatín az ellenoldalon carrageeninnel kiváltott neutrophil akkumulációt szignifikáns mértékben, 54.7 ± 3.8 %-kal gátolta (III/3. ábra).
3. TT-232 (20 µg/kg/óra, i.v.) kezelés a lábhat bőrben carrageeninnel kiváltott neutrophil akkumulációt 61.7 ± 5.9 %-kal gátolta, a solvens-kezelt kontrollokhöz viszonyítva (III/4. ábra).



III/2. ábra. Neutrophil leukocyták akumulációja N. ischiadicus elektromos ingerlése (20 V, 0.5 ms) után az innervált talpbőrben.



III/3. ábra. N. ischiadicus elektromos ingerlésének (20 V, 0.5 ms, 5 h, 0.5 Hz) hatása carrageeninrel kiváltott neutrophil leukocyták akumulációra az ellenoldali talpbőrben.



III/4. ábra. TT-232 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{óra}$, i.v.) hatása carrageeninrel kiváltott neutrophil leukocyta akkumulációra a labhati borben (5 n).

Következtetések

A n. ischiadicus antidrómos ingerlésével kiváltott neurogén gyulladás során kísérleteinkben a felszabadított endogén neuropeptidek (SP, CGRP) nem váltottak ki a bőrben neutrophil leukocyta akkumulációt. Ennek ellentmondó egyes irodalmi adatok igazolják, hogy az SP hízősejteken kifejtett proinflammációs citokineket (TNF- α , IL-1) felszabadító hatása mellett az exogén SP, valamint CGRP a vasculáris endothéliejtek korai adhéziós molekuláinak (E-selectin, P-selectin) expresszióját is képes fokozni (DeRose és mtsai, 1994, Smith és mtsai, 1993). Valószínű azonban, hogy az ideg ingerlésre ennél jóval kisebb mennyiségben felszabaduló endogén SP nem elégséges ilyen tartós hatások kiváltásához.

Érdekes módon az ideg ingerléssel felszabadított endogén szomatosztatin ezzel szemben képes volt gátolni a carrageeninrel kiváltott gyulladás sejtes fázisát. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a capsaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből felszabaduló szomatosztatin a keringésbe jutva már alacsony, 0.5 Hz-es ingerlés esetében is képes a leukocyta akkumulációját gátolni. Hasonló hatást fejtett ki a TT-232 szomatosztatin analóg is, ami igazolja, hogy gyulladásgátló hatásának a már igazolt neuropeptid felszabadulást gátló hatáson kívül a gyulladásos sejteket gátló komponense is van.

A szomatosztatinról ismert, hogy a gyulladással, illetve immunsejteken gátló hatást fejt ki, így a T-lymphocyták proliferációját, a B-lymphocyták immunglobulintermelését, valamint a hízósejtek, illetve basophil leukocyták degranulációját gátolja (Kolasinski és mtsai, 1992). Neutrophil leukocyták akkumulációját gátló hatását feltehetőleg részben ezen a hízósejt-mediált indirekt úton fejtí ki, emellett szerepet kap az idegvégződésekből az SP felszabadulás gátlása is, valamint nem zárható ki a neutrophil leukocyták szomatosztatin receptorain kifejtett direkt hatása sem. A leukocyták kitapadásának, illetve szöveti akkumulációjának feltétele egyes adhéziós molekulák fokozott expressziója a leukocyták membránjában (L-selectin, CD18, CD11), illetve a vasculáris endothelsejteken (E-selectin, P-selectin, ICAM-1) (Panés és mtsai, 1999). Eddig ugyan nem igazolták, de valószínűleg a szomatosztatin az adhéziós molekulák expresszióját is hatékonyan képes gátolni.

A nem-szteroid gyulladásgátlókról ismert, hogy stimulálják egyes adhéziós molekulák (ICAM-1, CD18) expresszióját, melyek elősegítik a leukocyták kitapadását az endothélhez (Wallace és mtsai 1993). A gyulladással sejtekből felszabaduló oxigén szabadgyökök és proteolitikus enzimek fontos szerepet játszanak a nem-szteroid gyulladásgátlók egyik komoly szövődményének, a gastrointestinális fekély kialakulásában (Wallace és mtsai, 1993). A TT-232 leukocyták akkumulációját gátló hatása újabb előnyt jelenthet az eddig használatos gyulladáscsillapítókkal szemben.

IV. SP, CGRP ÉS SZOMATOSZTATIN FELSZABADULÁSÁNAK VIZSGÁLATA A CAPSAICIN-ÉRZEKENY PRIMER AFFERENS NEURONOK VEGZŐDESEIBŐL ELEKTROMOS INGERLÉS, VALAMINT CAPSAICIN ANALÓGOK HATÁSÁRA

A fejezethez kapcsolódó saját közlemények:

IV./1. Németh J., Oroszi G., **Thán M.**, Helyes Zs., Pintér E., Farkas B., Szolcsányi J.: Substance P radioimmunoassay for quantitative characterization of sensory neurotransmitter release.

Neurobiology, 7, 437-444, 1999.

IV./2. Németh J., **Thán M.**, Helyes Zs., Oroszi G., Pintér E., Szolcsányi J.: Substance P radioimmunoassay for quantitative characterization of sensory neurotransmitter release.

Neurobiology, 7, 360, 1999. (előadáskivonat)

IV./3. **Thán, M.**, Németh, J., Helyes, Zs., Pintér, E., Szolcsányi, J.: Release of somatostatin and CGRP from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in vitro and in vivo.

Neurobiology, (közlésre elfogadva) 2000. (előadáskivonat)

Bevezetés

A capsaicin-erzekeny afferens neuronok periferias vegzodesei kettes, „szenzoros-efferens” funkcióval rendelkeznek (Szolcsányi 1984, Maggi 1995), azaz kémiai vagy elektromos ingerlés az idegvégződésekben tárolt szenzoros neuropeptidok (tachykininek, CGRP, szomatosztatin) felszabadulását eredményezi, amelyek mediátor szerepe testszerte kimutatható. Míg az elektromos ingerléssel kiváltott peptidfelszabadulás tetrodotoxinnal (TTX), valamint ω -conotoxinnal (CTX) kivédhető, a kémiai inger hatása Ca^{2+} függő, de TTX és CTX rezisztens, amely arra utal, hogy axonális vezetés, illetve feszültségfüggő N-típusú Ca^{2+} csatornák részvétele nélkül jön létre (Szolcsányi 1983, 1996a, Maggi 1995). A capsaicin és analógjainak izgató, illetve peptidfelszabadító hatása capsazepinnel, illetve ruthénium-vörösrel azonban blokkolható (Szolcsányi 1996a). Az elektromos, illetve kémiai stimulációval kiváltott neuropeptid felszabadulás tehát két eltérő mechanizmussal történik.

Napjainkban már több, a VR1 receptoron szelektíven ható szintetikus, illetve természetes analóg ismert. Szoros szerkezet-hatás összefüggést az agonisták egyes csoportjain belül lehet találni, de míg például a vanilloid struktúra kritikus a capsaicin esetében, nem jelentős az RTX molekulánál, ahol a diterpén vázon található ketocsoport hiánya jár a hatás elvesztésével (Szolcsányi és Jancsó-Gábor, 1975, Szolcsányi, 2000a,b). A capsaicin analógok nemcsak receptoraffinitásukban, hanem csatornanyitási kinetikájukban is különböznek (Szállási és Blumberg, 1999). Mivel a különböző áramkinetikáknak jelentős hatása van a membrán depolarizációra és így a fájdalomérzésre is, nem vonható direkt kapcsolat a receptoraffinitás és

az izgató hatás között. Az RTX a capsaicinhez hasonló hatásokat képes létrehozni (Szallási és Blumberg, 1989 és 1990, Blumberg és mtsai, 1993), azonban a hatáserősségben nagyságrendbeli különbségek vannak, egyes tesztekben az RTX 100 - 1000-szer hatékonyabbnak bizonyult (Szallási és Blumberg, 1990, Blumberg és mtsai, 1993). Mindezekon túl a két vegyület lényegesen különbözik abban is, hogy az RTX receptoraffinitása nagyobb, csatornanyitási kinetikája lassúbb, ami magyarázhatja voltage-clamp vizsgálatokban a capsaicin, illetve RTX kiváltotta áramok eltérő sajátosságait. Ez okozhatja az eltéréseket a két vegyület között az izgató, azaz fájdalomkeltő, illetve deszenzitizáló hatásukban (Szallási és Blumberg, 1999). Különböző receptor szubtypusok jelenlétét, vagyis a feltételezett „R” (RTX) és „C” (capsaicin) receptort (Szallási és Blumberg, 1993, Ács és mtsai, 1997) a klónozott VR1 receptoron kimutatott közös támadáspont (Caterina, és mtsai, 1997), valamint a VR1 receptor knockout egereken kapott eredmények kizárják (Caterina és mtsai, 2000, Davis és mtsai, 2000). Lehetséges azonban, hogy a VR1 receptoron specifikus felismerő hely van a capsaicinoidok, illetve resiniferanoidok számára, melyek közül az előző felel a csatornanyitáért, tehát az izgató hatásért, a második pedig a lassúbb aktiváció következtében elsősorban a Ca^{2+} felvételen keresztül a tachyphylaxiáért, illetve a deszenzitizációért (Szallási és Blumberg, 1999).

Szallási (1996) és Szallási és Blumberg (1999) feltételezései szerint az RTX a VR1 receptorhoz kötődve képes deszenzitizációt létrehozni előzetes izgatás nélkül. A pulmonáris J receptorok deszenzitizációját a Bezold Jarish reflex kiváltása nélkül (Szolcsányi és mtsai, 1990) azonban a társzerzőkkel ellentétben Szolcsányi olyan agonista hatással magyarázza, ami ugyan a VR1 receptor aktivációval jár, azonban az akciós potenciál frekvenciája elmarad a reflex kiváltásától. Ezen egymásnak ellentmondó vélemények birtokában érdekes feladat volt a capsaicin, valamint az RTX akut izgató és akut deszenzitizáló hatásának vizsgálata és összehasonlítása *in vitro* körülmények között a szenzoros neuropeptidek felszabadulásának meghatározása alapján.

Kísérleteinkben *in vitro*, perfúziós rendszerben vizsgáltuk izolált patkány trachea afferens idegvégződéseiből különböző frekvenciákkal végzett elektromos ingerlésre, illetve kémiai ingeranyagok (capsaicin, RTX, piperin) hatására történő neuropeptid transzmitterek (SP, CGRP, szomatosztatin) felszabadulását, ennek frekvencia, impulzusszám, illetve dózisfüggését, valamint az akut deszenzitizáció jelenségét.

Módszerek

Kísérleteinkhez 200-240 g súlyú nőstény Wistar patkányokat natrium pentobarbital (Nembutal, 40 mg/kg, i.p.) altatásban elvégeztettünk. Tracheáikat kimetszettük és szervfűrdőben az előzőekben leírt (II./1. fejezet) módon 60 percig perfundáltuk (1 ml/perc). Az átaramlás leállítását után a kamrákban lévő oldatot 8 percenként 3-szor lecserélve frakciókat gyűjtöttünk (ingerlés előtti - ingerelt - ingerlés utáni).

Az elektromos téringertést 40 V, 0.1 ms paraméterekkel a második periódus 5. percében kezdtük különböző frekvenciákkal: (0.5 Hz, 200 s), (2 Hz, 50 s), (2 Hz, 150 s), (10 Hz, 30 s), illetve (10 Hz, 120 s), hogy páronként különböző frekvenciákkal azonos impulzusszámot adjunk le.

Kémiai ingerlésre capsaicint (10^{-8} - 10^{-5} M), RTX-t (10^{-10} - 10^{-7} M) valamint piperint (10^{-6} - 5×10^{-5} M) használtunk, amely anyagokat a második (ingerelt) periódus 5. percében adtuk a rendszerhez. Az RTX esetén egy közép dózissal (10^{-8} M) 6 frakciót gyűjtöttünk, azaz az expozíciót követő kimosás után még 32 percig követtük a felszabadulás dinamikáját.

Az akut deszenzitizáció létrehozása különböző dózissal végzett 30 perces capsaicin (10^{-8} - 10^{-5} M), illetve RTX (10^{-10} - 10^{-7} M) előmosással történt, ami után elektromos téringertéssel (40 V, 0.1 ms, 10 Hz, 120 s) váltottunk ki peptidfelszabadulást és a gátló hatást az elektromos téringertés kontroll értékéhez viszonyítva számoltuk. Capsaicin akut deszenzitizáló hatását kémiai ingerrel, 10^{-7} M capsaicinnel kiváltott neuropeptid felszabadulásra is megvizsgáltuk. A mintákat jégbe hűtött csövekbe gyűjtöttük és a kísérlet végén a légszűrődarabok nedves súlyát lemértük. A frakciók SP, CGRP és szomatosztatin koncentrációit specifikus RIA módszerek segítségével határoztuk meg (Németh és mtsai, 1996, 1998a, 1999). A peptidok mennyiségét fmol/mg egységben, nedves szövetsúlyra vonatkoztatva fejeztük ki ($n=6$ minta/csoport).

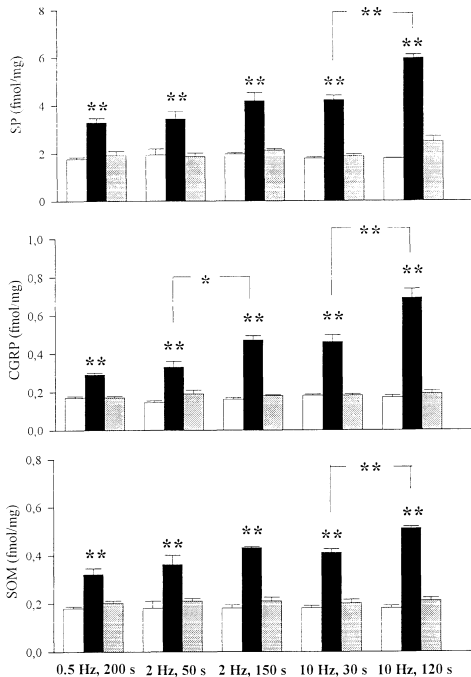
Az eredmények statisztikai értékelése Student-féle páros és páratlan t-tesztel történt. Statisztikailag szignifikánsnak $P < 0.05$ esetén értékeltük az adatokat (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Eredmények

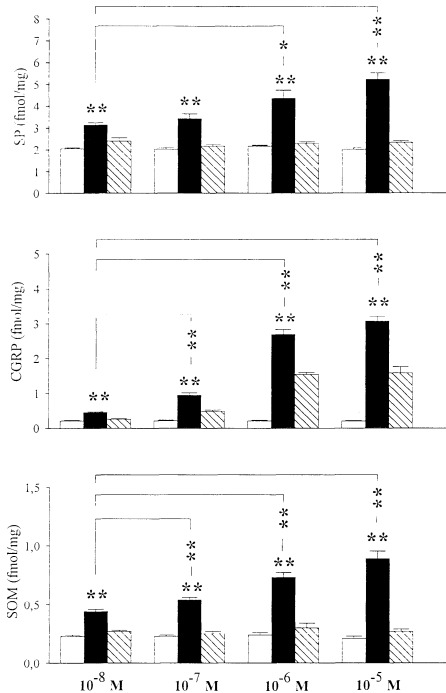
1. Elektromos téringelés 100 impulzus alkalmazása esetén 0.5 Hz és 2 Hz-es ingerlési frekvencián hasonló mértékű SP, CGRP és szomatosztatin felszabadulást váltott ki. Azonos számú impulzus esetén 0.5 Hz és 2 Hz-es, illetve 2 Hz és 10 Hz-es ingerlésnél nem volt szignifikáns különbség. Elektromos ingerlés tehát a három szenzoros neuropeptid impulzusszámfüggő felszabadulását váltotta ki, ami 10 Hz-es ingerlésnél, az impulzusszám 4-szeres növelése esetén szignifikánsnak bizonyult (IV/1. ábra).

2. Mindhárom ingeranyag koncentrációfüggő peptidfelszabadulást eredményezett. Az RTX már 10^{-10} M, a capsaicin 10^{-8} M koncentrációnál váltott ki szignifikáns emelkedést a frakciók SP, CGRP, illetve szomatosztatin koncentrációjában a bazális szinthez képest (IV/2. ábra), míg a piperin 50-100-szor gyengébbnek bizonyult, csak 10^{-5} M koncentrációban váltott ki szignifikáns mértékű peptidfelszabadulást (IV/1.a., b. és c. táblázat).

Az ingeranyagok nagyobb dóziséknál a kimosás utáni 3. frakcióban is emelkedett értékeket kaptunk, így a IV/1. táblázatban a 2+3 frakció együttesen vett értékeit tüntettük fel. Az RTX lassú, elhúzódo peptidfelszabadulást váltott ki, mely 10^{-8} M esetén még a 3., 4. és 5. frakcióban a vegyület kimosása után is megfigyelhető volt (IV/3. ábra).



IV/1. ábra. Elektromos téringéréssel kiváltott szenzoros neuropeptid felszabadulás *in vitro*.



IV/2. ábra. Capsaicinnel kiváltott szenzoros neuropeptid felszabadulás *in vitro*.

Capsaicin (M)	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
SP (fmol/mg)	1.43 ± 0.11	1.54 ± 0.18	2.31 ± 0.33	3.52 ± 0.36
CGRP (fmol/mg)	0.30 ± 0.02	1.01 ± 0.05	3.82 ± 0.14	4.26 ± 0.19
SOM (fmol/mg)	0.25 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.73 ± 0.06

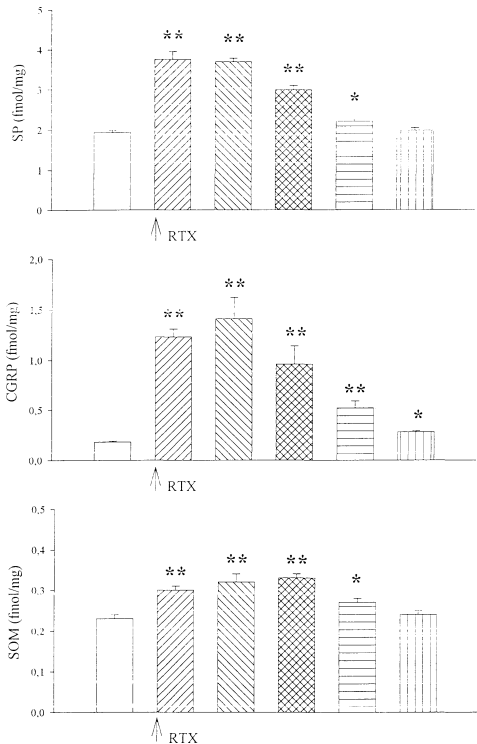
IV/1.a. táblázat. Abszolút peptidfelszabadulás (2.+3. frakcióban együttesen) capsaicin hatására izolált patkány tracheapreparátumon. (A táblázatban feltüntetett értékek mind szignifikánsan különböznek a bazális értéktől, ** $P < 0.01$.)

RTX (M)	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}
SP (fmol/mg)	1.07 ± 0.09	1.39 ± 0.12	1.73 ± 0.20	3.96 ± 0.38
CGRP (fmol/mg)	0.26 ± 0.02	0.57 ± 0.06	1.37 ± 0.14	3.55 ± 0.31
SOM (fmol/mg)	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.41 ± 0.03

IV/1.b. táblázat. Abszolút peptidfelszabadulás (2.+3. frakcióban együttesen) RTX hatására izolált patkány tracheapreparátumon. (A táblázatban feltüntetett értékek mind szignifikánsan különböznek a bazális értéktől, ** $P < 0.01$.)

Piperin (M)	2×10^{-6}	10^{-5}	5×10^{-5}
SP (fmol/mg)	0.49 ± 0.04	0.67 ± 0.08 **	2.50 ± 0.23 **
CGRP (fmol/mg)	0.06 ± 0.01	0.18 ± 0.02 *	0.75 ± 0.08 **
SOM (fmol/mg)	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.02 *	0.38 ± 0.03 **

IV/1.c. táblázat. Abszolút peptidfelszabadulás (2.+3. frakcióban együttesen) piperin hatására izolált patkány tracheapreparátumon (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).



IV/3. ábra. RTX (10⁻⁸ M) kiváltotta szenzoros neuropeptid felszabadulás dinamikája.

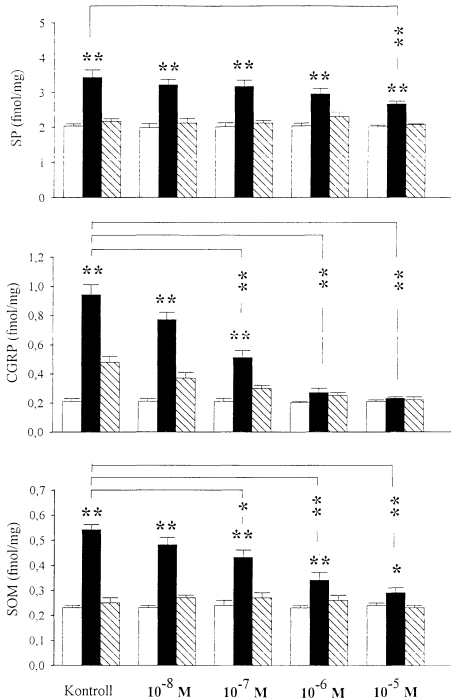
2. A küszöbkonzentrációkhoz hasonlóan az akut deszenzitizációt tekintve is az RTX szintén közel 100-szor hatásosabbnak bizonyult a capsaicinnél, azonban a vizsgált három peptid érzékenysége között ebben a tekintetben is eltérést tapasztaltunk. Capsaicin, illetve RTX a CGRP felszabadulását már $10^{-7}/10^{-9}$, a szomatosztatintét $10^{-6}/10^{-8}$, az SP-ét csak 10^{-5} , illetve 10^{-7} M koncentrációban védte ki. A capsaicin és az RTX tehát egyaránt legkisebb koncentrációban a CGRP, majd a szomatosztatint és végül az SP felszabadulását gátolta. (IV/2. a. és b. táblázat, IV/4. ábra).

Caps. (M)	Kontr.	10^{-8}	gátlás	10^{-7}	gátlás	10^{-6}	gátlás	10^{-5}	gátlás
SP (fmol/mg)	4.91 ± 0.19	4.48 ± 0.31	8.7 %	4.43 ± 0.36	9.8 %	4.36 ± 0.45	11.2 %	2.90 ± 0.36 **	40.9 %
CGRP (fmol/mg)	0.54 ± 0.04	0.50 ± 0.05	7.4 %	0.37 ± 0.02 **	31.5 %	0.14 ± 0.01 **	74.1 %	0.02 ± 0.01 **	99.6 %
SOM (fmol/mg)	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.04	0	0.35 ± 0.03	0	0.24 ± 0.02 **	29.4 %	0.15 ± 0.02 **	55.0 %

IV/2.a. táblázat. Elektromos téringelés (1200 imp.) hatására történő abszolút peptidfelszabadulás kontroll esetben, valamint capsaicin különböző koncentrációjú oldataival történt 30 perces előmosás után. A százalékos gátlás számításakor a kontroll értéket tekintettük 100 %-nak (** P<0.01).

RTX (M)	Kontr.	10^{-10}	gátlás	10^{-9}	gátlás	10^{-8}	gátlás	10^{-7}	gátlás
SP (fmol/mg)	4.91 ± 0.19	4.44 ± 0.24	9,6 %	4.72 ± 0.38	3,9 %	4.49 ± 0.46	8,6 %	3.30 ± 0.26 **	32,8 %
CGRP (fmol/mg)	0.54 ± 0.04	0.46 ± 0.04	14,8 %	0.32 ± 0.03 **	47,7 %	0.19 ± 0.01 **	64,8 %	0.17 ± 0.02 **	68,5 %
SOM (fmol/mg)	0.34 ± 0.02	0.30 ± 0.03	11,8 %	0.29 ± 0.01	14,7 %	0.22 ± 0.02 **	35,3 %	0.16 ± 0.01 **	52,9 %

IV/2.b. táblázat. Elektromos téringelés (1200 imp.) hatására történő abszolút peptidfelszabadulás kontroll esetben, valamint RTX különböző koncentrációjú oldataival történt 30 perces előmosás után. A százalékos gátlás számításakor a kontroll értéket vettük 100 %-nak (** P<0.01).



IV/4. ábra. Capsaicin különböző koncentrációjú oldataival történt előmosás (30 min) akut deszenzitáló hatása capsaicinnel kiváltott szenzoros neuropeptid felszabadulásra *in vitro*.

Következtetések

Eredményeink igazolták, hogy elektromos téringelés esetén a peptidfelszabadulás a capsaicin-érzékeny idegvégződésekből a leadott impulzusszámtól függ, és 0.5-10 Hz-es tartományban nem függ az ingerlés frekvenciájától. Bizonyított, hogy a capsaicin-érzékeny érzőrostok 0.1-1 Hz-cel végzett ingerlése már képes maximális vazodilatációs efférens választ kiváltani *in vivo*, a plazma extravazáció frekvenciaoptimuma pedig 2 Hz (Szojcsányi 1996a). Kísérleteink igazolják, hogy 0.5 Hz-es téringelés hatását a frekvencia növelésével a szomatosztatin, CGRP, valamint SP felszabadulásra nem lehet tovább növelni. Magasabb frekvencián (10 Hz) végzett ingerlés esetén egyértelműen bizonyított azonban, hogy a magasabb impulzusszám nagyobb mértékű neuropeptid felszabadulást vált ki a capsaicin-érzékeny idegvégződésekből.

A capsaicin analógokkal kapott eredmények igazolták, hogy mind a capsaicin, mind az RTX és a piperin akut izgató hatást fejt ki a capsaicin VRI receptoron, koncentrációfüggő neuropeptid felszabadulást okozva. A vizsgált analóg vegyületek között nagyságrendbeli különbségeket találtunk: RTX > capsaicin > piperin. Az RTX hosszan tartó peptidfelszabadító hatása valószínűleg a bevezetőben már említett lassú receptorkinetikából, valamint tartós depolarizációból ered (Szállási és Blumberg, 1999). Eredményeink azt is igazolják, hogy CGRP és SP szimultán felszabadulása mellett szomatosztatin is felszabadul a capsaicin-érzékeny idegvégzések elektromos, illetve kémiai ingerlésére. Az SP, valamint a CGRP fájtól, az érzőneuron típusától és az innervált területtől függően (exteroceptív/interoceptív) különböző, de jellemzően nagymértékben kolokalizáltan fordul elő az idegsejtekben. Patkány hátsó gyöki ganglionsejtek esetén az SP pozitívák szinte minden esetben tartalmaznak CGRP-t is (Lawson 1996), szomatosztatinnal a kolokalizáció azonban jóval kisebb mértékű, bár egyes irodalmi adatok szerint kimutatható mind az SP, mind a CGRP tartalmú rostokban (Dalsgaard 1987). A viscerális afferensek szinte mindegyike CGRP-, nagy többsége pedig SP-pozitív, azonban a szomatosztatin pozitivitás itt igazoltan kisebb arányú, mint a bőrben (Lawson 1996).

Akut deszenzitizációt tekintve az RTX szintén közel 100-szor hatásosabbnak bizonyult a capsaicinnél. A capsaicin kiváltotta klasszikus deszenzitizáció hátterében a szenzoros neuropeptidok, valamint a VRI receptorok depléciója, illetve az idegrostok degeneratív károsodása áll, azonban később kimutatták, hogy a capsaicin-deszenzitizáció megalapozott lehet anélkül is, hogy a szenzoros neuropeptidok szöveti szintjének szignifikáns depléciója

bekövetkezne (Maggi és mtsai, 1987). A deszenzitizáció ezen általunk is vizsgált korai szakasza más mechanizmusokhoz kapcsolódik és nem magyarázható a capsaicin alkalmazása után közvetlenül kialakuló kezdeti C-rost vezetési blokkal (Waddell and Lawson, 1989), hiszen érdekes módon az egyes szenzoros neuropeptidekre gyakorolt hatás tekintetében a capsaicin és RTX esetében egyaránt 100-szoros koncentrációkülönbség adódott. A jelenség mechanizmusa nem ismert, de felhívja a figyelmet arra, hogy a capsaicin VR1 receptor aktiválását követően további intracelluláris folyamatok, pl. másodlagosan a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák inaktivációja (Bevan és Szolcsányi, 1990) és más ma még nem tisztázott mechanizmusok játszhatnak szerepet. Ebben a szakaszban az efferens válasz hiánya tehát inkább valamiféle excitációs-szekréciós hibának, illetve szétkapcsolásnak tulajdonítható, mint a transzmitter depléciónak. A capsaicin alkalmazása után később a szenzoros neuropeptidok szintézise is csökken és mind *in vitro* mind *in vivo* a szenzoros neuropeptidok depléciója is létrejön az idegvégződéseken. Később degeneratív ultrastrukturális elváltozások is megfigyelhetők (Szolcsányi és mtsai, 1975; Jancsó és mtsai, 1984) tekintetesen a Na^{+} - és Ca^{2+} -iontöbblet intraneuronális akkumulációja következtében (Bevan és Szolcsányi, 1990).

A capsaicin-érzékeny szenzoros rostok szelektív inaktivációja, vagyis deszenzitizációja olyan fájdalmas állapotok, vizeletürítési zavarok, illetve gyulladós betegségek (arthritis, asthma, psoriasis) kezelése esetén lehet hatásos, amelyek tüneteiben a capsaicin-érzékeny rostok fokozott aktivációja szerepet játszik. Jelenleg a klinikumban capsaicin deszenzitizáló hatását intravesicálisan alkalmazva az urológiában detrusor hyperreflexia, hyperreaktív, illetve hyperszenzitív hólyag esetén hasznosítják (Ishizuka, 1995).

a szenzoros neuropeptid felszabadulás mérése alapján a capsaicin receptoron ható agonista és moduláló-antagonista farmakológiai hatások követésére a plazma szomatosztatin és CGRP szintek változását monitorozva.

Az új *in vivo* modell lehetőséget teremtett, hogy megvizsgáljuk az elmúlt évben az érdeklődés középpontjába került endogén cannabinoid ligand anandamid hatását a szenzoros neuropeptidok felszabadulására. Az anandamid (N-arachidonylmetanolamid) mint endogén cannabinoid, a CB1 receptor ligandja, mely elsősorban központi, valamint perifériás idegrendszeri struktúrákon található és aktivációja az adenil-cikláz, valamint a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák gátlásához és inward K^+ áramok aktiválásához vezet (DiMarzo és mtsai, 1998). Az elmúlt év kísérleti eredményei igazolták, hogy az olvanil, mint vanilloid capsaicin analóg képes az anandamid membrántranszportját gátolni (Beltramo és Piomelli, 1999). Az anandamid izolált artérián capsazepinnel blokkolható vazodilatációt hoz létre CGRP felszabadításán keresztül a capsaicin-érzékeny afferenseken hatva (Zygmunt és mtsai, 1999). Humán és patkány VR1-t expresszáló HEK sejteken végzett patch-clamp kísérletben szintén sikerült igazolni az anandamid izgató hatását a VR1 receptoron (Zygmunt és mtsai, 1999, Smart és mtsai, 2000). Ugyanakkor ismeretes, hogy az anandamid anti-nociceptív és perifériás anti-inflammátoros hatását a capsaicin-érzékeny primer afferenseken lévő CB1 receptoron fejti ki, melynek aktiválása a neurotranszmitter felszabadulás gátlását eredményezi a perifériás, illetve a centrális idegvégződéseken (Richardson és mtsai, 1998). Bár bizonyított, hogy egyes endogén kémiai (protonok), illetve fizikai (forró) ingerek képesek aktiválni a capsaicin receptorát, mind a mai napig nem tudunk a capsaicin VR1 receptort aktiváló endogén kémiai vegyületről. Ezért érthető, hogy a fenti adatok alapján élénk vita bontakozott ki arról, hogy az anandamid a cannabinoid receptor mellett a capsaicin receptor endogén ligandjaként is szerepelhet-e (Szolcsányi 2000a,b, Zygmunt és mtsai, 2000, Smart 2000).

A fent említett tények ismeretében vizsgáltuk meg azt, hogyan befolyásolja az anandamid a capsaicin-érzékeny idegek perifériás végződéseiből történő bazális, valamint az ingerléssel kiváltott neuropeptid felszabadulást *in vivo* modellünkben, illetve *in vitro* körülmények között.

Megvizsgáltuk továbbá az elmúlt években felfedezett nociceptin (Meunier és mtsai, 1995) hatását a szenzoros neuropeptidok RTX által kiváltott felszabadulására *in vivo* körülmények között. E vegyület nagy fokú szerkezeti hasonlóságot mutat az opioid peptidokkal, funkcionálisan azonban több szempontból eltérően viselkedik. Neve intracerebrovascularis adás esetén kiváltott nociceptív hatására vezethető vissza. Érdekessége,

hogy receptorát már a ligand azonosítása előtt felfedezték, azt „orphan” azaz árva receptornak, később ORL_1 vagyis „opioid receptor like 1”-nek elnevezve (Reinscheid és mtsai, 1995). A nociceptin előzetes kísérleteinkben gátolta *in vitro* körülmények között a szenzoros neuropeptid felszabadulást (Helyes és mtsai, 1997), valamint *in vivo* kísérletekben a neurogén gyulladásos folyamatokat, illetve a hűzősejtek degranulációját (Németh és mtsai, 1998b).

Korábbi összehasonlító vizsgálatok igazolták, hogy az anandamiddal szerkezeti homológiát mutató undecenyl-2-amino-ethanol képes enyhe izgató hatást kifejteni bizonyos fájdalomtesztekben, a capsaicinhez hasonlóan csökkentti a testhőmérsékletet és kiváltja a pulmonális chemoreflexet a capsaicin-érzékeny idegvégződések izgatása révén (Szolcsányi és Jancsó-Gábor, 1975, Solcsányi 1982). Elemeztük az undecenyl-2-amino-ethanol hatását is a plazma szomatosztatin és CGRP szintre, összevetve az RTX esetén tapasztalt izgató hatással.

Módszerek

1. CGRP és szomatosztatin felszabadulás vizsgálata *in vivo*

Kísérleteinket 200-240 g súlyú nőstény Wistar patkányokon végeztük, amelyeket nátrium thiopethallal (Trapanál, 100 mg/kg, i.p.) altattunk. A bal vena jugularist, valamint a jobb arteria carotist megkanuláltuk, a vénás anyagbeadás, illetve artériás vérmintanyerés céljából. Az állatoknak tracheakanült kötöttünk be és azokban az esetekben, amelyekben az RTX beadása után átmeneti légzésleállás következett be, rövid ideig mesterséges lélegeztetést alkalmaztunk.

1. Az RTX hatását több dózisban is megvizsgáltuk (0,1, 0,3, 0,6, 1 és 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) beadása után 5, illetve 60 perc elteltével artériás vérmintákat vettünk (3 ml/patkány) majd a plazma szomatosztatin és CGRP szinteket RIA-val meghatároztuk (n=5-6/csoport).

2. Kiválasztva az RTX 5 perces dózis-hatás görbéjéről a 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -os dózist mely megközelítőleg az ED_{50} értéknek felelt meg, megvizsgáltuk az RTX adása előtt 5 perccel adott endogén cannabinoid anandamid (10 és 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) hatását is. Az anandamid nagyobb dóziséknél, mely már szignifikáns gátlást eredményezett mindkét peptid esetén a szelektív CB1 antagonistá (SR141716A) hatását is elemeztük. Az SR141716A előkezelés (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) 10 perccel az anandamid (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) adás előtt történt. Vizsgáltuk az anandamid (1 mg/kg és 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) hatását önmagában a bazális plazmaszintekre is (n=6/csoport).

3. Hasonló időparaméterekkel megvizsgáltuk a szisztémásan alkalmazott nociceptin (20

hogy receptorát már a ligand azonosítása előtt felfedezték, azt „orphan” azaz arva receptornak, később ORL₁ vagyis „opioid receptor like 1”-nek elnevezve (Reinscheid és mtsai, 1995). A nociceptin előzetes kísérleteinkben gátolta *in vitro* körülmények között a szenzoros neuropeptid felszabadulást (Helyes és mtsai, 1997), valamint *in vivo* kísérletekben a neurogén gyulladásos folyamatokat, illetve a hízósejtek degranulációját (Németh és mtsai, 1998b).

Korábbi összehasonlító vizsgálatok igazolták, hogy az anandamiddel szerkezeti homológiát mutató undecenyl-2-amino-ethanol képes enyhe izgató hatást kifejteni bizonyos fájdalomtesztekben, a capsaicinhez hasonlóan csökkenti a testhőmérsékletet és kiváltja a pulmonális chemoreflexet a capsaicin-érzékeny idegvégződésök izgatása révén (Szołcányi és Jancsó-Gábor, 1975, Szołcányi 1982). Elemeztük az undecenyl-2-amino-ethanol hatását is a plazma szomatosztatin és CGRP szintre, összevetve az RTX esetén tapasztalt izgató hatással.

Módszerek

1. CGRP és szomatosztatin felszabadulás vizsgálata *in vivo*

Kísérleteinket 200-240 g súlyú nőstény Wistar patkányokon végeztük, amelyeket natrium thiopethallal (Trapanal, 100 mg/kg, i.p.) altattunk. A bal vena jugularist, valamint a jobb arteria carotist megkánuláltuk, a vénás anyagbeadás, illetve artériás vérmintanyerés céljából. Az állatoknak tracheakanült kötöttünk be és azokban az esetekben, amelyekben az RTX beadása után átmeneti légzésleállás következett be, rövid ideig mesterséges lélegeztetést alkalmaztunk.

1. Az RTX hatását több dózisban is megvizsgáltuk (0.1, 0.3, 0.6, 1 és 3 µg/kg, i.v.) beadása után 5, illetve 60 perc elteltével artériás vérmintákat vettünk (3 ml/patkány) majd a plazma szomatosztatin és CGRP szinteket RIA-val meghatároztuk (n=5-6/csoport).

2. Kiválasztva az RTX 5 perces dózis-hatás görbéjéről a 0.6 µg/kg-os dózist mely megközelítőleg az ED₅₀ értéknek felelt meg, megvizsgáltuk az RTX adása előtt 5 perccel adott endogén cannabinoid anandamid (10 és 100 µg/kg, i.v.) hatását is. Az anandamid nagyobb dózisánál, mely már szignifikáns gátlást eredményezett mindkét peptid esetén a szelektív CB1 antagonistá (SR141716A) hatását is elemeztük. Az SR141716A előkezelés (100 µg/kg, i.v.) 10 perccel az anandamid (100 µg/kg, i.v.) adás előtt történt. Vizsgáltuk az anandamid (1 mg/kg és 100 µg/kg, i.v.) hatását önmagában a bazális plazmaszintekre is (n=6/csoport).

3. Hasonló időparaméterekkel megvizsgáltuk a szisztémásan alkalmazott nociceptin (20

$\mu\text{g/kg}$, i.p.) azon dózist, mely a neurogén plazma extravázációt előző kísérleteinkben szignifikánsan gátolta ($n=5/\text{csoport}$).

4. Elemeztük a capsaicinnel szerkezeti hasonlóságot mutató undecenyl-2-amino ethanol (1 mg/kg, i.v.) hatására bekövetkező plazma CGRP és szomatosztatin szint változásokat ($n=6$).

Az egyes csoportokban az adatok átlagait adtuk meg a standard hibával (átlag \pm S.E.M.). Statisztikai értékelésre paratlan Student t-próbát használtunk. Statisztikailag szignifikánsnak $P<0.05$ esetén értékeltük az adatokat (** $P<0.01$, * $P<0.05$).

2. Neuropeptid felszabadulás vizsgálata *in vitro*

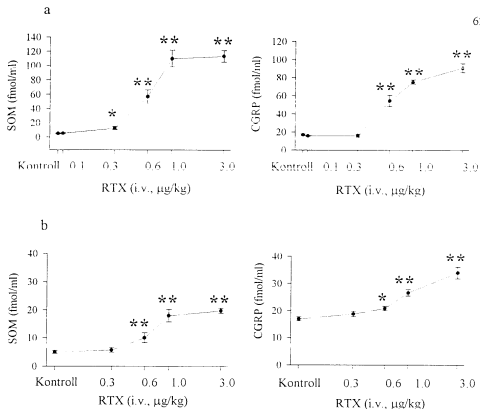
Kísérleteinkhez 200-240 g súlyú nőstény Wistar patkányokat natrium pentobarbitallal (Nembutal, 40 mg/kg, i.p.) történt altatásban elvégeztettünk. A tracheákat kimetszés után 37 °C-os oxigenizált (95 % O_2 és 5 % CO_2) Krebs oldattal 60 percen át perfundáltuk (1 ml/perc). Az ataromás leállítását után a kamrákban lévő odatot 8 percenként 3-szor lecserelve frakciókat gyűjtöttünk (ingerlés előtti - ingerelt - ingerlés utáni), (II./1. fejezet).

Az anandamidot a második periódus kezdetétől adtuk a szervfürdőbe 10^{-5} M koncentrációban önmagában, illetve PTX (100 ng/ml) jelenlétében. Anandamid hatását megvizsgáltuk nagyobb koncentrációban alkalmazva is (5×10^{-4} M) ($n=6$ minta /csoport).

A mintákat jégbe hűtött csövekbe gyűjtöttük és a frakciók SP, CGRP és szomatosztatin koncentrációit specifikus RIA módszerek segítségével határoztuk meg (Németh és mtsai, 1996, 1998a, 1999). A peptidek mennyiségét fmol/mg egységben, nedves szövetsúlyra vonatkoztatva fejeztük ki. Az eredmények statisztikai értékelése Student-féle páros és páratlan t-tesztel történt (** $P<0.01$, * $P<0.05$).

Eredmények

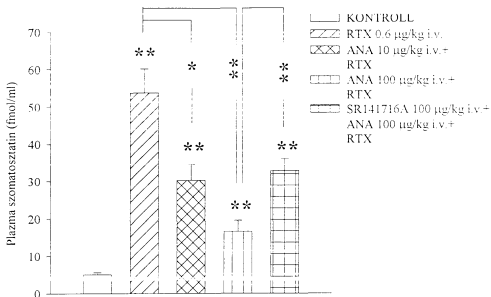
1. A szisztémásan alkalmazott RTX dózisfüggően emeli a plazma szomatosztatin, illetve CGRP szinteket. Az 5 perces értékeknél szignifikáns szomatosztatin szint emelkedést okozott már a 0.3 $\mu\text{g/kg}$ dózis, míg a CGRP-nél csak a 0.6 $\mu\text{g/kg}$. A 0.6 $\mu\text{g/kg}$, illetve ennél magasabb dózisoknál még 60 perc eltelté után is emelkedett plazmaszinteket mértünk mindkét peptid esetén (V/1.a. és b. ábra). A szomatosztatin tehát érzékenyebben reagál, azaz küszöbdózis alacsonyabb és dózis-hatás görbéje hamarabb éri el a maximumát.



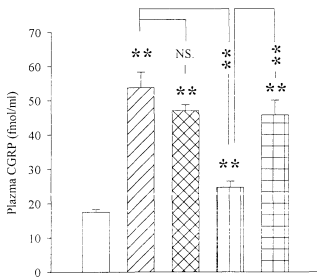
V/I. a és b. ábra. Plazma szomatosztatin és CGRP szintek dóziszfüggő változása szisztémás RTX kezelés hatására (a: 5 perces, b: 60 perces érték).

2. Anandamid (100 µg/kg, i.v.) mindkét peptid RTX-kiváltotta felszabadulását jelentős mértékben gátolta: a szomatosztatint 76.3 ± 3.02 %-kal ($P < 0.01$), a CGRP szint emelkedését 80.1 ± 4.56 %-kal ($P < 0.01$) csökkentette. A kisebb dózis (10 µg/kg, i.v.) azonban csak a szomatosztatin esetén ért el szignifikáns mértéket, 48.1 ± 3.24 %-os gátlást kifejtve ($P < 0.05$), a CGRP szint emelkedését csak 18.5 ± 1.71 %-kal csökkentette. Az SR141716A szelektív CB1 antagonistával végzett előkezelés mindkét peptid esetén szignifikáns mértékben képes volt csökkenteni az anandamid gátló hatását, a szomatosztatin (76.3 ± 3.02 %-ról 42.9 ± 2.36 %-ra, $P < 0.01$), valamint a CGRP (80.1 ± 4.56 %-ról 22.25 ± 1.64 %-ra, $P < 0.01$) felszabadulására is, azonban teljesen kivédeni nem tudta (V/2 a. és b. ábra).

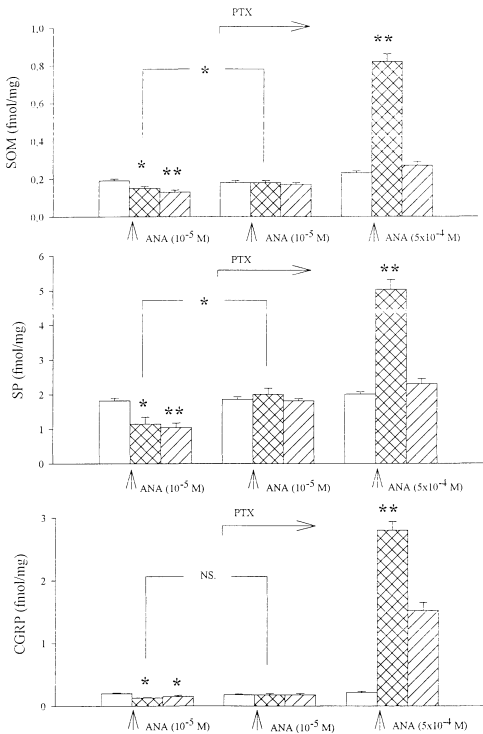
Önmagában alkalmazva az anandamid nagyobb dózisa (1 mg/kg, i.v.) a szomatosztatin bazális plazmaszintjét szignifikáns mértékben csökkentette a kontrollhoz képest (5.02 ± 0.56 -ről 3.52 ± 0.16 -re, fmol/ml) ($P < 0.05$), a CGRP esetén azonban nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést (17.5 ± 0.78 , illetve 18.0 ± 0.59 fmol/ml).



V/2. a. ábra. Anandamid hatása intravénás RTX kezeléssel kiváltott szomatosztatin felszabadulásra *in vivo*.



V/2. b. ábra. Anandamid hatása intravénás RTX kezeléssel kiváltott CGRP felszabadulásra *in vivo*.



V/3. Anandamid hatása a szenzoros neuropeptidok felszabadulására *in vitro*.

3. Anandamid (10^{-5} M) *in vitro* körülmények között mindhárom neuropeptid bazális felszabadulását szignifikáns mértékben csökkentette, melyet PTX a G-protein út gátlásán keresztül helyreállított. Ez arra utal, hogy az anandamid ezt a hatását a G-protein függő CBI receptoron és nem direkt ioncsatornákon fejtí ki (V/3 ábra). Fzzel szemben nagy koncentrációban alkalmazva (5×10^{-4} M) az anandamid igen jelentős neuropeptid felszabadulást eredményezett, ez körülbelül a 10^{-5} M capsaicin felszabadító hatásának felelt meg, ami már neurotoxicitásra utal.

4. Nociceptin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) szignifikáns mértékben 46.8 ± 3.8 %-kal ($P < 0.05$) gátolta az RTX-kiváltotta szomatosztatin felszabadulását, míg a CGRP esetén 38.5 ± 3.4 %-os gátlást tapasztaltunk. Az alkalmazott dózisban a nociceptin önmagában nem befolyásolta a bazális peptidszinteket.

5. Undecenyl-2-amino-ethanol (1 mg/kg, i.v.) a CGRP szintet nem befolyásolta, azonban szignifikáns emelkedést váltott ki a plazma szomatosztatin szintben (5.02 ± 0.56 -ról 14.62 ± 1.23 -ra, fmol/ml) ($P < 0.05$). Ez az izgató hatás közelítőleg megfelel az RTX $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ dózisának, ami arra utal, hogy az RTX közel 3000-szer hatásosabb a szomatosztatin felszabadítás tekintetében.

Következtetések

Kísérleteinkben *in vivo* körülmények között is igazoltuk a szisztémásan alkalmazott RTX akut izgató hatását a capsaicin-érzékeny idegvégződések VR1 receptorain, ami az intravénás adásból eredően feltehetőleg elsősorban a perivascularis chemonociceptorokon és a polymodális nociceptorokon érvényesül. Az aktiváció hatására felszabaduló peptidek a szisztémás keringésbe is bejutva a plazma CGRP, illetve szomatosztatin szint jelentős, dózisfüggő emelkedését okozzák. A kidolgozott módszer alkalmas *in vivo* modell a capsaicin receptoron ható agonista, illetve antagonistá vegyületek szenzoros neuropeptid felszabadulásra kifejtett hatásának vizsgálatára a plazma neuropeptid szintjeinek követésén keresztül.

A szomatosztatin felszabadulást kiváltó küszöbdózis alacsonyabb, $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ és a maximális hatás a plazma szint 22 2-szeres emelkedését eredményezte, ezzel szemben a CGRP felszabadulást kiváltó RTX küszöbdózis $0.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ és a maximális emelkedés csekélyebb, 5,2-szeres volt. A tartósan (60 perc) fennmaradó hatás az RTX receptorkinetikájából eredő elhuzodó, folyamatos peptidfelszabadítás következménye, tekintettel arra, hogy mindkét peptid féleletideje rövid (szomatosztatin 0.5-3 perc, CGRP 18-20 perc) (Patel és Wheatley, 1995,

McEwan és mtsai, 1988). Irodalmi adatok is bizonyítják, hogy míg a capsaicinnel kiváltott áramok az ingeranyag elvonása után rögtön megszűnnek, ezzel szemben az RTX által kiváltott ionáramválaszok sokkal tartósabbak és még az agonista elvonása után is sokáig fennmaradnak (Liu és Simon, 1994), ezzel a hosszantartó neuropeptid felszabadító hatás is magyarázható.

Anandamid es nociceptin gátló hatást fejtenek ki a capsaicin-érzékeny afferensekből kémiai ingerrel kiváltott neuropeptid felszabadulásra. Anandamid neuropeptid felszabadulásra kifejtett gátló hatása specifikus CB1 antagonistával kivédhető volt *in vivo*, ami arra utal, hogy az anandamid ezt a hatását a primer afferenseken lévő CB1 receptorok aktiválása útján fejtette ki. Ugyanezt igazolja a PTX-előkezelés eredménye is *in vitro*, mely a gátló hatást kivédte és a bazális peptidszinteket helyreállította. Nem lett volna meglepő eredmény az sem, ha a CB1 receptorok blokkolása után, anandamid hatására a peptidfelszabadulás fokozódik. Bizonyított, hogy az anandamid képes mindkét receptort, a CB1 és a VR1 receptort is aktiválni, egymást ellensúlyozó hatásokat kiváltva. Irodalmi adatok szerint az anandamid *in vitro* körülmények között CGRP felszabadulást 10^{-7} - 10^{-5} M koncentrációtartományban váltott ki (Zygmunt és mtsai, 1999), míg *in vivo* kísérletekben a capsaicin-kiváltotta CGRP felszabadulást a talpba adott 10^{-10} M koncentrációban gátolta, a bazális felszabadulás befolyásolása nélkül (Richardson és mtsai, 1998). Ezek alapján feltételezhető, hogy az anandamid capsaicin VR1 receptor aktiváló hatása a CB1 receptorokon kifejtett gátló hatás következtében nem tud manifesztálódni, ezért az anandamid capsaicin VR1 receptor endogén ligandjaként való funkciója nem látszik elfogadhatónak. *In vitro* kísérletünkben alkalmazott fiziológiásan nem releváns nagyobb koncentrációval (5×10^{-4} M) kiváltott peptidfelszabadulás lehet, hogy a VR1 receptor izgatás eredménye, de ilyen dózistartományban már neurotoxikus hatás sem zárható ki.

A nociceptin szintén gátolta a capsaicin-érzékeny afferensekből kémiai ingerrel kiváltott neuropeptid felszabadulást, feltehetőleg az idegvégződéseken elhelyezkedő ORL1 receptor aktiválása útján. Ebben a nociceptin eltér az opioid vegyületektől, mivel a klasszikus μ és δ receptor agonisták csak az elektromos stimulációval kiváltott peptidfelszabadulást gátolják (Maggi 1995). Irodalmi adatok szerint a nociceptin gátolja az alacsony feszültségű, T-típusú Ca^{2+} csatornák működését (Connor és mtsai, 1996), valószínűleg ezzel a mechanizmussal gátolva az idegvégződésekből stimuláció hatására történő neuropeptid felszabadulást is.

LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Patkányban a szomatoszenzoros idegekhez hasonlóan, a n. vagusok capsaicin-érzékeny szenzoros rostjainak antidrómus ingerlése az aktivált idegvégződésekből felszabaduló szomatosztatin által közvetített szisztémás gyulladásgátló hatást hoz létre patkányban. Hasonló endogén gyulladásgátló hatás váltható ki tengerimalacban a n. ischiadicus szomatoszenzoros idegvégződéscinke ingerlésével.

2. A capsaicin-érzékeny idegvégződések antidrómus, valamint orthodrómus aktivációjával felszabadított szomatosztatin anti-nociceptív hatást is kivált.

3. Kísérletes diabeteses neuropathiában SP, valamint CGRP csökkent felszabadulása mellett igazoltuk a capsaicin-érzékeny szenzoros rostokból a szomatosztatin felszabadulás csökkenését, valamint az így kiváltott endogén gyulladásgátló hatás károsodását is.

4. TT-232 heptapeptid szomatosztatin analóg vegyület gyulladásgátló hatást fejt ki akut neurogén gyulladással, valamint krónikus ízületi gyulladással járó folyamatokra egyaránt, hatását feltehetően döntően a neuropeptid felszabadulás gátlásán keresztül érte el a capsaicin-érzékeny idegvégződések sst1, illetve sst4 receptorain. TT-232 gátolta a carrageenin gyulladással leukocita akkumulációs fázisát is. Hasonló gátló hatással rendelkezett az antidrómus idegingerléssel felszabadított endogén szomatosztatin is. Ingerléssel felszabadított endogén neuropeptidokkal (SP, CGRP) azonban nem sikerült leukocita akkumulációt kiváltanunk a borbén.

5. Capsaicin, RTX és piperin, illetve elektromos téringerlés a capsaicin-érzékeny idegvégződésekben tárolt szomatosztatin, CGRP, valamint SP felszabadulását váltják ki koncentráció-, illetve impulzusszámfüggő módon. Az elektromos ingerléssel előidézett peptidfelszabadulás 0.5-10 Hz frekvenciatartományban azonos impulzusszám esetén azonos mértékű. RTX-szel, valamint capsaicinnel kiváltott akut deszenzitizáció szintén koncentrációfüggő és képes kivédeni mind az elektromos téringerlés-, mind a capsaicin-kiváltotta neuropeptid felszabadulást. Mindkét anyag után kialakuló deszenzitizáció legalacsonyabb koncentrációban csak a CGRP felszabadulást gátolja, majd a szomatosztatinét és végül legnagyobb koncentrációban az SP-ét.

6. Szisztémásan alkalmazott RTX a capsaicin-érzékeny chemonociceptorok izgatásával a plazma szomatosztatin és CGRP szint dóziszfüggő, rapid, de hosszantartó emelkedését váltja ki. Az így kiváltott neuropeptid felszabadulást az anandamid és a nociceptin gátolja. *In vivo* neuropeptid felszabadulás alapján kapott eredményeink tehát nem támogatják azt a koncepciót, mely szerint az anandamid a capsaicin VR1 receptor funkcionális hatásokért felelős endogén ligandja lenne.

HIVATKOZOTT KÖZLEMENYEK JEGYZÉKE

- Ankersen, M., Crider, M., Liu, S., Ho, B., Andersen, H.S. and Stüdsen, C. (1998). Discovery of a novel non-peptide somatostatin agonist with SST4 selectivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 1368-1373.
- Ács, G., Biró, T., Ács, P., Modarres, S. and Blumberg, P.M. (1997). Differential activation and desensitization of sensory neurons by resiniferatoxin. *J. Neurosci.*, 17, 5622-5628.
- Baluk, P., Bertrand, C., Geppetti, P., McDonald, D.M., Nadel, J.A. (1995). NK₁ receptors mediate leukocyte adhesion in neurogenic inflammation in the rat trachea. *Am. J. Physiol.*, 12, L263-L269.
- Bayliss, W.M. (1901). On the origin from the spinal cord of the vaso-dilator fibres of the hindlimb, and on the nature of these fibres. *J. Physiol.*, 26, 173-180.
- Beltramo, M. and Piomelli, D. (1999). Anandamide transport inhibition by the vanilloid agonist olvanil. *Eur. J. Pharmacol.*, 364, 75-78.
- Bennett, G.S., Garrett, N.E., Diemel, L.T., Brain, S.D. and Tomlinson, D.R. (1998). Neurogenic cutaneous vasodilation and plasma extravasation in diabetic rats: effect of insulin and nerve growth factor. *Br. J. Pharmacol.*, 124, 1573-1579.
- Bevan, S. and Szolcsányi, J. (1990). Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11, 330-333.
- Blumberg, P.M., Szállási, Á. and Ács, G. (1993). Resiniferatoxin – an ultrapotent capsaicin analogue. In *Capsaicin in the Study of Pain*. J.N. Wood, (Ed), pp. 45-62. Academic Press, London.
- Brain, S.D. (1996). Sensory neuropeptides in the skin. In *Neurogenic Inflammation*. Geppetti, P. and Holzer, P. (Eds.), pp. 229-244. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D. and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389, 816-824.
- Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I. and Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288, 306-313.
- Chrubasik, J. (1991). Somatostatin and chronic pain management. In *Contemporary Issues in Chronic Pain Management*, Parris, W.C.V. (Ed), pp. 87-96. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
- Coleridge, J.C.G. and Coleridge, H.M. (1984). Afferent vagal C fibre innervation of the lung and airways and its functional significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 99, 1-110.
- Connor, M., Yeo, A. and Henderson, G. (1996). The effect of nociceptin on Ca²⁺ channel current and intracellular Ca²⁺ in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Br. J. Pharmacol.*, 118, 205-207.
- Dalsgaard, C.J. (1988). The sensory system. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Björklund, A., Hökfelt, T. and Owman, C. (Eds), pp. 599-636. Elsevier Science publishers B.V.
- Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, J., et al. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 405, 183-187.

- DeRose, V., Robbins, R.A., Snider, R.M., Spurzem, J.R., Thiele, G.M., Rennard, S.I. and Rubinstein, I. (1994) Substance P increases neutrophil adhesion to bronchial epithelial cells. *J. Immunol.*, **152**, 1339-1346.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. and Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, **258**, 1946-1949.
- Diemel, L.T., Stevens, E.J., Willars, G.B., Tomlinson, D.R. (1992). Depletion of substance P and calcitonin gene-related peptide in sciatic nerve of rats with experimental diabetes: effects of insulin and aldose reductase inhibition. *Neurosci. Lett.*, **137**, 253-256.
- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T. and De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.*, **21**, 521-528.
- Donaldson, L.F., Harmar, A.J., McQueen, D.S. and Seckl, J.R. (1992). Increased expression of PPT, CGRP but not VIP mRNA in dorsal root ganglia during the development of adjuvant monoarthritis in the rat. *Mol. Brain. Res.*, **16**, 143-149.
- Donnerer, J., Schuligoi, R. and Stein, C. (1992). Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience* **49**, 603-608.
- Fedele, D. and Giugliano, D. (1997). Peripheral diabetic neuropathy. Current recommendations and future prospects for its prevention and management. *Drugs*, **54**, 414-421.
- Ferrel, W.R. and Lam, F.Y. (1996). Sensory neuropeptides in arthritis. In *Neurogenic Inflammation*. Gepetti, G. and Holzer, P. (Eds), pp. 33-42. Boca Raton, U.S.A.: CRC Press.
- Fischer, W.E., Muscarella, P., Boros, L.G. and Shirmer, W.J. (1998). Variable effect of streptozotocin diabetes on the growth of hamster pancreatic cancer (H2T) in the Syrian hamster and nude mouse. *Surgery*, **123**, 315-320.
- Gamse, R. and Jancso, G. (1985). Reduced neurogenic inflammation in streptozotocin-diabetic rats due to microvascular changes but not to substance P depletion. *Eur. J. Pharmacol.*, **118**, 175-180.
- Gepetti, P. and Holzer, P. (eds) (1996). *Neurogenic Inflammation*. Boca Raton, U.S.A.: CRC Press.
- Gyorf, A., Fazekas, A., Fehér, E., Ender, F. and Rosivall, L. (1996). Effects of streptozotocin-induced diabetes on neurogenic inflammation of gingivomucosal tissue in rat. *J. Periodontal Res.*, **31**, 249-255.
- Helyes, Zs., Nemeth, J., Pintér, E. and Szolcsányi, J. (1997). Inhibition by nociceptin of neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals. *Br. J. Pharmacol.*, **121**, 613-615.
- Helke, C.J. and Hill, K.M. (1988). Immunohistochemical study of neuropeptides in vagal and glossopharyngeal afferent neurons in the rat. *Neuroscience*, **26**, 539-551.
- Helliwell, R.J.A., McLatchie, L.M., Clarke, M., Winter, J., Bevan, S. and McIntyre, P. (1998). Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neurosci. Lett.*, **250**, 177-180.

- Hofland, L.J., Visser-Wisselaar, H.A. and Lamberts, S.W. (1995). Somatostatin analogs: clinical application in relation to human somatostatin receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol.*, 50, 287-297.
- Holzer, P. (1988). Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins and other neuropeptides. *Neuroscience*, 24, 759-768.
- Holzer, P. (1998). Neural Injury, Repair, and Adaptation in the GI Tract. II. The elusive action of capsaicin on the vagus nerve. *Am. J. Physiol.*, 275, (Gastrointest. Liver Physiol. 38) G8-G13.
- Holzer, P. and Maggi, C.A. (1998). Dissociation of dorsal root ganglion neurons into afferent and efferent-like neurons. *Neuroscience*, 86, No. 2, 389-398.
- Homann, A.G. and Herkenham, M. (1999). Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label *in situ* hybridization study. *Neuroscience*, 90, No 3, 923-931.
- Hoyer, D., Lübbert, H. and Bruns, C. (1994). Molecular pharmacology of somatostatin receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 350, 441-453.
- Högyes, A. (1878). Beiträge zur physiologischen Wirkung der Bestandteile des Capsicum annum. *Arch. Exp. Path. Pharmac.*, 9, 117-130.
- Ishizuka, O., Mattiasson, A. and Andersson, K.E. (1995). Urodynamic effects of intravesical resiniferatoxin and capsaicin in conscious rats with and without outflow obstruction. *J. Urol.*, 154, 611-616.
- Jancsó, N. (1955). Speicherung, Stoffanreicherung in Retikuloendothel und in der Niere. Budapest: Akadémiai Kiadó.
- Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A. and Szolcsányi, J. (1967). Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pre-treatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol.*, 31, 138-151.
- Jancsó-Gábor, A. and Szolcsányi, J. (1970). Action of rare earth metal complexes on neurogenic as well as on bradykinin-induced inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.*, 22, 366-370.
- Jancsó, G., Karesú, S., Király, E., Szebeni, A., Tóth, L., Bácsy, E., Joó, F. and Párducz, A. (1984). Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium. *Brain. Res.*, 295, 211-216.
- Karalis, K., Mastokaros, G., Chrousos, G.P. and Tolis, G. (1994). Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, 93, 2000-2006.
- Kéri, Gy., Mező, I., Vadász, ZS., Horváth, A., Idei, M., Vántus, Á., Balogh, G., Bökönyi, G., Bajor, T., Teplán, I., Tamás, J., Mák, M., Horváth, J. & Csuka, O. (1993). Structure-activity relationship studies of novel somatostatin analogs with antitumor activity. *Peptide Research*, 6, 281-288.
- Kéri, Gy., Ércegyi, J., Horváth, A., Mező, I., Idei, M., Vántus, T., Balogh, Á., Vadász, Zs., Bökönyi, Gy., Sepr, J., Teplán, I., Csuka, O., Tejeda, M., Gaál, D., Szegedi, Zs., Szende, B., Rote, C., Kalthoff, H. & Ullrich A. (1996). A tumor-selective somatostatin analog (TT-232) with strong *in vitro* and *in vivo* anti-tumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 12513-12518.

- Kolasiński, S.L., Haines, A., Siegel, E.L. et al. (1992). Neuropeptides and inflammation. A somatostatin analog as a selective antagonist of neutrophil activation by substance P. *Arthritis & Rheumatism* 35, 369-375.
- Lawson, S.N. (1996). Peptides and cutaneous polymodal nociceptor neurones. In *Progress in Brain Research* Kumazawa, T., Kruger, L., Mizumura, K. (Eds), Vol 113 pp 369-385 Elsevier, Amsterdam.
- Lembeck, F. and Holzer, P. (1979). Substance P as neurogenic mediator of vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 310, 175-183.
- Lembeck, F., Donnerer, J. and Barthó, L. (1982). Inhibition of neurogenic vasodilatation by substance P antagonists, somatostatin and (D-met², pro³)enkephalinamide. *Eur. J. Pharmacol.*, 85, 171-176.
- Liu, L. and Simon, S.A. (1994). A rapid capsaicin-activated current in rat trigeminal ganglion neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 91, 738-741.
- Liu, L. and Simon, S.A. (1996). Similarities and differences in the currents activated by capsaicin, piperine and zingerone in rat trigeminal ganglion cells. *J. Neurophysiol.*, 76, 1858-1869.
- Lundberg, J.M. (1996). Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: Integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol. Rev.*, 48, 113-178.
- Lundberg, J.M., Brodin, E. and Saria, A. (1983). Effects and distribution of vagal capsaicin-sensitive substance-P neurons with reference to the trachea and lungs. *Acta Physiol. Scand.*, 119, 243-252.
- Maggi, C.A. (1995). Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog. Neurobiol.*, 45, 1-98.
- Maggi, C.A., Santicioli, P., Gepetti, P., Giuliani, S., Patacchini, R., Frili, S., Grassi, J. and Meli, A. (1987). Involvement of peripheral site of action in the early phase of neuropeptide depletion following capsaicin desensitization. *Brain. Res.*, 436, 402-406.
- Maggi, C.A. and Meli, A. (1988). The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol.*, 19, 1-43.
- Matsuda, H., Kawakita, K., Kiso, Y., Nakano, T., Kitamura, Y., 1989. Substance-P induces granulocyte infiltration through degranulation of mast-cells. *J. Immunol.* 142, 927-931.
- McDonald, D.M. (1988). Neurogenic inflammation in the rat trachea. I. Changes in venules, leukocytes and epithelial cells. *J. Neurocytol.*, 17, 583-603.
- McDonald, D.M., Mitchell, R.A., Gabella, G. and Haskell, A. (1988). Neurogenic inflammation in the rat trachea. II. Identity and distribution of nerves mediating the increase in vascular permeability. *J. Neurocytol.*, 17, 605-28.
- McEwan, J.R., Benjamin, N., Larkin, S., Fuller, R.W., Dollery, C.T. and McIntyre, I. (1988). Vasodilatation by calcitonin gene-related peptide and by substance P: a comparison of their effects on resistance and capacitance vessels of human forearms. *Circulation*, 77, 1072-1080.

- McGillis, J.P. and Fernandes, S. (1999) Sensory neuropeptides, neurogenic inflammation and inflammatory cells. In: Pain and Neurogenic Inflammation, eds.: S.D. Brain and P.K. Moore, Birkhauser, pp.115-135.
- Meunier, J.-C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J.-L., Guillemot, J.-C., Ferrara, P., Monsarrat, B., Mazarguil, H., Vassart, G., Parmentier, M. & Costentin, J. (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL₁ receptor. *Nature*, 377, 532-535.
- Moroney, M.A., Alcaraz, M.J., Forder, R.A., Carey, F., Hoult, J.R.S. (1988). Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related glycone flavonoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 787-792.
- Németh, J., Helyes, Zs., Görcs, T., Gardi, J., Pintér, E. and Szolcsányi, J. (1996). Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone. *Acta Physiologica Hungarica*, 84, 313-315.
- Németh, J., Görcs, T., Helyes, Zs., Oroszi, G., Kocsy, T., Pintér, E. and Szolcsányi, J. (1998a). Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research. *Neurobiology*, 6, 473-475.
- Németh, J., Helyes, Zs., Oroszi, G., Thán, M., Pintér, E. and Szolcsányi, J. (1998b). Inhibition of nociceptin on sensory neuropeptide release and mast cell-mediated plasma extravasation in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 347, 101-104.
- Panés, J., Perry, M. and Granger, D.N. (1999). Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br. J. Pharmacol.* 126, 537-550.
- Patachini, R., Maggi, A., Meli, A. (1990) Capsaicin-like activity of some natural pungent substances on peripheral endings of visceral afferents. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342, 72-77.
- Patel, Y.C. and Wheatley, T. (1983). In vivo and in vitro plasma disappearance and metabolism of somatostatin-28 and somatostatin-14 in the rat. *Endocrinology*, 112, 220-225.
- Patel, Y.C. and Pierzchala, I. (1985). Cysteamine induces a loss of tissue somatostatin-28 when as somatostatin-28₍₁₁₋₂₈₎-like immunoreactivity but not when assayed as somatostatin-28₍₁₋₁₄₎-like immunoreactivity: evidence for the importance of the disulfide bond for cysteamine action. *Endocrinology*, 116, 1699-1702.
- Patel, Y.C., Murthy, K.K., Escher, E.E., Banville, D., Spiess, J. and Srikant, C.B. (1990). Mechanism of action of somatostatin: an overview of receptor function and studies of the molecular characterization and purification of somatostatin receptor proteins. *Metabolism*, 39 (Suppl. 2), 63-69.
- Pintér, E. and Szolcsányi, J. (1988). Inflammatory and antiinflammatory effects of antidromic stimulation of the dorsal roots in the rat. *Agents Actions*, 25, 240-241.
- Pintér, E. and Szolcsányi, J. (1996). Systemic anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of the dorsal roots in the rat. *Neurosci. Lett.*, 212, 33-36.
- Pintér, E., Helyes, Zs., Németh, J., Oroszi, G., and Szolcsányi, J., (1997). Somatostatin, as anti-inflammatory neuromediator: in vivo and in vitro evidence. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, Suppl. 1., 356, R-44.

- Ralevic, V., Belai, A., Burnstock, G. (1993). Impaired sensory motor nerve function in the isolated mesenteric arterial bed of streptozotocin-diabetic and gangliosid-treated streptozotocin-diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 110, 1105-1111.
- Reinscheid, R.K., Nuthacker, H.P., Bourson, A., Ardati, A., Hennitsen, R.A., Buitow, J.R., Grandy, D.K., Langen, H., Monsma, F.J. and Civelli, O. (1995). Orphanin FQ: A neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*, 270, 792-794.
- Reisine, T. (1995). Somatostatin. *Cellular and molecular Neurobiology*. 15, 597-615
- Reisine, T., He, H., Rens-Domiano, S., Martin, J., Raynor, K., Borislow, S. and Themos, K. (1990). Biochemical properties of somatostatin receptors. *Metabolism*, 39, (Suppl. 2.), 70-73.
- Richardson, J.D., Kilo, S. and Hargreaves, K.M. (1998). Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain*, 75, 111-119.
- Schierwagen, C., Bylund-Fellenius, A.C., Lundberg, C. (1990). Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *J. Pharmacol. Methods*, 23, 179-186.
- Springall, D.R., Cadieux, A., Oliveira, H., Su, H., Royston, D., Polak, J.M. (1987). Retrograde tracing shows that CGRP-immunoreactive nerves of rat trachea and lung originate from vagal and dorsal root ganglia. *J. Auton. Nerv. Syst.* 20, 155-166
- Stricker, S. (1876). Untersuchung über die Gefässwurzeln des Ischiadicus. *Sitz. Kaiserl. Akad. Wiss. (Wien)* 3, 173-180.
- Smart, D., Gunthorpe, M.J., Jerman, J.C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A.I., Chambers, J.K., Randall, A.D. and Davis, J.B. (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br. J. Pharmacol.* 129, 227-230.
- Smith, C.H., Barker, J.N., Morris, R.W., McDonald, D.M. and Lee, T.H. (1993). Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. *J. Immunol.*, 151, 3274-3282.
- Stein, C. (1995). The control of pain in peripheral tissue by opioids. *New England J. Med.*, 332, 1685-1690.
- Suzuki, H., Miura, S., Liu, Y.Y., Tsuchiya, M., Ishii, H. (1995). Substance P induces degranulation of mast cells and leukocyte adhesion to venular endothelium. *Peptides*, 13, 429-434.
- Szállási, A. and Blumberg, P.M. (1989). Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience*, 30, 515-520.
- Szállási, A. and Blumberg, P.M. (1990). Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. *Life Sci.* 47, 1399-1408
- Szállási, A. and Blumberg, P.M. (1996). Vanilloid-receptors: New insights enhance potential as a therapeutic target. *Pain*, 68, 195-208.
- Szállási, A. and Blumberg, P.M. (1999). Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. *Pharmacological Rev.* 51, 159-211.

- Szolicsányi, J. (1982). Capsaicin type pungent agents producing pyrexia. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, ed. Milton, A.S., Vol. 60., *Pyretics and Antipyretics*, pp. 437-478. Springer-Verlag, Berlin.
- Szolicsányi, J. (1983). Tetrodotoxin-resistant non-cholinergic neurogenic contraction evoked by capsaicinoids and piperine on the guinea-pig trachea. *Neurosci Lett.*, 42, 83-88.
- Szolicsányi, J. (1984). Capsaicin-sensitive chemoceptive neural system with dual sensory-effluent function. In *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation*. Chahl, L.A., Szolicsányi, J. and Lembeck, F. (Eds), pp. 27-53. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Szolicsányi, J. (1988). Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. *Agents Actions*, 23, 4-11.
- Szolicsányi, J. (1993). Actions of capsaicin on sensory receptors. In *Capsaicin in the Study of Pain*. J.N. Wood. (Ed), pp. 1-26. Academic Press, London.
- Szolicsányi, J. (1996a). Neurogenic inflammation: reevaluation of axon reflex theory. In *Neurogenic Inflammation*. Gepetti, G. and Holzer, P. (Eds), pp. 33-42. Boca Raton, U.S.A.: CRC Press.
- Szolicsányi, J. (1996b). Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. In *Progress in Brain Research*. Kumazawa, T., Kruger, L. and Mizumura, K. (Eds), Vol. 113., pp. 343-359. Elsevier, Amsterdam.
- Szolicsányi, J. (2000a). Are cannabinoids endogenous ligands for the VR1 capsaicin receptor? *Trends Pharmacol. Sci.*, 21, 41-42.
- Szolicsányi, J. (2000b). Anandamide and the question of its functional role for activation of capsaicin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 21, 203-204.
- Szolicsányi, J. and Janesó-Gábor, A. (1975). Sensory effects of capsaicin congeners. I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittel- Forschung*, 25, 19-877-1881.
- Szolicsányi, J., Janesó-Gábor, A. and Joó, F. (1975). Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Nanyn- Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 287, 157-169.
- Szolicsányi, J., Szállási, Á., Szállási, Z., Joo, F. and Blumberg, P.M. (1990). Resiniferatoxin: an ultrapotent selective modulator of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 255, 923-928.
- Szolicsányi, J., Helyes, Zs., Oroszi, G., Németh, J., and Pintér, E. (1998a). 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.*, 123, 936-942.
- Szolicsányi, J., Pintér, E., Helyes, Zs., Oroszi, G. and Németh, J. (1998b). Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br. J. Pharmacol.*, 125, 916-922.
- Tausk, F., Udem B. (1995). Exogenous but not endogenous substance P releases histamine from isolated human skin fragments. *Neuropeptides*, 29, 351-355.

- Theisen-Popp, P. and Müller-Peddinghaus, R. (1994) Antirheumatic drug profiles evaluated in the adjuvant arthritis of rats by multiparameter analysis. *Agents Actions*, 42, 50-55.
- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I. and Julius, D. (1998) The Cloned Capsaicin receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli. *Neuron*, 21, 531-543.
- Xu, X.J., Hao, J.X., Wiesenfeld-Hallin, Zs. Hakanson, R., Folkers, K. and Hökfelt, T. (1991). Spantide II, a novel tachykinin antagonist, and galanin inhibit plasma extravasation induced by antidromic C-fibre stimulation in rat hindpaw. *Neuroscience*, 42, 731-737.
- Villanueva, L., Peschanski, M., Calvino, B. and LeBars, D. (1986). Ascending pathways in the spinal cord involved in triggering of diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in the rat. *J. Neurophysiol.*, 55, 34-55.
- Waddell, P.J. and Lawson, S.N. (1989). The C-fibre conduction block caused by capsaicin on rat vagus nerve in vitro. *Pain*, 39, 237-242.
- Wallace, J.L., McKnight, W., Miyasaka, M. et al (1993). Role of endothelial adhesion molecules in NSAID-induced gastric mucosal injury. *Am. J. Physiol.* 265, G993-G998.
- Walmsley, D. and Wiles, P.G. (1991). Early loss of neurogenic inflammation in the human diabetic foot. *Clin. Sci. Colch.*, 80, 605-610.
- Winter, J., (1998). Brain derived neurotrophic factor, but not nerve growth factor, regulates capsaicin sensitivity of rat vagal ganglion neurones. *Neurosci. Lett.* 241, 21-24.
- Zygmunt, M.P., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sorgard, M., DiMarzo, V., Julius, D. and Högestatt, E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400, 452-457.
- Zygmunt, P.M., Julius, D., DiMarzo, V. & Högestatt, E.D. (2000). Anandamide-the other side of the coin. *Trends Pharmacol. Sci.*, 21, 43-44.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik támogatásukkal segítettek, hogy ez a doktori értekezés elkészüljön. Mindenekelőtt *Prof. Szolcsányi Jánosnak*, témavezetőmnek, hogy bevezetett a neurofarmakológia világába, és kutatómunkámat logikus gondolkodásával és konstruktív kritikáival mindvégig irányította. Ugyancsak köszönettel tartozom munkatársaimnak: *Dr. Németh Józsefnek*, *Dr. Pintér Erikának*, *Dr. Szilvassy Zoltannak* és *Dr. Helyes Zsuzsannának* a kísérletek elvégzésében és eredményeink közlésében való közreműködésükért, barátságukért. Asszisztensnőinknek, *Olasz Istvánné Csillának* és *Zöldhegyi Józsefné Marának* köszönöm gondos, megbízható, készséges segítségüket és a *Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet valamennyi dolgozójának*, hogy kiegyensúlyozott, nyugodt munkahelyi légkört biztosítottak számomra. Végül köszönettel tartozom *családomnak*, elsősorban szüleimnek, türelmükért, megertesükért és hasznos tanácsaikért, melyekkel mindvégig hozzájárultak ahhoz, hogy munkámat hatékonyan végezhessem.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

I. EREDETI KÖZLEMÉNYEK

A/ Nemzetközi folyóiratok

1. Németh J., Helyes Zs., Oroszi G., **Thán M.**, Pintér E., Szolcsányi J.: Inhibition of nociceptin on sensory neuropeptide release and mast cell-mediated plasma extravasation in rats.
Eur. J. Pharmacol., 347, 101-104, 1998.
2. Németh J., Szilvássy Z., **Thán M.**, Oroszi G., Sári R., Szolcsányi J.: Decreased sensory neuropeptide release from trachea of the rat with streptozotocin-induced diabetes.
Eur. J. Pharmacol., 369, 221-224, 1999.
3. Németh J., **Thán M.**, Sári R., Peitl B., Oroszi G., Farkas B., Szolcsányi J., Szilvássy Z.: Impairment of neurogenic inflammatory and anti-inflammatory responses in diabetic rats.
Eur. J. Pharmacol., 386, 83-88, 1999.
4. Helyes Zs., **Thán M.**, Oroszi G., Pintér E., Németh J., Kéri Gy., Szolcsányi J.: Antinociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogs in the rat.
Neurosci. Lett., 278, 185-188, 2000.
5. **Thán M.**, Németh J., Szilvássy Z., Pintér E., Helyes Zs., Szolcsányi J.: Anti-inflammatory effect of somatostatin released from capsaicin-sensitive vagal and sciatic sensory fibres of the rat and guinea-pig.
Eur. J. Pharmacol., (közlésre elfogadva) 2000.
6. Németh, J., **Thán, M.**, Szolcsányi, J.: Anandamide induced inhibition on the release of CGRP and somatostatin evoked by resiniferatoxin in the rat *in vivo*.
Brit. J. Pharmacol., (közlésre benyújtva) 2000.

B./ Angol nyelvű hazai folyóiratok

1. Németh J., Oroszi G., **Thán M.**, Helyes Zs., Pintér E., Farkas B., Szolcsányi J.: Substance P radioimmunoassay for quantitative characterization of sensory neurotransmitter release.
Neurobiology, 7, 437-444, 1999.

II. FOLYÓIRATOKBAN MEGJELENT ELŐADÁSKIVONATOK

A./ Külföldi folyóiratok, kongresszusi kiadványok

1. Szolcsányi J., Pintér E., Helyes Zs., Németh J., Oroszi G., **Thán M.**, Kéri Gy.: Anti-inflammatory effect induced by TT-232, a novel heptapeptide somatostatin analog.
Regul. Peptides, 80, 137, 1999.

2. **Thán M.**, Németh J., Helyes Zs., Szilvássy Z., Pintér E., Szolcsányi J.: Somatostatin mediated systemic anti-inflammatory effect induced by antidromic vagal and sciatic nerve stimulation. *Regul. Peptides*, 80, 137, 1999.
3. **Thán M.**, Németh J., Szilvássy Z., Oroszi G., Szolcsányi J.: Systemic anti-inflammatory effect mediated by somatostatin released from activated sensory vagal nerve terminals in rats and guinea-pigs. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13, 328s, 1999.
4. Pintér E., Helyes Zs., Németh J., Oroszi G., **Thán M.**, Kéri Gy., Szolcsányi J.: Pharmacological analysis of the anti-inflammatory effect induced by TT-232, a novel heptapeptide somatostatin analog. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13, 36s, 1999.
5. **Thán M.**, Pintér E., Brain S.D., Rawlingson A., Szolcsányi J.: Local and systemic effect of sciatic nerve stimulation on cutaneous neutrophil accumulation in the rat hindpaw. *Regul. Peptides*, 89, 84, 2000.
6. Németh J., **Thán M.**, Peitl B., Oroszi G., Szolcsányi J., Szilvássy Z.: Impaired anti-inflammatory response and decreased sensory neuropeptide release in streptozotocin-induced diabetes. *J. Physiol. London*, (közlésre elfogadva) 2000.

B / Angol nyelvű hazai folyóiratok

1. **Thán M.**, Németh J., Szilvássy Z., Oroszi G., Szolcsányi J.: Role of circulating somatostatin of neural origin in the development of systemic anti-inflammatory effect induced by local neurogenic inflammation in rats and guinea-pigs. *Neurobiology*, 7, 397, 1999.
2. Németh J., **Thán M.**, Helyes Zs., Oroszi G., Pintér E., Szolcsányi J.: Substance P radioimmunoassay for quantitative characterization of sensory neurotransmitter release. *Neurobiology*, 7, 360, 1999.
3. **Thán M.**, Németh J., Helyes Zs., Oroszi G., Pintér E., Szolcsányi J.: Release of somatostatin and CGRP from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in vitro and in vivo. *Neurobiology*, (közlésre elfogadva) 2000.
4. Németh J., **Thán M.**, Sari R., Peitl B., Oroszi G., Szolcsányi J., Szilvássy Z.: Impairment of neurogenic inflammation elicited systemic anti-inflammatory response in experimental diabetes. *Neurobiology*, (közlésre elfogadva) 2000.
5. Helyes Zs., **Thán M.**, Németh J., Pintér E., Kéri Gy., Szolcsányi J.: Mechanism of the inhibitory effect induced by TT-232 and anandamide on sensory neuropeptide release. *Neurobiology*, (közlésre elfogadva) 2000.

ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK LISTÁJA

1. **Thán M.**, Németh J., Oroszi G., Szilvássy Z., Szolcsányi J.: Szisztémás gyulladáscsökkentő hatás indukciója a n. vagus capsaicin-érzékeny rostjainak antidrómos ingerlésével. Magyar Élettani Társaság LXIII. Vándorgyűlése, Debrecen, 1998. július 8-11.
2. **Thán M.**, Oroszi G.: Szisztémás gyulladáscsökkentő hatás kiváltása a n. vagus capsaicin-érzékeny rostjainak antidrómos ingerlésével. Doktoranduszok II. Országos Konferenciája, Debrecen 1998. augusztus 30-szeptember 1.
3. **Thán M.**, Németh J., Szilvassy Z., Oroszi G., Szolcsányi J.: Role of circulating somatostatin of neural origin in the development of systemic anti-inflammatory effect induced by local neurogenic inflammation in rats and guinea-pigs. Magyar Idegtudományi Társaság VI. Konferenciája, Harkány-Pécs, 1999. január 27-30.
4. Németh J., **Thán M.**, Helyes Zs., Oroszi G., Pintér E., Szolcsányi J.: Substance P radioimmunoassay for quantitative characterization of sensory neurotransmitter release. Magyar Idegtudományi Társaság VI. Konferenciája, Harkány-Pécs, 1999. január 27-30.
5. **Thán M.**, Helyes Zs.: A vagus érzőidegvégződéseiből felszabaduló szomatostatin szisztémás gyulladásgátló hatása. Pécsi Akadémiai Bizottság- Neurobiológiai Munkabizottság, "Agykutatás Hete" Pécs, 1999. március 15-21."
6. Helyes Zs., **Thán M.**: A capsaicin-érzékeny érzőidegvégződésekből felszabaduló mediátor antinociceptív hatása. Pécsi Akadémiai Bizottság- Neurobiológiai Munkabizottság, "Agykutatás Hete" Pécs, 1999. március 15-21."
7. Szolcsányi J., Pintér E., Helyes Zs., Németh J., Oroszi G., **Thán M.**, Kéri Gy.: Anti-inflammatory effect induced by TT-232, a novel heptapeptide somatostatin analog. 9th Meeting of the European Neuropeptide Club, Ferrara, Olaszország, 12-15 May, 1999.
8. **Thán M.**, Németh J., Helyes Zs., Szilvássy Z., Pintér E., Szolcsányi J.: Somatostatin mediated systemic anti-inflammatory effect induced by antidromic vagal and sciatic nerve stimulation. 9th Meeting of the European Neuropeptide Club, Ferrara, Olaszország, 12-15 May, 1999.
9. **Thán M.**, Németh J., Szilvássy Z., Oroszi G., Szolcsányi J.: Systemic anti-inflammatory effect mediated by somatostatin released from activated sensory vagal nerve terminals in rats and guinea-pigs. 2nd European Congress of Pharmacology, Budapest, Hungary, 3-7 July, 1999.
10. Pintér E., Helyes Zs., Németh J., Oroszi G., **Thán M.**, Kéri Gy., Szolcsányi J.: Pharmacological analysis of the anti-inflammatory effect induced by TT-232, a novel heptapeptide somatostatin analog. 2nd European Congress of Pharmacology, Budapest, Hungary, 3-7 July, 1999.

11. **Thán M.**, Németh J., Szilvássy Z., Szolcsányi J.: Szisztémás gyulladáscsökkentő hatás indukciója a nervus vagus illetve a nervus ischiadicus capsaicin-érzékeny szenzoros rostjainak antidrómus ingerlésével patkányban és tengerimalacban. Az idegi eredetű somatostatin mediátor szerepe.

Tudógyógyászati, Allergológiai és Immunológiai Megbetegedések (TAIM) Nemzetközi Alapítvány V. Tudományos Konferenciája, Debrecen, 1999. augusztus 26-27. II. díjat nyert pályamunka.

12. **Thán M.**, Németh J., Helyes Zs., Oroszi G., Pintér E., Szolcsányi J.: Release of somatostatin and CGRP from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in vitro and in vivo. MITT 2000, Magyar Idegtudományi Társaság Konferenciája, Budapest, 2000. január 19-22.

13. Németh J., **Thán M.**, Sari R., Peitl B., Oroszi G., Szolcsányi J., Szilvássy Z.: Impairment of neurogenic inflammation elicited systemic anti-inflammatory response in experimental diabetes.

MITT 2000, Magyar Idegtudományi Társaság Konferenciája, Budapest, 2000. január 19-22.

14. Helyes Zs., **Thán M.**, Németh J., Pintér E., Kéri Gy., Szolcsányi J.: Mechanism of the inhibitory effect induced by TT-232 and anandamide on sensory neuropeptide release.

MITT 2000, Magyar Idegtudományi Társaság Konferenciája, Budapest, 2000. január 19-22.

15. **Thán M.**, Pintér E., Brain S.D., Rawlingson A., Szolcsányi J.: Local and systemic effect of sciatic nerve stimulation on cutaneous neutrophil accumulation in the rat hindpaw.

10th Annual Meeting of the European Neuropeptide Club, Innsbruck, Németország, 10-13 May, 2000.

16. Németh J., **Thán M.**, Peitl B., Oroszi G., Szolcsányi J., Szilvássy Z.: Impaired anti-inflammatory response and decreased sensory neuropeptide release in streptozotocin-induced diabetes.

Joint Meeting of the Physiological Society and the Hungarian Physiological Society, Budapest, Hungary, 27-29 May, 2000.

**AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ
SAJÁT KÖZLEMÉNYEK**

Systemic anti-inflammatory effect of somatostatin released from capsaicin-sensitive vagal and sciatic sensory fibres of the rat and guinea-pig

Mária Thán^a, József Németh^b, Zoltán Szilvássy^c, Erika Pintér^a, Zsuzsanna Helyes^a,
János Szolcsányi^{a,b,*}

^a Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University Medical School of Pécs, H-7601 P.O. Box 99, Pécs, Hungary

^b Neuropharmacology Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, H-7601 P.O. Box 99, Pécs, Hungary

^c Department of Pharmacology, University Medical School of Debrecen, H-4002 P.O. Box 12, Debrecen, Hungary

Received 23 December 1999; received in revised form 26 April 2000; accepted 27 April 2000

Abstract

The systemic anti-inflammatory effect induced by antidromic sensory nerve stimulation was investigated in rats and guinea-pigs. In antidromic stimulated rats, unilateral antidromic stimulation of vagal afferents (dorsal root G₁₀) evoked a 20% increase in plasma extravasation induced by 1% mustard oil on the acutely denervated hindlegs by $36.45 \pm 3.95\%$. Both the prevention of this inhibitory effect by cysteamine pretreatment and the stimulation-evoked rise of plasma somatostatin-like immunoreactivity in the two species suggest a mediator role of neural somatostatin. Since this response was blocked by systemic capsaicin pretreatment and slightly reduced after subdiaphragmatic vagotomy, participation of thoracic capsaicin-sensitive afferents is indicated. In guinea-pigs pretreated with guanethidine and pipercuronium, antidromic sciatic nerve stimulation induced $45.46 \pm 5.08\%$ inhibition on the contralateral leg and increased plasma somatostatin-like immunoreactivity. It is concluded that somatostatin released from the activated vagal capsaicin-sensitive sensory nerve terminals of the rat and somatic nerves of the guinea-pigs exerts a systemic humoral function. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Vagal afferent; Somatostatin; Capsaicin; Mustard oil; Antidromic stimulation; Anti-inflammatory effect

1. Introduction

It has been shown that activation of capsaicin-sensitive primary afferent nerve terminals results in vasodilatation and plasma extravasation in the relevant innervated areas (Holzer, 1992; Jancsó et al., 1967; Lundberg et al., 1983; McDonald, 1988; McDonald et al., 1988; Pintér and Szolcsányi, 1995; Szolcsányi, 1984a,b; Szolcsányi, 1996a). The local response, defined as antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation (Jancsó et al., 1967; Szolcsányi, 1996a), is underlain by the release of sensory neurotransmitters such as tachykinins (neurokinin A, sub-

stance P) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) (Holzer, 1992; Szolcsányi, 1996a,b). Evidence has been provided by our previous findings that, beyond evoking a local inflammatory reaction, antidromic electrical or orthodromic chemical stimulation of capsaicin-sensitive sensory nerve fibers (dorsal roots, sciatic nerve) elicits a systemic anti-inflammatory effect as well (Pintér and Szolcsányi, 1996; Szolcsányi et al., 1998a,c). The development of this unorthodox systemic humoral response was found to be due to somatostatin release from sensory nerve terminals activated by sciatic nerve stimulation or the cutaneous application of chemical irritants (Szolcsányi, 1996b; Szolcsányi et al., 1998a,c). Since these results provided clear evidence for this novel neuroregulatory mechanism in exteroceptive areas only, the aim of the present work is to study whether the systemic anti-inflammatory effect and the release of somatostatin could also be evoked through the activation of interoceptors, namely by stimulation of the sensory vagal nerve fibres.

*Corresponding author. Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Neuropharmacology Research Group of Hungarian Academy of Sciences, University Medical School of Pécs, H-7601 P.O. Box 99, 7643 Pécs, Hungary. Tel.: +36-72-324-122, 1601; fax: +36-72-211-761.
E-mail address: szolcs@apacs.pote.hu (J. Szolcsányi).

Substance P- and CGRP-immunoreactive afferent fibres of the trachea originate from the vagal nerve, while the stem bronchi and intrapulmonary airways have a crossed afferent innervation of both vagal and thoracic spinal origin (Lundberg et al., 1983; McDonald et al., 1988; Springall et al., 1987). There is clear evidence that, beyond their classical afferent function, sensory vagal nerve fibres also have a local effector function, which plays an important role in some disease processes (asthma bronchiale) (Lundberg et al., 1983; Szolcsányi, 1996a,b).

All these data made it interesting to examine whether bilateral antidromic electrical stimulation of the cut vagal nerves could evoke a systemic anti-inflammatory action and to analyse its neuromediator background. Furthermore, since all of our previous results were obtained with rats, we investigated somatostatin-mediated systemic anti-inflammatory adaptation in guinea-pigs, as another species.

2. Methods

2.1. Animals

The experiments were carried out on female Wistar rats and guinea-pigs weighing 200–250 and 400–500 g, respectively. The animals were kept in the Laboratory Animal Center of the Medical University of Pécs under pathogen-free conditions (12-h light/dark periods, temperature of 22–25°C, humidity of 50–70%) and had standard rat and guinea-pig chow and tap water ad libitum.

The experiments performed in the present work conform to European Community guiding principles for the care and use of laboratory animals. The experimental protocol applied was approved by the local ethical committee of Medical School of Pécs, Hungary.

2.2. Surgical procedures and experimental arrangements in rats

2.2.1. Vagal nerve stimulation

The rats were anaesthetized with sodium thiopentone (100 mg/kg, i.p.). Following anaesthesia, both vagal nerves were exposed in the neck, a pool was made and filled with liquid paraffin. The peripheral stumps of the cut vagal nerves were placed on two pairs of platinum hook-electrodes and stimulated (20 V, 1 ms, 8 Hz, 20 min or 20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min). In control cases, the nerves were only cut without stimulation. Atropine sulphate (2 mg/kg, i.v.) was given 10 min before vagal nerve excitation to prevent parasympathetic responses. In one set of experiments, hexamethonium bromide (5 mg/kg, i.v.) was also injected 10 min before stimulation to exclude neuropeptide release mediated by activation of autonomic ganglia. For selective immunological and functional inactivation of somatostatin, cysteamine (280 mg/kg, s.c.) was given 4 h

prior to nerve stimulation (Palkovits et al., 1982; Patel and Pierzchala, 1985; Szolcsányi et al., 1998a). The effect of this stimulation under these conditions was analysed on electrically induced neurogenic inflammation in the skin of the hindpaws, and on plasma somatostatin-like immunoreactivity (see experimental groups below).

2.2.2. Induction of cutaneous neurogenic inflammation

The left jugular vein was cannulated for drug administration and one of the carotid arteries was cannulated for blood sampling. At the time when electrical stimulation of the vagal nerves started, both acutely denervated hindlegs were smeared with 1% mustard oil dissolved in paraffin oil and the animals were exsanguinated 20 min later (Szolcsányi et al., 1998c). Plasma extravasation was determined by the Evans blue accumulation method.

2.3. Surgical procedures and experimental arrangements in guinea-pigs

2.3.1. Vagal nerve stimulation

The guinea-pigs were anaesthetized with sodium pentobarbitone (30 mg/kg, i.p.). In experiments with bilateral antidromic vagal nerve excitation (70 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min), surgical procedures were performed as described for experiments in rats. The guinea-pigs were also pretreated with atropine sulphate (2 mg/kg, i.v.) 10 min before vagal nerve stimulation to prevent parasympathetic responses, and the alterations of the plasma somatostatin-like immunoreactivity in response to the stimulation were analysed (see experimental groups below).

2.3.2. Stimulation of the sciatic nerve

Stimulation of the peripheral stump of the cut sciatic nerves of the anesthetized guinea-pigs was performed (30 V, 0.5 ms, 20 Hz, 20 min) as described for rats (Szolcsányi et al., 1998a). Guanethidine (8 mg/kg, i.p.) was given 1 h before nerve excitation to counteract the vascular effects of concomitant sympathetic nerve activation. Pipcuronium bromide (200 µg/kg, i.v.) was injected to block neuromuscular transmission and positive pressure ventilation was carried out through a T-tracheal tube connected to a small animal respirator (KUTESZ, Budapest, Hungary) that was supplied with room air. The tidal volume was set for 10 ml/kg and the respiratory rate was adjusted to 50–70 cycles/min.

Stimulation of the right sciatic nerve was followed by stimulation of the left one with an inter-stimulation interval of 5 min and the animals were killed by exsanguination 15 min following the second excitation. Plasma extravasation was determined with Evans blue.

In one set of experiments, we analysed the changes in plasma somatostatin-like immunoreactivity in response to electrical stimulation (30 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min) of one

sciatic nerve. For this purpose, one of the carotid arteries was cannulated for blood sampling.

2.4. Determination of plasma extravasation

Plasma extravasation was determined by the Evans blue accumulation method. Evans blue dye was given (50 mg/kg, i.v.) 10 min before the inflammatory stimulus and the dye accumulated in the skin samples was determined by spectrophotometry at 620 nm (Spectromom 195 MOM Budapest, Hungary). The results were expressed as $\mu\text{g dye/g wet tissue weight}$ (Szolesányi et al., 1998a,c).

2.5. Determination of plasma somatostatin-like immunoreactivity in rats and guinea-pigs

The plasma somatostatin-like immunoreactivity in response to bilateral antidromic stimulation of the vagal nerves (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min) was measured in both species after 12-h starvation. In guinea-pigs, changes of plasma somatostatin-like immunoreactivity provoked by antidromic stimulation (30 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min) of one sciatic nerve were analysed. Two minutes after the stimulation period, arterial blood samples (3 ml/animal) were taken into ice-cold tubes containing EDTA (6 mg) and Trasylol (1000 U). Plasma somatostatin-like immunoreactivity was measured with a specific and sensitive radioimmunoassay (RIA) (Németh et al., 1996; Szolesányi et al., 1998a,c).

2.6. Systemic and perineural capsaicin pretreatment

One group of rats received systemic capsaicin pretreatment. Capsaicin was administered (in doses of 30, 60 and 90 mg/kg, s.c.) on 3 consecutive days under anaesthesia (sodium pentobarbitone, 40 mg/kg, i.p.). Bilateral antidromic vagal nerve stimulation and plasma sampling for somatostatin-like immunoreactivity measurement was performed 3 days after the last dose was given.

Anaesthetized guinea-pigs received perineural capsaicin pretreatment. A small piece of fibrin sponge (Gelaspon), soaked with 2% capsaicin solution was applied around the sciatic nerve for 30 min. After removal of the cuff, the muscle and the skin were sutured and the animals recovered within the next 2 h. The pretreated sciatic nerve was stimulated 5–6 days later for measurement of plasma somatostatin-like immunoreactivity.

2.7. Drugs and solutions

Sodium thiopentone was purchased from Byk Gulden (Konslanz, Germany), sodium pentobarbitone, somatostatin-14, cysteamine (2-mercaptoethylamine), Evans blue dye, [Tyr⁸]somatostatin-(1–14), and capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) were from Sigma (St. Louis,

USA), atropine sulphate, lidocaine (2%) from Egis (Budapest, Hungary), pipercuronium bromide from Richter (Budapest, Hungary), hexamethonium bromide and mustard oil (allylthioisocyanate) from Fluka (Buchs, Switzerland), ethanol, formamide and Tween 80 from Reanal (Budapest, Hungary), Capsaicin was dissolved in 10% ethanol, 10% Tween 80 and 80% saline (0.9% NaCl).

2.8. Statistical analysis

The data are expressed as means \pm standard error of means (S.E.M.). Mann-Whitney's (non-parametric) *U*-test was used for statistical evaluation in the cases showing plasma extravasation. Plasma somatostatin-like immunoreactivity levels were analysed with an unpaired Student's *t*-test. Changes were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Inhibitory effect of bilateral antidromic vagal nerve stimulation on chemically induced cutaneous neurogenic inflammation of the hindpaws in rats

In atropine-pretreated rats, the peripheral stump of both cutaneous nerves was electrically stimulated with 0.1 Hz for 20 min to induce neurogenic inflammation in the trachea, distal part of the oesophagus, and the mediastinal connective tissue (Szolesányi, 1984a). The anti-inflammatory effect of this vagal stimulation was investigated on plasma extravasation evoked at the same time by local administration of 1% mustard oil on the hindpaws after acute denervation.

Plasma extravasation in the hindpaws was inhibited by $36.45 \pm 3.95\%$ by the simultaneous bilateral vagal excitation, as compared to the controls. In the second group of animals, the same experimental procedures were performed after intravenous hexamethonium (5 mg/kg) treatment. In this case, the inhibition induced by bilateral vagal nerve stimulation was $30.39 \pm 2.86\%$ ($n = 5-6$; Fig. 1a). In a subset of experiments, bilateral vagal nerve stimulation started 5 min prior to mustard oil application to the skin of the hindpaws. Under these conditions, plasma extravasation was inhibited by $54.05 \pm 5.26\%$ ($n = 5$).

In rats pretreated with cysteamine (280 mg/kg, s.c., 4 h before stimulation), the inhibitory action of bilateral vagal nerve stimulation (8 Hz, 20 min) on neurogenic inflammation in the hindpaws was reduced significantly by $82.37 \pm 9.53\%$ ($n = 5$; Fig. 1b).

3.2. Inhibitory effect of sciatic nerve stimulation on cutaneous plasma extravasation of the contralateral hindleg in guinea-pigs

The distal stump of the cut sciatic nerves of the guanethidine and pipercuronium pretreated animals was

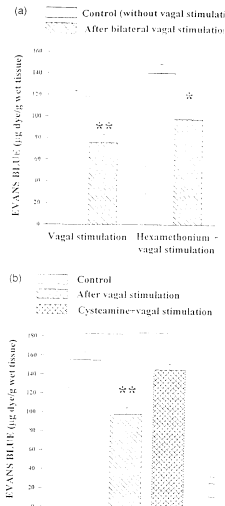


Fig. 1. (a) Cutaneous neurogenic inflammation evoked by 1% mustard oil smeared on the skin of rat hindpaws simultaneously with bilateral antidromic stimulation (20 V, 1 ms, 8 Hz, 20 min) of the peripheral stump of the cut vagal nerve, and in control rats. Rats were treated with atropine sulphate (2 mg/kg, i.v.) or with atropine plus hexamethonium bromide (5 mg/kg, i.v.) 10 min before the stimulation. (b) The inhibitory action of the bilateral antidromic vagal nerve stimulation was reduced by cysteamine (280 mg/kg, s.c.) pretreatment, 4 h before the experiment. Results are shown as means \pm S.E.M., $n = 5-6$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

stimulated with 20 Hz for 20 min. Stimulation of the right sciatic nerves was followed by similar stimulation of the left nerve 5 min later. The secondary response was inhibited by $45.46 \pm 5.08\%$ compared to the primary reaction ($n = 8$; Fig. 2), a value which was similar to that found in rats on sciatic nerve stimulation (Szoicsányi et al., 1998a).

3.3. Effect of bilateral antidromic vagal nerve stimulation on the level of plasma somatostatin-like immunoreactivity in rats — prevention of somatostatin release by systemic capsaicin pretreatment

In these experiments, the rats were divided into six groups. In the control group, the vagal nerves were only cut in the neck but not stimulated (group 1). In the stimulated group, bilateral antidromic vagal nerve stimulation was performed (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min; group 2). In the third group of animals, the abdominal branches of both vagal nerves were cut above the cardia combined with periesophageal administration of lidocaine (2%) and ethanol (96%) 30 min before the electrical stimulation of the peripheral stumps. The purpose of the abdominal vagotomy was to exclude the gastrointestinal release of somatostatin in response to nerve stimulation (group 3). In a separate group of animals, the abdominal surgery was performed but the abdominal vagal nerves were left intact. Cervical vagal stimulation started 30 min after abdominal surgery (group 4). In the sham-operated controls, only the abdominal surgical procedure was performed without cutting and stimulating the nerves (group 5). For rats, there was a sixth capsaicin-pretreated group (group 6).

Bilateral vagal nerve stimulation (5 Hz, 5 min) resulted in a 2.96-fold increase of plasma somatostatin-like immunoreactivity level in group 2 (30.5 ± 1.65 fmol/ml), compared to the control rats (group 1): 7.88 ± 1.56 fmol/ml). In the abdominal vagotomised rats (group 3),

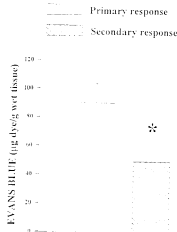


Fig. 2. Plasma extravasation in the skin of the guinea-pig (Fig. 1a, i.p.) and piperocapsaicin (200 µg/kg, i.v.)-pretreated guinea-pig hindpaw evoked by stimulation (50 V, 0.5 ms, 20 Hz, 20 min) of the peripheral stump of the cut sciatic nerve, and its inhibitory effect on the subsequent neurogenic inflammation evoked by stimulation of the contralateral sciatic nerve 5 min later with the same parameters. Results are shown as means \pm S.E.M., $n = 8$; * $P < 0.01$.

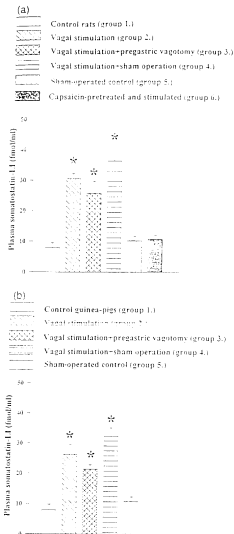


Fig. 3. Effect of bilateral antidromic vagal nerve stimulation (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min) on plasma somatostatin-like immunoreactivity (LI) in rats (a) and in guinea-pigs (b). Plasma samples were taken 2 min after the stimulation. The concentration of plasma somatostatin-like immunoreactivity was significantly elevated in the vagus-stimulated (group 2), abdominal vagotomised and stimulated (group 3), sham-operated and stimulated animals (group 4), compared to the controls (group 1). No significant elevation was observed after sham operation (group 5) or after vagal stimulation in capsaicin-pretreated animals (group 6). Results are shown as means \pm S.E.M., $n = 6-7$, * $P < 0.01$.

plasma somatostatin-like immunoreactivity increased 3.3-fold (25.73 ± 3.92 fmol/ml). In the sham-operated stimulated group (group 4), the increase was 4.6-fold ($36.3 \pm$

4.18 fmol/ml), and in the sham-operated controls (group 5), the basal plasma somatostatin-like immunoreactivity level was slightly but not significantly elevated (10.16 ± 1.24 fmol/ml). Systemic capsaicin pretreatment (group 6) prevented the significant increase of plasma somatostatin-like immunoreactivity level (10.66 ± 1.45 fmol/ml) ($n = 6$; Fig. 3a).

3.4. Effect of bilateral antidromic vagal nerve stimulation on the level of plasma somatostatin-like immunoreactivity in guinea-pigs

The five experimental groups used (Fig. 3b) were similar to those with rats. Bilateral antidromic vagal nerve stimulation (5 Hz, 5 min) elevated the plasma somatostatin-like immunoreactivity level 3.3-fold (26.26 ± 3.15 fmol/ml; group 2), compared to the control animals (group 1; 7.93 ± 1.87 fmol/ml). In the subdiaphragmatic vagotomised animals (group 3), the plasma somatostatin-like immunoreactivity level increased 2.7-fold (21.35 ± 1.38 fmol/ml) and in sham-operated stimulated (group 4) animals without vagotomy, the increase was 4.01-fold (32.27 ± 2.81 fmol/ml). In sham-operated controls (group 5), the basal plasma somatostatin-like immunoreactivity level in-

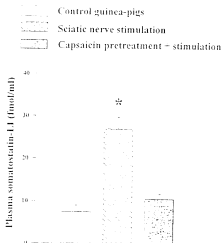


Fig. 4. Plasma somatostatin-like immunoreactivity (LI) level in guinea-pigs 2 min after stimulation of the peripheral stump of the cut sciatic nerve (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min), and in control and capsaicin-pretreated animals. Perineural administration of capsaicin around the sciatic nerve (2% solution, 20 min) was performed 5–6 days before the experiment. All guinea-pigs were pretreated with guanethidine (8 mg/kg, ip, 1 h) before nerve excitation and piperaconium bromide (200 μ g/kg, iv). Antidromic stimulation of the cut sciatic nerve caused a significant increase in plasma somatostatin-like immunoreactivity compared to the controls, which was prevented by perineural capsaicin pretreatment. Results are shown as means \pm S.E.M., $n = 5-6$, * $P < 0.01$.

creased slightly (10.75 ± 1.49 fmol/ml), but this elevation was not significant compared to the controls ($n = 6-7$; Fig. 3b).

3.5. Changes in plasma somatostatin-like immunoreactivity level in response to sciatic nerve stimulation in guinea-pigs — effect of perineural capsaicin pretreatment

Antidromic electrical stimulation of one sciatic nerve (30 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min) caused a significant (3.5-fold) increase in plasma somatostatin-like immunoreactivity level in guinea-pigs (126.98 ± 2.79 fmol/ml), compared to the controls (7.45 ± 1.58 fmol/ml). Perineural 2% capsaicin pretreatment almost completely prevented the stimulation-induced release of somatostatin (10.54 ± 1.12 fmol/ml; $n = 5-6$; Fig. 4).

3.6. Circulatory parameters

During anaesthesia and pretreatments, the average heart rate and mean arterial blood pressure did not show significant alterations compared to the baseline in either rats (337 ± 42 bpm and 92 ± 5.8 mm Hg) or guinea-pigs (312 ± 29 bpm and 75 ± 4.4 mm Hg).

4. Discussion

It has been reported that, besides their classical afferent function, sensory vagal nerve fibres contain neuropeptides in their terminals, and that release of these neuromediators elicits local effector responses consisting of vasodilatation, increased vascular permeability of venules with consequent protein extravasation and bronchoconstriction (Janesó et al., 1967; Lundberg et al., 1983; McDonald, 1988; McDonald et al., 1988; Pintér and Szolcsányi, 1995; Szolcsányi, 1984a,b; Szolcsányi, 1996a).

A sensory nerve-mediated anti-inflammatory effect with a possible adaptive function has been shown by our group, using several experimental conditions with rats (Pintér and Szolcsányi, 1996; Szolcsányi et al., 1998a,c). In these studies, somatostatin release with concomitant anti-inflammatory effect was evoked by (1) antidromic stimulation of the dorsal roots, (2) antidromic stimulation of the sciatic nerve, and (3) excitation of nociceptors by chemical irritants. Furthermore, evidence was obtained that the mediators of the systemic anti-oedema effect were derived from the activated nerve endings, and not from the inflammatory exudate. All of these experiments were carried out on rats and involved activation of nociceptors only in exteroceptive skin areas, but did not test for a similar function of vagal interoceptors.

The present study provided evidence for the first time that excitation of capsaicin-sensitive sensory nerve fibres of the rat vagal nerve elicits not only a local effector

response, but a systemic anti-inflammatory effect as well, via somatostatin release from the activated nerve endings. We also reproduced the response in guinea-pigs. A possible contribution of autonomic efferent fibres in this inhibitory action was eliminated by the full development of the response under the effect of hexamethonium, atropine and guanethidine, as well as the blocking effect of capsaicin pretreatment on the release of the proposed mediator, somatostatin. Further, as in the case of antidromic stimulation of the sciatic nerve (Szolcsányi et al., 1998d) or orthodromic excitation of nociceptors by mustard oil (Szolcsányi et al., 1998c), the anti-inflammatory effect evoked by vagal stimulation was also prevented in rats pretreated with cysteamine. Cysteamine is a sulphhydryl agent which induces a selective loss, at the dose range applied, of both biologically and immunologically active somatostatin by forming disulphide bonds with the peptide without affecting the levels of enkephalin, luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH), vasopressin, vasoactive intestinal polypeptide or cholecystokinin (Palkovits et al., 1982; Patel and Pierzchała, 1985). Prevention by this agent of the appearance of somatostatin-like immunoreactivity in plasma, in response to sensory nerve stimulation, was demonstrated in our previous studies (Szolcsányi et al., 1998a,c).

A pronounced enhancement of somatostatin-like immunoreactivity in the plasma was now shown in response to vagal nerve stimulation in atropine-pretreated rats and guinea-pigs. The respective 3.86-fold and 3.3-fold increases in somatostatin-like immunoreactivity level were only slightly diminished after subdiaphragmatic vagotomy (3.3-fold and 2.7-fold, respectively). Consequently, the vagal nerve terminals of thoracic organs are the main sources of the enhancement of this neuropeptide level in the circulating plasma. Systemic pretreatment of adult rats with capsaicin completely prevented this increase of somatostatin-like immunoreactivity in the plasma, providing evidence for the mediating role of capsaicin-sensitive vagal sensory fibres. Capsaicin excites thoracic chemoreceptive vagal C-afferents in the heart, epicardium, great vessels, bronchi and lung including the pulmonary J-receptors (Coleridge and Coleridge, 1984; Szolcsányi, 1993). On the other hand, cardiovascular and pulmonary, slowly or rapidly adapting vagal mechanoreceptors, aortic body chemoreceptors, are not stimulated by capsaicin (Coleridge and Coleridge, 1984; Szolcsányi, 1993). Since the long-lasting sensory blocking effect of capsaicin in rats pretreated as adults is restricted to those afferents, which are excited by low doses, the subset of sensory receptors as sites of the released somatostatin could be delineated on the basis of these single unit studies (Coleridge and Coleridge, 1984; Szolcsányi, 1993). It is worth mentioning that field stimulation of the rat isolated trachea elicits the release of somatostatin into the organ bath and capsaicin-induced release of somatostatin, CGRP and substance P from this preparation is not inhibited by lidocaine or

terodotoxin (Szolcsányi et al., 1998b), providing clear evidence for the existence of a sensory neuropeptide releasing process without axon reflexes (Szolcsányi, 1996a,b; Szolcsányi et al., 1998b).

These data, and our previous results, proving the systemic release and humoral effects of somatostatin, establish a novel "endocrine like" or "systemic efferent" function of some capsaicin-sensitive sensory nerve endings (Pintér and Szolcsányi, 1996; Szolcsányi, 1996b; Szolcsányi et al., 1998a,b,c; Thán et al., 1999).

Somatostatin released from the hypothalamus serves as a neuroendocrine hormone, with a growth hormone-release inhibitor effect, while released from the gastric D-cells, it has a paracrine function through inhibition of acid secretion (Shubert et al., 1987). To differentiate the sensory nerve-mediated release process of somatostatin from the already described endocrine and paracrine mechanisms, the term "sensocrine" function would seem suitable. Sensory neuropeptides, other than somatostatin, are probably released and also serve as sensocrine hormones when the vagal nerves are stimulated, since although cysteamine completely prevented the rise in plasma somatostatin-like immunoreactivity level evoked by sciatic nerve stimulation, about 17% of the anti-inflammatory response to vagal nerve stimulation persisted after this treatment. In the case of sciatic nerve stimulation or cutaneous application of capsaicin, both responses were completely abolished (Szolcsányi et al., 1998a,c). These observations are consistent with the immunohistochemical data, which indicate that of the dorsal root ganglion cells innervating the rat skin, about 20% are somatostatin-like immunoreactive (Lawson, 1996), while in the nodosal, jugular and petrosal ganglia somatostatin-like immunopositive cells seems to be less common (Helke and Hill, 1988) and sparse among those which innervate the rat stomach (Green and Dockray, 1988).

The inhibitory effect of sensory nerve-mediated somatostatin certainly interacts at the release site with the neurogenic inflammation elicited by co-release of substance P and CGRP. This aspect seems to be relevant for consideration, the recently introduced concept (Holzer and Maggi, 1998), suggesting the existence of neurones in the dorsal root ganglia without sensory function in contrast to the gastric vagal chemoreceptive sensory fibres proposed to be without an efferent function. The pronounced release of somatostatin mainly from thoracic, but also from subdiaphragmatic vagal fibres, clearly indicates the release of an inhibitory neuropeptide from vagal capsaicin-sensitive nerve terminals.

Acknowledgements

The authors thank Mrs. Csilla Zádor and Mrs. Mária Zsoldos for technical assistance. This study was supported by the Hungarian Academy of Sciences and Hungarian

Research Grants OTKA: T-029428, T-030766, T-032002 and ETT: T-0-032/99 and T-03031/99.

References

- Colledge, J.C.G., Colledge, H.M., 1984. Efferent vagal efferent innervation of the lung and airways and its functional significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 9, 1–170.
- Green, T., Dockray, G.J., 1988. Characterization of the peptidergic afferent innervation of the stomach in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 12, 181–197.
- Holzer, C.J., Hill, K.M., 1988. Immunohistochemical study of neuropeptides in vagal and glossopharyngeal afferent neurons in the rat. *Neuroscience* 26, 559–551.
- Holzer, P., 1992. Peptidergic sensory neurones in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 121, 49–140.
- Holzer, P., Maggi, C.A., 1998. Dissociation of dorsal root ganglion neurons into afferent and efferent-like neurons. *Neuroscience* 86, 389–398.
- Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A., Szolcsányi, J., 1967. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pre-treatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 31, 138–151.
- Lawson, S.N., 1996. Peptides and cutaneous polymodal nociceptor neurones. In: Kumazawa, T., Kruger, L., Mizutani, K. (Eds.), *Progress in Brain Research* vol. 113 Elsevier, Amsterdam, pp. 363–385.
- Lundberg, J.M., Brodin, E., Sara, A., 1983. Effects and distribution of vagal capsaicin-sensitive substance-P neurons with reference to the cutaneous microcirculation. *Acta Physiol. Scand.* 120, 17–24.
- McDonald, D.M., 1988. Neurogenic inflammation in the rat trachea: Part I. Changes in venules, leukocytes and epithelial cells. *J. Neurocytol.* 17, 583–603.
- McDonald, D.M., Mitchell, R.A., Gabella, G., Haskell, A., 1988. Neurogenic inflammation in the rat trachea: Part II. Identity and distribution of nerves mediating the increase in vascular permeability. *J. Neurocytol.* 17, 605–628.
- Németh, J., Hejles, Zs., Pintér, E., Szolcsányi, J., 1996. Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone. *Acta Physiol. Hung.* 54, 221–223.
- Palkovits, M., Brownstein, M.J., Eiden, L.E., Bentfield, M.C., Russel, J., Armura, A., Szabó, S., 1982. Selective depletion of somatostatin in rat brain by cysteamine. *Brain Res.* 240, 178–180.
- Patel, Y.C., Pterchala, I., 1985. Cysteamine induces a loss of tissue somatostatin-28 when measured as somatostatin-28_(111–147)-like immunoreactivity but not when assessed as somatostatin 28_(1–147)-like immunoreactivity: evidence for the importance of the disulfide bond for cysteamine action. *Endocrinology* 116, 1699–1702.
- Pintér, E., Szolcsányi, J., 1995. Plasma extravasation in the skin and pelvic organs evoked by antidromic stimulation of the lumbosacral dorsal roots of the rat. *Neuroscience* 68, 603–614.
- Pintér, E., Szolcsányi, J., 1996. Systemic anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of the dorsal roots in the rat. *Neurosci. Lett.* 212, 33–36.
- Shubert, M.L., Edwards, N.F., Armura, A., Makhlof, G.M., 1987. Paracrine regulation of gastric acid secretion by fundic somatostatin. *Am. J. Physiol.* 252, G485–490.
- Springall, D.R., Cadieux, A., Oliveira, H., Su, H., Royston, D., Polak, J.M., 1987. Retrograde tracing shows that CGRP-immunoreactive nerves of rat trachea and lung originate from vagal and dorsal root ganglia. *J. Auton. Nerv. Syst.* 20, 177–186.
- Szolcsányi, J., 1984a. Capsaicin and neurogenic inflammation: history and early findings. In: Chahl, L.A., Szolcsányi, J., Lembeck, F. (Eds.), *Antinociceptive Vasodilatation and Neurogenic Inflammation*. Akademiai Kiadó, Budapest, pp. 7–25.
- Szolcsányi, J., 1984b. Capsaicin-sensitive chemoreceptive neural system

- with dual sensory-efferent function. In: Chahl, L.A., Szolcsányi, J., Lembeck, F. (Eds.), *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation*. Akademiai Kiadó, Budapest, pp. 27–36.
- Szolcsányi, J., 1993. Actions of capsaicin on sensory receptors. In: Wood, J. (Ed.), *Capsaicin in the Study of Pain*. Academic Press, London, pp. 1–26.
- Szolcsányi, J., 1996a. Neurogenic inflammation: reevaluation of axon reflex theory. In: Gerevici, G., Holzer, P. (Eds.), *Neurogenic Inflammation*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 33–42.
- Szolcsányi, J., 1996b. Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an orthodox neuroregulatory mechanism. In: Kamezawa, T., Kruger, L., Mizumura, K. (Eds.), *Progress in Brain Research* vol. 115. Elsevier, Amsterdam, pp. 343–359.
- Szolcsányi, J., Helveg, Z., Grosz, G., Németh, I., Pintér, E., 1998a. 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.* 123, 936–942.
- Szolcsányi, J., Németh, I., Grosz, G., Helveg, Z., Pintér, E., 1998b. Effect of capsaicin and resiniferatoxin on the release of sensory neuropeptides in the rat isolated trachea. *Br. J. Pharmacol. Proc. Suppl.* 124, 8 pp.
- Szolcsányi, J., Pintér, E., Helveg, Z., Grosz, G., Somjen, J., 1999. Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br. J. Pharmacol.* 125, 916–922.
- Thán, M., Németh, I., Helveg, Z., Szolcsányi, J., Pintér, E., Grosz, G., J., 1999. Somatostatin mediated systemic anti-inflammatory effect induced by antidromic input and tactile nerve stimulation. *Regul. Pept.* 80, 147.

REGULATORY
PEPTIDES

Volume 80(3) 1999

ANTI-INFLAMMATORY EFFECT INDUCED BY TT-232. A NOVEL HEPTAPEPTIDE SOMATOSTATIN ANALOG
 J. Szolcsányi, E. Pintér, Zs. Helyes, J. Németh, G. Oroszi, M. Than and Gy. Keri*. Dept. Pharmacol. Medical School of Pécs, H-7643 Pécs, P.O.B. 99., 1st Dept. Biochem. Semmelweis Univ. of Medicine, H-1043 Budapest, Puskin u. 3. Hungary*

We have shown earlier that somatostatin (SOM) released from the activated capsaicin-sensitive sensory nerve endings mediates a systemic anti-inflammatory action. The aim of the present study was to investigate in rats the anti-inflammatory effect of a novel SOM analog, TT-232, which possesses no endocrine activity. Neurogenic plasma extravasation evoked by 1% mustard oil in the paw skin was inhibited by TT-232 administered i.p./i.v. ($1-40 \mu\text{g kg}^{-1}$) or s.c. ($10-320 \mu\text{g kg}^{-1}$) in a dose dependent manner. Its effect lasted for 6h and subcut treatment reduced also the Freund adjuvant-induced arthritis. Reference drugs, diclofenac and meloxicam did not reduce neurogenic inflammation but all three of them dose-dependently diminished non-neurogenic dextran (5%) -oedema of the paw. TT-232 (500 nM) inhibited SP, CGRP and SOM release from the rat isolated trachea by 36%, 38%, 42% when electrical field stimulation was applied and by 79%, 24%, 74% when the peptides were released by capsaicin (10^{-7} M), respectively. Since neurogenic component of different inflammatory diseases is not affected by current therapy, it is concluded, that TT-232 is a promising compound with a novel site of action for inhibition of inflammation. Supported by OTKA T-029428.

★
SOMATOSTATIN MEDIATED SYSTEMIC ANTI-INFLAMMATORY EFFECT INDUCED BY ANTIDROMIC VAGAL AND SCIATIC NERVE STIMULATION

Thán M., Németh J., Helyes Zs., Szilvássy Z., Pintér E., Szolcsányi J. Dept. of Pharmacology, Medical School of Pécs, H-7643 Pécs, P.O.Box 99, Hungary

It has been established that beyond evoking a local neurogenic inflammation, activation of capsaicin-sensitive primary afferents elicits systemic anti-inflammatory effect mediated by somatostatin (SOM). In the present work we analysed this adaptive response evoked by activation of interoceptive nerve terminals in rats and guinea-pigs. Bilateral antidromic electrical stimulation of the sensory vagal fibres (20 V, 0.5 ms, 8 Hz, 20 min) inhibited the secondary neurogenic inflammation by 36.45% in rats. The vagal excitation (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min) increased plasma SOM level (in fmoI/ml) from 7.88 ± 1.56 to 30.5 ± 1.65 in rats and from 7.93 ± 1.87 to 26.26 ± 1.15 in guinea pigs. Plasma SOM increase was prevented by systemic capsaicin (1%) pretreatment. Since abdominal vagotomy did not diminish SOM elevation, importance of gastrointestinal SOM can be excluded. Antidromic stimulation of one sciatic nerve (30 V, 0.5 ms, 20 Hz, 20 min) inhibited the secondary inflammation by 45.03% in guinea-pigs, and elevated plasma SOM level 3.5 fold to 26.98 ± 2.79 , which was also prevented by capsaicin pretreatment. These data present further evidence to prove that circulating SOM with systemic anti-inflammatory action derives from capsaicin-sensitive sensory neurones in rats and in guinea-pigs. This work was supported by the Hungarian Academy of Sciences, OTKA T-029428.

SOMATOSTATIN AND EPILEPSY

A. Vezzani. Dept. of Neuroscience, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri". Via Eritrea 62, 20157 Milano, Italy

Evidence in human tissue and in experimental models of epilepsy suggests that somatostatin (SRIF) in CNS is involved in seizure phenomena. Thus, SRIF-containing neurons degenerate after status epilepticus in rats at a different extent depending on the severity and duration of seizures while they express higher SRIF mRNA levels and increased immunoreactivity in cell bodies and axon terminals after kindling epileptogenesis (Schwarzer et al 1996 Brain Res Rev 22: 27-50). These changes are associated with lasting modifications in peptide release from hippocampal and entorhinal cortex slices. SRIF1 and SRIF2 receptors in the hippocampus undergo distinct changes after status epilepticus and in kindling. Thus, sst_2 binding sites are selectively decreased in kindling while sst_1 and sst_4 receptors are reduced after kainic acid. Pharmacological studies indicate that SRIF exerts an inhibitory control on limbic seizures. Thus, intracerebral application of sst_2 receptor agonists protect rats from acute and chronic seizure susceptibility induced by kainic acid. Inactivation of endogenous SRIF by a specific antibody delays kindling rate. Thus, SRIF-mediated neurotransmission in the limbic system is modified by seizures and this peptide has both anticonvulsive and antiepileptogenic properties.

Fundamental & Clinical Pharmacology

INCLUDING THE FORMER ARCHIVES INTERNATIONALES DE PHARMACODYNAMIE ET DE THERAPIE

VOL. 13/Suppl. 1

1999

FCPHEZ (S) 19-3969 1999
ISSN 0767-3981

THE INTERNATIONAL PUBLICATION OF THE FRENCH PHARMACOLOGICAL SOCIETY
THE OFFICIAL JOURNAL OF EPHAR, THE FEDERATION OF THE EUROPEAN PHARMACOLOGICAL SOCIETIES

2nd EUROPEAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY

Drugs against disease to improve quality of life: gateway
to the 21st Century through EPHAR symposia

Budapest, Hungary, 3-7 July 1999

ABSTRACTS



Cited/abstracted in: *Biological Abstracts/Biosis, CABS, CNRS/Pascal, Current Contents/Life Sciences, Excerpta Medica/Embase, Index Medicus/Medline, Science Citation Index.*



ELSEVIER



SYSTEMIC ANTI-INFLAMMATORY EFFECT MEDIATED BY SOMATOSTATIN RELEASED FROM ACTIVATED SENSORY VAGAL NERVE TERMINALS IN RATS AND GUINEA-PIGS

M. Thain, J. Nemeth, Z. Szivassy, G. Orosz, and J. Szolcsányi

Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University Medical School of Pécs, H-7641 Pécs, P.O. Box 99, Hungary

PW4

Introduction: It has been established that beyond evoking a local neurogenic inflammation activation of capsaicin sensitive primary afferent nerve fibres elicits systemic anti-inflammatory response related to the release of somatostatin from the activated sensory nerve terminals. The aim of the present work was to study the systemic effect of bilateral antidromic electrical stimulation of the vagal nerves in rats, and to examine the development of somatostatin-mediated systemic anti-inflammatory adaptation in another species. **Methods:** Experiments were carried out on female Wistar rats, and guinea-pigs. Bilateral antidromic electrical stimulation of the peripheral stump of the cut vagal nerves was performed (20V, 0.5ms, 8Hz, 20min), and the effect of this stimulation was analysed on a secondary neurogenic inflammation induced by topical application of 1% mustard oil on the acutely denervated hindpaw skin. In guinea pigs the effect of antidromic electrical stimulation of one sciatic nerve (30V, 0.5ms, 20Hz, 20min) was examined on a secondary neurogenic inflammation. Changes of the plasma somatostatin level in response to bilateral vagal nerve stimulation (20V, 0.5ms, 5Hz, 5min) were analysed in five groups of animals of both species: 1. controls, 2. stimulated, 3. abdominal vagotomized and stimulated, 4. abdominal sham operated and stimulated, 5. abdominal sham operated controls. Plasma somatostatin levels were measured by means of radioimmunoassay (RIA) developed in our laboratory. **Results:** Bilateral antidromic electrical excitation of the vagal nerves inhibited the secondary neurogenic inflammation by 36.45%, and 30.39% in normal and in hexamethonium pretreated rats, respectively. In guinea-pigs the inhibition was 45.46%. Bilateral vagal nerve stimulation increased the plasma somatostatin level (in fmol/ml) from 7.88 ± 1.56 to 30.5 ± 1.65 in rats and from 7.93 ± 1.87 to 26.26 ± 1.15 in guinea pigs. In group 3, the increased levels were 25.73 ± 3.92 and 21.35 ± 1.38 in rats and guinea-pigs, respectively. The sham operation slightly but not significantly elevated the plasma somatostatin concentration. **Discussion:** Systemic anti-inflammatory effect mediated by circulating somatostatin can be evoked through the activation of capsaicin sensitive sensory vagal fibres. This adaptive reaction mediated by somatostatin of neural origin is reproducible also in guinea-pigs.

PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF ISOLATED ACTIVE INGREDIENTS FROM THE HUNGARIAN CHAMOMILE

Petri, G.,¹ Florián, E.,² Szeghi, J.,³ Szalontay, M.¹

¹Institute of Pharmacognosy Semmelweis University of Medicine, Hungary 1085 Budapest, Üllői út 26., ²Semmelweis Univ. of Med., Dept. of Dermatology, Hungary 1085, Budapest, Mária u., ³Univ. of Med., Inst. of Pharmacology, 4012 Debrecen, Nagyerdő krt. 98., Hungary

PW5

The chamomile is one of the most popular medicinal plants believed in the cosmetics too. After isolation we proved the pharmacological value of the active ingredients. The antispasmodic effect exerted on spasm of the smooth muscle on isolated small intestine, the antiphlogistic effect was investigated on dextran oedema of the rat's paw. The microbiological experiments were carried out at a solid and fluid Sabouraud-(d)-nutritive medium. The proved fungicides were Trichophyton mentagrophytes, Tr. rubrum and Candida albicans.

The spasm was produced with 0.5 µg/ml histamine or with BaCl₂ 1 mg/ml. The isolated compounds were proved in 5- and 50 µg/ml concentrations mixed in 2,5 % Tween-80. Studying the effect of the isolated compounds we repeated the experiments 4 times.

Results: Antispasmodic effect has the hole essential oil, The chamazulene like to the control guajazulene as well as the flavonoids.

Antiphlogistic effect has also the chamazulene. The raw and the purified (-)-bisabolol have smaller effect in contrary to the literature. Chamazulene has a sharper antiinflammatory effect than the guajazulene control material. Farnesene, - cycloethers and flavonoids have no effect.

Microbiological investigations show an antifungal effect which is high in case of the essential oil components, a smaller action have the total flavonoids, and a negative result has the umbelliferone coumarin. After a 30 minute contact in a 1000 µg/ml concentration (-)-bisabolol has a fungicide effect on Candida albicans. Therefore to develop a chamomile cream or lotion has not only cosmetic but also medicinal value.

EVIDENCE FOR FUNCTIONAL C5a RECEPTOR SUBTYPES

N. Paczkowski¹, J. Whitmore¹, A. Wong², D. Fairlie², S. Vogen², S. Sanderson², S. Taylor¹

¹Dept Physiol and Pharmacology, and ²Centre for Drug Design and Development, University of Queensland, St Lucia,

QLD 4072, Australia. ³Eppley Institute for Cancer Research and Allied Diseases, University of Nebraska, NE 68198, USA.

C5a has important inflammatory and immunomodulatory roles in the body. Many small peptide analogues of C5a have been synthesised in order to study the actions of C5a and its receptor (C5aR) and to develop antagonists which may be useful in the treatment of diseases. The aim of this study was to investigate possible differences in C5aRs present in different assay systems, namely, PMN (polymorphonuclear leukocyte) activation and stimulation of smooth muscle spasmogenesis. C5a is equipotent in these assays, however, a panel of C5aR agonists showed differing selectivities, and two peptides tested were approximately 3000 times more selective for spasmogenesis than PMN activation. Several C5aR antagonists also showed differing potencies between the assays, having the same potency in inhibiting spasmogenesis, but displaying differences in the inhibition of PMN activation. These antagonists can inhibit agonist peptide-induced PMN activation, but do not inhibit spasmogenesis caused by the same C5a agonist analogue.

PW6

This pharmacological evidence supports the existence of C5aR subtypes. The subtypes can be distinguished by the use of different ligands, which have different potencies and inhibitory profiles in different systems. These functional differences may be due to the existence of more than one gene for the C5aR, although only one has been cloned to date, or they may be due to differences in the G-protein transduction systems within different cell types. The possibility of further functional subtypes is being investigated.

Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogues in the rat

Zsuzsanna Helyes^a, Márta Thán^a, Gábor Oroszi^a, Erika Pintér^a, József Németh^a, György Kéri^b, János Szolcsányi^{a,*}

^aDepartment of Pharmacology and Pharmacotherapy, Neuropharmacological Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, University Medical School of Pécs, H-7643, P.O. Box 99, Pécs, Hungary

^b1st Department of Biochemistry, Semmelweis University of Medicine, H-1034 Puskin ter 3, Budapest, Hungary

Received 27 September 1999; received in revised form 19 November 1999; accepted 23 November 1999

Abstract

In rats anaesthetized with urethan and pretreated with pipercuronium bromide nocifensive reaction of blood pressure elevation evoked by intraarterial capsaicin injection was inhibited over 40 min by bilateral antidromic stimulation of the sensory fibres of the sciatic nerves. Rise in blood pressure, heart rate and respiratory frequency evoked by capsaicin were markedly diminished after smearing 1% mustard oil on the acutely denervated hindpaws indicating a release of mediators with anti-nociceptive action from cutaneous nociceptors. Intravenous injection of the putative mediator somatostatin (10 µg/kg) or its analogues RC-160 and TT-232, but not octreotide inhibited the cardiorespiratory and blood pressure responses evoked by topical cutaneous application of mustard oil or capsaicin instillation into the eye. It is concluded, that the endocrine and the anti-nociceptive effects of somatostatin are mediated through distinct receptor subtypes and therefore, TT-232, a novel heptapeptide analogue without endocrine action, is a promising analgesic compound. © 2000 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Anti-nociceptive effect; Chemonociceptive reflexes; Capsaicin-sensitive; Mustard oil; Antidromic nerve stimulation; TT-232; Octreotide; RC-160

It has been shown that activation of nociceptors sensitive to capsaicin, noxious heat or inflammatory mediators [13,14] results not only in pain sensation but causes release of sensory neuropeptides as well. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP) elicit neurogenic inflammation at sites where chemically-evoked pain is induced [14].

Somatostatin is also stored in the capsaicin-sensitive subpopulation of nociceptors, from where it can be released and depleted [15,16]. Somatostatin inhibits neurogenic inflammation [6] and nociception [4] and our previous studies revealed that sufficient amount of somatostatin could be released from the activated primary afferent nerve terminals to elicit a systemic anti-inflammatory action [15,16]. Based on these data, we hypothesize that somatostatin of neural origin may give rise to systemic anti-nociceptive action beyond the established systemic anti-

inflammatory effect. Thus, the present study was undertaken to investigate whether antidromic or orthodromic stimulation of the capsaicin-sensitive sensory nerve terminals exerts anti-nociceptive effect. Furthermore, the effect of somatostatin and its cyclic synthetic analogues, octreotide, RC-160 (vapeptide) and TT-232 (a heptapeptide somatostatin analogue with a 5 residue ring) was examined on cardiorespiratory reflexes in response to chemonociceptive stimuli. Investigations with the latter compound seems to be particularly attractive due to its lacking endocrine activity [7,8].

Experiments were carried out on anaesthetized female Wistar rats (150–250 g). The experimental protocols conform to the guiding principles of the European Community for the care and use of laboratory animals. Anaesthesia provided by an i.p. injection of 1 g/kg urethan (Reanal, Hungary) was considered to be appropriate for testing chemonociceptive autonomic reflex responses, when the animals did not respond with movements to pinching the skin [9]. Both the left external jugular vein and the right

* Corresponding author. Tel./fax: +36-72-211-761.

E-mail address: szolcs@apaacs.cote.hu (J. Szolcsányi).

carotid artery were cannulated to inject drugs or capsaicin, respectively. Plasma somatostatin-like immunoreactivity (somatostatin-LI) was determined from blood samples as described [15,16]. T-tracheal tube was inserted for artificial respiration (first experimental group) or for recording respiratory frequency. Blood pressure and heart rate were continuously monitored through a cannula placed into the left carotid artery by a Statham transducer connected to a computer for data evaluation (Geopolta Ltd., Hungary). Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide, Sigma, USA) was dissolved in 10% ethanol, 10% Tween 80 (Reanal, Hungary) and 80% isotonic NaCl to provide a 1% stock solution. This was further diluted with saline and administered intraarterially (i.a.) at a dose of 1 µg/kg from a 1 µg/ml solution to elicit cardiorespiratory reflexes.

In the first experimental group ($n = 6$) the effect of antidromic sciatic nerve stimulation was investigated on capsaicin-evoked nocifensive responses. The sciatic nerves were exposed and cut in the thigh and the surrounding skin flaps were fixed to a metal ring to make a pool which was filled with liquid paraffin. The peripheral stumps of the nerves were stimulated with C-nore strength (20 V, 0.5 ms, 5 Hz for 5 min) following pipercuronium bromide (200 µg/kg, i.v.; Richter Gedeon Rt., Hungary) administration, as described previously [15]. Nocifensive blood pressure rise [9] in response to capsaicin injections was recorded before and after sciatic nerve stimulation.

In a separate experiment ($n = 11$), the influence of orthodromic sensory nerve excitation was tested on nocifensive reflex rise of blood pressure, heart rate and respiration frequency in response to i.a. capsaicin applications, as described above. Both hindlegs were acutely denervated (saphenous and sciatic nerves were cut 30 min before the experiment) to exclude the interference of reflexes due to stimulation of the nociceptors in the hindleg. As an orthodromic chemical challenge, 1% mustard oil (allylthiocyanate; Fluka, Switzerland) was smeared on the skin of the hindpaws or in the control group of animals paraffin oil (the solvent of mustard oil) was applied. Blood pressure and heart rate were continuously recorded before and 5, 10 and 15 min following mustard oil/paraffin oil application.

In the third experimental setting ($n = 60$) mustard oil or capsaicin were used as nociceptive stimuli to assess the anti-nociceptive effect of somatostatin and its synthetic analogues. The animals were pretreated with 10 µg/kg i.p. somatostatin (Sigma, St. Louis, MO, USA) or one of its analogues (octreotide (Sandostatin; Sandoz, UK), RC-160 (vapreotide; Debiopharm, Switzerland)) or TT-232 (synthesized in the Central Research Institute for Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences) 13 min prior to mustard oil or capsaicin application. Somatostatin and its analogues were dissolved in isotonic NaCl with 50 µl acetic acid for 1 ml of a 1 mg/ml stock solution, and further dilutions were made up with saline. In the control group, animals were treated with saline in the same volume. Systemic blood pressure, heart rate and respiration rate were continuously

recorded, as described above. Nociceptive responses of the pretreated groups to mustard oil or capsaicin were compared with that observed in the respective saline treated control rats.

Data are presented as mean \pm SEM. Non-parametric Mann-Whitney test (unpaired data) and Wilcoxon's signed rank test (paired data) were used for statistical evaluation. Probability values $P < 0.05$ or less were regarded as significant.

The first series of experiments was performed on rats, in which 1 µg/kg i.a. capsaicin evoked a reproducible rise in blood pressure exceeding 20 mmHg. The average mean arterial blood pressure (MAP) rise in these rats was $47.7 \pm 3.5\%$ (from 74.5 ± 5.7 to 110.1 ± 10.6 mmHg) and no significant diminution of the responses occurred if the injections were repeated eight to 10 times under control conditions. The capsaicin-evoked control responses were inhibited by $49.78 \pm 0.92\%$ 10 min subsequent to bilateral antidromic sciatic nerve stimulation and recovered within an hour (Fig. 1).

Nocifensive cardiorespiratory reflexes evoked by capsaicin were also inhibited by orthodromic chemical stimulation of the cutaneous nociceptors. In these rats i.a. capsaicin injection (1 µg/kg) elevated MAP by $42.41 \pm 6.9\%$ (from 70.9 ± 6.5 to 100.9 ± 11.58 mmHg), heart rate by $14.9 \pm 1.9\%$ (from 286 ± 29 to 329 ± 34 per min) and respiration rate by $33.7 \pm 2.9\%$ (from 85 ± 9 to 114 ± 15 per min) prior to chemical stimulation. Fig. 2 shows that these nociceptive reflex responses were significantly diminished 5, 10, 15 min after cutaneous application of 1% mustard oil on the acutely denervated hindlegs, but not after paraffin oil application in the control group.

In the third group of rats the anti-nociceptive action of somatostatin analogues on the nocifensive reflexes evoked by topical application of mustard oil or capsaicin were recorded. In control rats 1% mustard oil smearing on the intact hindlegs increased MAP 8–10 s later with 46.7 ± 3.8

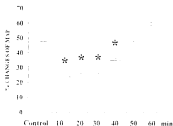


Fig. 1. Changes (%) of MAP in response to intraarterial capsaicin injections (1 µg/kg) before (control) and 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min after bilateral antidromic stimulation of the sciatic nerves (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min) in urethane-anaesthetized (1 g/kg i.p.) rats. Rats were pretreated with pipercuronium bromide (200 µg/kg i.v.) and guanethidine (8 mg/kg i.p.). Results are shown as means \pm SEM of $n = 5$ experiments. * $P < 0.01$ (Wilcoxon's signed rank test) compared to the first, pre-stimulation response.

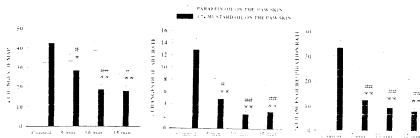


Fig. 2. Changes (%) of MAP, heart rate and respiration rate in response to intraarterial capsaicin injections (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in urethane-anesthetized rats before (control) and 5, 10 and 15 min after topical application of 1% mustard oil on the skin of the acutely generated hindpaw (solid bars). Open bars indicate the results of the control group, where the solvent paraffin oil was smeared on the skin instead of mustard oil. Results are shown as means \pm SEM of $n = 10$ experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Wilcoxon's signed rank test) compared with the control response before mustard oil smearing and * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Mann-Whitney U -test) compared with the paraffin oil-treated control group.

mmHg, heart rate with 85.2 ± 6.9 per min and respiration rate with 61.4 ± 7.1 per min. Capsaicin instillation (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) into the conjunctival sack elevated blood pressure with 55.6 ± 6.1 mmHg, heart rate with 143.3 ± 9.7 per min and respiration rate with 48.7 ± 6.0 per min, the latency was 2–3 s. These efferent responses were significantly decreased after pretreating the rats with somatostatin, RC-160 or TT-232 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.), but not after the administration of octreotide in the same dose. TT-232 had the greatest antinociceptive activity (Fig. 3).

Our findings demonstrate that nociceptive responses evoked by chemonociceptive stimulus (i.e. capsaicin), are significantly decreased by either orthodromic or antidromic activation of sensory nerve terminals. The nociceptive responses are fully reproducible even for 1 h indicating that the repeated test doses of capsaicin do not induce desensitization. Moreover, somatostatin and its analogues, TT-232 and RC-160 but not octreotide, also show inhibitory effect on autonomic nociceptive reflexes.

Antidromic sciatic nerve stimulation with parameters applied in the present work elicited a 4-fold increase in the plasma somatostatin-LI and exerted a pronounced systemic

anti-inflammatory action [15]. Both of these responses were prevented by somatostatin depletion and the anti-inflammatory action was absent after somatostatin antiserum pretreatment [15]. Selective excitation of the cutaneous capsaicin-sensitive sensory nerve endings by 1% mustard oil [11] also elevated the plasma somatostatin level [16] and inhibited the chemonociceptive responses. Furthermore, intraperitoneal injection of somatostatin inhibited the cardiovascular and respiratory nociceptive responses evoked by topical application of capsaicin or mustard oil. Therefore, we suggest that somatostatin released from the activated capsaicin-sensitive nociceptors may account for the analgesic effect. Since all the afferent pathways were disrupted, reflexes from the activated sites involving participation of the central nervous system, e.g. as in the form of diffuse noxious inhibitory control [17] can be ruled out in the analgesic effects observed. Plasma somatostatin-LI after three subsequent i.a. injection of 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ capsaicin with 5-min intervals did not differ from that of the solvent treated controls (7.0 ± 0.54 and 6.95 ± 0.08 fmol/ml, respectively, $n = 5$ –4) suggesting that this low dose of capsaicin used as a nociceptive stimulus did not release significant amount of somatostatin by itself.

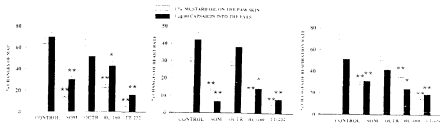


Fig. 3. Changes (%) of MAP, heart rate and respiration rate in response to chemonociceptive stimulations evoked by 1% mustard oil smeared on the skin of the hindpaws (open bars) or capsaicin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) instilled into the conjunctival sack (solid bars), in urethane-anesthetized rats. Animals were pretreated with an i.p. dose of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ somatostatin or one of its analogues (octreotide, RC-160, TT-232) or saline (control group) 10 min before the beginning of the measurement. Means are shown with SEM, $n = 5$ in each group (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. respective control group, Mann-Whitney U -test).

The therapeutic use of native somatostatin is limited by its broad spectrum of effects mediated via five receptor subtypes and short (3 min) half life-time. In addition, the present results show that stable, synthetic octapeptide (RC-160) and heptapeptide (TT-232) analogues are in fact more potent to inhibit reflex responses evoked by chemoreceptive stimuli (mustard oil, capsaicin) than the native molecule. Since these agents inhibit the evoked reflex responses of three distinct effector pathways concerning blood vessels, heart and respiratory muscles, their site of action is likely to be on the nociceptors, because peptides hardly pass the blood-brain barrier. The most potent compound, TT-232, seems to be a particularly important candidate as an analgesic agent, since it is devoid of any endocrine effects [7,8]. On the other hand, octreotide, which acts on sst2, sst3 and sst5 receptors [12] possessing pronounced hormonal effects with some actions in certain pain conditions [10,18], was found to be ineffective as an anti-nociceptive agent in the present experiments. RC-160, with an sst2 and sst5 receptor agonistic effect, induces analgesia in humans [1] and exerts well documented anti-nociceptive action [2,7] which has been confirmed in the present study. Involvement of central opioid-mediated naloxone-reversible mechanism [2,5] and NK₁ receptor antagonism [3] in the effect of RC-160 have also been described. On the other hand, TT-232, the most potent agent in this study, showed no endocrine effects [7,8], which emphasizes the significance of sst1 and/or sst4 receptors in the analgesic effect of somatostatin analogues. In conclusion, stimulation of the capsaicin-sensitive nociceptors by mustard oil or antidromic activation of these fibres of the sciatic nerve elicits anti-nociceptive effect in the rat. Possible mediator role for somatostatin released from the capsaicin-sensitive sensory receptors is suggested. TT-232, a stable synthetic heptapeptide somatostatin analogue without endocrine action, is a promising molecule for development of novel, non-opioid type analgesic agents.

This work was supported by OTKA T-029428, ETT-372/96, ETT T-04 032/99 and the Hungarian Academy of Sciences. Special thanks to Mrs. Mária Zsoldos for the expert technical assistance.

- Aumaitre, O., Marcheix, J.C., Fialip, J., Eschaler, A. and Duchene-Marullaz, P., Preliminary clinical evidence for analgesic effect of vapreotide, DICI. *Ann. Pharmacother.*, 25 (1991) 1136–1138.
- Bétoin, F., Ardid, D., Hernet, A., Aumaitre, O., Kemény, J.L., Duchene-Marullaz, P., Lavaranne, J. and Eschaler, A., Evidence for a central long lasting effect of vapreotide, an analog of somatostatin, involving an opioidergic mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 269 (1994) 7–14.
- Bétoin, F., Advenier, C., Fardin, V., Wilcox, G., Lavaranne, J. and Eschaler, A., In vitro and in vivo evidence for a tachykinin NK₁ receptor antagonist effect of vapreotide, an analgesic analog of somatostatin. *Eur. J. Pharmacol.*, 279 (1995) 241–249.
- Chrubasik, J., Somatostatin and chronic pain management. In: W.C.V. Pariss, Ed., *Contemporary Issues in Chronic Pain Management*, Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, 1991, pp. 87–96.
- Eschaler, A., Aumaitre, O., Ardid, D., Fialip, J. and Duchene-Marullaz, P., Long-acting antinociceptive effect of RC-160, a somatostatin analog, in mice and rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 199 (1991) 119–125.
- Karais, K., Mastokoros, G., Litrosos, G.F. and Tans, G., Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo. *J. Clin. Invest.*, 93 (1994) 2000–2006.
- Kéri, Gy., Mező, I., Vadasz, Zs., Horváth, A., Idó, M., Vántus, A., Balogh, G., Bókönyvi, G., Bajor, T., Teplán, I., Tamás, J., Mak, M., Horváth, J. and Csuka, O., Structure-activity relationship studies of novel somatostatin analogs with antitumor activity. *Pept. Res.*, 6 (1993) 281–288.
- Kéri, Gy., Ercenyi, J., Horváth, A., Mező, I., Idó, M., Vántus, T., Balogh, A., Vadasz, Z.S., Bókönyvi, Gy., Seprődi, J., Teplán, I., Csuka, O., Tejeda, M., Gaal, D., Szegedi, Zs., Szende, B., Roze, C., Kalthoff, H. and Ullrich, A., A tumor-selective somatostatin analog (TT-232) with strong in vitro and in vivo anti-tumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 22 (1995) 12010–12014.
- Ness, T.J. and Gebhart, G.F., Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain*, 41 (1990) 167–234.
- Pincus, T., Smith, S. and Oates, J.A., Somatostatin analogue octreotide is effective in relieving musculoskeletal pain associated with carcinoid syndrome. *Arthritis. Rheum.*, 32 (Suppl. 4) (1989) S71.
- Reeh, P.W., Kocher, L. and Jung, S., Does neurogenic inflammation alter the sensitivity of myelinated nociceptors in the rat? *Brain Res.*, 384 (1986) 42–50.
- Sieher, S., Seuwen, K. and Hoyer, D., [¹²⁵I] [Tyr3] octreotide labels human somatostatin sst2 and sst5 receptors. *J. Pharmacol.*, 348 (1998) 311–320.
- Szállási, A. and Blumberg, P.M., Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharm. Rev.*, 51 (1999) 159–211.
- Szolcsányi, J., Porszász, R. and Pethő, G., Capsaicin and pharmacology of nociceptors. In: J.M. Besson, G. Gullbaud and H. Ollat (Eds.), *Peripheral Neurons in Nociception: Physio-pharmacological Aspects*, John Libbey, Eurotext, Paris, 1994, pp. 109–124.
- Szolcsányi, J., Helyes, Zs., Oroszi, G., Németh, J. and Pintér, E., Release of somatostatin and its role in mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of the rat sciatic nerve. *Br. J. Pharmacol.*, 123 (1998) 936–942.
- Szolcsányi, J., Pintér, E., Helyes, Zs., Oroszi, G. and Németh, J., Systemic anti-inflammatory effect induced by counter irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br. J. Pharmacol.*, 125 (1998) 916–922.
- Villanueva, L., Peschanski, M., Cavino, B. and Le Bars, D., Ascending pathways in the spinal cord involved in triggering of diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in the rat. *J. Neurophysiol.*, 55 (1986) 34–55.
- Williams, G., Ball, J., Lawson, R.A., Joplin, G.F. and Boom, S., Analgesic effect of somatostatin analogue (octreotide) in headache associated with pituitary tumors. *Br. Med. J.*, 295 (1987) 247–248.

Short communication

Decreased sensory neuropeptide release from trachea of rats with streptozotocin-induced diabetes

Joseph Nemeth^{a,*}, Zoltan Szilvassy^{b,c}, Martha Than^c, Gabor Oroszi^c, Reka Sari^c,
Janos Szolesanyi^{d,1}

^a Neuroscience Research Group, University Medical School of Pécs, H-7643, Szeged u. 12, Pécs, Hungary

^b Dept. of Pharmacology and Pharmacochemistry, University Medical School of Pécs, H-7643, Szeged u. 12, Pécs, Hungary

^c 1st Dept. Medicine, Albert Szent-Györgyi Medical University, Szeged, Hungary

Received 24 September 1998; revised 3 February 1999; accepted 9 February 1999

Abstract

We studied the release of somatostatin, calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P in response to electrical field stimulation from isolated tracheas of rats following 4 weeks of streptozotocin (50 mg/kg i.v.)-induced diabetes. Field stimulation (40 V, 0.1 ms, 10 Hz) for 170 s increased the release of somatostatin, CGRP and substance P from the trachea to 1.82 ± 0.070 , 0.377 ± 0.037 and 1.77 ± 0.086 to 0.51 ± 0.022 , 0.69 ± 0.115 , and 5.96 ± 0.377 in control preparations and 0.31 ± 0.081 , 0.41 ± 0.142 , and 3.14 ± 0.443 fmol/mg wet tissue weight in preparations from diabetic rats as measured by radioimmunoassay (control vs. diabetic, $P < 0.01$ for each). The results show a simultaneous decrease in release of the three sensory neuropeptides and an enhanced plasma somatostatin level in rats with streptozotocin-induced diabetes. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Diabetes; Somatostatin; CGRP (calcitonin gene-related peptide); Substance P; Field stimulation; Trachea; Rat

1. Introduction

Sensory neural dysfunction commonly occurs in patients with peripheral neuropathy, a major complication of diabetes mellitus. Sensory nerves not only transmit sensory information, but also act upon the local environment by releasing several biologically active mediators (see for reviews, Holzer, 1992; Szolesanyi, 1996). Therefore, a deficiency in axon reflex vasodilation influences ongoing inflammatory disorders, wound healing processes, local control of vascular proliferative mechanisms, and sensory-effector nerve function in cardio-pulmonary diseases (Holzer, 1992; Tosaki et al., 1996; Brain, 1996; Lundberg, 1996). Moreover, we have recently found that somatostatin released from primary sensory neurons mediates a systemic anti-inflammatory effect as well (Szolesanyi et al., 1998). Thus, beyond their sensory function, the functional

integrity of these nerves is a prerequisite for widespread effector regulatory mechanisms (Szolesanyi, 1996; Ferdinandy et al., 1997). Regarding the neurotransmitters involved, most evidence favours a role for calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P, somatostatin and nitric oxide (NO) (Szolesanyi, 1996; Moncada and Higgs, 1995).

Depletion of CGRP and substance P has been shown to occur in the sciatic nerve of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus (Diemel et al., 1992). The decreased amount of these sensory neuropeptides has been suspected to underlie a weak neurogenic inflammatory response in both experimental animals and clinical patients with diabetes mellitus (Györfi et al., 1996; Walmsley and Wiles, 1991). Nevertheless, to the best of our knowledge, no studies have been conducted to study the effect of diabetes on simultaneous release of CGRP, substance P and somatostatin in response to nerve stimulation. The present work was therefore concerned with the possibility that experimental diabetes induced by streptozotocin would influence the field stimulation-induced release of these neuropeptides from isolated trachea of the rat.

* Corresponding author. Fax: +36-72-211-761. E-mail: jnemeth@apacs.pote.hu

2. Methods

2.1. Ethics

The experiments performed in the present work conformed to European Community guiding principles for the care and use of laboratory animals. The experimental protocol applied was approved by the local ethical committee of Medical University of Pecs, Hungary.

2.2. Experimental groups

The study was carried out with 36 male Wistar rats weighing 200–210 g. They were housed in an animal room (12-h light/dark periods a day, temperature of 22–25°C, humidity of 50–70%) with four animals per cage fed commercial laboratory chow and allowed tap water ad libitum. The animals were randomly divided into two experimental groups. Group 1 (control): animals treated with the solvent for streptozotocin; Group 2 (treatment group): animals treated with 50 mg/kg streptozotocin i.v. (ZANONAT, LIPJONH, KARABAZOK, SÁ).

2.3. Neurotransmitter release studies

These have been described in detail elsewhere (Helyes et al., 1997; Nemeth et al., 1998). In brief, following exsanguination, the whole trachea was removed, cleaned of fat and adhering connective tissues. Tracheas from two animals were perfused (1 ml/min) in an organ bath (1.8 ml) with a temperature- (37°C) and pH- (7.2) controlled oxygenized Krebs solution for 60 minutes (equilibration period). After discontinuation of flow, the solution was changed three times for eight minutes to produce pre-stimulated, stimulated, post-stimulated fractions. Electrical field stimulation (40 V, 0.1 ms, 10 Hz for 120 s) was applied to elicit neurotransmitter release in the second 8-min period. Calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P, and somatostatin concentrations were determined from 200- μ l samples of organ fluid of the preparations by means of radioimmunoassay methods developed in our laboratories as described (Nemeth et al., 1996, 1998; Helyes et al., 1997). The whole experimental protocol was repeated with separate preparations (three preparations from 6 animals per group) preincubated with 1 μ M tetrodotoxin.

2.4. Experimental protocol

Fig. 1 provides a schematic representation of the experimental protocol applied. Four weeks after treatment with streptozotocin/solvent, the animals from both groups were exsanguinated. Food had been withdrawn 12 h prior to blood sampling for glucose and plasma somatostatin measurements. Plasma somatostatin immunoreactivity was determined by radioimmunoassay as described earlier (Nemeth et al., 1996; Szolcsányi et al., 1998). The rats were divided into two experimental groups: 18 animals of

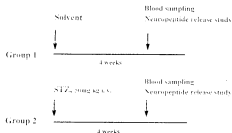


Fig. 1. Schematic representation of the experimental protocol. Group 1 indicates the controls, whereas Group 2 indicates the group of animals treated with streptozotocin (50 mg/kg i.v.). The horizontal lines represent the experimental process, the arrows indicate moments of particular interventions/examinations.

the first group (control) were treated with the solvent for streptozotocin, the other 18 rats were given streptozotocin (second group). Twelve animals from each experimental group were killed for neuropeptide release studies. Blood samples were taken from the animals 6 days after fasting for blood glucose and plasma somatostatin determination. The tracheas of these animals were removed for supplementary experiments to confirm the neuroselectivity of the field stimulation protocol used, i.e., the sensitivity of neuropeptide release to tetrodotoxin.

2.5. Statistical analysis

The results expressed as means \pm standard deviation (S.D.) were analyzed with Student's *t*-test for paired data. Changes were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of diabetes on body weight, plasma glucose, and somatostatin levels

The animals in 'Group 1' grew steadily over the 4-week observation period, with an average weight gain of 42 ± 3.3 g, whereas the animals in 'Group 2' had a weight loss of 8 ± 1.3 g. Fasting blood glucose and plasma somatostatin levels were 4.4 ± 0.6 mmol/l and 6.36 ± 0.71 pmol/l in the controls (Group I) and 15.2 ± 3.9 mmol/l ($P < 0.01$) and 11.12 ± 3.36 pmol/l ($P < 0.05$) in the streptozotocin treated animals (Group II), respectively.

3.2. Field stimulation-induced sensory neuropeptide release

Field stimulation induced a significant increase in levels of substance P, CGRP and somatostatin in the organ fluid of the tracheas from normal animals (Fig. 2). The release of these neuropeptides in response to the same field stimulation protocol was significantly attenuated when the tracheas were from diabetic animals. The resting neuropep-

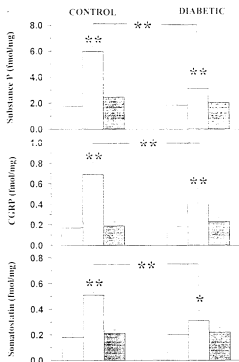


Fig. 2. Electrical field stimulation-induced sensory neuropeptide release from tracheas of normal and diabetic rats. The data are means \pm S.D. obtained with 6 preparations in each group. Resting values are represented by blank columns (sampling 1; see Section 2). Hatched columns show neuropeptide concentrations in 'sample 2', i.e., after a 2-min period of field stimulation. Cross-hatched columns show corresponding 'sampling 3' data. * denotes a significant difference between values compared as indicated at $P < 0.05$; ** $p < 0.01$.

tide levels, however, were the same in both groups (Fig. 2). In normal animals, field stimulation failed to produce any significant increase in substance P, CGRP and somatostatin concentration in the presence of $1 \mu\text{M}$ tetrodotoxin: post-stimulation values of 2.23 ± 0.38 , 0.15 ± 0.03 and 0.25 ± 0.03 vs. resting 2.32 ± 0.46 , 0.13 ± 0.02 and 0.19 ± 0.03 fmol/mg wet wt tissue for substance P, CGRP and somatostatin, respectively. Similarly, tetrodotoxin completely blocked neuropeptide release in diabetic animals as well (data not shown).

4. Discussion

The results presented show that the release of substance P, CGRP and somatostatin from isolated tracheas of diabetic rats is substantially diminished in response to electrical field stimulation as compared to that of preparations from normal animals. Since the release of these peptides

was completely blocked by tetrodotoxin, a fast Na^+ channel blocker, the neuropeptide release elicited by the field stimulation protocol applied can be considered to have been of neural origin. Fasting plasma somatostatin, however, was significantly increased in diabetic vs. normal animals.

Detrimental changes in autonomic, sensory and motor nerves are typically involved in diabetic neuropathy. Detective axonal transport, including that of neuropeptides, is believed to be a critical initiating factor in degenerative distal neuropathies leading to severe microcirculatory changes in diabetic patients. As the local effector function of peripheral sensory nerves is known to be supported by the ability of these nerves to release neuropeptides in response to various stimuli, direct measurement of the relevant neurotransmitters may serve as an indicator of the integrity of the effector function of sensory nerves. Depletion of CGRP and substance P content has been shown to occur in sensory nerves of streptozotocin-diabetic rats (Diemel et al., 1992); nevertheless, direct measurement of sensory neuropeptides released in response to a highly standardized challenge obviously provides a more accurate assessment of the functional effector capacity of sensory nerves in diseased states than does determination of tissue neuropeptide content. To the best of our knowledge,

this report is the first to describe a deficiency in simultaneous release of the three neuropeptides, i.e., CGRP, substance P, and somatostatin in response to field stimulation in diabetic rats. Besides a significant decrease in neuropeptide release, the streptozotocin-treated rats had characteristic features of insulin-dependent (Type I) diabetes mellitus in that they failed to gain weight, and suffered from hyperglycaemia. It is therefore strongly suggested that the deficiency in neuropeptide release detected in the streptozotocin-treated group was caused by the ensuing diabetic state.

Beyond its local effector function, somatostatin has recently been shown to underlie a systemic anti-inflammatory effect (Szolesanyi et al., 1998). The decrease in neural release of somatostatin in parallel with that of CGRP and substance P may participate in disturbed endogenous protective mechanisms against inflammation in insulin-deficient diabetes. The present data make it tempting to assume that the moderate increase in plasma somatostatin level recently described in streptozotocin-induced diabetes in rats (Fisher et al., 1998) may be somehow compensatory. Whatever the precise mechanism, the results provide a further description of the significant role diabetes-induced alterations in sensory effector neural mechanisms play in the development of late complications of diabetes mellitus.

Acknowledgements

This work was supported by Hungarian Grants: OTKA T-016945, T-08058/97, ETT-372, and the Hungarian

Academy of Sciences. Special thanks to Mrs Csilla Zador and Maria Zsoldos for expert technical assistance.

References

- Brain, S.D., 1996. Sensory neuropeptides in the skin. In: Geppetti, P., Holzer, P. (Eds.), *Neurogenic Inflammation*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 229–244.
- Dwivedi, L.T., Stevens, E.J., Whites, G.D., Tomlinson, D.R., 1992. Depletion of substance P and calcitonin gene-related peptide in sciatic nerve of rats with experimental diabetes: effects of insulin and aldose reductase inhibition. *Neurosci. Lett.* 137, 253–256.
- Ferdinandy, P., Csont, T., Csonka, C., Torók, L., Dux, M., Nemeth, J., Horvath, L.L., Szilvassy, Z., Jancsó, G., 1997. Capsaicin-sensitive local sensory innervation is involved in pacing-induced preconditioning in rat hearts: role of nitric oxide and CGRP? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 356, 356–363.
- Fisher, W.E., Mascarella, P., Boros, L.G., Schirmer, W.J., 1998. Variable effect of streptozotocin-diabetes on the growth of hamster pancreatic cancer (H2T) in the Syrian hamster and nude mouse. *Surgery* 123, 315–320.
- Györfi, A., Fazekas, A., Feher, E., Ender, F., Rosvall, L., 1996. Effects of streptozotocin-induced diabetes on neurogenic inflammation of gingivomucosal tissue in rat. *J. Periodontol. Res.* 31, 249–255.
- Helves, Z., Nemeth, J., Pinter, E., Szócsányi, J., 1997. Inhibition by nociceptin on neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals. *Br. J. Pharmacol.* 121, 613–615.
- Holzer, P., 1992. Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanism and significance in the cutaneous and spinal and vascular beds. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 121, 79–146.
- Lundberg, J.M., 1996. Pharmacology of co-transmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol. Rev.* 48, 153–178.
- Montcada, S., Higgs, E.A., 1995. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 9, 1319–1331.
- Nemeth, J., Helves, Z., Görös, T., Gardi, J., Pinter, E., Szócsányi, J., 1996. Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone. *Acta Physiol. Hung.* 84, 913–915.
- Nemeth, J., Helves, Z., Oroszl, G., Thais, M., Pinter, E., Szócsányi, J., 1998. Inhibition of nociceptin on sensory neuropeptide release and mast cell-mediated plasma extravasation in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 347, 101–104.
- Szócsányi, J., 1996. Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an orthodox neuroregulatory mechanism. In: Kumazawa, T., Kruger, L., Mizumura, K. (Eds.), *Progress in Brain Research*, Vol. 115, Elsevier, Amsterdam, pp. 343–359.
- Szócsányi, J., Helves, Z., Oroszl, G., Nemeth, J., Pinter, E., 1998. Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *Br. J. Pharmacol.* 123, 936–942.
- Tosaki, A., Engelman, D.I., Engelman, R.M., Das, D.K., 1996. The evolution of diabetic response to ischemia (reperfusion and preconditioning) in isolated working rat hearts. *Cardiovasc. Res.* 31, 526–536.
- Walsley, D., Wiles, P.G., 1991. Early loss of neurogenic inflammation in the human diabetic foot. *Clin. Sci. Colch.* 80, 605–610.

Impairment of neurogenic inflammatory and anti-inflammatory responses in diabetic rats

József Németh^a, Márta Thán^b, Réka Sári^c, Barna Peitl^b, Gábor Oroszi^b, Beatrix Farkas^d,
János Szolcsányi^{a,b}, Zoltán Szilvássy^{e,*}

^a *Neuropharmacology Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, H-7601 Pécs, Box 99, Pécs, Hungary*

^b *Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University Medical School of Pécs, H-7601 P.O. Box 99, Pécs, Hungary*

^c *Department of Medicine, Albert Szent-Györgyi Medical University, H-6701 P.O. Box 499 Szeged, Hungary*

^d *Department of Dermatology, University Medical School of Pécs, H-7601 P.O. Box 99, Pécs, Hungary*

^e *Department of Pharmacology, University Medical School of Debrecen, H-4002 P.O. Box 12, Debrecen, Hungary*

Received 12 October 1999; accepted 15 October 1999

Abstract

The effect was studied of a primary (preconditioning) neurogenic inflammatory challenge (induced by electrical stimulation of the peripheral stump of the sciatic nerve (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, for 5 min) on neurogenic oedema (5 min later) induced by stimulation of the contralateral sciatic nerve. Plasma extravasation due to the second stimulation was decreased by $52.7 \pm 3.1\%$ ($P < 0.01$) in normal animals and by 29.7 ± 2.2 and $18.1 \pm 1.5\%$ with 50 mg/kg streptozotocin pretreatment i.v. 4 and 8 weeks previously, respectively. Subsequently, bilateral sciatic nerve stimulation increased baseline plasma somatostatin levels from 6.4 ± 0.3 , 11.7 ± 1.4 , and 16.8 ± 3.8 to 28.3 ± 2.9 ($P < 0.01$), 17.9 ± 3.7 , and 25.1 ± 1.7 pmol/l in normal, and 4- and 8-week diabetic animals, respectively. We conclude that experimental diabetes impairs the capability of a preconditioning neurogenic inflammatory episode to elicit a systemic anti-inflammatory effect. This is accompanied by a deficiency in elevation of the plasma somatostatin level in response to nerve stimulation, although the baseline plasma somatostatin level increases proportionally to the duration of experimental diabetes. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Diabetic rat; Somatostatin; Neurogenic inflammation; Inflammatory preconditioning

1. Introduction

Sensory nerves transmit sensory information and release several biologically active substances (see for reviews Holzer, 1992; Szolcsányi, 1996). Evidence favours a role for calcitonin gene-related peptide (CGRP), tachykinins such as substance P and neurokinin A, nitric oxide and somatostatin (see for reviews Moncada and Higgs, 1995; Lundberg, 1996; Szolcsányi, 1996). These transmitters released from sensory nerve terminals have been described to mediate vasoactive effects predominantly at the microvascular level, thus contributing to the regulation of blood flow in peripheral tissues and to ongoing inflammatory and wound healing processes (see for review Brain, 1996). Somatostatin of sensory neural origin and resulting

from local neurogenic inflammation has been found to mediate systemic anti-inflammatory effects to produce hormone-like anti-inflammatory activity in rats (Pintér and Szolcsányi, 1996; Szolcsányi et al., 1998a,b).

Sensory neural dysfunction commonly occurs in patients with peripheral neuropathy, a major complication of diabetes mellitus. Insulin-sensitive depletion of sensory neuropeptides such as substance P, CGRP and somatostatin is characteristic of experimental insulin-deficient diabetes mellitus (Gamse and Janesch, 1985; Diemel et al., 1992; Nemeth et al., 1999) and has been suspected to underlie an attenuated neurogenic inflammatory response in both experimental animals and diabetic patients (Walmsley and Wiles, 1991; Györfi et al., 1996). Together, the key role of somatostatin in the development of the systemic anti-inflammatory effect provoked by a primary neurogenic inflammatory episode (Szolcsányi et al., 1998a,b) and a decreased somatostatin release in response

* Corresponding author. Tel.: +36-52-427-899; fax: +36-52-427-899.
E-mail address: szilvassz@pharm.fod.pte.hu (Z. Szilvássy).

to a standardized challenge in experimental diabetes (Nemeth et al., 1999), have led us to investigate the possibility that the somatostatin-mediated systemic anti-inflammatory adaptive mechanism may be impaired in the insulin-deficient diabetic state in rats.

2. Methods

2.1. Ethics

The experiments performed in the present work conformed to the European Community guiding principles for the care and use of laboratory animals. In addition, the experimental protocol applied was approved by the local ethical committee of the Medical University of Pécs, Hungary.

2.2. Experimental groups

The experiments were carried out with 72 male Wistar rats weighing 200–230 g. The animals were kept in the Laboratory Animal Center of the University Medical School of Pécs under pathogen-free conditions (12-h light/dark periods a day, temperature of 22–25°C, humidity of 50–70%) and were provided with standard rat chow and tap water ad libitum. The rats were randomized into three experimental groups. Group 1: animals without streptozotocin. Groups 2 and 3: animals treated with 50 mg/kg streptozotocin *i.v.* 4 or 8 weeks prior to the experiments, respectively. Each group consisted of 24 rats; six animals for determination of plasma extravasation, 12 for the measurement of fasting plasma somatostatin, insulin and blood glucose levels and six for nerve conduction velocity tests.

2.3. Induction of neurogenic inflammation

Neurogenic inflammation was induced by electrical nerve stimulation as follows: the rats were anaesthetized with sodium thiopentone (50 mg/kg *i.p.*). The left jugular vein was cannulated, and a T-tracheal tube connected to a small animal respirator (KUTESZ, Budapest, Hungary) was inserted for artificial respiration as described (Pintér et al., 1997). The sciatic nerves were exposed and cut in the thigh and the surrounding skin flaps were fixed to a metal ring to make a pool filled with liquid paraffin. The peripheral stumps of the nerves were placed on pairs of platinum hook electrodes and stimulated with C-fibre strength (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min) (Pintér and Szolcsányi, 1996; Szolcsányi et al., 1998a). Guanethidine (8 mg/kg, *i.p.*) was given 1 h before nerve stimulation to counteract the vascular effects of concomitant sympathetic nerve excitation (Pintér et al., 1997). Pipecuronium bromide (200 µg/kg, *i.v.*) was injected to block neuromuscular transmission. Stimulation of the right sciatic nerve was fol-

lowed by stimulation of the left one (or vice versa) with an interval of 5 min between the first and second stimulation periods. Plasma extravasation was determined with the Evans blue accumulation method.

2.4. Plasma extravasation

Evans blue dye (50 mg/kg, *i.v.*) was given 30 min after acute denervation. The animals were exsanguinated 20 min after the second sciatic nerve stimulation. The cutaneous areas supplied by the sciatic nerve (plantar and lateral dorsal skin of the hindpaw) were cut out. The dye content of the tissue samples was extracted with formamide over 72 h at room temperature for photometric determination at 620 nm (Spectromom 195, MOM, Budapest, Hungary). Evans blue accumulation was expressed as µg dye/g wet tissue weight as described (Pintér and Szolcsányi, 1996; Szolcsányi et al., 1998a,b).

2.5. Protocol for blood sampling

In addition to the instrumentation described above (Section 2.4), a polyethylene cannula was inserted into the right carotid artery to collect blood. Bilateral sciatic nerve stimulation was performed (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min) 2 min preceding blood sampling for plasma somatostatin measurement. For control, samples were also taken from rats whose sciatic nerves were cut but not stimulated. These experiments were carried out with animals that had been fasted for a 12-h period.

2.6. Determination of plasma somatostatin, insulin and blood glucose concentrations

Arterial blood samples (3 ml/rat) were taken into ice-cold tubes containing EDTA (6 mg) and Trasylol (1000 IU) 2 min after discontinuation of the stimulation. The samples were then centrifuged at 4°C (2000 rpm, for 10 min), the somatostatin content of 1 ml plasma was extracted by addition of 3 vol. of absolute alcohol. After precipitation and a second centrifugation with the same parameters, the supernatants were aspirated off then evaporated under nitrogen. Plasma somatostatin immunoreactivity was determined by radioimmunoassay (RIA) as described (Nemeth et al., 1996; Szolcsányi et al., 1998a,b). Plasma insulin levels were measured by RIA, and blood glucose levels with the glucose oxidase-peroxidase method. Of course, plasma insulin and blood glucose levels were also measured in animals without nerve stimulation.

2.7. Nerve conduction velocity

Left femoral nerve conduction velocity was determined in subgroups of normal (Group 1) and diabetic animals.

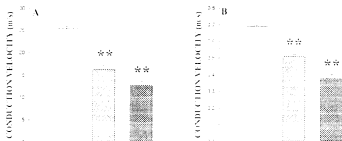


Fig. 1. Femoral nerve conduction velocity values for A- (A) and C-fibres (B) in normal and diabetic rats. Blank columns, non-diabetic controls (Group 1); hatched columns: 4-week streptozotocin-diabetic animals (Group 2); cross-hatched bars: 8-week diabetic animals. The data are expressed as means obtained with six animals in each group. Error bars are S.E.M. Significantly different from Group 1 at * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

(Group 2 and 3). In thiopentone-anaesthetized animals (Section 2.3), the nerve was prepared, cleaned of fat and adhering connective tissue and trains of square-wave constant voltage stimuli were applied through a pair of platinum electrodes placed as high as possible. The intensity, frequency and number of stimuli varied but the pulse width (500 μ s) was kept constant. Another pair of electrodes was applied approximately 2 cm distal to the stimulating electrodes for recording the summation action potentials evoked by the proximal stimulation. The time lags between stimulation and the appearance of corresponding "A" and "C" waves were determined, reflecting activation of populations of A- and C-fibres, respectively. Average conduction velocity (m/s) was calculated by dividing the distance between the stimulating and receiving electrodes by the interval between the end of the stimulatory impulses (20 stimuli) and the appearance of the corresponding "A" and "C" signals (Janig and Lisney, 1989).

2.8. Drugs and solutions

Sodium thiopentone (Trapanal) was purchased from Byk Gulden (Konstanz, Germany), streptozotocin (Zanosar) from Upjohn (Kalamazoo, USA), guanethidine, somatostatin-14, [Tyr¹]somatostatin-14 from Sigma (St. Louis, USA), pipercuronium bromide (Arduan), trasylol (Gordox) from Richter (Budapest, Hungary), EDTA, formamide, Evans blue dye from Reanal (Budapest, Hungary), insulin RIA kit from Izinta (Budapest, Hungary). ¹²⁵I-labelled somatostatin RIA tracer was prepared in our laboratory.

2.9. Statistical analysis

The data are expressed as means \pm standard error of means (S.E.M.). Plasma extravasation values were evaluated with a non-parametric Mann-Whitney test, plasma somatostatin, insulin, blood glucose concentrations and sciatic nerve conduction velocity values were analyzed

with Student's *t*-test for unpaired data. Changes were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of diabetes on body weight, fasting blood glucose and plasma insulin levels

The control (Group 1) animals grew steadily over the 8-week experimental period with an average weight gain of 72 ± 4.8 g, whereas animals in Group 2 and Group 3 had a weight loss of 6.3 ± 1.1 and 10.7 ± 2.4 g, respectively.

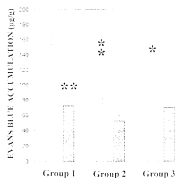


Fig. 2. Plasma extravasation evoked in the skin of the hindpaw by two consecutive periods (5-min intervals) of stimulation (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min) of the peripheral stump of the sciatic nerve in normal and diabetic rats. Group 1, non-diabetic control; Group 2, 4-week, and Group 3, 8-week diabetic rats. Blank columns represent plasma extravasation provoked by the 1st (preconditioning) stimulation, hatched bars show values due to the 2nd stimulation on the other side. The data are expressed as means obtained with six animals in each group. Error bars are S.E.M. Significant difference between 1st and 2nd stimulation values within groups at * $P < 0.05$ and at ** $P < 0.01$, otherwise as indicated.

Fasting blood glucose levels were 6.0 ± 0.2 (Group 1), 23.6 ± 3.1 (Group 2; $P < 0.01$), and 18.4 ± 3.2 mmol/l (Group 3; $P < 0.01$). Plasma insulin concentrations were significantly decreased from 10.5 ± 2.7 (Group 1), to 2.5 ± 0.6 (Group 2; $P < 0.05$), and 2.8 ± 0.9 μ U/ml (Group 3; $P < 0.05$).

3.2. Nerve conduction velocity test: evidence for the presence of diabetic neuropathy

Fig. 1 shows the diabetes-induced decrease in nerve conduction velocity in fast conducting myelinated (A-fibres in Fig. 1A) and slow conducting unmyelinated (C-fibres in Fig. 1B) fibres. At a stimulation intensity suprathreshold for A- (0.5 V, 5 Hz) or C- (3 V, 5 Hz) fibres, conduction velocity decreased progressively with the duration of the pre-existing diabetic state.

3.3. Effect of diabetes on cutaneous neurogenic inflammation and the systemic anti-inflammatory effect evoked by antidromic sciatic nerve stimulation

The distal stump of the right sciatic nerve was stimulated with C-fibre strength (1500 pulses), for 5 min followed by the same stimulation on the contralateral side. Evans blue accumulation in the skin of both hindpaws was then determined. In Group 1, the primary neurogenic inflammation resulted in $52.7 \pm 3.1\%$ inhibition of the secondary neurogenic cutaneous plasma extravasation of the contralateral hindleg ($P < 0.01$). Diabetes was found to produce "per se" an inhibitory effect on the primary inflammatory response characterized by a significant decrease in plasma extravasation as compared to that seen in

Group 1. In Groups 2 and 3, the plasma extravasation produced by the 1st and 2nd stimulations did not differ from each other (Fig. 2).

3.4. Effects of diabetes mellitus on the level of plasma somatostatin — changes in response to bilateral antidromic sciatic nerve stimulation

Bilateral sciatic nerve stimulation elicited an approximately 4-fold increase in plasma somatostatin concentration in Group 1 animals. Baseline plasma somatostatin levels were significantly increased by diabetes of either 4 weeks (Group 2) or 8 weeks (Group 3) duration. However, bilateral nerve stimulation failed to increase the plasma somatostatin level in Groups 2 and 3 (Fig. 3).

4. Discussion

The results confirmed previous findings that the plasma somatostatin level increases in insulin-deficient experimental diabetes (Fischer et al., 1998; Németh et al., 1999) and that streptozotocin diabetes attenuates the primary neurogenic inflammatory response characterized by plasma extravasation in streptozotocin diabetic rats (Gamse and Janos, 1985; Györfi et al., 1996). The results also show that sensory nerve stimulation results in a dramatic increase in plasma somatostatin levels with the development of a systemic anti-inflammatory effect indicated by significant alleviation of plasma extravasation in response to a standardized inflammatory challenge in otherwise healthy rats (Szolesányi et al., 1998a,b). The lack of a difference between amplitudes of plasma extravasation in response to repetitive inflammatory insults in insulin-deficient experimental diabetes is the major original finding of the present work i.e., the *inflammatory preconditioning* phenomenon is lost in diabetes.

The streptozotocin-treated rats exhibited characteristic features of Type I (insulin-dependent) diabetes in that they failed to gain weight, suffered from hyperglycaemia, and on direct determination of fasting plasma insulin levels, showed a substantial insulin deficiency. Moreover, the nerve conduction velocity test, the gold standard for verifying diabetic neuropathy (Love et al., 1996; Cameron and Cotter, 1997; Kato et al., 1998) confirmed that the diabetic animals suffered from a superimposing sensory neuropathy.

According to the report of the San Antonio Conference (1988), "diabetic neuropathy is a descriptive term meaning a demonstrable disorder, either clinically evident or sub-clinical, that occurs in the setting of diabetes mellitus without other causes for peripheral neuropathy". As an experimental approach, streptozotocin-induced diabetes has been extensively used to study the pathogenesis of diabetic neuropathy. In this model, neuropathy, similar to that seen

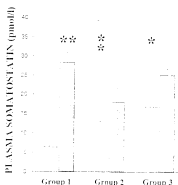


Fig. 3. Plasma somatostatin levels in normal and diabetic rats. Group 1: non-diabetic control; Group 2: 4-week, and Group 3: 8-week diabetic rats. Blank columns represent baseline levels, hatched columns represent values obtained after a single period of bilateral sciatic nerve stimulation (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min). The data are expressed as means obtained with six animals in each group. Error bars are S.E.M. Significant difference between baseline and post-stimulation values within groups at * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, otherwise as indicated.

in the Type I diabetes typically involves detrimental changes in autonomic, sensory and motor nerves (Soediono et al., 1993; Lavee et al., 1996; Kato et al., 1998). As far as the pathomechanism of sensory neuropathy associated with Type I diabetes is concerned, a defective axonal transport including that of sensory neuropeptides is believed to be a critical initiating factor in degenerative distal neuropathies leading to severe microcirculatory changes in both diabetic patients and experimental animals (Ralevic et al., 1993; see for review, Fedele and Giugliano, 1997; Bennett et al., 1998). As the local effector function of peripheral sensory nerves is known to be underlain by the ability of these nerves to release neuropeptides in response to various stimuli (see for reviews Brain, 1996; Szolcsányi, 1996), it is not surprising that streptozotocin diabetes, a state characterized by a deficient sensory neuropeptide content/release has a profound influence on neurogenic inflammation. Depletion of CGRP and substance P content has been shown to occur in sensory nerves of streptozotocin-diabetic rats (Diemel et al., 1992), and direct measurement of CGRP, substance P and somatostatin released in response to a highly standardized challenge evidenced a parallel attenuation of the release of these sensory neuropeptides from isolated trachea of the rat with a pre-existing 4-week streptozotocin diabetes (Svenning et al., 1999).

Beyond its local effector function, somatostatin has recently been shown to underlie a systemic anti-inflammatory effect associated with neurogenic inflammation (Szolcsányi et al., 1998a,b). This means that a preceding neurogenic inflammatory episode significantly decreases the intensity of a subsequent one induced by either electrical stimulation or counter-irritants even at remote sites. It has also been proven that the protective effect is mediated by circulating somatostatin predominantly of sensory neural origin (Szolcsányi et al., 1998a,b). The phenomenon resembles that of preconditioning, a term originally coined by Murry et al. (1986) for the dramatically increased tolerance of the myocardium to a normally lethal ischaemic injury achieved by an initial brief exposure to ischaemia. Later, Kloner's group has shown that transient ischaemia of the gastrocnemius muscle combined with electrical stimulation significantly decreased infarct size due to prolonged coronary artery occlusion in rabbits (Birnbaum et al., 1997). Moreover, Ferdinandy et al. (1997a) elegantly demonstrated that the preconditioning phenomenon depended on the functional integrity of capsaicin-sensitive sensory nerve fibres. Therefore, we think that, analogous to the ischaemic preconditioning phenomenon, the ability of a preceding neurogenic inflammation to reduce the intensity of a succeeding one can be termed *inflammatory preconditioning*. Myocardial preconditioning, however, seems to be a healthy-heart phenomenon since both hyperlipidaemia and streptozotocin diabetes block the phenomenon (Szilvassy et al., 1995; Tosaki et al., 1996; Ferdinandy et al., 1997b; see for review Ferdinandy et al., 1998). The present results also

show that the *inflammatory preconditioning* phenomenon was also blocked by streptozotocin diabetes. As indicated by the results presented in Fig. 2, plasma extravasation produced by the primary neurogenic inflammatory episode was significantly decreased in diabetic animals and this was accompanied by a significantly increased baseline plasma somatostatin level (Fig. 3). However, the electrical stimulation protocol applied failed to further increase plasma somatostatin concentrations, and there was no *inflammatory preconditioning* phenomenon. This is consistent with the concept that it is neural somatostatin which is of crucial importance in triggering the development of the inflammatory adaptive mechanisms, nevertheless, an increase in plasma somatostatin of metabolic origin can also mediate an anti-inflammatory effect.

In summary, streptozotocin-induced diabetes is referred to as a condition which renders the organism relatively resistant to interventions that provoke neurogenic inflammation. On the other hand, possibly due to a deficient neural somatostatin release mechanism, insulin-deficient diabetes blocks the *inflammatory preconditioning* phenomenon in rats.

Acknowledgements

This work was supported by Hungarian Research Grants from OTKA T-029428, T-030766, T-08058/97, T-029398 and a Neuroscience Research Grant from the Hungarian Academy of Sciences. The authors express thanks to professor Gábor Czéh for much valuable advice pertaining to experimental approaches to diabetic neuropathy and to professor Istvan Nagy for the kind supply of Zanosar. The expert technical assistance of Mrs. Csilla Zádor, Mária Zsoldos and Zsuzsanna Árvai is also gratefully acknowledged.

References

- Bennett, G.S., Garrett, N.E., Diemel, L.T., Brain, S.D., Tomlinson, D.R., 1998. Neurogenic cutaneous vasodilation and plasma extravasation in diabetic rats: effect of insulin and nerve growth factor. *Br. J. Pharmacol.* 124, 1573–1579.
- Birnbaum, Y., Hale, S.L., Kloner, R.A., 1997. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation* 96, 1641–1646.
- Brain, S.D., 1996. Sensory neuropeptides in the skin. In: Goppert, P., Holzer, P. (Eds.), *Neurogenic Inflammation*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 229–231.
- Cameron, N.E., Cotter, M.A., 1997. Neurovascular effects of 1-aminocaproic treatment in diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 319, 249–254.
- Diemel, L.T., Stevens, E.J., Willars, G.B., Tomlinson, D.R., 1992. Depletion of substance P and calcitonin gene-related peptide in sciatic nerve of rats with experimental diabetes: effects of insulin and aldose reductase inhibition. *Neurosci. Lett.* 137, 253–256.
- Fedele, D., Giugliano, D., 1997. Peripheral diabetic neuropathy. Current recommendations and future prospects for its prevention and management. *Diagn. Treat.* 434–421.

- Ferdinandy, P., Coeur, E., Corchia, C., Trank, M., Dux, M., Nemeth, J., Horvath, L.T., Davy, L., Szekeres, Z., Jancso, G., 1997b. Csp-gamma sensitive heat sensory innervation is involved in pain-mediated sensitization in rat hearts: role of nitric oxide and P2U₁ receptors. *Neurosci Lett* 231, 157–160.
- Ferdinandy, P., Szekeres, Z., Baxter, G.H., 1998. Adaptation to myocardial stress in diseased states. Is preconditioning a healthy heart phenomenon? *Thromb Thrombolysis Vasc Dis* 19, 223–229.
- Fischer, W.E., Marschella, P., Barros, L.G., Shimizu, W.J., 1998. Variable effect of streptozotocin diabetes on the growth of handker parchment cancer (H121) in the Syrian hamster and nude mouse. *Surgery* 125, 315–320.
- Gamble, R., Jancso, G., 1985. Reduced neuropeptide changes (but not α -substance P depletion). *Eur J Pharmacol* 118, 175–180.
- Goyert, A., Frazzetta, A., Feller, E., Ender, F., Rosvoldi, L., 1996. Effects of streptozotocin-induced diabetes on neuropeptide inflammation of gingivoinflamed tissue in rat. *J Periodontol Res* 31, 249–255.
- Heldner, P., 1992. Peptidergic sensory neurons in the context of vascular functions: mechanism and significance in the cutaneous and splanchnic innervation of the arterial system. *Neurosci Biobehav Rev* 17, 99–106.
- Jung, W., Linsky, S.J.W., 1989. Small diameter myelinated afferents possess vasodilation but not plasma extravasation in rat skin. *J Physiol* 413, 477–486.
- Kane, N., Mikami, M., Mizuno, K., Suzuki, T., Shinoda, M., 1998. Sensitization of sensory nerve conduction velocity and minimal F-wave latency in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett* 244, 169–172.
- Lowe, A., Cotter, M.A., Cameron, N.E., 1996. Nerve function and regeneration in diabetic and galactosamine rats: antioxidant and neural chelator effects. *Eur J Pharmacol* 314, 33–39.
- Ludberg, J.M., 1996. Pharmacology of co-transmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev* 48, 113–178.
- Monscha, S., Higgs, E.A., 1995. Molecular mechanism and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 9, 1319–1330.
- Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A., 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124–1136.
- Nemeth, J., Helyes, Zs., Gercs, T., Gardi, J., Pinter, E., Szekeres, J., 1996. Development of subcutaneous radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of substance A(1) Png and α -MSH. *Neurosci Lett* 212, 87–90.
- Nemeth, J., Szekeres, Z., Pinter, E., Gercs, T., Szekeres, J., 1999. Decreased sensory neuropeptide release from trachea of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur J Pharmacol* 369, 221–225.
- Pinter, E., Szekeres, J., 1998. Systems with inflammatory effect inhaled by autonomic stimulation of the dorsal roots in the rat. *Neurosci Lett* 247, 87–90.
- Pinter, E., Helyes, Zs., Gercs, T., Szekeres, J., 1997. Neurogenic and peptidergic sympathetic regulation of carotimus microcirculation in the rat. *Eur J Pharmacol* 325, 67–74.
- Rakovic, V., Bekar, A., Burrows, G., 1993. Impaired sensory, motor nerve function in the isolated mesenteric arterial bed of streptozotocin-diabetic and ganglioside-treated streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol* 110, 1105–1111.
- San Antonio Conference, 1988. Carotimus: structure, aspect and recent indications of the San Antonio Conference on Diabetes. *Neurology* 37, 1000–1004.
- Sokolovic, P., Bekar, A., Burrows, G., 1995. Prevention of neuropathy in the pyloric sphincter of streptozotocin-diabetic rats by gangliosides. *Gastroenterology* 104, 1072–1082.
- Szekeres, Z., Ferdinandy, P., Szekeres, J., Nagy, L., Karcs, S., Jancso, J., 1997. Evidence for the role of neuropeptides of nociceptors in afferent pain. *Neurosci Biobehav Rev* 22, 259–269.
- Szekeres, Z., 1998. Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and hopes of an antidote neuroregulatory mechanism. *Int J Neuropharmacol* 113 Elsevier, Amsterdam, pp. 343–359.
- Szekeres, J., Helyes, Zs., Orosz, G., Nemeth, J., Pinter, E., 1998a. Release of somatostatin and its role in the modulation of the anti-inflammatory effect induced by antidiabetic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *Br J Pharmacol* 123, 936–942.
- Szekeres, J., Pinter, E., Helyes, Zs., Orosz, G., Nemeth, J., 1998b. Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br J Pharmacol* 125, 916–922.
- Troski, A., Engelhorn, D.T., Engelhorn, R.M., Dux, D.K., 1996. The evolution of diabetic response to ischemia: reperfusion and preconditioning in isolated working rat hearts. *Cardiovasc Res* 31, 576–586.
- Wahleber, D., Wiles, P.G., 1991. Early loss of neuropeptide inflammation in the human diabetic foot. *Chin. Sci. Bull* 30, 665–670.

The

Physiological

Society



*Joint Meeting with the
Hungarian Physiological
Society*

*Hungarian Academy
of Sciences,
Budapest*

*Saturday to Monday
27th to 29th May 2000*

Website: <http://www.physoc.org>

ABSTRACTS

Impaired anti-inflammatory response and decreased sensory neuropeptide release in streptozotocin-induced diabetic rats

J. Nemeth, M. Than, B. Peitl, G. Oroszi, J. Szolcsányi and Z. Szilvassy

Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pecs, P.O.Box 99, H-7601 Pecs, Hungary

Neuropeptides (calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP)) released from capsaicin-sensitive sensory nerve endings elicit neurogenic inflammation. It has also been shown that somatostatin (SOM) is released from this group of sensory nerve endings and induces a systemic anti-inflammatory effect (Szolcsányi et al. 1998a,b). In the present work we studied the influence of streptozotocin-induced diabetes on the systemic anti-inflammatory action in rats *in vivo* and on the neuropeptide release from isolated rat tracheas *in vitro*. In anaesthetized rats (sodium thiopentone, 50 mg kg⁻¹, i.p.) after guanethidine and pipecuronium pretreatment, plasma extravasation induced by stimulation (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, for 5 min) of the peripheral stump of the sciatic nerve is inhibited by identical nerve stimulation performed on the contralateral leg 5 min earlier. Plasma extravasation in the skin of the hindpaws was quantified by using the Evans-blue method and SOM plasma levels were measured by radioimmunoassay (RIA). For the *in vitro* experiments the tracheas of the anaesthetized and exsanguinated rats were removed. Tracheas of two rats were electrically stimulated (40 V, 0.1 ms, 10 Hz for 120 s) and concentrations of SP, CGRP and SOM in the organ fluid were determined by RIA. Data are expressed as means \pm S.E.M. (n=6). All experiments were in agreement with the rules of the Ethics Committee on Animal Research of the University. Results show that (i) plasma extravasation due to the second stimulation was decreased by 52.7 \pm 3.1 % (P <0.01) in control animals, but was inhibited only by 29.7 \pm 2.2 and 18.1 \pm 1.5 % in 4- or 8-week diabetic rats, respectively, compared to values of the first excitation; (ii) bilateral sciatic nerve stimulation increased plasma SOM levels from 6.4 \pm 0.3, 11.7 \pm 1.4 and 16.8 \pm 3.8 to 28.3 \pm 2.9 (P <0.01), 17.9 \pm 3.7 and 25.1 \pm 1.7 pmol l⁻¹ in normal and in 4- or 8-week diabetic rats, respectively, indicating that although there is a progressive increase in basal SOM level in diabetic rats, the effect of nerve stimulation is diminished. SOM, CGRP and SP release from tracheas obtained from 4-week diabetic rats evoked by field stimulation was smaller than that of the controls, respective values being 0.31 \pm 0.09, 0.41 \pm 0.14, 3.14 \pm 0.44 and 0.51 \pm 0.03, 0.69 \pm 0.12, 5.96 \pm 0.38 fmol mg⁻¹ from an identical baseline of 0.18 \pm 0.03, 0.17 \pm 0.03, 1.77 \pm 0.09 fmol mg⁻¹. It is concluded, that in diabetes (i) reduced liberation of pro-inflammatory neuropeptides may account for reduction of the primary neurogenic inflammation and (ii) there is also a decreased sensory SOM release which may be responsible for attenuation of the systemic anti-inflammatory effect.

This work was supported by OTKA T-029428, ETT T-04032/99 and the Hungarian Academy of Sciences.

REFERENCES

- SZOLCSÁNYI, J., HELYES, ZS., OROSZI, G., NEMETH, J. & PINTER, E. (1998a). *Br. J. Pharmacol.*, **123**, 936-942.
SZOLCSÁNYI, J., PINTER, E., HELYES, ZS., OROSZI, G. & NEMETH, J. (1998b). *Br. J. Pharmacol.*, **125**, 916-922.

REGULATORY
PEPTIDES

Volume 8(8,3) 1999



ANTI-INFLAMMATORY EFFECT INDUCED BY TT-232, A NOVEL HEPTAPEPTIDE SOMATOSTATIN ANALOG

J. Szolcsányi, E. Pintér, Zs. Helyes, J. Németh, G. Oroszi, M. Than and Gy. Kéri* Dept. Pharmacol. Medical School of Pécs, H-7643 Pécs, P.O.B. 99., 1st Dept. Biochem. Semmelweis Univ. of Medicine, H-1043 Budapest, Puskin u. 3. Hungary*

We have shown earlier that somatostatin (SOM) released from the activated capsaicin-sensitive sensory nerve endings mediates a systemic anti-inflammatory action. The aim of the present study was to investigate in rats the anti-inflammatory effect of a novel SOM analog, TT-232, which possesses no endocrine activity. Neurogenic plasma extravasation evoked by 1% mustard oil in the paw skin was inhibited by TT-232 administered i.p., i.v. ($1-40 \mu\text{g kg}^{-1}$) or s.c. ($10-320 \mu\text{g kg}^{-1}$) in a dose dependent manner. Its effect lasted for 6h and subcut treatment reduced also the Freund adjuvant-induced arthritis. Reference drugs, diclofenac and meloxicam did not reduce neurogenic inflammation but all three of them dose-dependently diminished non-neurogenic dextran (5%) oedema of the paw. TT-232 (500 nM) inhibited SP, CGRP and SOM release from the rat isolated trachea by 36%, 38%, 42% when electrical field stimulation was applied and by 79%, 24%, 74% when the peptides were released by capsaicin (10^{-7} M), respectively. Since neurogenic component of different inflammatory diseases is not affected by current therapy, it is concluded, that TT-232 is a promising compound with a novel site of action for inhibition of inflammation. Supported by OTKA T-029428.

SOMATOSTATIN MEDIATED SYSTEMIC ANTI-INFLAMMATORY EFFECT INDUCED BY ANTIDROMIC VAGAL AND SCIATIC NERVE STIMULATION

Thán M., Németh J., Helyes Zs., Szilvássy Z., Pintér E., Szolcsányi J. Dept. of Pharmacology, Medical School of Pécs, H-7643 Pécs, P.O. Box 99, Hungary

It has been established that beyond evoking a local neurogenic inflammation, activation of capsaicin-sensitive primary afferents elicits systemic anti-inflammatory effect mediated by somatostatin (SOM). In the present work we analysed this adaptive response evoked by activation of interoceptive nerve terminals in rats and guinea-pigs. Bilateral antidromic electrical stimulation of the sensory vagal fibres (20 V, 0.5 ms, 8 Hz, 20 min) inhibited the secondary neurogenic inflammation by 36.45% in rats. The vagal excitation (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min) increased plasma SOM level (in fmol/ml) from 7.88 ± 1.56 to 30.5 ± 1.65 in rats and from 7.93 ± 1.87 to 26.26 ± 3.15 in guinea pigs. Plasma SOM increase was prevented by systemic capsaicin (1%) pretreatment. Since abdominal vagotomy did not diminish SOM elevation, importance of gastrointestinal SOM can be excluded. Antidromic stimulation of one sciatic nerve (30 V, 0.5 ms, 20 Hz, 20 min) inhibited the secondary inflammation by 45.03% in guinea-pigs, and elevated plasma SOM level 3.5 fold to 26.98 ± 2.79 , which was also prevented by capsaicin pretreatment. These data present further evidence to prove that circulating SOM with systemic anti-inflammatory action derives from capsaicin-sensitive sensory neurones in rats and in guinea-pigs. This work was supported by the Hungarian Academy of Sciences, OTKA T-029428.

SOMATOSTATIN AND EPILEPSY

A. Vezzani, Dept. of Neuroscience, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Via Eritrea 62, 20157 Milano, Italy

Evidence in human tissue and in experimental models of epilepsy suggests that somatostatin (SRIF) in CNS is involved in seizure phenomena. Thus, SRIF-containing neurons degenerate after status epilepticus in rats at a different extent depending on the severity and duration of seizures while they express higher SRIF mRNA levels and increased immunoreactivity in cell bodies and axon terminals after kindling epileptogenesis (Schwarzer et al 1996 Brain Res Rev 22: 27-50). These changes are associated with lasting modifications in peptide release from hippocampal and entorhinal cortex slices. SRIF1 and SRIF2 receptors in the hippocampus undergo distinct changes after status epilepticus and in kindling. Thus, sst_2 binding sites are selectively decreased in kindling while sst_3 and sst_4 receptors are reduced after kainic acid. Pharmacological studies indicate that SRIF exerts an inhibitory control on limbic seizures. Thus, intracerebral application of sst_2 receptor agonists protect rats from acute and chronic seizure susceptibility induced by kainic acid. Inactivation of endogenous SRIF by a specific antibody delays kindling rate. Thus, SRIF-mediated neurotransmission in the limbic system is modified by seizures and this peptide has both anticonvulsive and antiepileptogenic properties.

Fundamental & Clinical Pharmacology

INCLUDING THE FORMER ARCHIVES INTERNATIONALES DE PHARMACODYNAMIE ET DE THÉRAPIE

VOL. 13/Suppl. 1

1999

FCPHEZ (S) 1s-396s 1999
ISSN 0767-3981

THE INTERNATIONAL PUBLICATION OF THE FRENCH PHARMACOLOGICAL SOCIETY
THE OFFICIAL JOURNAL OF EPHAR, THE FEDERATION OF THE EUROPEAN PHARMACOLOGICAL SOCIETIES

2nd EUROPEAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY

Drugs against disease to improve quality of life: gateway
to the 21st Century through EPHAR symposia

Budapest, Hungary, 3-7 July 1999

ABSTRACTS



Cited/abstracted in: *Biological Abstracts/Bases, CABS, CNRS/Pascal, Current Contents/Life Sciences, Excerpta Medica/MBase, Index Medicus/Medline, Science Citation Index.*



ELSEVIER



PHARMACOLOGICAL ANALYSIS OF THE ANTI INFLAMMATORY EFFECT INDUCED BY TT-232, A NOVEL HEPTAPEPTIDE SOMATOSTATIN ANALOG

E. Punter, Zs. Helyes, J. Németh, G. Orosz, M. Than, Gy. Keri* and J. Szecsenyi

Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University Medical School of Pécs, H-7643 Pécs, P.O.B. 99 Hungary

Department of Biochemistry, Semmelweis University of Medicine, H-1045 Budapest, Puskin u. 7 Hungary

Our previous results have demonstrated that the novel heptapeptide somatostatin analog, TT-232, which is free from endocrine effect exerts potent anti-inflammatory action. The aim of the present study was to test the dose-related activity of this agent after i.p., i.v. and s.c. administration in anaesthetized rat. Neurogenic plasma extravasation (Evans blue accumulation) evoked by 1% mustard oil in the paw skin was inhibited by TT-232 administered i.p., i.v. (1, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$) or s.c. (10, 20, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{g kg}^{-1}$) in a dose dependent manner. The anti-inflammatory effect lasted for 6 h. Reference non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), diclofenac and a selective cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam did not reduce neurogenic inflammation but all three of them dose-dependently diminished non-neurogenic dextran (5%) oedema of the paw. TT-232 (2 x 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ s.c.) significantly attenuated Freund adjuvant-induced arthritis over a period of 18 days. Oedema of the paws and knee joints was measured by plethysmometry. TT-232 (500 nM) also inhibited substance P, calcitonin gene-related peptide and somatostatin release from the rat isolated trachea by 36, 48, 42% when electrical field stimulation (40 V, 0.1 ms, 10 Hz, 120 s) was applied and by 79, 24, 74% when the peptides were released by capsaicin (10^{-6} M), respectively. TT-232 did not influence the basal peptide release. Since neurogenic component of different inflammatory diseases are not affected by NSAID, it is concluded, that TT-232 is a promising compound with a novel site of action for inhibition of neurogenic and non-neurogenic inflammation. This work was supported by the Hungarian Academy of Sciences, OTKA T-016945 and ETT-372.

NEUROPEPTIDE MECHANISMS IN ALLERGY

P. Geppetti, S. Amadesi, M. Hatjiniikilas, *FLM Ricciardolo, C. Mapp, D. Miotto, L.M. Fabbri, **C. Bertrand

Dept of Exp. Clin Med. Univ. of Ferrara, Ferrara, and Univ. of Padua *Inst. of Respir. Dis. Univ. of Catania, Catania, Italy, **Inflammatory Unit, Roche Bioscience, Palo Alto.

Inflammatory components of the allergy response are multiple. Histamine, leukotrienes and other mediators play a role. However, the discovery of non peptide antagonists for tachykinin receptors has clarified that also the tachykinin substance P (SP) and neurokinin A (NKA) contribute. This is particularly evident in the airways where plasma extravasation and bronchoconstriction that follows exposure to antigen of sensitized animals is markedly reduced by NK₁ and NK₂ receptor antagonists. The release of SP and NKA from sensory nerves during the airway anaphylactic response seems to be mediated by the formation of kinins that stimulate excitatory B₂ receptors on sensory nerve terminals. Additional evidence has shown that selective or dual NK₁ and NK₂ antagonists reduce hyperresponsiveness, eosinophil accumulation and cough induced by exposure to antigen. Immunohistochemistry shows that both NK₁ and NK₂ receptors are present in the human bronchi on smooth muscle cells and in vascular endothelial and smooth muscle cells. NK₂ and NK₁ receptor activation contracts isolated human bronchi. However, it is not known if tachykinins and tachykinin receptors play a role in allergic asthma and in other allergic human diseases. The study was funded by Azienda Ospedaliera Sant'Anna, Ferrara.

CGRP, CGRP mRNA AND CGRP₁ RECEPTOR mRNA IN THE HUMAN TRIGEMINOVASCULAR SYSTEM AND THEIR ROLE IN MIGRAINE

L. Edvinsson

Department of Internal Medicine, University Hospital, Lund, Sweden

During attacks of primary headaches (migraine, cluster headache) and in subarachnoid hemorrhage with vasospasm calcitonin gene-related peptide (CGRP) is released in concert with headache and vasospasm, respectively. Two mechanisms have been proposed to account for the effects of CGRP in the cerebral circulation, one to relax cerebral vessels, the other to modulate sensory nerve activity. We have examined the localisation of CGRP with immunocytochemistry and of CGRP mRNA with *in situ* hybridisation in man. In addition, the CGRP₁ receptor mRNA was studied with RT-PCR in human trigeminal ganglion and cerebral vessels.

We observed that the CGRP immunoreactive (ir) neurones occurred in high numbers (30-40% of all neuronal cells) in each section and distributed homogeneously throughout the trigeminal ganglion. Double immunostaining revealed the co-existence of CGRP- and nitric oxide synthases (NOS)-ir. A few (3%) CGRP-ir neurones were NOS positive. Only few scattered CGRP fibres were seen in cerebral arteries. The human trigeminal ganglion cells showed expression of CGRP mRNA by *in situ* hybridisation.

PCR products of the expected size (339 bp) revealed the presence of mRNA for the human CGRP₁ receptor in trigeminal ganglia and in cerebral arteries. This product was seen also in vessels without endothelium and the adventitia. Restriction mapping and sequence analysis of the PCR product yielded fragments of expected molecular size, which correlate with published sequences for the human CGRP₁ receptor.

Thus, we have demonstrated the presence of the CGRP₁ receptor mRNA in the human trigeminal ganglion and in cerebral blood vessels, indicative of both prejunctional (trigeminal) and postjunctional location (blood vessels) of the CGRP₁ receptors. The release of CGRP in head-ache disorders may thus involve two separate sites of action.

IBRO - MITT MILLENNIUMI KONFERENCIA

BUDAPEST 2000
JANUÁR 19 – 22

**Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Kar**

MECHANISM OF THE INHIBITORY EFFECT INDUCED BY TT-232 AND ANANDAMIDE ON SENSORY NEUROPEPTIDE RELEASE

HELYES, ZS., THÁN, M., NÉMEHI, J., OROSZI, G., PINTÉR, E., * KÉRI, GY. and SZOLCSÁNYI, J.

Dept. of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical Faculty, University of Pécs.

*1st Dept. of Biochemistry, Semmelweis University of Medicine, Budapest, Hungary

Chemical or electrical stimulation of the capsaicin-sensitive afferent nerve terminals results not only in pain sensation but a release of sensory neuropeptides. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is responsible for vasodilatation and substance P (SP) for plasma protein extravasation in the innervated areas, furthermore somatostatin (SOM) exerts systemic anti-inflammatory effect. TT-232 is a stable and selective heptapeptide SOM analog with strong tyrosine kinase inhibitory action, which has been proved to have anti-inflammatory and anti-nociceptive activity in rats *in vivo*. Anandamide is an analgetic CB₁ cannabinoid receptor antagonist and since it is structurally related to capsaicin, it may have interaction with vanilloid receptors too. The aim of the present study was to investigate the effect of TT-232 and anandamide on SP, CGRP and SOM release measured with RIA from isolated rat tracheae and to examine their mechanism of action using the G-protein blocker pertussis toxin (PTX) and the tyrosine kinase inhibitor genistein. TT-232 (200 and 500 nM) dose-dependently inhibited the release of the peptides induced both by capsaicin (10^{-7} M) and electrical stimulation (10 Hz, 120 s) and this inhibition was prevented by 100 ng/ml PTX. Genistein (50 μ M) and PTX by itself did not influence electrically-induced peptide release. Anandamide (10^{-5} M) decreased the basal release and this action was also abolished by PTX. Therefore, the effect of both agents is mediated via G-protein coupled receptors. Since TT-232 is free of endocrine actions, participation of SOM 1 and/or 4 receptor subtype in peptide release inhibition is suggested. As genistein was ineffective, the tyrosine kinase inhibitory mechanism is unlikely in these studies. Anandamide in the present case is supposed to act on CB₁ receptors and not directly on ion channels.

Supported by OTKA T-029428, ETT-372/96, ETT-T04 032/99 and MTA.

REGULATORY **PEPTIDES**

AN INTERNATIONAL JOURNAL

Editors-in-Chief

M. Ian Phillips, Gainesville, FL, USA
Wolfgang E. Schmidt, Bochum, Germany

Associate Editors

Mohan Raizada, Gainesville, FL, USA
Baptist Gallwitz, Bochum, Germany

VOLUME 89 (2000)



ELSEVIER

AMSTERDAM - LAUSANNE - NEW YORK - OXFORD - SHANNON - TOKYO

★
LOCAL AND SYSTEMIC EFFECT OF SCIATIC NERVE STIMULATION ON CUTANEOUS NEUTROPHIL ACCUMULATION IN THE RAT HINDPAW

M.Than, E.Pinter, S.D.Brain*, A.Rawlingson* and J.Szocslany
 Dept. Pharmacol. PTE, Pécs, Szegény u. 12. H-7623, Hungary,
 *Dept. Pharmacol. KCL, Guy's Campus, London, SE11 1UL, UK

Earlier data documented that stimulation of the sciatic nerve induces vasodilatation and plasma protein extravasation in the skin of the rat hindpaw. Our former studies provided evidence that somatostatin released by sciatic nerve stimulation elicits systemic inhibitory action on plasma extravasation. The aim of the present study was to investigate the effect of nerve stimulation on leukocyte accumulation in ipsilateral hindpaw, and its inhibitory action on carrageenin-induced neutrophil accumulation in the skin of contralateral hindpaw. Experiments were carried out on anaesthetized rats after guanethidine and pipercuronium pretreatment. The peripheral stump the nerve was stimulated with 20V, 0.5 ms, 0.5-10Hz, 1-5h. 100 µl 1% carrageenin was injected into the contralateral hindpaw. After 5h accumulation period the number of accumulated neutrophils was determined by photometric measurement of myeloperoxidase content of the samples. Nerve stimulation failed to induce significant leukocyte accumulation however caused 50% inhibition of carrageenin-induced neutrophil accumulation in the contralateral hindpaw. **In conclusion:** Endogenous SP cannot act on their own to mediate neutrophil accumulation. We suppose that the systemic inhibitory action of nerve stimulation is due to the release of neural somatostatin. Supported by OTKA T-032548.

INCREASED EXPRESSION OF BRAIN PROLACTIN (PRL) DURING LACTATION AFFECTS NEUROENDOCRINE RESPONSES TO STRESS

L. Turner, G. Hava*, S. Toschi, C. Clapp*, J.D. Neumann.
 Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany, and *Neurobiology Center, Queretaro, Mexico.

PRL is involved in the regulation of maternal behaviour and lactation. Here we examined by RT-PCR the expression of mRNA PRL in the hypothalamus of pregnant and lactating rats. Further, we analysed the role of PRL in the regulation of HPA axis and oxytocin (OXT) responses to stress in lactating rats by antisense AS targeting to downregulate the expression of brain PRL receptors. mRNA from hypothalamus of virgin diestrous (DE), or oestrous (E), pregnant (17-21 days) and lactating (4-6 days) rats were isolated, retrotranscribed into cDNA and amplified by PCR. Southern showed an increase in PRL cDNA in pregnant and lactating rats, which was highest in the latter. In another set of experiments lactating rats were intracerebrally infused (i.c.) osmotic minipumps, into the lateral cerebral ventricle with Ringer (Veh), AS or mixed bases MB, beginning one day after parturition. AS treatment increased the stress-induced ACTH percentage (veh: 90, 7±20, 4; MB: 137±23, 8; AS: 423±114) and OXT (%percentage veh: 10, 4±1, 1; MB: 2, 1±0, 7, 0; AS: 2, 0±1, 0) responses. We conclude that the attenuated neuroendocrine responsiveness seen in lactation is, at least partly, due to the enhanced expression of brain PRL.

supported by DFG and CONACYT.

PAR-2 AGONISTS CAUSE NEUROPEPTIDE RELEASE FROM PRIMARY SENSORY NEURONS

M. Iyemoto, M. Steinhof, M. Freviani, S. Amadesi, E. Mayer, E. Grady, N.W. Bunnett, P. Geppetti, Dept. of Exp. & Clin. Med., Univ. Ferrara, Italy and Univ. of California, San Francisco, Univ. of California, Los Angeles, USA.

Protease activated receptor-2 (PAR-2) belongs to a new class of G protein coupled receptors activated by proteases. PAR-2 is activated by trypsin and trypstatin and by the tethered ligand SLIGRL-NH₂. We localized PAR-2 on primary sensory neurons by immunocytochemistry. A large proportion of the neurons grown in culture and taken from dorsal root trigeminal and nodose ganglia that responded (Ca²⁺ mobilization) to capsaicin responded also to PAR-2 agonists. Trypsin, trypstatin and SLIGRL-NH₂, but not the reverse peptide LRGLS-NH₂ caused release of substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity from slices of rat dorsal spinal cord, and guinea-pig trachea and bronchi. SP and CGRP release was abolished by capsaicin-pretreatment and by a Ca²⁺-free medium. **Conclusion:** PAR-2 is expressed on primary sensory neurons. PAR-2 agonists (i.v.) in pentobarbital anaesthetized guinea-pigs caused a bronchoconstrictor response that was reduced by a combination of the tachykinin NK₁ (SR 140333) and NK₂ (SR 48668) antagonists. Thus, PAR-2 is present in capsaicin-sensitive primary sensory neurons where it promotes mobilization of intracellular Ca²⁺ and release of neuropeptides. SP and CGRP release may result in neurogenic inflammatory responses, including bronchoconstriction.

OXYTOCIN WITHIN THE SUPRAOPTIC (SON), BUT NOT PARAVENTRICULAR (PVN), NUCLEUS INHIBITS LOCAL AND PERIPHERAL VASOPRESSIN RELEASE.

N. Toschi, L. Turner, J.D. Neumann, Max Planck Institute of Psychiatry, 80804 Munich, Germany

In response to various stressors, oxytocin (OXT) is released into blood as well as within the rat SON and PVN independent of gender. In contrast, stress-induced release of vasopressin (AVP) occurs intrahypothalamically, while its release into blood is unchanged. So far, the mechanisms involved in this robust inhibition are unknown. Here, the role of intra-SON and intra-PVN OXT in the regulation of local and peripheral AVP release was studied using an OXT receptor antagonist (OXT-A) applied bilaterally into the SON or the PVN of male rats via reversed microdialysis (10 µg/ml, 3.3 µl/min). The basal and stress-induced HPA axis activity was also monitored. OXT-A in the SON increased local release of AVP under basal conditions (4.35-fold increase; p<0.05) as well as in response to forced swimming (FS; 60 sec, 22 °C; vehicle 2.6-fold, OXT-A: 14.7-fold increase; p<0.01). In addition, basal AVP release into blood was disinhibited (2.8-fold increase; p<0.05), but remained unchanged after FS. In contrast, OXT-A in the PVN did not affect local or peripheral release of AVP under basal or stress conditions. Confirming previous results, OXT-A in the PVN increased basal ACTH secretion. Further, the stress-induced increase in ACTH secretion was reduced by OXT-A in the PVN (vehicle: 8.61-fold, OXT-A: 4.65-fold increase; p<0.01). OXT-A in the SON had no effect on ACTH secretion. Thus, depending on the site of its intracerebral release, OXT exerts inhibitory effects on local and peripheral AVP release and regulates HPA axis activity. Supported by DFG and Conacyt.

RESEARCH REPORT

SUBSTANCE P RADIOIMMUNOASSAY FOR QUANTITATIVE CHARACTERIZATION OF SENSORY NEUROTRANSMITTER RELEASE

NEMETH, J., OROSZI, G., THAN, M., HELYES, ZS., PINTER, E.,
FARKAS, B.¹ and SZÖCSANYI, J.

Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical University of Pécs,
P.O. Box 99, H-7601 Pécs, Hungary

¹Department of Dermatology, University Medical School of Pécs,
P.O. Box 99, H-7601 Pécs, Hungary

Summary: In the present work we report the development of a new radioimmunoassay method for measuring the substance P content liberated from isolated rat tracheae in response to electrical or chemical (capsaicin, resiniferatoxin, piperine) stimulation. The amount of substance P released by electrical stimulation has been found to be dependent on the number of pulses and chemically elicited substance P release also proved to be dose-dependent. Our findings reinforce previous data that resiniferatoxin is approximately 100 times more potent than capsaicin and the potency ratio between piperine and capsaicin is 1.50.

Key words: substance P, radioimmunoassay, electrical field stimulation, capsaicin, resiniferatoxin, piperine

INTRODUCTION

Substance P (SP), an 11-amino acid basic peptide was first isolated from bovine hypothalamus (Chang and Leeman, 1970) almost three decades ago. Beyond its neurotransmitter and/or neuromodulator role in the central nervous system its presence and physiological function have been

Correspondence should be addressed to:

Dr. J. Németh

Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical University of Pécs
P.O. Box 99, H-7601 Pécs, Hungary

demonstrated in the pancreas, the urogenital tract, the gastrointestinal tract and the skin (McGregor, 1982). More recently, involvement of SP in skin diseases such as psoriasis and atopic dermatitis (Scholzen et al., 1998) furthermore, in healthy wound healing has been receiving increasing attention (Brain, 1997). Local release of SP along with other tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) from peripheral terminals of capsaicin-sensitive primary afferent neurons underlies the main part of neurogenic inflammation (Holzer, 1988; Maggi, 1995; Szolcsányi, 1996). In the airways, due to its potent spasmogenic and pro-inflammatory property, SP has been implicated in a variety of pathological conditions in particular bronchial asthma (Krishna et al., 1998; Yamawaki et al., 1993). Regarding the rapidly expanding spectrum of disease processes in which participation of SP is increasingly recognised, the exact and reliable assessment of the peptide in various samples is demanding. Accordingly, the present work is devoted to describe a recently developed sensitive radioimmunoassay (RIA) method which is capable of measuring the SP content liberated in response to electrical or chemical challenge and clarifying the mechanism of release from isolated rat tracheae.

METHODS AND MATERIALS

Description of SP RIA: Antiserum: "L83", a generous gift from Prof. G.J. Dockray (University of Liverpool, UK) was raised in a rabbit immunised with synthetic SP conjugated to bovine serum albumin (BSA) by glutaraldehyde (Vaillant et al., 1982). Tracer: 125 I-SP labelled with Bolton and Hunter reagent from Amersham. Standard: synthetic SP was used as RIA standard ranging from 0 to 1000 fmol/ml. Buffer: the assay was prepared in 1 ml 0.05 mol/l (pH 7.4) phosphate buffer containing 0.1 mol/l NaCl, 0.25% (w/v) BSA and 0.05% (w/v) NaN_3 . Assay procedure: 100 μ l antiserum (working dilution 1:45,000), 100 μ l RIA tracer (5000 cpm/tube) and 100 μ l SP standard or unknown sample were measured into polypropylene RIA tubes (Merck) with assay buffer. After 48–72 h of incubation at 4 °C, the antibody-bound labelled peptide was separated from the free one by addition of 100 μ l separating solution (10 g charcoal, 1 g dextran, 0.2 g commercial fat free milk powder in 100 ml distilled water). Following centrifugation (3000 rpm, 4 °C, 15 min) and measurement of radioactivity, SP concentrations of the unknown samples were read from a calibration curve.

SP release study: Adult female Wistar rats weighing 220–250 g were anaesthetized with sodium thiopentone (100 mg/kg i.p.) and exsanguinated. The whole tracheae were removed and cleaned of fat and adhering connective tissue. Tracheae of two animals were then perfused with oxygenated and pH adjusted (7.2) Krebs solution consisting of NaCl: 119, NaHCO₃: 25, KH₂PO₄: 1.2, MgSO₄: 1.5, KCl: 4.7, CaCl₂: 2.5, glucose: 11 mmol/l in an organ chamber (1.8 ml) at 37 °C for 60 min. After equilibration, the flow was discontinued and three eight-min fractions (prestimulated, stimulated, poststimulated) were collected consecutively. In the second eight-min period electrical field stimulation (40 V, 0.1 ms) (Szolesányi and Barthó, 1982) with various pulses (100, 300, 1200) or chemical excitation (capsaicin 10⁻⁸–10⁻⁵, resiniferatoxin 10⁻¹⁰–10⁻⁷, piperine 2×10⁻⁶–5×10⁻⁵ mol/l) was performed to elicit SP release. SP content of the collected samples was measured by means of the newly developed RIA.

Materials: Synthetic SP, capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonamide) and resiniferatoxin were bought from Sigma (St. Louis, USA); NaCl, NaHCO₃, KH₂PO₄, MgSO₄, KCl, CaCl₂, D-glucose, NaN₃ from Merck (Darmstadt, Germany), Na₂HPO₄, Na₂H₂PO₄, ethanol and Tween-80 from Keanal (Budapest, Hungary); charcoal (Norit A) and dextran FP70 from Serva (Heidelberg, Germany); sodium thiopentone from Byk (Konstanz, Germany); BSA and glutaraldehyde from BHD (Dorset, England); piperine from Fluka (Buchs, Switzerland). Capsaicin was dissolved in a mixture of 10 % ethanol, 10 % Tween-80 and 80% saline (v/v).

Statistical analysis: Data are expressed as means±S.E.M. Comparisons were made by means of Student's t-test for paired data. Changes were considered significant at p<0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

The average D₅₀ value obtained with the calibration curves of ten consecutive assays was 36.3±3.5 fmol/ml (Fig. 1). Intra-assay coefficient of variation was 4.3%, inter-assay coefficient of variation was 9.6%. Detection limit of the assay was 2 fmol/tube. Directly iodinated Tyr⁸-SP using Iodogen method (Salacinski et al., 1981) underwent structural modification, therefore exclusively Bolton and Hunter reagent conjugated SP could bind to antiserum "L83" and be employed as a RIA tracer.

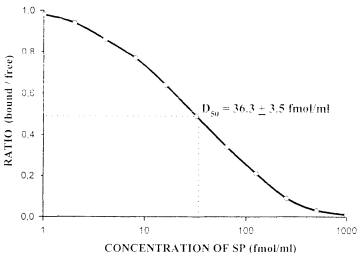


Fig. 1. Calibration curve of the substance P radioimmunoassay. In ten consecutive assays the concentrations of standard required for 50% inhibition of label to antibody was $36.3 \pm 3.5 \text{ fmol/ml}$.

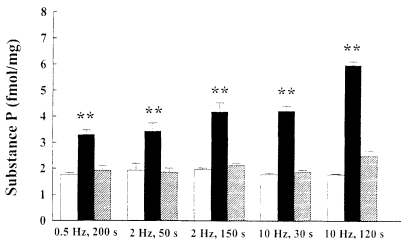


Fig. 2. Substance P release in response to electrical field stimulation (40 V, 0.1 ms). Blank columns show the concentration of the peptide in the pre-stimulated, black columns denote the concentration of the peptide in the stimulated, hatched columns indicate the concentration of the peptide in the poststimulated fractions. Data are expressed as mean \pm S.E.M., $n=5$. Comparisons were made to the prestimulated values (**) $p < 0.01$.

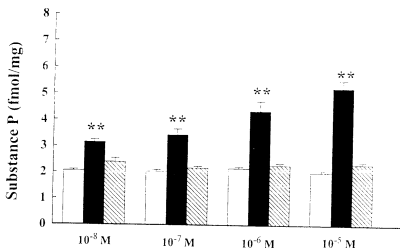


Fig. 3. Substance P release elicited by capsaicin at concentrations of 10^{-8} mol/l, 10^{-7} mol/l, 10^{-6} mol/l and 10^{-5} mol/l. White columns show the concentration of the peptide in the prestimulated, black columns denote the concentration of the peptide in the stimulated, hatched columns indicate the concentration of the peptide in the post-stimulated fractions. Data are expressed as mean \pm S.E.M., $n=5$. Comparisons were made to the pre-stimulated values (**) $p<0.01$.

Electrical field stimulation at various frequencies ranging from 0.5 to 10 Hz was effective to release SP from sensory nerve endings of isolated rat tracheae (Fig. 2). The amount of the peptide released is dependent on the number of pulses (100 pulses: 1.43 fmol/mg, 1200 pulses: 4.90 fmol/mg). It has also been demonstrated that capsaicin, resiniferatoxin and piperine evoked SP release in a dose-dependent manner (capsaicin 10^{-8} mol/l: 1.43 fmol/mg, 10^{-5} mol/l: 3.52 fmol/mg; resiniferatoxin 10^{-10} mol/l: 1.08 fmol/mg, 10^{-7} mol/l: 3.95 fmol/mg; piperine 2×10^{-6} mol/l: 0.49 fmol/mg, 5×10^{-5} mol/l: 2.50 fmol/mg) (Figs 3, 4, 5). Our findings are in accordance with previous observations (Szolcsányi 1983, Szallasi and Blumberg, 1999) that all the three naturally occurring pungent substances are capable of stimulating capsaicin-sensitive afferents in a dose-dependent fashion. The order of potency of the stimulants to elicit SP release is similar to that described in terms of physiological responses (Szolcsányi and Jancsó-Gábor 1975, Patacchini et al., 1990). Capsaicin is approximately 50 times more potent than

piperine and resiniferatoxin is two order of magnitude more potent than capsaicin but it requires longer time to reach its maximum effect

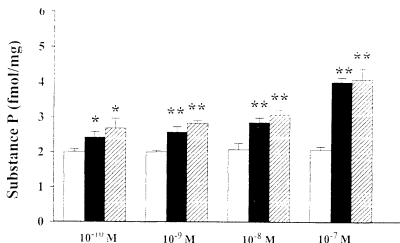


Fig. 4. Substance P release evoked by resiniferatoxin at concentrations ranging from 10^{-10} to 10^{-7} mol/l. Blank columns show the concentration of the peptide in the prestimulated, black columns denote the concentration of the peptide in the stimulated, hatched columns indicate the concentration of the peptide in the poststimulated fractions. Data are expressed as mean \pm S.E.M., $n=5$. Comparisons were made to the prestimulated values (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Based on the parameters described above and findings obtained with the recently elaborated method in our laboratory, the RIA has proved to be a sensitive, reliable and specific assay for determination of SP content liberated from isolated rat tracheae. Beyond the above detailed application, the method has also been found to be suitable for measuring the SP content of tissue extracts and blood plasma.

Acknowledgements. This work was supported by Hungarian Research Grants from OTKA T-029428, T-08058/97 and ETT 032/99.

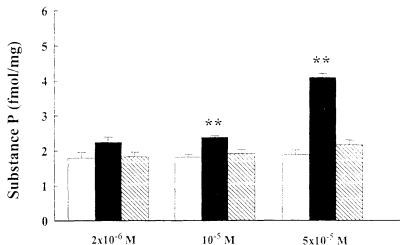


Fig. 5. Substance P release in response to piperine at concentrations ranging from 2×10^{-6} to 5×10^{-5} mol/l. Blank columns show the concentration of the peptide in the pre-stimulated, black columns denote the concentration of the peptide in the stimulated, hatched columns indicate the concentration of the peptide in the post-stimulated fractions. Data are expressed as means \pm S.E.M., $n=5$. Comparisons were made to the pre-stimulated values (**) $p < 0.01$.

REFERENCES

- Brain, S.D. (1997) Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology* 37: 133-152.
- Chang, M.M. and Leeman, S.E. (1970) Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterisation as substance P. *J. Biol. Chem.* 245: 4784-4790.
- Holzer, P. (1988) Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins and other neuropeptides. *Neuroscience* 24: 739-768.
- Krishna, M.T., Chauhan, A.J., Frew, A.J., Holgate, S.T. (1998) Toxicological mechanisms underlying oxidant pollutant-induced airway injury. *Rev. Environ. Health*, 13: 59-71.
- Maggi, C.A. (1995) Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog. Neurobiol.* 45: 1-98.

- McGregor, G.P. (1982) Substance P. In: *Radioimmunoassay of Gut Regulatory Peptides* (Eds. Bloom, S.R. and Long, R.G.) pp. 154–163. W.B. Saunders Company Ltd, London–Philadelphia–Toronto
- Patacchini, R., Maggi, C.A., Meli, A. (1990) Capsaicin-like activity of some natural pungent substances on peripheral endings of visceral primary afferents. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342: 72–77
- Salaicinski, P.R.P., McLean, C., Sykes, J.E.C., Clement-Jones, V.V., Lowry, P.J. (1981) Iodination of proteins glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-5 α ,6 α -diphenyl glycouril (Iodogen). *Anal. Biochem.* 117: 136–146
- Scholzen, T., Armstrong, C.A., Bunnett, N.W., Luger, T.A., Olerud, J.E., Ansel, J.C. (1998) Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune system. *Exp. Dermatol.* 7: 81–96
- Szallasi, A. and Blumberg, P.M. (1999) Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51: 159–211
- Szolesányi, J. (1983) Tetrodotoxin-resistant non-cholinergic neurogenic contraction evoked by capsaicinoids and piperine on the guinea-pig trachea. *Neurosci. Lett.* 42: 83–88
- Szolesányi, J. (1996) Neurogenic inflammation: reevaluation of axon reflex theory. In: *Neurogenic Inflammation* (Eds. Geppetti, G. and Holzer, P.) pp. 33–42. CRC Press, Boca Raton
- Szolesányi, J. and Barthó, L. (1982) Capsaicin-sensitive non-cholinergic excitatory innervation of the guinea-pig tracheobronchial smooth muscle. *Neurosci. Lett.* 34: 247–252
- Szolesányi, J. and Jancsó-Gábor, A. (1975) Sensory effects of capsaicin congeners. *Arzneimittelforschung* 25: 1877–1881
- Vaillant, C., Bu'lock, A., Dimaline, R., Dockray, G.J. (1982) Distribution and development of peptidergic nerves and gut endocrine cells in mice with congenital aganglionic colon, and their normal littermates. *Gastroenterology* 82: 291–300
- Yamawaki, I., Geppetti, P., Bertrand, C., Huber, O., Daffonchio, I., Omini, C., Nadel, J.A. (1993) Levodropropizine reduces capsaicin- and substance P-induced plasma extravasation in the rat trachea. *Eur. J. Pharmacol.* 243: 1–6

**SIXTH ANNUAL MEETING OF THE
HUNGARIAN NEUROSCIENCE
SOCIETY**

ORGANIZER: G. CZÉH

**JANUARY 28 – 30, 1999
PÉCS - HARKÁNY, HUNGARY**

ABSTRACTS

SUBSTANCE P RADIOIMMUNOASSAY FOR QUANTITATIVE CHARACTERIZATION OF SENSORY NEUROTRANSMITTER RELEASE

NÉMETH, J., THAN, M., HELYES, ZS., OROSZI, G., PINTÉR, E. and SZOLCÁSANYI, J.

Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical University of Pécs, Hungary

Substance P (SP) is an 11-amino acid basic peptide, found in both the central nervous system and the gastrointestinal tract. It has been shown that local release of SP with other tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) from peripheral terminals of capsaicin-sensitive primary afferent neurons underlying the main part of neurogenic inflammation (1, 2). In the present work we report the development of a new sensitive SP radioimmunoassay (RIA) to elucidate the mechanism responsible for the peptide release in response to electrical or chemical stimulation from sensory nerve endings of isolated rat tracheae.

Description of RIA: antiserum: "L83" (1: 450,000) from Prof. G.J. Dockray University of Liverpool, tracer: ^{125}I -SP (5000 cpm) labelled with Bolton and Hunter reagent from Amersham, standard: SP (0-1000 fmol/ml) from Sigma, buffer: 0.05 mol/l (pH 7.4) phosphate containing 0.1 mol/l NaCl and 0.25 % (w/v) BSA, incubation, at 4°C for 48-72 hours, separation: addition of 100 μl separating solution (10 g charcoal, 1 g dextran, 0.2 g milk powder in 100 ml distilled water) and centrifugation (3500 rpm, 4°C , 15 min).

Release study: Tracheae of two adult Wistar rats were perfused with oxygenated Krebs solution in an organ bath (1.8 ml) at 37°C for 60 min. After equilibration, the flow was stopped and three eight-min fractions (prestimulated, stimulated, poststimulated) were taken. Electrical field stimulation (40 V, 0.1 ms) with different pulses (100, 300, 1200) or chemical excitation (capsaicin 10^{-8} - 10^{-5} , resiniferatoxin 10^{-10} - 10^{-7} mol/l) was performed to elicit SP release. SP content of the collected samples was measured by means of this RIA.

Results and discussion: This radioimmunoassay newly developed in our laboratory has been proved to be a sensitive and specific one to determine SP concentrations in various biological samples. The average D50 value obtained with the calibration curves of ten consecutive assays was

Sixth Annual Meeting of HNS

361

36.3+4.2 fmol/ml. It has been assessed by means of this RIA that capsaicin or resiniferatoxin evoked a SP release dose-dependently (capsaicin 10^{-8} mol/l: 1.43 fmol/mg, 10^{-5} mol/l: 3.52 fmol/mg; resiniferatoxin 10^{-10} mol/l: 1.08 fmol/mg, 10^{-7} mol/l: 3.95 fmol/mg). According to our results it is suggested that resiniferatoxin is 100 times more potent to liberate SP than capsaicin but it requires longer time to reach its maximum effect. It has also been shown that electrical field stimulation ranging from 0.5 Hz to 10 Hz is effective to release SP from sensory nerve endings in rat tracheae. The amount of the peptide released is dependent on the number of pulses (100 pulses: 1.43 fmol/mg, 1200 pulses: 4.90 fmol/mg).

References:

1. Holzer, P., (1988) *Neuroscience* 24, 739-768.
2. Maggi, C.A., (1995) *Prog. Neurobiol.* 45, 1-98.

IBRO - MITT MILLENNIUMI KONFERENCIA



BUDAPEST 2000

JANUÁR 19 – 22

**Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Kar**

RELEASE OF SOMATOSTATIN AND CGRP FROM CAPSAICIN-SENSITIVE SENSORY NERVE TERMINALS IN VITRO AND IN VIVO

* THÁN, M., ** NÉMETH, J., ** HELYES, ZS., * PINTER, E. and * ** SZOLCSANYI, J

* Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs, Hungary

** Neuropharmacology Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Pécs, Hungary

Activation of the capsaicin-sensitive primary afferents elicits a Ca^{2+} dependent release of neuropeptides (calcitonin-gene related peptide (CGRP), somatostatin, substance P) stored in the nerve terminals. The aim of the present study was to analyse the release of CGRP and somatostatin in rats in response to chemical stimulation (capsaicin, resiniferatoxin (RTX)) in vitro and in vivo, combined with pharmacological modulation by systemic nociceptin and anandamide pretreatment. *in vitro release study*: Dissected tracheae of two adult Wistar rats were perfused in an organ bath (1.8 ml) with oxygenated Krebs solution at 37 °C for 60 min. After equilibration the solution was changed three times for 8 min (prestimulated-stimulated-poststimulated fractions) and the CGRP and somatostatin content of each fractions was measured with RIA. Chemical stimulation (capsaicin 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/l, and RTX 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} mol/l) induced concentration dependent peptide release, in which RTX was 100 times more potent. Six fractions were collected after RTX 10^{-8} mol/l to demonstrate the slower kinetic and longer duration of its action compared to capsaicin. For *in vivo experiments* Wistar rats were used, anaesthetised with sodium thiopentone 100 mg/kg i.p. RTX (0.1, 0.3, 0.6, 1, 3 µg/kg, i.v.) was injected and arterial blood samples (5 ml/animal) were collected 5 min and 60 min after the RTX administration. RTX provoked a dose-dependent elevation in plasma level of CGRP and somatostatin at 5 min, and lasted for 60 min. Pretreatment with the endogenous CB1 ligand anandamide (100 µg/kg i.v.) significantly inhibited the release of both neuropeptides induced by RTX (0.6 µg/kg, i.v.), while the inhibitory effect of the ORL-1 ligand nociceptin (20 µg/kg, i.p.) reached significant level only on somatostatin release. These data support the acute excitatory effect of RTX on capsaicin-sensitive nerve terminals resulting a dose-dependent and long-lasting release of CGRP and somatostatin, which action can be modified by systemic anandamide and nociceptin administration.

This work was supported by OTKA T-029428, and ETT T-04032/99.

Anandamide-induced inhibition on the release of CGRP and somatostatin evoked by resiniferatoxin in the rat *in vivo*

József Németh, Márta Thán & *János Szolcsányi

Neuropharmacology Research Group of the Hungarian Academy of Sciences and Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs, H-7643 P.O.Box 99, Pécs, Hungary

To determine the effect of anandamide on the capsaicin receptor *in vivo* the release of CGRP and somatostatin was measured in the rat by radioimmunoassay in response to i.v. injection of resiniferatoxin, anandamide and 10-undecenyl-ethanolamide. Resiniferatoxin (0.1–3 µg kg⁻¹) caused 5 min after injection a dose-dependent increase in plasma somatostatin and CGRP level up to 22.2- and 5.2-fold, respectively. Anandamide (10 and 100 µg kg⁻¹) inhibited the resiniferatoxin (0.6 µg kg⁻¹)-induced release of these sensory neuropeptides. 1 mg kg⁻¹ of anandamide decreased and 10-undecenyl-ethanolamide increased the basal somatostatin level. The anandamide-induced inhibition on the resiniferatoxin-evoked neuropeptide release was antagonized by the cannabinoid receptor 1 antagonist SR141716A (100 µg kg⁻¹). It is concluded, that the capsaicin receptor agonist effect of anandamide on the sensory neuropeptide release *in vivo* is suppressed over a 100-fold dose range by its opposite effect induced by agonism on the cannabinoid receptors.

Keywords: Anandamide; resiniferatoxin; somatostatin; CGRP; RIA; primary afferent neurones

Abbreviations: ANA, anandamide; CB1 receptor, cannabinoid receptor 1; CGRP, calcitonin gene-related peptide; RIA, radioimmunoassay; RTX, resiniferatoxin; UEA, 10-undecenyl-ethanolamide; VR1, vanilloid subtype 1 capsaicin receptor

Introduction It has been described that both anandamide (ANA), an endogenous cannabinoid ligand (Pertwee, 1997; Di Marzo *et al.*, 1998) and resiniferatoxin (RTX), a potent irritant of plant origin (Szallási & Blumberg, 1999) are agonists at the cloned vanilloid subtype 1 capsaicin receptor (VR1) (Caterina *et al.*, 1997; Zygmunt *et al.*, 1999, 2000; Smart *et al.*, 2000). Furthermore, recently it has also been shown that ANA following activation of VR1 receptors of the capsaicin-sensitive sensory fibres induces vasorelaxation in several isolated arterial preparations via release of CGRP (Zygmunt *et al.*, 1999). On this ground it has been suggested that ANA is an endogenous ligand for the VR1 capsaicin receptor (Zygmunt *et al.*, 1999, 2000; Smart *et al.*, 2000; Smart & Jerman, 2000). The functional significance of this mechanism, however, was questioned owing to the highly potent inhibitory effect of ANA on the CGRP release via activation on the cannabinoid receptors of the cutaneous nerves and in the spinal cord (Szolcsányi, 2000a,b). The issue remained unsettled since ANA activated cannabinoid receptors in several isolated organ preparations in similar concentrations as the capsaicin receptors of the isolated arterial segments (Zygmunt *et al.*, 2000). Furthermore, on primary cultures of small trigeminal neurones 200 nM ANA elicited both an increase in intracellular calcium concentration and an inhibition of the capsaicin-evoked calcium transients (Széke *et al.*, 2000).

The aim of the present series of experiments was to analyse the effect and interaction of RTX and ANA on the plasma level of CGRP and somatostatin to obtain data *in vivo* for the role of inhibitory cannabinoid and excitatory capsaicin receptors in the action of ANA on the release of sensory neuropeptides. Some experiments were also made with another ethanolamide compound (10-undecenyl-ethanolamide (UEA)) which in functional studies activated several capsaicin-sensitive

mechanisms and was proposed to be a capsaicin receptor agonist (Szolcsányi & Jancsó-Gábor, 1975; Szolcsányi, 1982).

Methods After 12 h starvation Wistar rats of both sexes (240–280 g) were anaesthetized with sodium thiopentone (100 mg kg⁻¹, i.p.). Following anaesthesia the left jugular vein and the right carotid artery were cannulated for drug administration and blood sampling, respectively. A tracheal T-cannula was inserted for artificial respiration when required. RTX, ANA and UEA were injected intravenously in a volume of 0.2 ml per 100 g of body weight. Dose-response relations between systemic RTX administration (0.1, 0.3, 0.6, 1 and 3 µg kg⁻¹, i.v.) and elevation of plasma somatostatin and CGRP levels were determined. The effects of ANA (100 µg kg⁻¹ and 1 mg kg⁻¹, i.v.) or UEA (1 mg kg⁻¹, i.v.) were investigated on basal somatostatin and CGRP levels and the influence of ANA on RTX-evoked neuropeptide release was also determined. The effect of pretreatment with ANA (10 and 100 µg kg⁻¹, i.v.) 5 min prior to RTX (0.6 µg kg⁻¹, i.v.) injection was analysed. The action of selective cannabinoid receptor 1 (CB1) antagonist (SR141716A) pretreatment (100 µg kg⁻¹, i.v., 10 min before 100 µg kg⁻¹, i.v. ANA) was investigated on the inhibition induced by ANA on RTX (0.6 µg kg⁻¹, i.v.)-evoked neuropeptide release (*n* = 6 in each group). Arterial blood samples (3 ml animal⁻¹) were taken 5 min after drug administration into ice-cold tubes containing EDTA (5 mg) and Trasylol (1000 U). Following centrifugation (2000 r.p.m. for 10 min at 4 °C) the peptides from the plasma were extracted by addition of 3 volume of absolute alcohol. After precipitation and a second centrifugation (3000 r.p.m. for 10 min at 4 °C) the samples were dried under nitrogen flow. Plasma somatostatin (Németh *et al.*, 1996) and CGRP (Németh *et al.*, 1998) concentrations were measured by means of specific and sensitive radioimmunoassay (RIA) methods.

Ethics The experiments performed in the present work conform to European Community guiding principles for the care and use of laboratory animals. The experimental protocol applied has been approved by the local ethical committee of Medical Faculty, University of Pécs, Hungary.

Drugs and chemicals Sodium thiopentone (Byk Gulden, Konstanz, Germany), trasyol (Richter, Budapest, Hungary), EDTA (Reanal, Budapest, Hungary), somatostatin-14, Tyr(1)-somatostatin-14, resiniferatoxin (Sigma, St. Louis, USA), anandamide (RBI, Natick, USA), SR141716A (Sanofi, Montpellier, France), rat Tyr- α -CGRP (23-37) (Bachem, Bubendorf, Switzerland) were used. 10-undecyl- α -ethanolamide was synthesized by Székely, Medical School of Szeged. 125 I-labelled Tyr- α -CGRP (23-37) and Tyr(1)-somatostatin-14 were prepared in our laboratory (Németh *et al.*, 1996, 1998). Somatostatin and CGRP antisera were provided by Dr. T. Görös, University Medical School of Budapest. RTX and UEA were dissolved with ethanol and further dilutions were made with saline.

Statistical analysis The results are expressed as means \pm standard error of means (S.E.M.). Data were analysed by unpaired Student's *t*-test. Changes were considered significant at $P < 0.05$.

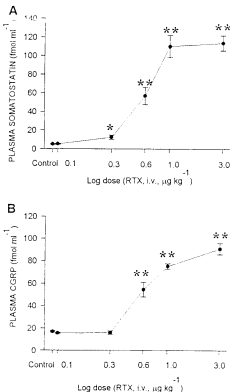


Figure 1. Systemic RTX administration (0.1, 0.3, 0.6, 1 and 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$, i.v.) caused a dose-dependent elevation of plasma somatostatin (A) and CGRP (B) levels 5 min after the injection. Data are expressed as means \pm s.e. mean ($n=6$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to the respective control value.

Results **Effect of RTX on plasma somatostatin and CGRP levels** Systemic RTX administration (0.1–3 mg kg^{-1} , i.v.) caused dose-dependent elevation of plasma somatostatin (from 5.02 ± 0.56 up to 113.66 ± 8.07 fmol ml $^{-1}$) and CGRP (from 17.54 ± 0.78 up to 90.92 ± 4.93 fmol ml $^{-1}$) levels. Significant increases in plasma somatostatin and CGRP concentrations were observed from doses of 0.3 and 0.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$, i.v. RTX and the maximum increase was 10.7- and 3.1-fold, respectively (Figure 1).

The effect of ANA and UEA on basal somatostatin and CGRP plasma levels 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of ANA did not cause significant alterations in plasma neuropeptide levels (somatostatin: 5.13 ± 0.89 vs 5.02 ± 0.56 , CGRP: 18.4 ± 0.23 vs 17.5 ± 0.78 fmol ml $^{-1}$), while 1 mg kg^{-1} significantly decreased the plasma somatostatin concentration (from 5.02 ± 0.56 to 3.52 ± 0.16 fmol ml $^{-1}$, $P < 0.05$) but the CGRP plasma concentration remained unchanged (17.5 ± 0.78 vs 18.0 ± 0.59 fmol ml $^{-1}$). In contrast, UEA (1 mg kg^{-1}) significantly elevated the plasma somatostatin concentration (from 5.02 ± 0.56 to 14.62 ± 1.23 fmol ml $^{-1}$, $P < 0.01$) but failed to increase the plasma CGRP level (17.5 ± 0.78 vs 18.56 ± 0.72 fmol ml $^{-1}$). Thus, efficacy of UEA (1 mg kg^{-1}) on somatostatin release was similar to that of 0.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ RTX (12.44 ± 2.37 fmol ml $^{-1}$).

The effect of ANA on RTX-evoked release of somatostatin and CGRP ANA was injected 5 min before the $\mu\text{g kg}^{-1}$ doses (10 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) which by itself did not change the basal plasma level of somatostatin and CGRP (see above). The dose of RTX was approximately the ED $_{50}$ value (Figure 1). ANA decreased the neuropeptide release evoked by RTX in a dose-dependent manner. After the ANA dose of 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ somatostatin and CGRP release were inhibited by 48.1 ± 3.24 ($P < 0.05$) and 18.5 ± 1.71 %, respectively and after 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ the respective inhibitions were 76.3 ± 3.02 ($P < 0.01$) and 80.1 ± 4.56 % ($P < 0.01$). Pretreatment with the cannabinoid CB1 receptor antagonist (SR141716A, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) markedly diminished the ANA action on RTX-evoked release of somatostatin (76.3 ± 3.02 % inhibition was reduced to 42.9 ± 2.36 %, $P < 0.01$) and CGRP (80.1 ± 4.56 % inhibition was reduced to 22.25 ± 1.64 %, $P < 0.01$) (Figure 2).

Discussion In the rat enhancement of plasma somatostatin and CGRP levels evoked by intravenous injection of RTX was used to assess the *in vivo* release of sensory neuropeptides from the capsaicin-sensitive nerve endings in response to stimulation of the VR1 capsaicin receptors (Caterina *et al.*, 1997; Szallási & Blumberg, 1999). The effect of RTX on the release of the two neuropeptides was dose-dependent but it was more pronounced in the case of somatostatin. In respect of the rise in plasma level of somatostatin the doses of RTX for the threshold and maximum effects were about 2–3 times lower than those of CGRP. Furthermore, both the evoked maximum and the enhancement of the somatostatin plasma concentrations exceeded the corresponding values of CGRP.

ANA in a dose of 1 mg kg^{-1} inhibited the somatostatin concentration in the plasma but caused no change in the CGRP level. ANA in 10 to 100 times lower dose range caused no change in basal neuropeptide levels but inhibited the enhancements induced by RTX. This anandamide-induced inhibition was partly prevented by pretreatment the rat with the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR141716A (Pertwee, 1997). Therefore, it is concluded that the release of sensory neuropeptides to systemic activation of the VR1 capsaicin

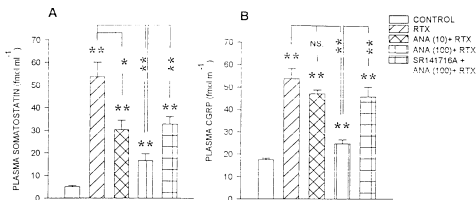


Figure 2. Effect of ANA (10 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, i.v.) on RTX-evoked (0.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$, i.v.) release of somatostatin (A) and CGRP (B). ANA pretreatment decreased the RTX-evoked neuropeptide release in a dose-dependent manner. Pretreatment with SR141716A (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, i.v.) significantly decreased the inhibitory action of ANA. Results are expressed as mean \pm s.e. mean (n=6). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ when compared to respective control value, otherwise as indicated.

receptors by RTX is inhibited by the potent cannabinoid CB1 receptor agonism of ANA. This inhibitory action of ANA overcomes the described (Zygmunt *et al.*, 1999, 2000; Smart *et al.*, 2000) VR1 receptor activation as indicated by the fact that plasma somatostatin and CGRP levels were decreased by ANA in a 10-100 times dose range.

The ANA-induced release of CGRP in isolated arterial preparations (Zygmunt *et al.*, 1999, 2000) is an indication that some capsaicin-sensitive sensory fibres are probably less densely supplied by cannabinoid CB1 receptors and in these vascular areas the effect of VR1 receptor agonism of ANA is not suppressed by the powerful inhibition due to activation of CB1 receptor. In some vessels CGRP release to VR1 activation by ANA might have a local regulatory function (Maggi, 1995; Szolcsányi, 1996, 2000a,b), but the present experiments clearly showed that it is not the case for the overall responsiveness of the capsaicin-sensitive sensory

fibres of the rat's vasculature. In contrast to ANA another ethanolamide

having a 10-undecenyl alkyl chain instead of the arachidonyl one of ANA enhanced the plasma somatostatin level. This synthetic compound was described long time ago as a capsaicin receptor agonist on the basis of functional studies in control and capsaicin-desensitized animals (Szolcsányi & Jancsó-Gábor, 1975; Szolcsányi, 1982, 2000a). It is tempting to assume, that putative ANA-like lipids without cannabinoid receptor agonist action are the functionally relevant endogenous ligands for the VR1 capsaicin receptor.

This work was supported by the Hungarian Academy of Sciences and Hungarian Research Grants OTKA: T-029428 and ETT: T-04032/99. Thanks are given to Sanofi Pharmaceutical Company for the generous supply of SR141716A.

References

- CATERINA, M.J., SCHUMACHER, M.A., TOMINAGA, M., ROSEN, T.A., LEVINE, J.D. & JULIUS, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**, 816-824.
- DI MARZO, V., MELCK, D., BISOGNO, T. & DE PETROCELLIS, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.*, **21**, 521-528.
- MAGGI, C.A. (1995). Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog. Neurobiol.*, **45**, 1-98.
- NÉMETHI, J., GÖRCS, T., HILLYES, ZS., OROSZI, G., KOCSY, T., PINTÉR, E. & SZOLCSÁNYI, J. (1998). Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research. *Neurobiology*, **6**, 473-475.
- NÉMETHI, J., HILLYES, ZS., GÖRCS, T., GARDI, J., PINTÉR, E. & SZOLCSÁNYI, J. (1996). Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone. *Acta Physiol. Hung.*, **84**, 313-315.
- PERTWEE, R.G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Therap.*, **74**, 129-180.
- SMART, D., GUNTHORPE, M.J., JERMAN, J.C., NASIR, S., SHAY, J., MOON, A.L., CHENBERG, J.K., WOODRUFF, A.D. & DAVIS, J.B. (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br. J. Pharmacol.*, **129**, 227-230.
- SMART, D. & JERMAN, J.C. (2000). Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 134.
- SZÁLLÁSI, A. & BLUMBERG, P.M. (1999). Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Rev.* **51**, 159-211.
- SZOLCSÁNYI, J. (1982). Capsaicin type pungent agents producing pyrexia. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, ed. Milton, A.S. Vol. 60, pp. 437-478. Berlin: Springer Verlag.
- SZOLCSÁNYI, J. (1996b). Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. In *Progress in Brain Research*, ed. Kawanawa, T., Kruger, L. & Mizumura, K. Vol. 113, pp. 343-359. Amsterdam: Elsevier.
- SZOLCSÁNYI, J. (2000a). Are cannabinoids endogenous ligands for the VR1 capsaicin receptor? *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 41-42.
- SZOLCSÁNYI, J. (2000b). Anandamide and the question of its functional role for activation of capsaicin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 203-204.
- SZOLCSÁNYI, J., HILLYES, ZS., OROSZI, G., NÉMETHI, J. & PINTÉR, E. (1998a). 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.*, **123**, 936-942.
- SZOLCSÁNYI, J. & JANCsó-GÁBOR, A. (1975). Sensory effects of capsaicin congeners. I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.)*, **25**, 1877-1881.
- SZÓKE, É., BALLA, ZS., CSERNOCHE, I., CZEH, G. & SZOLCSÁNYI, J. (2000). Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurons. *Neuroreport*, in press.
- ZYGMUNT, P.M., JULIUS, D., DIMARZO, V. & HÖGESTATT, E.D. (2000). Anandamide—the other side of the coin. *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 43-44.
- ZYGMUNT, P.M., PETERSSON, J., ANDERSSON, D.A., CHUANG, H., SORGARD, M., DIMARZO, V., JULIUS, D. & HÖGESTATT, E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, **400**, 452-456.