

KRÓNIKUS FÁJDALOM ÉS KOGNITÍV MECHANIZMUSOK VIZSGÁLATA EGÉRMODELLEKBEN

Doktori (PhD) értekezés

Szentes Nikolett



Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Vegetatív és szenzoros idegek zsigeri működése és farmakológiája Program

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika

Programvezető: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna

Témavezetők: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, Dr. Tékus Valéria

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs, 2021.

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	5
1. Általános bevezetés	7
1.1. Fájdalom, nocicepció, allodínia, hiperalgécia	7
1.2. Komplex Regionális Fájdalom Szindróma (CRPS)	8
1.3. Neuroinflammáció és idegi komponensű neuropátiás jellegű fájdalom.....	10
1.4. Új típusú analgetikumok fejlesztésének szükségessége	11
1.5. Szomatosztatin és receptorai: fókuszban a SST ₄ receptor	13
1.6. Öregedés és a szomatosztatin közti összefüggés	16
1.7. Tanulás és memória	17
1.8. <i>In vivo</i> állatkísérletek jelentősége a fájdalom és tanulás vizsgálatában, transzlációs problémák	17
2. Általános célkitűzés.....	19
3. Alkalmazott módszerek általános bemutatása.....	20
3.1. CRPS passzív transzfer-trauma egérmodell	20
3.1.1. Humán IgG injekciós protokoll.....	20
3.1.2. Kísérleti állatok és etikai engedély.....	21
3.1.3. Betegek és egészséges önkéntesek szérum készítménye	22
3.1.4. Talpbőr-izom incízió	23
3.1.5. Funkcionális mérések	23
3.1.6. Szenzoros neuropeptidek és gyulladáscitokinek mennyiségi meghatározása szövet- és plazmamintákból	24
3.1.7. A plazmafehérje kiáramlás és a neutrofil mieloperoxidáz aktivitás meghatározása <i>in vivo</i> optikai képalkotással (IVIS).....	25
3.1.8. Immunhisztokémiai vizsgálatok.....	26
3.1.9. Farmakológiai befolyásolási lehetőségek.....	27
3.1.10. Transzkriptomikai elemzéshez használt módszerek és kísérleti protokoll.....	28
3.1.11. Statisztikai módszerek.....	30

3.2 Tanulás és memória vizsgálata	31
3.2.1 Kísérleti állatok és etikai engedély.....	31
3.2.2. Funkcionális tesztek	32
3.2.3. Statisztikai módszer.....	34
4. Eredmények.....	35
4.1. Neuroinflammációs mechanizmusok szerepének vizsgálata a CRPS passzív transzfer-trauma egérmódeljében	35
4.1.1. A CRPS IgG tartósan fennálló mechanikai hiperalgéziát okoz	35
4.1.2. A CRPS IgG hatására a korai fázisban nő a neutrofil mieloperoxidáz aktivitás....	38
4.1.3. A CRPS IgG adása minimálisan befolyásolja a gyulladásos paraméterek szintjét a láb szöveteiben	39
4.1.4. A CRPS IgG fokozza a mikroglia aktivációt a központi idegrendszerben	41
4.1.5. Neuroinflammációval kapcsolatos génexpressziós változások CRPS IgG-vel kezelt egerekben egészséges IgG kezeléshez viszonyítva	43
4.1.6. A CRPS-ben szerepet játszó lehetséges főbb mechanizmusok a DE gének alapján	45
4.1.7. A CRPS IgG neuroinflammációs változásokat idéz elő a DRG-ben, amelyben a TNF és a JAK-STAT jelátvitel aktiválása kulcsszerepet játszik	46
4.1.8. A TNF és JAK szignalizáció gátlása csökkenti a CRPS IgG-vel kiváltott mechanikai hiperalgézia-fokozódást	48
4.1.9. A TNF és a JAK szignalizáció gátlása csökkenti a CRPS IgG által kiváltott neuroinflammációt a fájdalommal kapcsolatos központi idegrendszeri területeken	49
4.1.10. Az IL-1 receptor blokkolás megelőzi és csökkenti a CRPS-hez kapcsolódó hiperalgéziát és gliózist	53
4.1.11. A mikroglia szelektív IL-1 β deléciója enyhíti, míg a teljes IL-1 $\alpha\beta$ kiütése kivédi a CRPS kialakulását	55
4.2. A szomatosztatin 4 receptor szerepének vizsgálata tanulás és memória egérmódeljeiben	57

4.2.1. Az Sstr4 génhiány nincs hatással a térbeli memóriára, amely az életkorral csökken	57
4.2.2. Az Sstr4 génhiány és az öregedés rontja a nőstény egerek felfedező aktivitását, amely korlátozza a munkamemória megítélését	58
4.2.3. Az öregedéssel csökken a spontán lokomotoros aktivitás és növekszik a szorongási szint mindkét nemből és genotípusban	60
4.2.4. Csökken a felfedező viselkedés az Sstr4 génhiányos fiatal és öreg egerekben.....	61
5. Megbeszélés	63
6. Új eredmények összefoglalása	70
7. Következtetések	71
8. Irodalomjegyzék.....	72
9. Mellékletek.....	89
10. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk.....	92
11. Egyéb publikációk és konferencia elismerések.....	93
12. Köszönetnyilvánítás	96

Rövidítésjegyzék

ANOVA: Analysis of variance (Variancia Analízis)

A β : Amyloid- β (Amiloid- β)

CGRP: Calcitonin gene-related peptide (Kalcitonin gén-rokon peptid)

CPIP: Chronic post-ischemic pain (Krónikus poszt iszkémiás fájdalom)

CRPS: Complex Regional Pain Syndrome (Komplex Regionális Fájdalom Szindróma)

DE: Differentially expressed (Differenciáltan expresszált)

DPA: Dynamic plantar aesthesiometry (Dinamikus plantáris észteziométer)

GABA: Gamma-aminobutyric acid (Gamma-aminovajsav)

GFAP: Glial fibrillary acidic protein (Gliális fibrilláris savas fehérje)

GO: Gene Ontology (Gén Ontológia)

I.p.: Intraperitoneal (Intraperitoneális)

IASP: International Association for the Study of Pain (Nemzetközi Fájdalomkutató Szövetség)

Iba1: Ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Ionizált kalcium-kötő adaptor molekula 1)

ICG: Indocyanine green (Indocianin zöld)

IgG: Immunoglobulin G (Immunglobulin G)

IL-1/IL-4/: Interleukine 1/4 (Interleukin 1/4)

IVIS: *In Vivo* Imaging System (*In Vivo* optikai képalkotó készülék)

JAK: Janus kinase (Janus kináz)

JAK-STAT: Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (Janus kináz-szignál transzducer és transzkripció aktivátor)

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

KO: Knockout (génhiányos)

L: Lumbal (Lumbális)

L-PAG: Lateral periaqueductal grey matter (Laterális periakveduktális szürkeállomány)

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1 (Monocita kemoattraktáns protein-1)

MPO: Myeloperoxidase (Mieloperoxidáz)

mRNS: messenger RNS (hírvivő RNS)

NOR: Novel object recognition (Új tárgy felfedezése)

NSAID: Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug (Nem szteroid gyulladáscsökkentő)

OF: Open field (Nyílt tér)

PACAP: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (Hipofízis-adenilát-cikláz-aktiváló polipeptid)

PAG: Periaqueductal grey matter (Periakveduktális szürke állomány)

PBS: Phosphate-buffered saline (Foszfáttal pufferelt sóoldat)

PCR: Poliymerase chain reaction (Polimeráz láncreakció)

RAM: Radial arm maze (Többkaros útvesztő)

RANTES: Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted

RNS/RNA: Ribonucleic acid (Ribonukleinsav)

ROI: Range of interest (Mérési terület)

SEM: Standard errors of means (Átlag standard hibája)

SP: Substance P (P anyag)

SRIF: Somatotropin release inhibiting factor (Szomatotropin felszabadulást gátló faktor)

SSC: Somatosensory cortex (Szomatoszenzoros kéreg)

SST₄: Somatostatin 4 receptor (Szomatosztatin 4 receptor)

SSTR₄: Somatostatin 4 receptor gene in humans (Szomatosztatin 4 receptor génje emberben)

Sstr₄: Somatostatin 4 receptor gene in mice (Szomatosztatin 4 receptor génje egérben)

Sstr₄^{-/-}: *Sstr4* génhiányos egér

Sstr₄^{+/+}: Vad típusú egér

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3 (Sznál transzducer és transzkripció aktivátor 3)

TNF: Tumor necrosis factor (Tumor nekrozis faktor)

TNF- α : Tumor necrosis factor alfa (Tumor nekrozis faktor alfa)

WT: Wild type (Vad típus)

1. Általános bevezetés

1.1. Fájdalom, nocicepció, allodínia, hiperalgéria

A **fájdalom** a Nemzetközi Fájdalomkutató Szövetség (International Association for the Study of Pain, IASP) meghatározása alapján valódi vagy potenciális szövetkárosodás következtében kialakuló kellemetlen érzéskvalitás. Két komponenssel jellemezhető: az egyik, neurobiológiai elemként a **nocicepcióval**, melyet állatkísérletekkel tudunk vizsgálni, ez a fájdalmas stimulus észlelése szenzoros tapasztalat során; valamint az **affektív komponenssel** a fájdalom emocionális megjelenésével, mely csak emberekben vizsgálható (1). Az állatkísérletekben a nocicepció során az aktiválódott nociceptorokat és a nocifenzív (fájdalmas ingerre történő elhárító) reakciót a fájdalomküszöb meghatározásával tudjuk vizsgálni. A nociceptorok olyan receptorok, melyek különböző ingerek felfogására specializálódtak, mint például mechanikai (nyomás), termális (hideg, meleg) vagy kémiai (kapszaicin, ecetsav, formalin stb.), és többféle szempont szerint csoportosíthatók. A **receptorok érzékenysége alapján** lehetnek unimodálisak (termális, mechanikai) vagy polimodálisak (hő, mechanikai, kémiai ingerek). A **fájdalom időtartama alapján** megkülönböztetünk akut és krónikus fájdalmat. Az akut fájdalom hirtelen jelentkező, rövid ideig tartó állapot, azonban erős fájdalom esetén napokig vagy hetekig elhúzódhat. Ez a szervezet legfontosabb védekező mechanizmusa. A 3-6 hónapnál tovább tartó fájdalom esetén beszélhetünk krónikus fájdalomról, amely a szövetek gyógyulását követően is fennmarad (2,3). Okozhatja sérülés vagy gyulladás, mely érinti a perifériás idegeket vagy a gerincvelőt is. Az idegkárosodással (idegfájdalom) együttjáró hosszan fennálló fájdalom esetén neuropátiás fájdalomról beszélünk. Nem fájdalmas inger által létrejövő fokozott érzékenységet **allodíniának**, míg az enyhén fájdalmas inger hatására kialakuló fájdalomérzetet **hiperalgériának** nevezzük (2). Az **axonok mielinizáltsága alapján** megkülönböztetünk gyorsan vezető, vékonyan mielinizált A δ , és lassan vezető, nem mielinizált C rostokat. A perifériás nociceptorok kb. 50-70%-át a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések alkotják, melyek vékony mielinhüvelyes (A-) és a mielinhüvely nélküli (C-) rostokkal érik el a periféris szövetet (4). Nevüket a kapszaicinról, a paprika alkaloidjáról kapták, mely a csípősséget okozza, azáltal, hogy az idegvégződések membránjában a kapszaicin specifikus, Tranziens Receptor Potenciál Vanillod 1 ioncsatorna található. Jancsó Miklós és Szolcsányi János az 1950-es években fedezték fel, hogy a kapszaicin hatására csökkent a fájdalomérzet, ezáltal a kapszaicin deszenzibilizáló hatását feltételezték (5).

A kapszaicin érzékeny perifériás idegvégződések ún. hármas funkcióval jellemezhetők.

Rendelkeznek egy klasszikus afferens funkcióval, amikor az inger hatására a szenzoros idegvégződések a központi idegrendszer felé továbbítják az ingerületet, így alakul ki a nocicepció, vagyis a fájdalomérzet. A második, a lokális efferens funkció, mely során az érzőidegvégződésből szenzoros neuropeptidok szabadulnak fel, vazodilatációt és plazmafehérje kiáramlást idézve elő. A gyulladás és fájdalom mértéke fokozódik az idegvégződés közelében, neurogén gyulladás kialakulását eredményezve (6). Ilyen fájdalom és gyulladáskeltő neuropeptidok a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) és a tachikininek (substance P (SP) és neurokinin A). A harmadik funkció, az ún. szisztémás efferens funkció. Az érzőidegvégződésből a gyulladáskeltő neuropeptidok mellett fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő neuropeptidok is felszabadulnak, melyek a véráramba kerülve képesek a test távolabbi pontjain csökkenteni a gyulladás és fájdalom mértékét. Ilyen anyag például a szomatosztatin és a hipofízis-adenilát-cikláz-aktiváló polipeptid (PACAP) (7,8).

1.2. Komplex Regionális Fájdalom Szindróma (CRPS)

A Komplex Regionális Fájdalom Szindróma egy krónikus fájdalomállapot, amely általában végtag trauma után alakul ki. Az első 6 hónapban a betegek körülbelül 80%-ánál megemelkedik a bőrhőmérséklet (9), és az érintett terület vörös elszíneződése figyelhető meg a CGRP értágító hatása miatt (10). Nagymértékben megnövekszik a vazodilatáció az érintett és ellenoldali végtag esetében is, a fehérje extravazáció mértéke azonban csak az érintett oldalon nő (11). A CRPS-t tehát korlátozott végtagok, érzékszervi, autonóm, motoros, bőr- és csontelváltozások jellemzik, azonban a fő tünet a fájdalom és a hiperalgézia (**1. ábra**). Egyes betegeknél pszichológiai tünetek (szorongás, depresszió) és alvászavar is kialakulhat. A komplex tünetek miatt integrált interdiszciplináris kezelésre van szükség az egyénre szabva. Az elsődleges cél a fájdalom csökkentése, a funkció megőrzése vagy helyreállítása és a betegek életminőségének javítása. Még a korai, megfelelő kezelés mellett is nehéz a teljes gyógyulást elérni (12).

Két fő típusa van, az egyik a valódi idegsérüléssel nem járó CRPS I, illetve a tényleges idegsérüléssel járó CRPS II típus (13). A megbetegedés korábban reflex szimpatikus disztrófia, algodisztrófia, algoneurodisztrófia, Sudeck atrófia és kauzalgia neveken volt ismert (12). A CRPS diagnosztikájának pontos meghatározására új kritériumokat hoztak létre az IASP kritérium rendszer frissítésével, melyben a „Budapest kritérium” szerinti beosztás nagymértékben javította a diagnózis felállítását(14).

A betegség pontos patofiziológiája ezidáig ismeretlen, de egyes kutatások szerint néhány beteg jól reagál immunglobulin kezelésre, mely bizonyítja az autoantitestek által mediált immunreakciók lehetséges szerepét (12,15–17). A betegeknél a szisztémás gyulladásos

markerek normálisak maradnak, de a regionális gyulladáshoz köthető mediátorok és az autoimmunitás hozzájárulnak a tünetek megjelenéséhez (16). Továbbá a neuroplasztikus mechanizmusok tartós fájdalmat eredményeznek a gerincvelőben és az agyban (18). A legtöbb CRPS-ben szenvedő páciens egy hónapon belül javulást mutat, akár kezeléssel, akár anélkül (19), azonban a betegek 20%-ánál tartós fájdalom alakul ki, amely gyakran évekig, vagy akár az egész életen át tart (20).

A neuropeptidok, úgy mint a SP és a CGRP aktivitása rendellenesen magas a CRPS kialakulása során az érintett bőrben, és mind a tumor nekrozis faktor alfa (TNF- α), mind az interleukin-6 (IL-6) koncentrációja emelkedett az érintett végtagból vett ödémafolyadékban (11,21). Patkány sápcsonttörés modellben a SP által kiváltott extravazáció és ödéma fokozódott, azaz a SP jelátvitel hozzájárul a vaszkuláris és nociceptív rendellenességekhez (22,23). A kapszaicin injekcióval vagy elektromos stimulációval kiváltott szenzoros neuropeptid felszabadulás stimulálja a gyulladásgátló citokinek, mint a tumor nekrozis faktor (TNF), az interleukin-1 (IL-1) és az IL-6, valamint az idegi eredetű növekedési faktor termelését a patkányok bőrében (24). Kutatócsoportunk a Liverpooli Egyetemen (Department of Translational Medicine, University of Liverpool, The Walton Centre NHS Foundation Trust, Liverpool) kollaborációban már korábban kidolgozott egy CRPS passzív transzfer-trauma egérmodellt, és vizsgáltuk annak transzlációs jelentőségét. Kísérleteinkben a szöveti mikrosérülés modellezésére talpbőr-izom incíziót végeztünk az egereken, és sikerült kiváltani a betegségre jellemző főbb tüneteket, mint fájdalom, hiperalgécia és ödéma a CRPS betegekből nyert tisztított immunglobulin G (IgG) frakció naponta történő adásával (25,26).



1. ábra: A CRPS feltételezett patomechanizmusa

1.3. Neuroinflammáció és idegi komponensű neuropátiás jellegű fájdalom

A CRPS neuropátiás mechanizmusok által közvetített fájdalomállapot, amelynek kialakulásában mikroglia és asztrocita aktiváció, neuroinflammáció és központi idegrendszeri szenzitivizáció játszik szerepet (27,28). A CRPS patogenezisében az agy és a gerincvelő kóros neurofiziológiai folyamatait is vizsgálják. A betegségben a nem fájdalmas ingerek is fájdalmat okoznak, így a központi szenzibilizációt tartják a fő patofiziológiai mechanizmusnak. A központi mechanizmusok nemcsak a fájdalommal kapcsolatos érzékszervi utakat befolyásolják, hanem neuroplasztikus hatásokat is eredményeznek, ezáltal változást okozva az érzékszervi és motoros funkciókban is. A központi neurofiziológia folyamatok a perifériás gyulladásos mechanizmusokkal együtt neurogén gyulladást váltanak ki (29–31).

A CRPS-ben neuropátiás fájdalom komponenseket is feltételeznek (32). A perifériás sérülés következtében fellépő neuropátiás fájdalom helyi gyulladással jár együtt, és nitrogén-oxid szintázok, valamint gyulladásos citokinek túlzott expressziója következik be (33). A CRPS-ben a szomatikus kis rostok felismerik és továbbítják a potenciálisan káros mechanikai, termikus és kémiai ingerek által kiváltott információkat (32) ugyanakkor, a vazomotoros és trófikusság efferens funkcióik aktiválódásával vazoaktív neuropeptidok, köztük a CGRP és a SP szabadul fel. A gátló interneuronok csökkent aktivitása is kimutatható a gerincvelő hátsó szarvában (10).

Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a CRPS háttérében kis rostos polineuropátiák is állhatnak (10). Ezen neuroinflammációs mechanizmusok további vizsgálata hozzájárulhat a CRPS mechanizmusainak jobb megértéséhez, valamint új terápiás célpontok azonosításához.

A neuroinflammáció potenciális szerepét a CRPS kórélettani mechanizmusában elsőként patkány krónikus posztisztkémiás fájdalom (CPIP) modellben vizsgálták hátsó gyöki ganglion (DRG) mintákból. Az eredmények bizonyították, hogy a DRG transzkriptomikai elemzésével azonosíthatók a legfontosabb mediátorok és jelátviteli utak, valamint feltérképezhetők potenciális új fájdalomcsillapító célpontok (34). A CRPS során az epigenetikai módosítások befolyásolhatják a gyulladáscsökkentő citokin metabolizmust, a neurotranszmitter reakciókészségét és a fájdalomcsillapító érzékenységet a DRG-kben (35). CRPS páciensek a fájdalom csökkenéséről számoltak be a jobb oldali lumbális (L)4/L5 DRG-k közelébe történő neurostimulátor beültetés után (36,37). A DRG-k kórélettani változásai befolyásolhatják a krónikus fájdalmak, köztük a CRPS kialakulását, ezáltal a kezelésként alkalmazott DRG stimulálás hatékony módszer lehet a fájdalomcsillapításra (37). Az elektroakupunktúrát széles körben alkalmazzák különböző klinikai fájdalomállapotokban és a CRPS állatmodelljeiben is hatékonyan bizonyult (38,39).

1.4. Új típusú analgetikumok fejlesztésének szükségessége

A krónikus, neuropátiás komponenseket is tartalmazó fájdalomállapotok kezelésére a jelenleg forgalomban lévő hagyományos fájdalomcsillapító gyógyszerek (nem szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID), opioidok) számos esetben nem hatékonyak és/vagy a széles körű, súlyos mellékhatások miatt nem lehet hosszú távon alkalmazni (40). Az NSAID-ok gátolják a ciklooxygenáz enzimeket, amellyel megakadályozzák a gyulladás és fájdalom közvetítéséért felelős prosztaglandinok szintézisét (41). Az eredményességüket azonban csökkenteni, hogy számos gasztrointesztinális és renális mellékhatással kell számolni, mint például az opioidok esetén, különösen a nagyobb dózisok alkalmazásakor émelygést, hányást, székrekedést, kognitív károsodást és aluszékonyságot okozhatnak (42). Súlyosabb mellékhatásaik a légzésdepresszió, és a betegek kisebb részénél ugyan, de függőség is kialakulhat (43). A krónikus neuropátiás fájdalom kezelésében az adjuváns analgetikumok (triciklikus antidepresszánsok, antiepileptikumok, helyi érzéstelenítők) lehetnek még alkalmasak, azonban számos kardiovaszkuláris és központi idegrendszeri mellékhatásuk miatt hosszú távú alkalmazásukkal nem lehet számolni (44). Az elmúlt 100 évben nem hoztak forgalomba új hatásmechanizmusú fájdalomcsillapító hatóanyagot, amely áttörést jelenthetne ezen a területen.

A CRPS-ben számos gyógyszert használnak a fájdalom és gyulladás csökkentésére, valamint a funkcionális állapot javítására, úgymint az NSAID-ok, a kortikoszteroidok, az antiepileptikumok, az antidepresszánsok, az opioidok, a biszfoszfonátok és a kalciumcsatorna blokkolók (43). Az NSAID-ok, a ciklooxygenáz-2 gátlók, a kortikoszteroidok és a szabad gyök eltávolító szerek hatékonyságára nincs bizonyíték (41). Klinikai vizsgálatok során bizonyították, hogy a glükokortikoidok hatékonyan csökkentik a gyulladást a CRPS korai szakaszában (41,45), a nagy dózisú kortikoszteroid kezelés pedig olyan citokin változást indukál (TNF- α csökkenés), melynek hatására a fájdalom is csökken (46). Prednizolon kezelés hatására javult az érintett végtag funkcionális képessége és az életminőség azoknál a betegeknél, akiknél traumás sérülést követően alakult ki CRPS, megakadályozva a betegség krónikus fázisba lépését (47,48). Prednizolon kezelés az esetek 83,3%-ában, míg a metilprednizolon kezelés 91%-ban csökkentette a stroke miatt kialakult CRPS korai tüneteit (49,50). Az orális vagy intravénás biszfoszfonátok, mint az alendronát, a pamidronát, klodronát és ibandronát csökkentette a fájdalmat és javította a fizikai funkciókat az akut poszttraumás CRPS I-ben szenvedő betegeknél (41,51–54). Azonban a tartósan fennálló CRPS-ben még az adjuváns analgetikumok sem mutattak jelentős hatékonyságot. Ugyan a triciklikus antidepresszánsok hatásosak lehetnek, de toxikus mellékhatásokkal járnak, így a 6 hónapnál régebben fennálló polineuropátiás betegeknél eredményesebbek lehetnek azok az antidepresszánsok (pl. venlafaxin), melyek szerotonin és noradrenalin visszavételt gátló hatást mutatnak (55,56). A gerincvelő stimulátor beültetésével, elektromos impulzusokat alkalmazva, a betegek mintegy 50%-ánál csökkenti a fájdalmat (57). A CRPS megfelelő terápiája a többféle gyógyszerhasználaton és a korai fizioterápián alapul (41). A betegek egy részénél a plazmaferezis hatékony lehet, amely az autoimmunitás jelentős szerepét támasztja alá (12,15–17). Mindezek alapján egyértelmű, hogy a CRPS igazi terápiás kihívást jelent a fájdalomcsillapításban, ahol új típusú analgetikumok szükségesek (57).

Egy másik új, ígéretes gyógyszer-célpont lehet a szomatosztatin 4 (SST₄) receptor (58–61) a jelenleg mással nem kezelhető fájdalomállapotokra vonatkozóan. Munkacsoportunk bizonyította az SST₄ receptor fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő és antidepresszáns hatásokat közvetítő szerepét. Különböző kísérleti modellekben az SST₄ agonisták ígéretes antinociceptív, antihiperalgetikus hatásait írták le gyulladásos és neuropátiás állapotokban (58,62,63). A közelmúltban SST₄ agonisták fejlesztése számos gyógyszeripari vállalat érdeklődési körébe került (64,65). Stabil, nem peptid szerkezetű, szájon át adható és jól tolerálható molekulák preklinikai fejlesztése és korai klinikai fázis vizsgálatok kezdődtek (65).

Munkacsoportunk részvételével is folyik ilyen irányú kutatási projekt (64,66,67). Az SST₄ receptor perifériás és központi idegrendszeri lokalizációjából (lásd. **1.5. fejezet**) adódóan szerepet játszhat a szenzoros és motoros funkciókban (68), stressz reakciókban, tanulási folyamatokban (69), hangulatszabályozásban (70,71), kognitív teljesítményben és a neurodegeneratív folyamatokban (72). Ezért gyógyszerfejlesztési szempontból is fontos a funkciók vizsgálata.

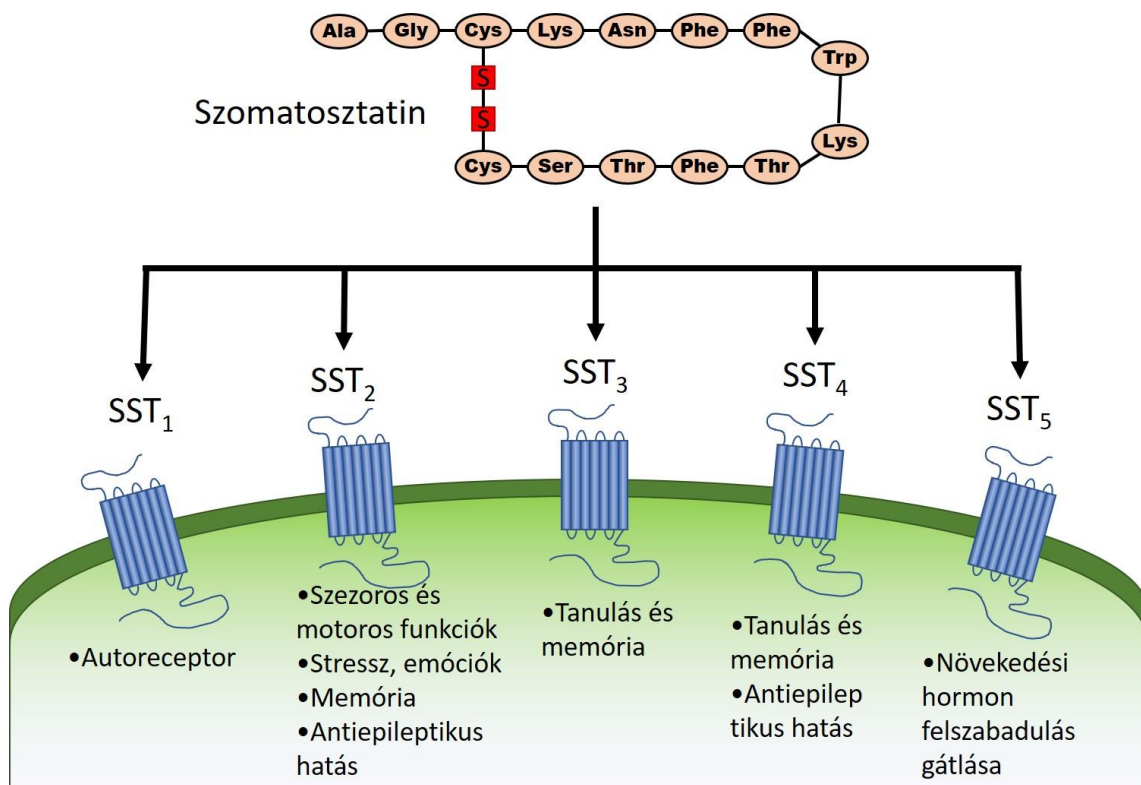
1.5. Szomatosztatin és receptorai: fókuszban a SST₄ receptor

A **szomatosztatin** egy 14 vagy 28 aminosavból álló peptid, mely megtalálható a perifériás és központi idegrendszerben, valamint a szervezet számos területén (73–76). Eredetileg növekedési hormon vagy szomatotropin gátló faktornak (SRIF) nevezték. Később felismerték, hogy széles spektrumú gátló neurotranszmitter, melynek komplex hatása van az egész központi idegrendszerben (69,77,78), valamint a periférián különféle auto-, para- vagy endokrin hatásokat közvetít (79,80). A szomatosztatinerg neuronok két alpopulációja különböztethető meg a központi idegrendszerben, a hosszú nyúlványos szomatosztatinerg idegsejtek és a rövid proximális glutamát és gamma-aminovajsav (GABA) -erg interneuronok (81,82). A szomatosztatin a fájdalmat és hangulatot szabályzó agyi régiókban expresszálódik, főként a hátsó-oldalsó prefrontális, a cinguláris kéregben és az amigdalában (83–85). Számos serkentő és gátló neurotranszmitter felszabadulását gátolja, mint a szerotonin, acetilkolin, glutamát és GABA (86).

Kutatócsoportunk már korábban bizonyította az aktivált kapszaicin-érzékeny peptiderg szenzoros idegekből felszabadult szomatosztatin szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatását a periférián, melyet „szenzokrin” funkciónak hívnak (59,87).

A szomatosztatin számos neurológiai betegségben is szerepet játszik, mint az Alzheimer- és Huntington-kór (88), valamint vizsgálták az epilepsziában való hatásait is (89). Alacsonyabb szomatosztatin szintet mértek olyan betegek gerincvelő- és agymintáikban, akik súlyos depressziós és bipoláris rendellenességekben, skizofréniában, Alzheimer vagy Parkinson kórban szenvedtek (90).

További vizsgálatok során öt különálló **szomatosztatin receptor** gént klónoztak különféle fajokból, beleértve az embert, a patkányt és az egeret. Ezek a gének a G-proteinhez kapcsolt receptor szupercsalád tagjai és feltételezték, hogy membrán-glikoproteinek, amelyek hét α -spirális transzmembrán domént tartalmaznak. Szerkezet alapján a szomatosztatin receptorok két csoportba sorolhatók: a SRIF1 csoportba tartoznak az SST₂, SST₃ és SST₅, melyek közepes vagy magas affinitást mutatnak az oktreotid és seglitid mesterséges szomatosztatin analógokkal szemben, míg az SRIF2 csoportba tartozó SST₁ és SST₄ rendkívül alacsony affinitást mutatnak ezekkel az agonistákkal szemben (91). Egerekben és patkányokban az SST₂ receptor két változatban található, az SST₂ (a) és az SST₂ (b), amelyek csak a karboxi-végük hosszában és összetételében különböznek (92). Az SST₄ receptor közvetíti a gyulladásgátló, fájdalomcsillapító hatást endokrin hatás nélkül, az SST₂ és SST₃ pedig a szorongásgátló és antidepresszáns hatásokért felelős (58,60,63,91,93–96) (2. ábra).



2. ábra: A szomatosztatin receptorok szerepe és funkciója

A **szomatosztatin 4 receptorok** eloszlását immunhisztokémiával vizsgálva patkány agyi és gerincvelői régiókban megállapították, hogy a frontális és pefrontális kéregben, a nukleusz kaudátuszban, a putamenben, a hippocampusban, a szaglóidegekben, az amigdalában, és a kisagyban, valamint a gerincvelő hátsó szarvában is lokalizálódik (92). Az emberi szomatosztatin 4 receptor génjének (*SSTR4*) messenger RNS-e (mRNS) megtalálható

elsősorban az agyban, az agykéregben és a hippokampuszban, közepes mértékben pedig a hipotalamuszban, a szaglógumóban és a kisagyban (97). Perifériás szervekben is kimutatták mRNS szinten: patkányok esetében számos szervben (szív, éhbél, tüdő, vese, hasnyálmirigy), és az emberi tüdőben (92). Szintén patkány kísérletben kimutatták az SST₁, SST₂ és SST₄ receptorok jelenlétét a striátumban, valamint az SST₂ és SST₄ funkcionális szerepét a lokomotoros aktivitásban (98). Korábban bizonyították, hogy az SRIF által közvetített viselkedési tevékenységeket a glutamáterg neurotranszmisszió befolyásolja (98). Az *SSTR4* expressziója arra utal, hogy jelen van a viselkedéssel, megismeréssel és memóriával kapcsolatos agyi területeken, mint a hippokampuszban és a striátumban (99–102). Munkacsoportunk feltérképezte az SST₄ expresszióját a fájdalommal és hangulatszabályozással kapcsolatos egér és emberi agyterületeken (61). Ultraszenzitív RNAscope *in situ* hibridizációs technikával jelentős expressziót figyeltek meg a glutamáterg serkentő, a GABAerg gátló és a kolinerg neuronokban (61). Munkatársaink ugyancsak kimutatták a humán *SSTR4* expresszióját transzgenikus egerekben hasonló agyterületeken (103). Korábbi kísérleteink során megállapítottuk, hogy az SST₄ receptor ígéretes célpont lehet a neurogén gyulladás, neuropátiás fájdalom és depresszió gátlására (13,63), mely felfedezést számos kutatás megerősített (104,105). A kis molekulájú SST₄ agonisták potenciális gyógyszerjelöltek lehetnek olyan új fájdalomcsillapítóként, melyek egyidejűleg antidepresszáns hatással is rendelkeznek (63), valamint orálisan adott új SST₄ agonisták erős antihiperalgetikus hatást fejtettek ki krónikus neuropátia modellben (64). A gyógyszerfejlesztés szempontjából ezért nagyon fontos az SST₄ receptor komplex központi idegrendszeri funkcióinak tisztázása.

1.6. Öregedés és a szomatosztatin közti összefüggés

1900 óta a globális átlagos élettartam több, mint kétszeresére nőtt, és mostanra meghaladja a 70 évet. Ma a 60 éves és annál idősebb emberek száma és aránya növekszik (106). Öregedő társadalmunkba nagyon fontos tényező a megfelelő fizikai és szellemi teljesítőképesség megtartása (107).

Az **öregedés** jelentősen befolyásolja a kognitív funkciókat, a memóriát és a tanulást. A kor előrehaladtával a tanulás lelassul, de az emlékezet nem feltétlenül romlik. A szemantikai memória (a világról való tudásunk, ismereteink tárolása) vagy az általános ismeretek jellemzően változatlanok maradnak a késői felnőttkorig (108). A kognitív károsodás és memória romlásának lassítása vagy megakadályozása a gyógyszerfejlesztés középpontjában áll (78). Az intelligencia is életkorral romlik, de ez változhat és akár stabil maradhat az élet nagy részében, mígnem az élet végéhez közeledve hirtelen romlik. A kognitív hanyatlás mértéke egyéni különbségeket mutat, mely az eltérő élettartammal magyarázható (109). Az életkor előrehaladtával a demencia egyre gyakoribbá válik (110).

A szomatosztatin mRNS szintje a nőstény Wistar patkányok striátumában, a frontális és a parietális kérgében szignifikánsan csökken az öregedéssel (111). A membránhoz kötött metalloproteáz, a neprilizint *in vivo* amiloid-béta (A β) bontó enzimként azonosították patkány hippocampuson végzett radioaktív A β nyomjelző kísérletekkel (112). Kimutatták, hogy a neprilizin szintje csökken az életkorral a temporális és frontális kéregben, mind az Alzheimer-kóros, mind pedig az egészséges agyban is (113). A szomatosztatin genetikai hiánya megváltoztatja a hippocampusz neprilizin aktivitását és lokalizációját, valamint egerek agyában nő az A β hidrofób 42 képződése, ami az Alzheimer-kór kialakulásához vezet. A szomatosztatin potenciális védő szerepet játszhat az Alzheimer-kór és a kognitív károsodás kialakulásában (72). Bár az A β lerakódása az agyban az Alzheimer-kór jellemzője, de az A β -t a demenciában nem szenvedő idős egyéneknél is kimutatták. Neurodegenerációs egérmódelben leírtak olyan szomatosztatin agonistákat (NNC 26-9100, L-803,087), melyek javítják a memória funkciót, valamint a hosszú és rövid távú memóriát (100,114).

Az öregedés mellett a nemek közti eltérés és a kognitív teljesítmény is egy kritikus tényező (115), ezért preklinikai modellekben fontos analizálni a különbségeket. A hipotalamusz szomatosztatin immunreaktivitása is szignifikánsan csökkent az idős nőstény egerekben (116) és patkányokban (117). A szomatosztatin által szabályozott növekedési hormon termelő sejtek száma csökken az életkor előrehaladtával (116–118). Különböző fajokat vizsgálva, köztük az embereket (119), a patkányokat (120) és az egereket (121–125), jól megalapozott, hogy a peptid

neurotranszmitterek, mint a szomatosztatin, a PACAP, a kortikotropin felszabadító hormon, az inzulinszerű növekedési faktor-1, a növekedési hormon, a neurotropikus faktor és a kötőszöveti növekedési faktor fontos szabályozó szerepet játszanak az életkor függő betegségekben. Mindezen vizsgálatok ellenére nagyon keveset tudunk az öregedéssel összefüggő szomatosztatinerg rendszer funkcionális és expressziós változásairól, valamint a receptorok mechanizmusáról az agyban (117).

1.7. Tanulás és memória

A **tanulás** folyamata az ismeretek és készségek elsajátítását jelenti strukturált keretek között, azonban eredményeként alakulnak ki pl. szokásaink, attitűdjeink és tudásunk is. Nem minden esetben közvetlen tapasztalat, hiszen sok mindent tanulunk meg társas közegben anélkül, hogy személyes tapasztalat történt volna. Megkülönböztetünk egyszeri tapasztalat eredményeként létrejövő és hosszú, sokáig tartó, ismétlés útján történő tanulást (126,127). **Memória** a szervezet azon információ feldolgozó képessége, mely során az információ befogadása, feldolgozása (kódolás), tárolása, és végül az eltárolt információ előhívása történik. A memóriában részt vevő fő agyterületek az amigdala, a hippocampusz, a kisagy és a prefrontális kéreg (128). Három típusát különböztetjük meg: a rövid és hosszú távú, valamint a munka memóriát. A **rövid távú memória** megfeleltethető William James által 1890-ban leírt „elsődleges memóriának”, miszerint az észlelés után megmarad a tudatban és annak részét fogja képezni (129). Az információ megőrzése ez esetben rövid ideig tart, néhány másodperc vagy perc. A **munkamemória** nem sokban különbözik a rövid távú memóriától. 1960-ban Miller és munkatársai használták a kifejezést arra a memóriára, amikor az egyén megtervezi, majd végrehajtja az adott viselkedést. A folyamat során rövid ideig tárolt információval összetett feladat végrehajtására kerül sor. Az előző memória folyamatokkal ellentétben a **hosszú távú memóriának** nincs kapacitás korlátja. Lehetővé teszi, az információ tárolását hosszú időn keresztül. Atkinson és Shiffrin modellje szerint az emlékezet a rövid távú memóriából kerül a hosszú távúba (129).

1.8. *In vivo* állatkísérletek jelentősége a fájdalom és tanulás vizsgálatában, transzlációs problémák

A krónikus neuropátiás fájdalomállapotok kezelési lehetőségei korlátozottak, a jelenleg rendelkezésre álló fájdalomcsillapítók hatékonysága nem megfelelő és számos mellékhatást okoznak (44). Transzlációs állatmodellek alkalmazása elősegítheti ezen patofiziológiai mechanizmusok feltérképezését, és hozzájárulhatnak a hatékony terápiák kidolgozásához.

Alkalmazásukkal azonosíthatóak a fájdalom kialakulásában szerepet játszó szignalizációs útvonalak molekuláris mechanizmusai és funkciói, ezáltal ígéretes lehetőségeket nyújthatnak új támadáspontú vegyületek fejlesztésekor (130,131). Limitáló tényező, hogy állatmodellekben csak a nociceptív viselkedés vizsgálható, míg a fájdalom emocionális komponense nem. További kihívásokat jelent a megfelelő kísérleti állatfajok és törzsek, modellek, protokollok és vizsgálati módszertan megválasztása (130).

Állatmodellekben végezhető tanulás és memória tesztek az emberi folyamatok egyes aspektusait tükrözik, mint az epizodikus, a felismerési, a szemantikai, a térbeli és az érzelmi memóriát (132). A rágcsálókban vizsgált viselkedési és a megismerési tesztek (133–135) alkalmasak az agy öregedési folyamatának és neurodegeneratív betegségeinek, különösen a demencia mechanizmusainak feltérképezésére (72). Az egyes tesztek azonban különböző módon tükrözik az emberi agy öregedését és kognitív deficitjét (136). A legáltalánosabban használt kognitív tesztek a térbeli memória vizsgálatára alkalmas Morris vízi labirintus, többkaros útvesztő (RAM) és Y-útvesztő, valamint az új tárgy felismerési (NOR) és a félelem kondicionálására alkalmas tesztek. Mivel Alzheimer-kórban elsősorban a térbeli memória funkciók romlanak, ezen betegségre irányuló rágcsálómodellekben e funkciókat vizsgálták (132). A tanulási és memória deficit vizsgálatára alkalmas kognitív tesztek esetében figyelni kell a kísérleti állatok életkor szerinti megkülönböztetésre, valamint a nemek közti eltérésekre (137–141).

A rágcsáló teszteknek vannak limitációi, de alkalmazásuk elengedhetetlen a betegségek pontos kórleletani mechanizmusainak feltérképezésében és a gyógyszerfejlesztési folyamatokban.

2. Általános célkitűzés

PhD munkám során a következő célokat tűztük ki:

1. Az általunk korábban kidolgozott **új CRPS transzlációs egérmódel**ben a betegekből származó plazma IgG frakciók egérbe injektálása után kis talpi bemetszést követően a perifériás és központi idegrendszeri patofiziológiai mechanizmusok feltérképezése.
 - 1.1. Funkcionális változások (nocicepció, ödéma) vizsgálata
 - 1.2. Perifériás vaszkuláris és sejtgyulladásos mechanizmusok meghatározása (optikai képalkotás és citokin vizsgálatok)
 - 1.3. Központi idegrendszeri neuroinflammációs folyamatok (gliasejt aktiváció vizsgálata)
 - 1.4. A hátsó gyöki ganglionok transzkriptomikai vizsgálata
 - 1.5. Az azonosított kórélettani folyamatok validálása génhiányos egerekkel és farmakológia módszerekkel, új farmakoterápiás lehetőségek meghatározása

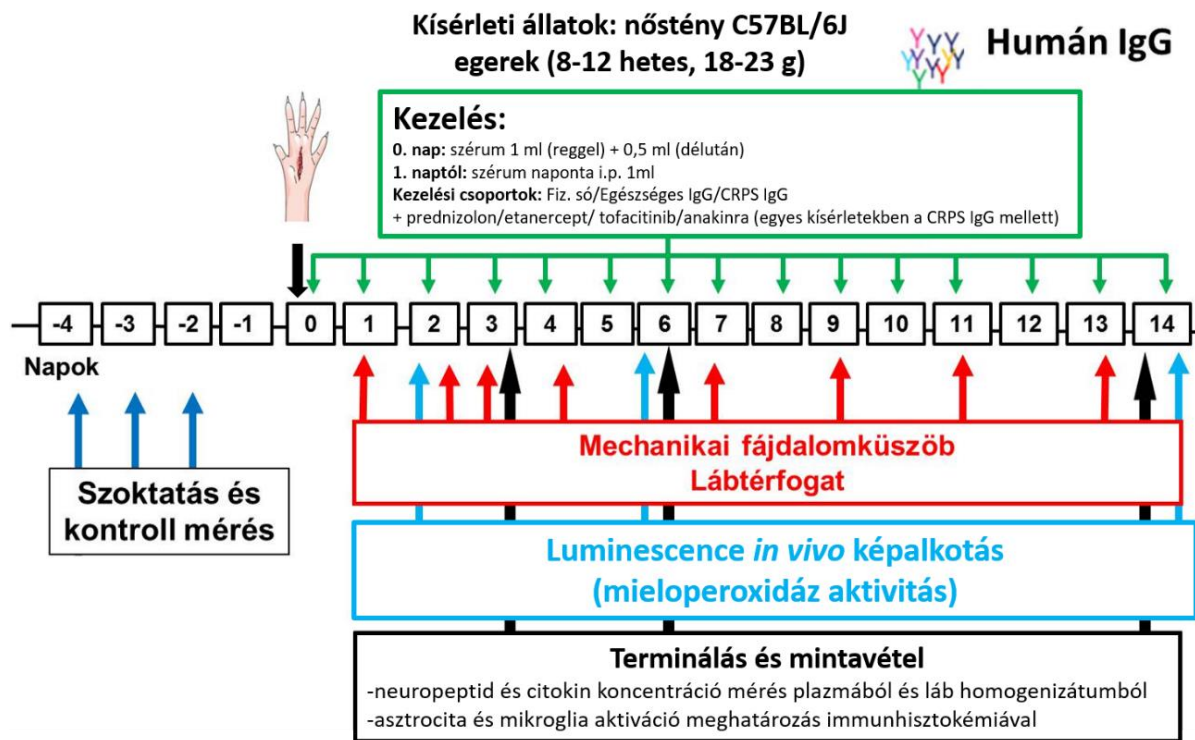
2. A munkacsoportunk kutatási középpontjában álló új fájdalomcsillapító célmolekula, a **szomatosztatin 4 receptor**, szerepének vizsgálata egérben a spontán lokomotoros aktivitásra és kognitív folyamatokra a **tanulás és memória** (új útkereső magatartás, a munka és referencia memória), valamint a felfedező tesztekben (új tárgy felismerése) különös tekintettel az öregedésre és a nemek közti különbségre.

3. Alkalmazott módszerek általános bemutatása

3.1. CRPS passzív transzfer-trauma egérmódel

3.1.1. Humán IgG injekciós protokoll

A kísérletekben az egereket naponta intraperitoneálisan (i.p.) 8 mg/ml humán IgG-vel kezeltük (142). A naponta történő adás azért szükséges, hogy az átvitt humán IgG-vel kompenzáljuk a rágcsálók gyors metabolizmusa általi veszteséget. A humán IgG-szint csökkenésének elkerülése érdekében a 0. napon 1,5 ml/egér és 1. naptól kezdve pedig 1 ml/állat humán IgG-vel kezeltük az egereket (26).



3. ábra: Kísérleti protokoll. A kísérleteinket C57BL/6J nőstény egerekkel végeztük, azonban egyes kísérletek során génhányos állatokkal is dolgoztunk, mint a mikroglia specifikus *IL-1 β* kondicionális KO és *IL-1 $\alpha\beta$* KO egerekkel. A szoktatás és kontroll mérések után a kísérlet 0. napján talpbőr-izom incíziót végeztünk az egerek jobb talpán (25,26). Az egereket minden nap i.p. kezeltük (6 egér/csoport). A 0. nap (1 ml szérum adás reggel + 0,5 ml szérum adás délután) kivételével 1 ml/nap (8 mg/ml-es humán IgG) szérum kezelést alkalmaztunk a CRPS vagy egészséges IgG-vel kezelt csoportokban. A kontroll csoport fiziológiás sóoldatot kapott. Egyes kísérletekben az IgG kezelést kiegészítettük prednizolon (4 mg/kg i.p.), IL-1 antagonistá anakinra (10 mg/kg i.p.), szolubilis tumor nekrozis faktor etanercept (5 mg/kg i.p.) vagy Janus kináz inhibitor tofacitinib (30 mg/kg *subcutan*) adásával (0,1 ml/10 g). Ezen kiegészítő kezelések az IgG adást után 4 órával történtek. Megadott kísérleti napokon mértük

a mechanikai fájdalomküszöböt dinamikus plantáris észteziométerrel, az ödéma mértékét pletizmométerrel és a MPO enzimaktivitást IVIS készülékkel. Az egerek súlyát a kísérlet alatt minden nap detektáltuk. Az utolsó nap (3, 6 vagy 14 nap) az állatokat ketamin-xilazin (100 mg / kg és 5 mg / kg i.p.) kombinációjával altattunk. Ezután a plazmákat és a lábakat folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd -80 °C-on tároltuk a későbbi neuropeptid és citokin koncentráció meghatározásig. Az egereket transzkardiálisan perfundáltuk először a szervek átmosásához szükséges 0,01 M PBS (pH 7,6), majd a fixáláshoz szükséges 4% paraformaldehid oldattal. A perfúzió után eltávolítottuk az agyat és a gerincvelőt a későbbi immunhisztokémiai vizsgálatokig (26).

3.1.2. Kísérleti állatok és etikai engedély

A tanulmány az európai jogszabályok (2010/63/EU irányelv) és a Magyar Kormányrendelet (40/2013., II. 14.) szerint készült a tudományos célokra használt állatok védelméről. A projektet a Pécsi Tudományegyetem Állatvédelmi Bizottsága, az Országos Állatkísérleti Tudományos Etikai Bizottság és a Baranya Megyei Kormányhivatal engedélyével végeztük (engedélyszám: BA02/2000-31/2016). Igyekeztünk a kísérlet elvégzéséhez szükséges legkisebb állatszámot használni, és a kísérletbe bevont állatok szenvedését minimálisra csökkenteni.

A CRPS passzív transzfer-trauma modell beállításakor is használt **C57BL/6J nőstény egerekkel** dolgoztunk (25). A CRPS gyakrabban alakul ki nőkben, ezért kísérleteinket ennek megfelelően nőstényeken végeztük (6-6 egér/csoport, 10-12 hetes, 18-25 g). Az eredeti tenyészpárokat a *Jackson Laboratories*-tól (USA) vásároltuk a *Charles River* Magyarországon keresztül. Az egereket a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és

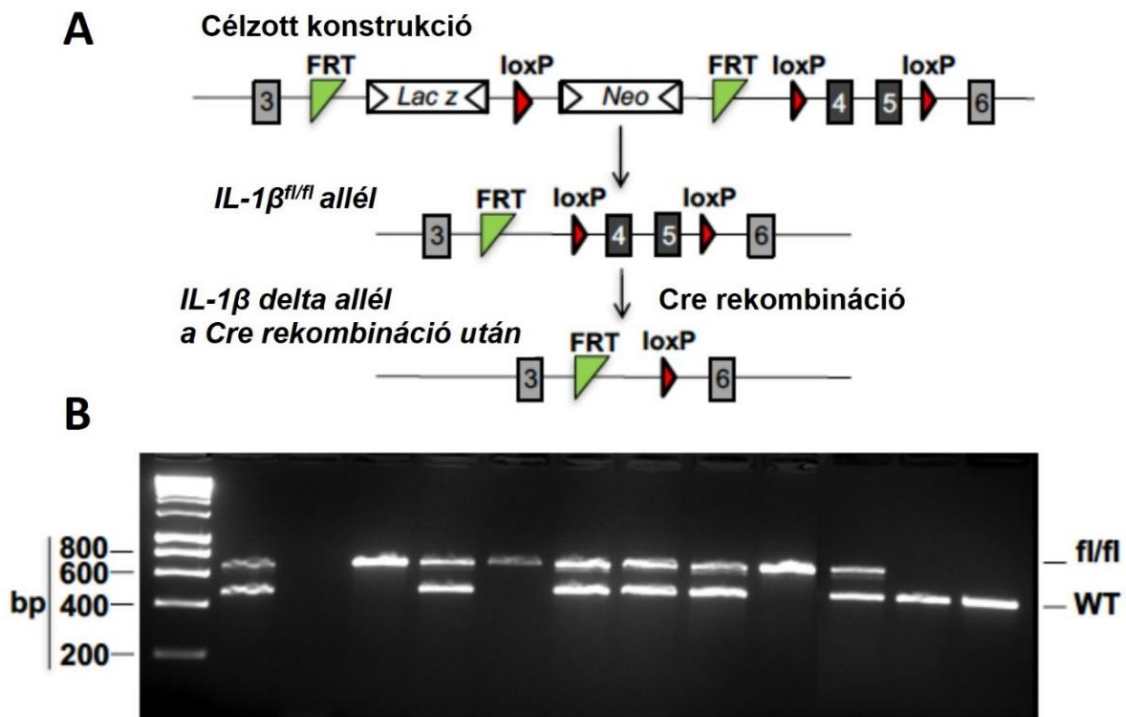


4. ábra: C57BL/6J egerek

Farmakoterápiai Intézet állatházában a szokásos körülmények között tenyésztettük és tartottuk (optimális 24-25 °C hőmérsékleten, rágcsálótáppal és vízzel *ad libitum* ellátva).

Mikroglia *IL-1 β* g \acute{e} nh \acute{a} nyos (KO) egerek

A C57BL/6J egerekkel megegyez \acute{o} kor \acute{u} és nem \acute{u} g \acute{e} nh \acute{a} nyos \acute{a} llatokat is haszn \acute{a} ltunk a k \acute{i} s \acute{e} rleteinkhez, melyeket a K \acute{i} s \acute{e} rleti Orvostudom \acute{a} nyi Kutat \acute{o} int \acute{e} zet \acute{a} llath \acute{a} z \acute{a} b \acute{a} n teny \acute{e} sztettek, majd a k \acute{i} s \acute{e} rlet alatt a P \acute{e} csi Tudom \acute{a} nyegyetem Szent \acute{a} gothai J \acute{a} nos Kutat \acute{o} k \acute{o} zpont \acute{a} llath \acute{a} z \acute{a} b \acute{a} n tartottak az optim \acute{a} lis 24-25 $^{\circ}$ C h \acute{o} m \acute{e} r \acute{s} ekleten, r \acute{a} gcs \acute{a} l \acute{o} t \acute{a} ppal \acute{e} s v \acute{i} zzel *ad libitum* ell \acute{a} tva.



5. \acute{a} bra: Mikroglia *IL-1 β* KO egerek létrehoz \acute{a} sa. A c \acute{e} lzott konstrukci \acute{o} b \acute{a} n az *IL-1 β* g \acute{e} n 4. \acute{e} s 5. exonjai loxP helyekkel hat \acute{a} roltak. Tartalmazott tov $\acute{a$ bb \acute{a} egy *LacZ* riporter g \acute{e} nt \acute{e} s egy *Neo* rezisztencia g \acute{e} nt a floxolt szakaszok el $\acute{o$ tt, amelyek a flipp \acute{a} z rekombin \acute{a} ci \acute{o} seg \acute{i} ts \acute{e} g \acute{e} vel v \acute{a} g \acute{o} dtak ki, \acute{e} s \acute{i} gy az *IL-1 β ^{fl/fl}* all \acute{e} l keletkez \acute{e} s \acute{e} t eredm \acute{e} nyezte. A mikroglia specifikus *IL-1 β* kond \acute{i} ci \acute{o} n \acute{a} lis KO egerek el \acute{o} \acute{a} ll \acute{t} as \acute{a} hoz az *IL-1 β* floxolt egereket keresztezt \acute{u} k tamoxifennel induk \acute{a} lható B6.129P2(C)-*Cx3cr1^{tm2.1(cre/ERT2)Jung/J}* egerekkel (JAX k \acute{e} szlet # 020940) (143) (A). A genotipiz \acute{a} l \acute{o} polimer \acute{a} z l \acute{a} ncreakci \acute{o} (PCR) a vad t \acute{i} p \acute{u} s \acute{u} (WT) (480 bp) \acute{e} s az *IL-1 β* floxolt all \acute{e} l (673 bp) amplifik \acute{a} ci \acute{o} j \acute{a} t mutatta (B). (Az egereket biztos $\acute{i$ totta a k \acute{i} s \acute{e} rletekhez: Dr. D \acute{e} nes \acute{A} d \acute{a} m, K \acute{i} s \acute{e} rleti Orvostudom \acute{a} nyi Kutat \acute{o} int \acute{e} zet MTA, Molekul \acute{a} ris Neuroendokrinol \acute{o} gia Kutat \acute{o} csoport, Budapest)

3.1.3. Beteg \acute{e} k \acute{e} s eg \acute{e} szs \acute{e} ges \acute{o} nk \acute{e} ntesek s \acute{z} erum k \acute{e} sz \acute{i} tm \acute{e} nye

Az angol kollabor \acute{a} ci \acute{o} s partner \acute{u} nk etikai enged \acute{e} lye nagyobb mennyis \acute{e} g \acute{u} CRPS betegs \acute{e} rum ism \acute{e} telt mintav \acute{e} tel \acute{e} re sz \acute{o} l olyan CRPS-ben szenved \acute{o} p \acute{a} ciensekt \acute{o} l, akik \acute{e} letkora (\pm 10 \acute{e} v) \acute{e} s

neme megegyezik az egészséges páciensekével (15/NW/0467, *NorthWest Ethics Haydock*, Egyesült Királyság). Kis mennyiségű szérumot gyűjtöttek össze olyan klinikai vizsgálatban részt vett betegek mintáiból (n = 7, 15/NW/0135, *NorthWest Ethics Haydock*, Egyesült Királyság), akiknek a kiindulási fájdalomintenzitásuk egy 11 pontos numerikus értékelési skálán 7/10 volt (ahol a 0 = nincs fájdalom, 10 = elviselhető legnagyobb fájdalom). A betegek írásos beleegyezésüket adták szérummintáik kutatási célokra történő felhasználásához (144). (A tisztított humán szérum IgG készítményeket biztosították munkánkhoz: Dr. Andreas Goebel és kutatócsoportja, Department of Translational Medicine, University of Liverpool and Department of Pain Medicine, The Walton Centre National Health Service Foundation Trust, United Kingdom)

3.1.4. Talpbőr-izom incízió

A CRPS-re jellemző szöveti mikrosérülés modellezésére talpbőr-izom incíziót használtuk az egereken. A módszert eredetileg patkányon alkalmazták (145), majd egerekre is adaptálták (146). A műtétet i.p. adott ketamin (*Richter Gedeon*, Magyarország, 100 mg/kg) - xilazin (*Eurovet Animal Health BV*, Hollandia, 5 mg/kg) kombinációjával történő altatás mellett végeztük a kísérlet 0. napján, majd egy 0,5 cm hosszú vágást ejtettünk az egerek jobb hátsó talpának közepén. A sebet steril 5/0 selyemfonallal zártuk le és helyileg povidon-jóddal kezeltük. A varratot az állatok nagyrésze magától kiszedte az incízió utáni napra, de ha nem, akkor mi távolítottuk el (147).

3.1.5. Funkcionális mérések

Mechanikai fájdalomküszöb mérés

A mechanikai fájdalomküszöböt dinamikus plantáris észteziométerrel (DPA - *Ugo Basile* 37400, Comerio, Olaszország) határoztuk meg az egerek hátsó lábán. A módszert módosított, elektromos von Frey-nek is nevezik (25,26). A mérés során az egereket műanyag kis dobozokba tettük,



6. ábra: Dinamikus plantáris észteziométer

mely alatt egy fém rácson (fém hálón) keresztül tompa végű tüvel növekvő erőt gyakoroltunk az egér hátsó talpára (maximális erő: 10 g, 4 másodperc alatt) (26). Bár az inger enyhe, mégis fájdalmas reakciót vált ki egerekben, melyre az állat elhárító magatartással reagál (elrántja a lábát). A jobb és bal láb mérésekor detektált értékeket tekintjük a mechanikai

fájdalomküszöbnek, melyet százalékosan fejezünk ki az alapértékhez viszonyítva. Egy hetes kísérletek alkalmával a szoktató és kontroll mérések után mértük a fájdalomküszöböt a kísérletek 1., 3., 4. és 7. napjain. A mért értékek folyamatos csökkenése hiperalgéziát mutatott.

Lábtérfogat mérése

A láb térfogatát pletizmométerrel mértük (*Ugo Basile*, 7140, Comerio, Olaszország). A készülék két függőlegesen összekapcsolt *Perspex* cellából áll, amelyeket a jelig folyadékkal töltünk fel. Az állat lábának bemerítésekor a cellához csatlakoztatott transzducer érzékeli a kiszorított folyadék mennyiségét. A digitális kijelző a láb térfogatát mutatja cm^3 -ben. Az ödéma százalékos növekedését a kontroll értékhez viszonyítva határoztuk meg (25,148). Egy hetes kísérletben a méréseket az 1., 3., 4. és 7. napokon végeztük.



7. ábra: Pletizmométer

3.1.6. *Szenzoros neuropeptidok és gyulladásos citokinek mennyiségi meghatározása szövet- és plazmamintákból*

Az egerek terminálásakor lefagyasztott lábakat felolvasztottuk, összeaprítottuk, majd homogenizáltuk *Triton X-100*-at és *Calbiochem* proteáz-gátló koktélt tartalmazó Tris-HCl pufferben $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Minden esetben $400\ \mu\text{l}$ homogenizációs puffert használtunk $50\ \text{mg}$ szövetminta tömegére a minta méretbeli különbségének normalizálása érdekében. A homogenizátumot $15000\text{--}20000\ \text{g}$ -vel 20 percig $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk, majd a felülúszót összegyűjtöttük és fagyasztva tároltuk a későbbi neuropeptid és citokin meghatározásokig.

A lábakból a CGRP- és SP-szerű immunreaktivitását érzékeny *radioimmunoassay* technikával mértük a korábban leírtak szerint (25). Az $\text{IL-1}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , $\text{TNF-}\alpha$, keratinocita (CXCL-1), monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1), granulocita- kolónia stimuláló faktor, RANTES (CCL5), interferon- γ , interleukin-4, és interleukin-10 koncentrációját egér plazmából és láb homogenizátumból multiplex mikrogyöngy mátrix [*cytometric bead array (CBA)*] technikával (*BD Biosciences*) végeztük a gyártók protokollja szerint. A mintákat *BD FACSVers*e áramlási citométerrel mértük és az *FCAP Array v3* szoftverrel (*BD Biosciences*) elemeztük az adatokat. Az összes citokin és kemokin koncentrációját pg mértékegységben fejeztük ki a milliliterkénti nedves szövet homogenizátum szerint. (A mérést végezte: Dr. Dénes Ádám és kutatócsoportja, Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet MTA, Molekuláris Neuroendokrinológia Kutatócsoport, Budapest)

3.1.7. A plazmafehérje kiáramlás és a neutrofil mieloperoxidáz aktivitás meghatározása *in vivo* optikai képalkotással (IVIS)

A CRPS IgG okozta lábduzzadás hátterében álló mechanizmusok nem ismertek, de az egyik lehetőség a fokozott plazma extravazáció. Az intravénásan injektált indocianin zöld (ICG), ami egy fluoreszcens cianin festék, kötődik a plazmafehérjékhez és az egészséges érrendszerben marad. Az ICG-t (0,5 mg/kg) frissen oldottuk Kolliphor HS 15 vizes oldatában, és intravénásan injektáltuk ketamin (100 mg/kg; *Calypsol*; *Gedeon Richter Plc*) -xilazin (10 mg/kg; *Sedaxylan*; Eurovet Animal Health BV) altatásban.

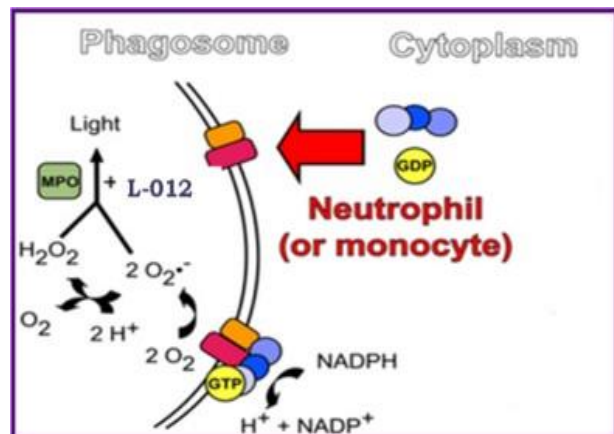
A fluoreszcenciás képalkotást 20 perccel az injekció beadása után IVIS Lumina II *in vivo* optikai képalkotó rendszerrel (PerkinElmer; autoakvizíciós idő, f/stop = 1,

binning = 2, gerjesztés: 745 nm, emissziós szűrő: > 800 nm) végeztük (149). A neutrofil mieloperoxidáz (MPO) aktivitás mérés egy *in vivo* optikai képalkotó módszer. A kemilumineszcens reakciót egy Luminol analóggal, az L-012-vel [8-amino-5-klór-7-fenil-pirido (3, 4-d) piridazin-1,4 (2H, 3H) dion - *Wako Pure Chemical Industries Ltd.*] váltottuk ki. Az MPO által a neutrofilekben és makrofágokban a reaktív oxigén és

nitrogén gyökök termelődését mértük az L-012-vel, mely a gyulladásos sejtaktivitás érzékeny markere (150). Az incízió utáni 2., 6. vagy 13. napon az egereket elaltattuk és mindkét hátsó lábukról eltávolítottuk a szőrt, hogy megakadályozzuk a fényjel szétszóródását/elnyelését. L-012-t (25 mg/kg) steril foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS, 20 mg/ml) oldottuk és injektáltuk i.p. az egerekbe. A lumineszcenciát az injekció beadása után 10 perccel mértük az IVIS Lumina II *in vivo* optikai képalkotó készülékkel (180 másodperces felvétel, F/stop = 1, binning = 8). és az adatokat *Living Image*® szoftverrel (*PerkinElmer, Waltham, USA*) értékeltük ki.



8. ábra: IVIS Lumina II *in vivo* optikai képalkotó készülék



9. ábra: Neutrofil mieloperoxidáz (MPO) aktivitás folyamatábrája

Mindkét mérési módszer esetében azonos mérési területet (ROI) alkalmaztunk hátsó lábak körül a bokáig. A fluoreszcenciát teljes sugárzási hatásként [(fotonok/s/cm²/sr)/(μW/cm²)], míg a lumineszcenciát az elemzett ROI-kból származó összesített sugárzásként (teljes foton fluxus/s) fejeztük ki. *(A mérést Kiss Tamás segítségével végeztem: Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Szentágothai János Kutatóközpont, Pécs)*

3.1.8. Immunhisztokémiai vizsgálatok

A gerincvelőt és az agyat a kísérletek utolsó napján eltávolítottuk az egerek transzkardiális perfundálása után. A mintákat még 4 órán keresztül 4%-os paraformaldehid oldatban (*Sigma*) tároltuk, majd 30%-os szacharóz (*Duchefa Biochemie*) oldatba helyeztük egy éjszakán át 4 °C-on. Ezt követően a metszeteket (30 μm) fagyasztó mikrotómmal (*Leica Biosystems Nussloch GmbH*) készítettük el. A metszeteket 0,05 M Tris pufferolt sóoldattal (pH 7,6) mostuk és inkubáltuk 0,3% H₂O₂ / metanolban (Szkarabeusz Ltd., Magyarország) 3x10 percig az endogén peroxidáz aktivitás gátlására. A mosási lépések után a mintákat primer antitestekben inkubáltuk 48 órán át 4 °C-on [gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) hígítás: 1: 1000, *Novocastra™ Leica Biosystems*; ionizált Ca-kötő adaptor molekula 1 (Iba1) hígítás: 1: 500, *Wako Chemicals GmbH*, Németország]. Az elsődleges antitestet 2 órás inkubálás után követte a szekunder antitest a *Vectastain Elite ABC HRP Kit*-szel (*Vector Labs, USA*), majd egy kromogén komplexel, a nikkell (II)-szulfát-hexahidrát/3,3'-diaminobenzidin-tetrahidrokloriddal (*Sigma-Aldrich, USA*) tettük láthatóvá azáltal, hogy a jelzett sejtekben barnás csapadékot eredményezett. A metszeteket zselatinizált tárgylemezekre helyeztük és hagytuk egy éjszakán át száradni. Ezt követően növekvő etanol-koncentrációval dehidratáltuk, majd lefedtük DPX-szel (*Sigma-Aldrich, USA*), és hagytuk újra megszáradni.

A GFAP asztrocita és Iba1 mikroglia immunpozitivitását vizsgáltuk a sejtsűrűség meghatározásával, hogy a megszámlolt sejtek számát elosztottuk a mért terület térfogatával, sejtszám/cm³-ben kifejezve a gerincvelő, valamint az agy periakveduktális szürke állomány (PAG) és szomatoszenzoros kéreg (SSC) területeiről. Csoportonként 3-4 állatból készítettünk metszeteket, melyeket a *NeuroLucida* szoftverrel, *Nikon Eclipse* mikroszkóppal értékeltük ki. *(A mérést Dr. Pohóczky Krisztina segítségével végeztem, Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Gyógyszerhatástani Tanszék, Gyógyszerésztudományi Kar, Szentágothai János Kutatóközpont, Idegtudományi Centrum, Pécs)*

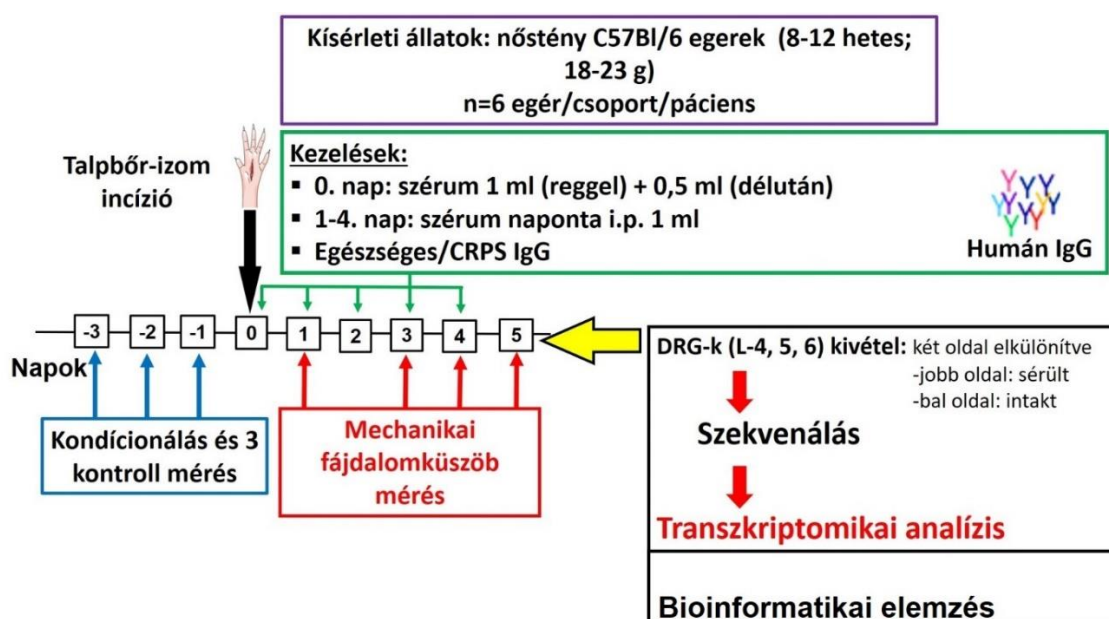
Immunfluoreszcencia

25 µm vastag agymetszeteket inkubáltunk 5% normál szamar szérummal, majd egy éjszakán át 4 °C-on az elsődleges antitestek megfelelő kombinációjával: nyúl anti-P2Y12 (hígítás: 1:500, # 55043A, *AnaSpec*), kecske anti-IL-1α (hígítás: 1: 500, # AF-400 - NA K+F) Systems) és kecske anti-IL-1β (hígítás 1:500, # AF-401-NA R&D Systems). A szemléltetéshez szamar anti-nyúl Alexa 488 és szamar anti-kecske Alexa 647 szekunder antitesteket (1: 500) használtunk. A képeket Nikon Ni-E C2 + (Nikon, Tokió, Japán) konfokális mikroszkóppal rögzítettük, és a képfeldolgozást a *NIKON NIS Elements Viewer 4.20* szoftver (*Auroscience Ltd.*, Budapest, Magyarország) segítségével hajtottuk végre. *(A mérést végezte: Dr. Dénes Ádám és kutatócsoportja, Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet MTA, Molekuláris Neuroendokrinológia Kutatócsoport, Budapest)*

3.1.9. Farmakológiai befolyásolási lehetőségek

Egyes kísérletek alkalmával az egerek egy újabb csoportja a CRPS IgG szérum mellett a gyulladás és fájdalom enyhítésére glükokortikoid kezelésként, **prednizolont** (4 mg/kg i.p.; *Prednisolonnatrium-succinaat* 25 mg, Centrafarm), IL-1 receptor antagonist **anakinrát** [10 mg/kg i.p; Svéd *Orphan Biovitrum AB*, SE-112 76], Janus kináz (JAK) inhibitor **tofacitinibet** (30 mg/kg *subcutan* T-1399 Tofacitinib, citrát só 99%, *Lc Laboratories Inc.*, *United Kingdom*) vagy szolubilis TNF receptor **etanerceptet** (5 mg/kg i.p., *Enbrel*, *Pfizer Europe, Ireland*, 10 mg por oldatos injekció) kapott.

3.1.10. Transzkriptomikai elemzéshez használt módszerek és kísérleti protokoll



10. ábra: Kísérleti protokoll. A kísérleteinket C57BL/6J nőstény egereken végeztük. A mechanikai fájdalomküszöb mérésének szoktatása és kontroll mérései után a 0. napon végeztük a talpbőr-izom incíziót az egerek jobb talpán (25, 26). Az egereket minden nap i.p. kezeltük (6 egér/csoport). A 0. nap (1 ml szérum adás reggel + 0,5 ml szérum adás délután) kivételével 1 ml/nap (8 mg/ml-es humán IgG) szérum kezelést alkalmaztunk a CRPS vagy egészséges IgG-vel kezelt csoportokban. A mechanikai fájdalomküszöb mérést az 1., 3., 4. és az 5. napon végeztük. Az IgG kezeléseket a 4. napon fejeztük be, és az egereket az 5. napon termináltuk. Izoláltuk az L4-L6 DRG mintákat és folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd az ribonukleinsav (RNS) kivonásig -80 °C-on tároltuk. Az RNS szekvenálást követően transzkriptomikai elemzést végeztünk.

RNS kivonás és minőségellenőrzés

A teljes RNS izolálását és tisztítását egy korábban leírt módszer szerint végeztük (151). Az eljárás során csak kiváló minőségű (RIN>8) RNS mintákat dolgoztunk fel a fenol-kloroform alapú TRI Reagenssel (Zymo Research, Irvine, CA, USA), amíg az RNS-t tartalmazó vizes réteget el nem értük. Majd a vizes fázist azonos térfogatú abszolút etanollal összekevertük és a Zymo-Spin™ IICR oszlopba töltöttük. Direct-zol RNA MiniPrep kitet (Zymo Research, Irvine, CA, USA) használtunk a gyártó protokolljának megfelelően, beleértve az opcionális oszlopon lévő DNase emésztést. Az RNS koncentrációkat a Qubit 3.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) alkalmazásával mértük. Az RNS minőségét a TapeStation 4200-on ellenőriztük RNA ScreenTape (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) alkalmazásával. A kiváló minőségű (RIN>8) RNS mintákat használtuk fel a könyvtár elkészítéséhez. (A kísérletes munkát végezte: Dr. Aczél Tímea, Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Pécs)

Illumina mRNS könyvtár elkészítése és szekvenálása

Az Illumina szekvenálás könyvtárát a *NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina* (NEB, Ipswich, MA, USA) segítségével készítettük el. Az mRNS-t 100 ng teljes RNS-ből izoláltuk a *NEBNext Poly (A) mRNS MAgnetic Isolation Module* (NEB, Ipswich, MA, USA) alkalmazásával. Ezt követően az mRNS-t fragmentáltuk, a végeit kezeltük és az adapterhez ligáltuk. Végül a könyvtárát a gyártó utasításainak megfelelően amplifikáltuk. A könyvtárak minőségét 4200 *TapeStation System*-en ellenőriztük *D1000 Screen Tape* segítségével, a mennyiséget *Qubit 3.0*-on mértük. A ribonukleinsav szekvenálást (RNS-szekvencia) Illumina NextSeq550 készülékkel (Illumina, San Diego, Kalifornia, USA) végeztük 1x76 futtatási konfigurációval. A nyers szekvenálási adatok az Európai Nukleotid Archívumban a PRJEB40366 csatlakozási szám alatt érhető el.

Bioinformatika

A szekvenálási eredményeket a *Mus musculus* referencia genomhoz (Ensembl GRCm38 összeillesztett szekvencia) illesztettük a STAR v2.5.3a szoftverrel (152). Ezután a szekvenálási adatokat az ismert fehérjéket kódoló génekhez illesztettük, és az egyes génekhez kapcsolódó leolvasások számát az *Rsubread v2.0.0* csomag segítségével számoltuk meg (153). A génszámadatokat normalizáltuk az *edgeR R/Bioconductor* csomag (M3,28, R v3,6,0, *Bioconductor v3.9*) M-értékeinek normalizált módszerével (154). A statisztikai teszteléshez az adatokat tovább log transzformáltuk a voom megközelítés (155) alkalmazásával a limma csomagban (156). Funkcionális elemzést végeztünk a gének annotációinak figyelembevételére érdekében a Gén Ontológia (GO) (157), a *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (158) és a *Reactome* (159) adatbázisok felhasználásával. Funkcionális változások kimutatására került sor a differenciáltan expresszált (DE) génlistában (DE lista enrichment: Fisher egzakt teszt GO-ra, valamint hipergeometriai teszt a KEGG-re és a *Reactome*-ra). Az összes DE gént rangsoroltuk a bizonyítékok alapján (rangsorolt lista enrichment: nem-parametrikus Kolmogorov-Smirnov teszt GO és KEGG esetében, hipergeometrikus teszt a *Reactome* számára) a topGO v2.37.0, *ReactomePA* v1.30.0, gage v2.36.0 csomagokat alkalmaztuk. A v1.26.0 pathview csomagot (160) használtuk, hogy az adatok alapján feltérképezzük az érintett KEGG útvonalakat. A *PathwayStudio* online programot (Elsevier B.V., Amszterdam, Hollandia) alkalmaztuk a génkészlet enrichment elemzéshez alapértelmezett beállításokkal és próba hozzáféréssel. (A mérést végezték: Dr. Gyenesei Attila, Dr. Kun József és Urbán Péter a Pécsi Tudományegyetem, Szentágotthai János Kutatóközpont, Idegtudományi Centrum Genomika és Bioinformatika Kutatócsoport tagjai, Pécs)

3.1.11. Statisztikai módszerek

A CRPS egérmodellben az adatok átlagait a standard hibákkal együtt (SEM) ábrázoltuk. A különböző kezelési csoportokba tartozó állatok mechanikai fájdalomküszöb és lábtérfogat mérése különböző időpontokban történt, melyekre Kétutas Variancia Analízis (ANOVA) Bonferroni többszörösen összehasonlító tesztet használtunk. Az *in vivo* képkalkotó vizsgálat, az immunhisztokémia mérések (asztrócita és mikroglia aktivitás), valamint a neuropeptid és citokin koncentrációk mérése során kapott értékek elemzésére- az intakt és sérült oldalakat összehasonlítva az egyes kezelési csoportokban- Egyutas ANOVA Bonferroni többszörösen összehasonlító tesztet alkalmaztunk. Az statisztikai analízissel a * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ értékek tartoztak a szignifikáns tartományba. Az statisztikai számításokat és ábrákat *GraphPad 8* statisztikai programmal készítettük.

3.2 Tanulás és memória vizsgálata

3.2.1 Kísérleti állatok és etikai engedély

A tanulmány az európai jogszabályok (2010/63 / EU irányelv) és a Magyar Kormányrendelet (40/2013., II. 14.) szerint készült a tudományos célokra használt állatok védelméről. A projektet a Pécsi Tudományegyetem Állatvédelmi Bizottsága, az Országos Állatkísérleti Tudományos Etikai Bizottság és a Baranya Megyei Kormányhivatal engedélyével végeztük (engedélyszám: BA02/2000-76/2017). Igyekeztünk a kísérlet elvégzéséhez szükséges legkisebb állatszámot használni, és a kísérletbe bevont állatok szenvedését minimálisra csökkenteni.

A tanulás és memória tesztekhez C57BL/6J alapú *Sstr4* génhíányos (*Sstr4*^{-/-}), valamint vad típusú (*Sstr4*^{+/+}) egereket használtunk. Az eredeti *Sstr4* heterozigóta (*Sstr4*^{+/-}) tenyészpárokat Prof. Dr. Pierce C. Empson kutatócsoportja (*Laboratory of Molecular Neuroscience, The Babraham Institute, Babraham Research Campus, Babraham, Cambridge CB22 3AT, Egyesült Királyság*) által állt rendelkezésünkre. Az *Sstr4*^{+/-} egerek pároztatása



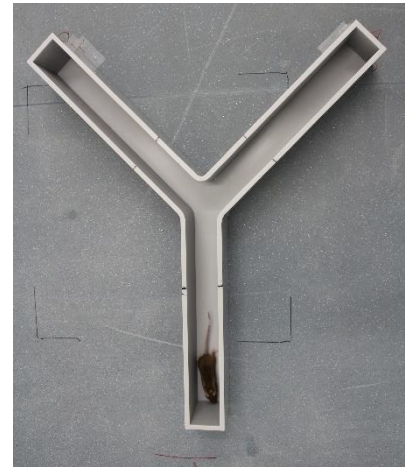
11. ábra: *Sstr4* génhíányos egerek

során az utódjaik genotípusának meghatározását PCR módszerrel végezték. A tesztekben a külön szaporított *Sstr4*^{-/-} és *Sstr4*^{+/+} egerek utódait használtuk. Hím és nőstény *Sstr4* génhíányos egereket (60,63,161) és vad típusú megfelelőiket vizsgáltuk három különböző életkorban (3, 12, 17 hónap). A kísérleti egerek tartása és gondozása a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézet állatházában történt. Az összes állat standard műanyag ketrecekben volt tartva, 24-25 °C-on, 12-12 órás világos-sötét ciklussal, és standard rágcsáló táppal és víz *ad libitum* ellátva.

3.2.2. Funkcionális tesztek

Y-útvesztő teszt (*Y-maze test*)

Az Y-útvesztő az egyszerűen elágazó labirintus tesztek közé tartozik, amely a rágcsálók **térbeli memória** és útvonal-tanulási képességeinek vizsgálatára alkalmas (162,163). Az egeret egy Y formájú, felülről nyitott karba helyeztük, melynek minden karja azonos hosszúságú (35 cm), szélességű (5 cm) és magasságú (6 cm). A mérést 5 percig végeztük az útvesztőben, melyben az állatok a rendelkezésre álló területen szabadon mozoghattak.



12. ábra: *Y-maze*

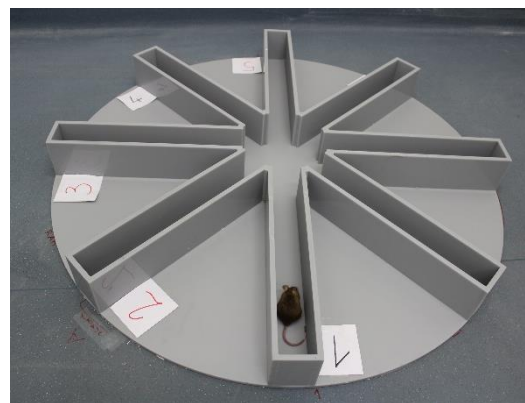
A mérés során a következő paramétereket vizsgáltuk:

1. Érintett karok száma
2. Lehetséges karkombinációk (ABC, CBA, BCA stb.) száma
3. Karkombinációk százalékos aránya:

$$\text{karkombinációk (alternációs index) \%} = \frac{n(\text{karkombinációk})}{[n(\text{összes karlátogatás} - 2)]} * 100$$

Többkaros útvesztő teszt (*Radial arm maze test - RAM*)

A RAM teszt egy 8 karos útvesztő, jól meghatározott központi régióval, mely alkalmas mind a **munkamemória**, mind a **hosszú távú (referencia) memória** vizsgálatára (164,165). Az útvesztő mindegyik karja 25 cm hosszú, 7,5 cm széles és 6 cm magas, a központi része 20 cm átmérőjű. A kísérlet során 4 meghatározott karba 4 db cukor pelletet (jutalomfalatot) helyeztünk, melyek helye a kísérlet során nem változott. A vizsgálat 4 napig tartott, a



13. ábra: *Radial arm maze*

mérési idő pedig minden nap 5 perc volt az arénában. Az első két napon az állatok kondicionálása történt, ahol első nap az egér jutalomfalat nélkül szabadon mozoghatott, míg a második naptól néhány kiválasztott karba jutalomfalatokat helyeztünk (2, 3, 5, 8-as karba). A mérést a harmadik és a negyedik napon végeztük. A vizsgálat ezeken a napokon már csak addig tartott, amíg az állat mind a 4 cukros pelletet meg nem találta vagy le nem járt a mérés idő (166). Az eredmények kiértékelése a negyedik napi mérésekből történt.

A mérés során a következő paramétereket vizsgáltuk:

1. Összes karlátogatás száma
2. Ismételt karok száma (ha az állat ugyanazon mérés alatt a már meglátogatott karba újra bement, amely jutalomfalatot tartalmazott)
3. Tévesztett karok száma (ha az állat azt a kart látogatta meg, amely nem tartalmazott jutalomfalatot)
4. Megtalált jutalomfalatok száma
5. A jutalomfalatok megtalálásához szükséges idő (az az időtartam, mely alatt az állat az összes jutalomfalatot megtalálta, vagy lejárt a mérés ideje)

Az eredmények kiértékelésénél többféle számolást végzünk:

A **munkamemória** jellemzésére az ismételt karok számát osztjuk az összes karlátogatással, majd azt szorozzuk százzal:

$$\text{munkamemória} = \frac{\text{ismételt karok száma}}{\text{összes karlátogatás}} * 100$$

A **hosszú távú memória** vizsgálatához a tévesztett karok számát osztjuk az összes karlátogatással, majd a kapott értéket százzal szorozzuk:

$$\text{referencia memória} = \frac{\text{tévesztett karok száma}}{\text{összes karlátogatás}} * 100$$

Értékeljük a jutalomfalatok megtalálásának átlagidejét, amely az állat lokomotoros aktivitását jelzi (167,168).

$$\text{jutalomfalatok megtalálásának átlagideje} = \frac{t \text{ (jutalomfalatok megtalálása)}}{n \text{ (megtalált jutalomfalat)}}$$

Új tárgy felismerési teszt (*Novel object recognition test* - NOR)

A NOR tesztet széles körben használják a **felfedező viselkedés** és azokhoz kapcsolódó emlékezési folyamatok vizsgálatára (169). A tesztet 40x40 cm alapterületű magas falú, felül nyitott dobozban (*open field* - OF) végeztük, ami 20 egyenlő részre van osztva. A kísérlet három napig tartott, melynek első napján az állatokat 5 percen keresztül szoktattuk és közben detektáltuk a spontán lokomotoros aktivitást és a szorongást (mozgással töltött, illetve a közepén és a széleken töltött idő mérésével) (63,170,171). A második napon két azonos, az egérnél kisebb tárgyat helyeztünk az *open field* dobozba, és 5 percig hagytuk, hogy az egerek megismerkedjenek a tárgyakkal. A harmadik, egyben utolsó napon (24 óra múlva) az egyik tárgyat egy másik, eltérő alakú és színű tárgyra cseréltük és az állatokat 5 percig figyeltük meg. A kísérletben vizsgáltuk, hogy az egerek mennyi időt töltenek az ismerős és az új tárgy felfedezésével és ezek arányából határoztuk meg a rekogníciós indexet (172), mely során az új

(ismeretlen) tárgy felfedezéséig eltelt időt osztjuk az új tárgy plusz a régi (ismert) tárgy felfedezéséig eltelt idővel, majd ezt szorozzuk százzal:

$$RI = \frac{t(\text{új})}{[t(\text{új}) + t(\text{régí})]} * 100$$



14. ábra: *Open field* doboz a *Novel object recognition* tesztben

3.2.3. Statisztikai módszer

Az összes kísérleti elemzést a *Noldus* számítógépes programmal végeztünk és az eredményeket az *EthoVision XT* szoftver segítségével értékeltük ki. A statisztikai kiértékelést faktoriális ANOVA Tukey HSD *post hoc* teszttel végeztük, valamint az adatok átlagait a standard hibákkal együtt (SEM) ábrázoltuk (n = 6-18 egér/csoport); * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (életkor szerint: idős és fiatal állatok); # p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001 (nemek szerint: nőstények és hímek); + p < 0,05, ++ p < 0,01, +++ p < 0,001 (genotípus szerint: KO vs. WT). A statisztikai analízist *Statistics* programmal, az ábrákat pedig *GraphPad 8* programmal készítettük.

4. Eredmények

4.1. Neuroinflammációs mechanizmusok szerepének vizsgálata a CRPS passzív transzfer-trauma egérmodelljében

A fejezet alapjául szolgáló közlemények adatai:

Transfer of complex regional pain syndrome to mice via human autoantibodies is mediated by interleukin-1-induced mechanisms

Helyes Zs, Tékus V, Szentes N, Pohóczky K, Botz B, Kiss T, Kemény Á, Környei Zs, Tóth K, Lénárt N, Ábrahám H, Pinteaux E, Francis S, Sensi S, Dénes Á, and Goebel A
PNAS (2019), 116(26)13067-13076
doi.org/10.1073/pnas.1820168116

Discovery of novel targets in a CRPS mouse model by transcriptomics: TNF and JAK - STAT pathway

Pohóczky K, Kun J, Szentes N, Aczel T, Urbán P, Gyenesei A, Bölcskei K, Szőke É, Sensi S, Dénes Á, Goebel A, Tékus V, Helyes Zs (beküldött kézirat, 2021)

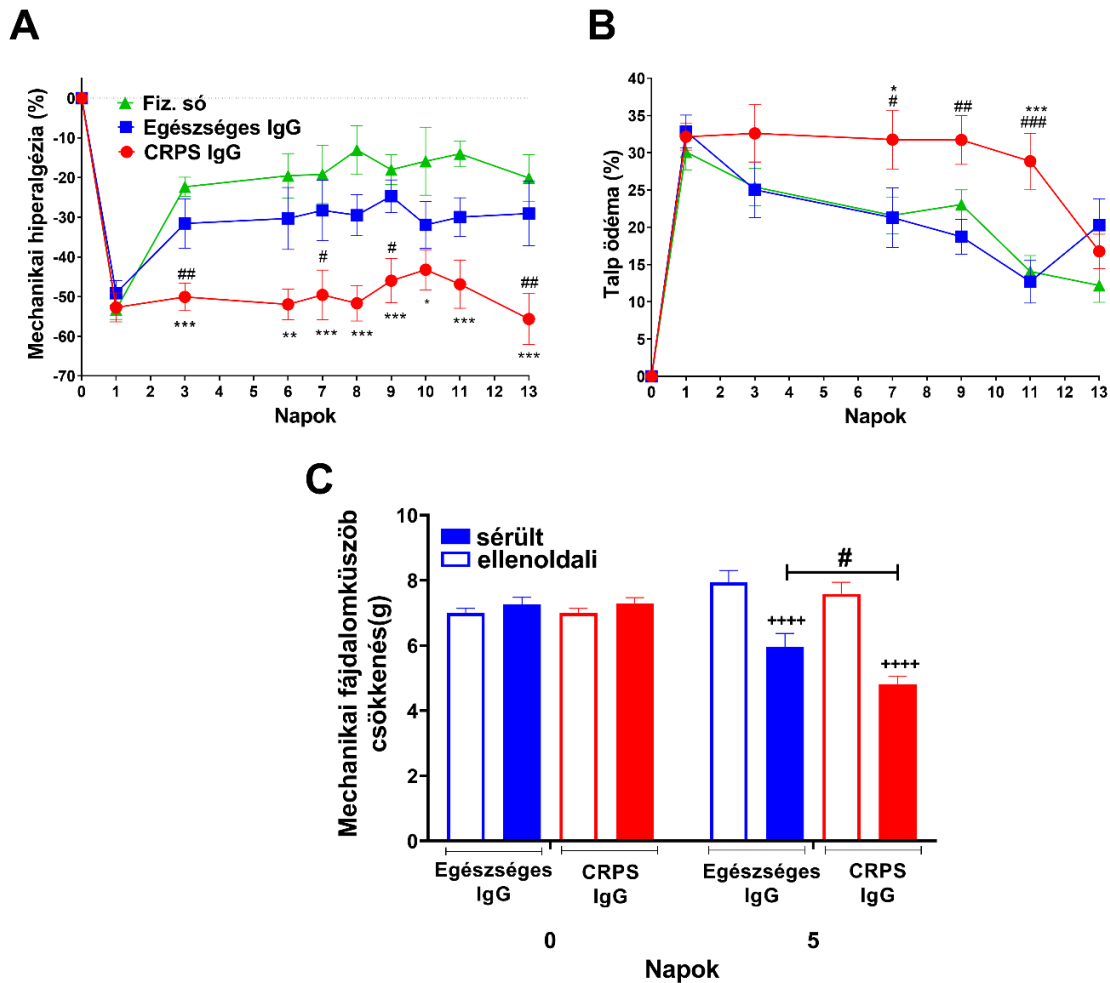
4.1.1. A CRPS IgG tartósan fennálló mechanikai hiperalgéziát okoz

A jobb lábon, az incízió előtt mért kontroll mechanonociceptív küszöbértékek nem különböztek szignifikánsan egymástól ($8,65 \pm 0,08$ fiziológiás sóoldattal, $8,69 \pm 0,09$ egészséges IgG-vel és $8,60 \pm 0,07$ CRPS IgG-vel kezelt csoportnál). A talp bemetszést követő napra 45-50%-os mechanonociceptív küszöbcsökkenés alakult ki mindhárom kezelési csoportban. A létrejövő posztoperatív fájdalom enyhe, nem szignifikáns mechanikai hiperalgézia formájában a kísérlet végéig fennmaradt a fiziológiás sóoldattal és az egészséges IgG-vel kezelt állatokban. A CRPS IgG adása megnövelte a kialakult mechanikai hiperalgézia mértékét az egészséges IgG-vel kezeltékhez képest, mely a kísérlet késői fázisában tovább fokozódott (**15/A. ábra**), korrelálva az IgG-t adó pácienseknél tapasztalt tünetekkel. A kontralaterális (intakt) lábak esetében nem volt mechanikai fájdalomküszöb-csökkenés (**Melléklet 1/A ábra**). A műtétet követő 1. napon körülbelül 30%-os térfogat növekedés alakult ki az érintett végtagon mindhárom kezelési csoportban (**15/B ábra**). A kialakult ödéma mértéke a CRPS IgG-vel kezelt csoportban a

kísérlet végéig szignifikánsan nagyobb mértékű volt, míg az egészséges IgG és a fiziológias sóoldattal kezelt csoportokban 1-2 napon belül normalizálódott **(15/B. ábra)**.

A DRG-k transzkriptomikai elemzéséhez végzett mechanikai fájdalomküszöb méréskor a sérült lábak kontroll értékei az egészséges IgG és CRPS IgG-vel kezelt egerek esetében $7,27 \pm 0,20$, illetve $7,29 \pm 0,17$ g volt. A CRPS IgG hatását vizsgálva ebben az esetben is kialakult egy 45-50%-os mechanikai fájdalomküszöb-csökkenés az incízió utáni 5. nap, míg az intakt oldalon nem volt különbség a kontroll értékekhez képest **(15/C ábra)**. A CRPS IgG napi, ismételt adása szignifikánsan fenntartotta a mechanonociceptív küszöb-csökkenést az egészséges IgG-vel kezelt csoporthoz képest ($4,81 \pm 0,23$ g vs. $5,95 \pm 0,42$ g) **(15/C ábra)**.

Az egerek súlya a műtét utáni időszakban néhány napig minimálisan csökkent a kiindulási értékhez képest, majd ezután teljesen helyreállt. A csoportok között jelentős különbségek nem voltak **(Melléklet 2. ábra)**.

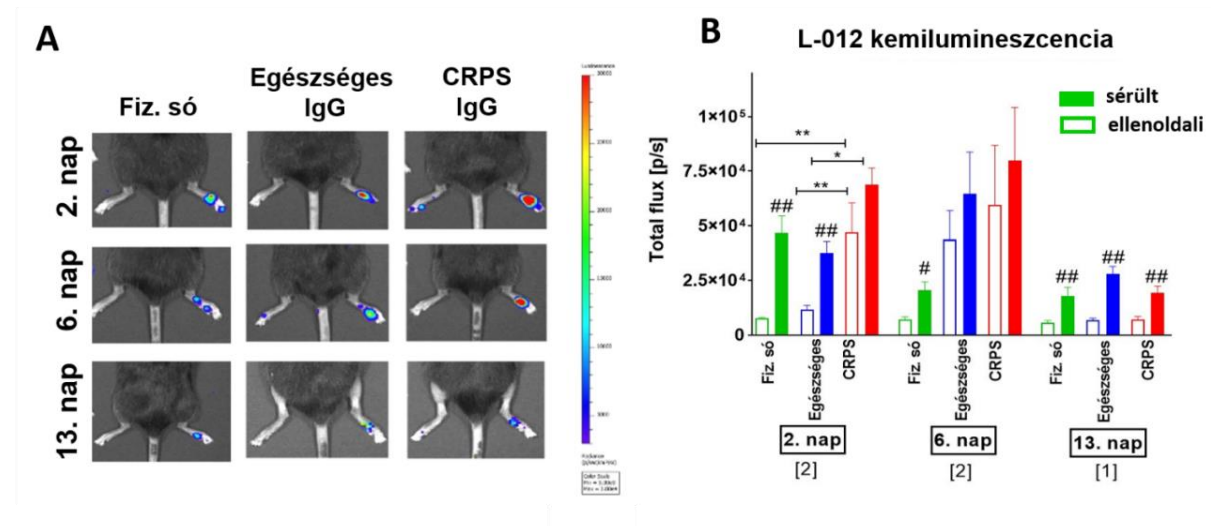


15. ábra: A CRPS betegekből és egészséges önkéntesekből származó szérum IgG i.p. injekciójának hatása az incízió okozta mechanikai hiperalgéziára (A) és az egér hátsó lábának duzzadására (B). A C ábra mutatja a DRG-k transzkriptomikai elemzéséhez mért sérült és intakt lábak mechanonociceptív küszöbértékeit a 0. és az 5. napon. Az egerek jobb hátsó talpán a 0. napon történt a bemetszés, körülbelül 6 órával az első IgG injekció adása után, majd az állatokat naponta kezeltük. Az A és B ábrák három hosszú távú kísérlet összesített eredményeit mutatják (10 vagy 13 naposak), és mindegyik különböző IgG-készítmény adásával történt (#2-4 -es páciens mintáival). A C ábra esetében egy beteg szérum IgG-készítményével (#3-as páciens mintája) végeztük a mérést ($n = 6$ egér/csoport). Kétutas ANOVA Bonferroni többszörösen összehasonlító teszt; adatok átlaga \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (CRPS IgG vs. Fiziológias sóoldat); # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (CRPS IgG vs. Egészséges IgG), ++++ $p < 0,0001$ (vs. megfelelő ellenoldal).

4.1.2. A CRPS IgG hatására a korai fázisban nő a neutrofil mieloperoxidáz aktivitás

Az ICG eredetű fluoreszcencia, mely az érrendszeri kiáramlást detektálja, nem mutatott szignifikáns növekedést az sérült láb esetében egyik csoportban sem 2 nappal a talp bemetszés után. A sérült láb esetében a CRPS IgG nem befolyásolta specifikusan a plazmafehérje extravazációt [fluoreszcencia intenzitás (fotonok/másodperc/1 cm²/szteradián)/(mikrowatt/1 cm²): fiziológias sóoldat: $1,52 \times 10^9 \pm 1,11 \times 10^8$; egészséges IgG-vel kezelt: $1,42 \times 10^9 \pm 1,54 \times 10^8$; CRPS IgG-vel kezelt: $1,70 \times 10^9 \pm 2,2 \times 10^8$].

Az L-012 kemilumineszcenciás *in vivo* képalkotás megnövekedett jelet csak a végtag trauma hatására mutatott. A neutrofil granulocita MPO aktivitás szignifikánsan megnövekedett a CRPS IgG-vel kezelt állatok esetében a sérült oldalon, 2 nappal a bemetszés után a kontroll csoporttal szemben. Az MPO aktivitás különbsége a CRPS IgG és az egészséges IgG csoport között a 6. napra megszűnt, de intakt oldalhoz képest a 13. napon is jelentős különbség volt (16/B ábra). A különböző IgG-készítmények között az MPO aktivitást illetően erős változékonyságot tapasztaltunk (Melléklet 3. ábra). A 2. vagy a 6. napon mért kemilumineszcencia nem korrelált sem a láb duzzadásának mértékével, sem a 6. napon fellépő hiperalgéziával. Az MPO aktivitás változása nem korrelált egyik funkcionális paraméter változásával sem.

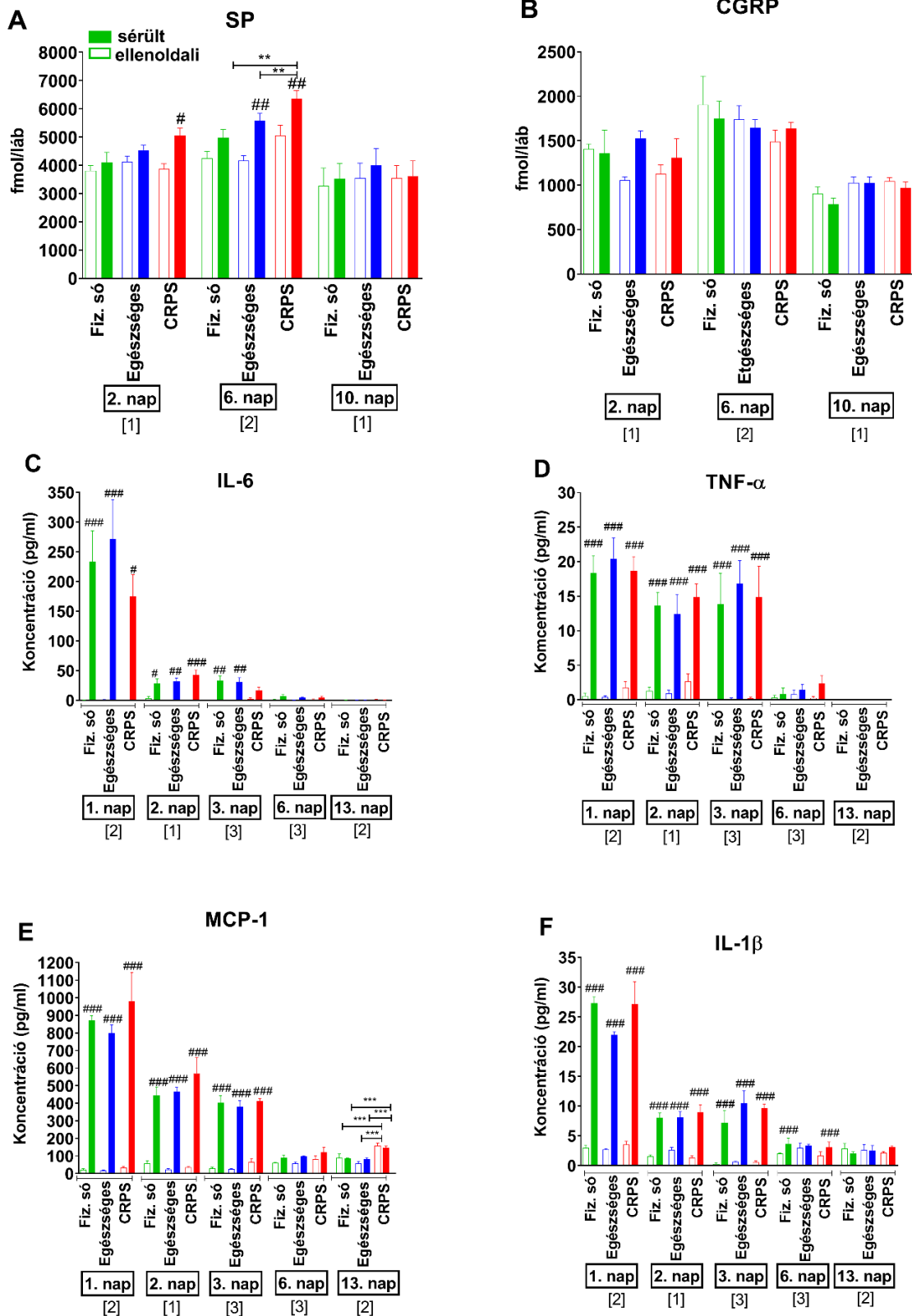


16. ábra: Az *in vivo* lumineszcens képalkotás a gyulladás kialakulását mutatja az egerek sérült hátsó talpán. Az L-012 anyag beadása után készült kemilumineszcenciás *in vivo* felvételek az egerek altatása után készültek a talpbőr-izom incíziót követő 2., 6. és 13. napon. A képeken a vörös szín erős kemilumineszcenciát jelez. A kemilumineszcencia intenzitása (A) és a mennyiségi meghatározása (B) szerepel az ábrán. A CRPS és egészséges IgG készítményekkel végzett kísérletek összesített eredményei a három időpontban (a szérum készítmények száma zárójelben van feltüntetve). Együttes ANOVA Bonferroni többszörösen összehasonlító teszt; adatok átlaga ± SEM; Egészséges (egészséges IgG-vel

kezelt csoport), CRPS (CRPS IgG-vel kezelt csoport); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (vs. megfelelő kontroll csoport); # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ (vs. megfelelő ellenoldal); $n = 6-18$ egér/csoport.

4.1.3. A CRPS IgG adása minimálisan befolyásolja a gyulladási paraméterek szintjét a láb szöveteiben

Több kísérletsorozatból (1-13 napig tartó kísérletekből) gyűjtöttük össze a hátsó lábak szöveteit különféle gyulladási változások értékelésére (állatok száma és az IgG készítmények: **Melléklet 1. táblázat**). Korábbi eredményekhez hasonlóan (25) az SP szintje nőtt a sérült lábban a 6. napon a CRPS IgG-vel kezelt csoportban (**17/A ábra**), míg a CGRP szintje nem változott szignifikánsan (**17/B ábra**). A sérült lábak esetében ugyan szignifikánsan fokozódott a gyulladási mediátorok szintje az intakt oldalhoz képest, azonban a különbség az idő előrehaladtával fokozatosan csökkent (**17/C-F ábra**). A CRPS és egészséges IgG-vel kezelt csoportok között a gyulladási mediátorok szintjeiben nem találtunk különbséget egyik időpontban sem (**17/C-F ábra**). Egyedül az MCP-1 esetében tapasztaltunk szignifikáns növekedést a CRPS IgG hatására, de csak a 13. napon (**17/E ábra**). Az incízió után 13 nappal a legtöbb mediátor már nem volt kimutatható annak ellenére, hogy a hiperalgémia mértéke ekkor volt a legmagasabb. A vérplazma mintákban nem volt szignifikáns különbség egyik citokin koncentráció szintjében sem.

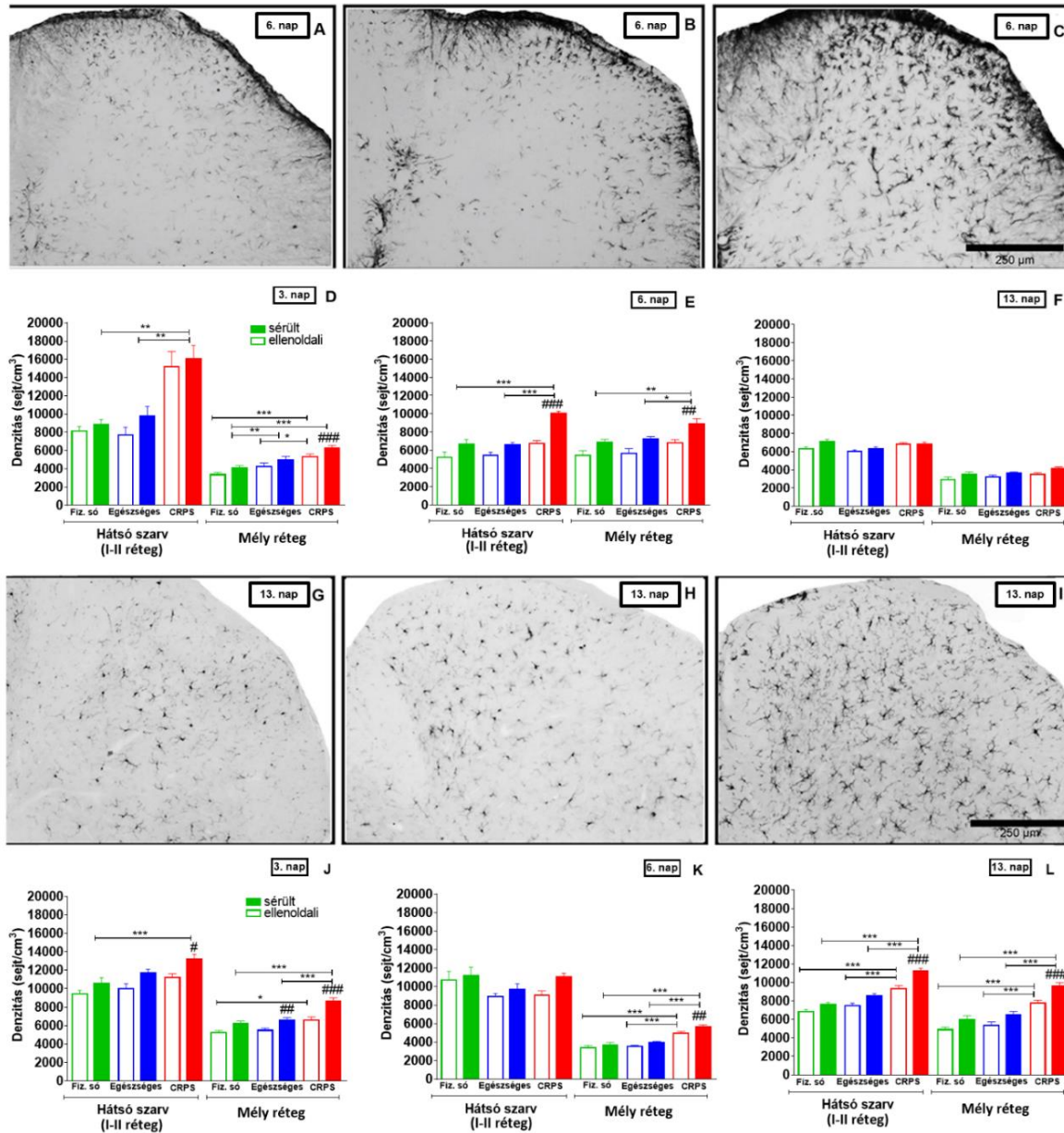


17. ábra: A humán IgG hatása a szenzoros neuropeptidek és a gyulladásos citokin koncentrációkra. A SP (A) és CGRP (B) koncentrációit *radioimmunoassay* módszerrel mértük a leölés után eltávolított hátsó láb homogenizátumokból. Az IL-6 (C), TNF- α (D), MCP-1 (E) és IL-1 β (F)

koncentrációit pedig ugyanazokból a mintákból származó multiplex mikrogyöngy mátrix technikával mértük. Az adatok 1-3 kísérletből származnak/időpont (a zárójelben vannak jelelve az x-tengely alatt a kísérletek száma), melyeket különböző IgG-készítményekkel végeztük. *Egyutas ANOVA Bonferroni többszörösen összehasonlító teszt; adatok átlaga \pm SEM; Egészséges (egészséges IgG-vel kezelt csoport), CRPS (CRPS IgG-vel kezelt csoport); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$ (vs. megfelelő kontroll csoport); # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (vs. megfelelő ellenoldal).*

4.1.4. A CRPS IgG fokozza a mikroglia aktivációt a központi idegrendszerben

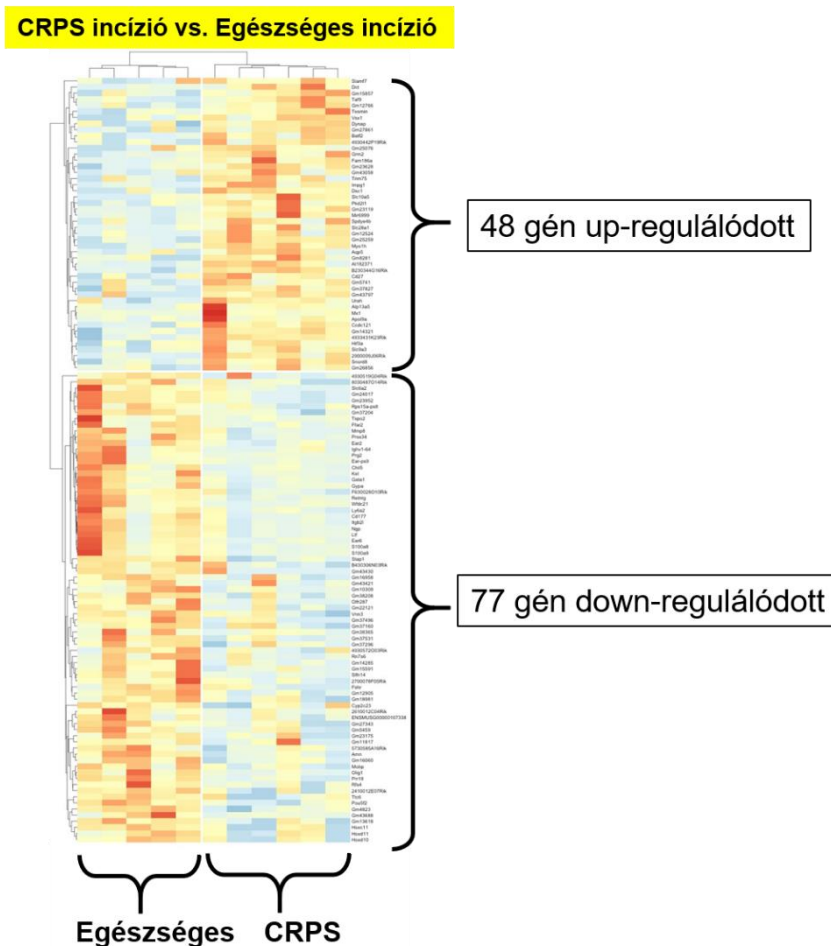
A CRPS IgG-vel kezelt csoportban szignifikáns növekedést tapasztaltunk, mind az asztrocita, mind a mikroglia aktivált sejtek számában a fiziológias sóoldattal és az egészséges IgG-vel kezelt csoportokhoz képest a gerincvelő hátsó szarvában. Az asztrociták száma a korai időszakban (3. és 6. nap), míg a mikroglia sejtszám pedig az egész kísérleti idő alatt (13. napig) fokozódott (**18. ábra**). A modellben tehát átmeneti asztrocita és tartós mikroglia aktivációt figyeltünk meg.



18. ábra: A gliasejt aktiváció L4-L6 gerincvelő hátsó szarvában. GFAP immunpozitivitást jelző asztrocitákat (A - C), és Iba1 immunpozitivitást jelző mikroglia sejteket (G - I) mutatják az ábrák a fizioológias sóoldattal (A, G), az egészséges IgG-vel (B, H) és a CRPS IgG-vel (C, I) kezelt csoportokban. Az ábrákon a GFAP immunpozitivitást az incízió utáni 6. napon, az Iba1 immunpozitivitást pedig a 13. napon mutatjuk be. Az asztrocita (D - F) és a mikroglia reaktivitás (J - L) mennyiségi meghatározása a gerincvelő L4-L6 hátsó szarvában (I-II réteg) és a mélyebb rétegekben a bemetszés utáni 3, 6 és 13 nap. Mindegyik ábra összesített eredményeket mutat két kísérletből és két különböző IgG mintával (#3, #4). Együttes ANOVA Bonferroni többszörösen összehasonlító teszt; adatok átlaga ± SEM; Egészséges (egészséges IgG-vel kezelt csoport), CRPS (CRPS IgG-vel kezelt csoport); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (vs. megfelelő kontroll csoport); # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (vs. megfelelő ellenoldal); $n = 6-7$ egér/csoport.

4.1.5. Neuroinflammációval kapcsolatos génexpressziós változások CRPS IgG-vel kezelt egerekben egészséges IgG kezeléshez viszonyítva

A hőtérkép 125 DE gén csoportosulását mutatja a CRPS és egészséges IgG-vel kezelt egerek sérült oldali DRG mintáit összehasonlítva. Az egészséges és CRPS IgG-vel kezelt minták a két csoportnak megfelelően, jól elkülönülten csoportosultak. 48 gén up-regulálódott és 77 gén down-regulálódott a CRPS IgG-vel kezelt DRG-mintákban (**19. ábra**).



19. ábra: A differenciálisan expresszált gének hőtérkép ábrázolása a DRG mintákban. A mintákat 5 nappal a talpbőr-izom incízió után vettük a CRPS IgG-vel vagy egészséges IgG-vel kezelt egerekből. Az ábrán a sorok a géneket, az oszlopok pedig az egyes állatokból vett DRG mintákat mutatják ($n = 5-6$ egér/csoport).

A 125 szignifikáns DE gén közül kiválasztottunk 12 up- és 12 down-regulálódott gént a p-érték alapján, melyek szerepet játszhatnak a CRPS-ben, valamint meghatároztuk ezen gének által kódolt fehérjék sejten belüli lokalizációját és potenciális funkcióit (**1. táblázat**).

A. Up-regulálódott										
Avg rank	FC	P érték	Leírás	Gén	Funkció		Elhelyezkedés			
					Gyulladásos válasz	Szignál transzdukció	Plazma membrán	Extracelluláris mátrix	Sejtmag	Citoplazma
10	4.34	0.0099	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 1	Slc28a1			+			
17	3.96	0.0107	desmocollin 1	Dsc1			+			
27	3.01	0.0087	expressed sequence AI182371	AI182371	+			+		
29	3.01	0.0092	glutamate receptor, metabotropic 2	Grm2		+	+			
70	2.87	0.0358	tripartite motif-containing 75	Trim75	+					
73	2.57	0.0166	polycystic kidney disease 2-like1	Pkd211		+	+			
88	2.49	0.0251	SLAM family member 7	Slamf7	+		+			
94	2.33	0.0146	TATA-box binding protein associated factor 9	Taf9		+			+	
96	2.46	0.0316	visual system homeobox 1	Vsx1		+			+	
119	2.28	0.0250	CD27 antigen	Cd27	+	+	+			
185	2.17	0.0491	interphotoreceptor matrix proteoglycan 1	Impg1				+		
251	2.01	0.0453	ATPase type 13A5	Atp13a5		+	+			
B. Down-regulálódott										
1	0.13	0.0094	homeobox C11	Hoxc11					+	+
5	0.23	0.0048	olfactory receptor 287	Olf287		+	+			
20	0.26	0.0139	oligodendrocyte transcription factor 1	Olig1		+			+	
22	0.27	0.0160	myelin-associated oligodendrocytic basic protein	Mobp						+
32	0.31	0.0225	WAP four-disulfide core domain 21	Wfdc21	+			+		
33	0.30	0.0235	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100a8	+	+	+	+		+
37	0.25	0.0370	homeobox D10	Hoxd10					+	+
41	0.28	0.0330	integrin beta 2-like	Itgb2l	+	+	+			
43	0.34	0.0149	resistin like gamma	Retnlg		+	+			
48	0.35	0.0172	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin),	Slc6a2			+			
58	0.32	0.0348	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	S100a9	+	+				
147	0.47	0.0085	signal transducing adaptor family member 1	Stap1		+			+	+

1. táblázat: Tizenkét kiválasztott up-regulálódott (A) és tizenkét kiválasztott down-regulálódott gén (B) az egér DRG mintákból, 5 nappal a talpbőr-izom incízió után. A DE gének a „fold change”: (FC) érték és a p-értékek átlaga alapján történő rangsorolása, a sejtek lokalizációjával és a társított GO adatbázis alapján a megjelölt gének potenciális funkcióival.

4.1.6. A CRPS-ben szerepet játszó lehetséges főbb mechanizmusok a DE gének alapján

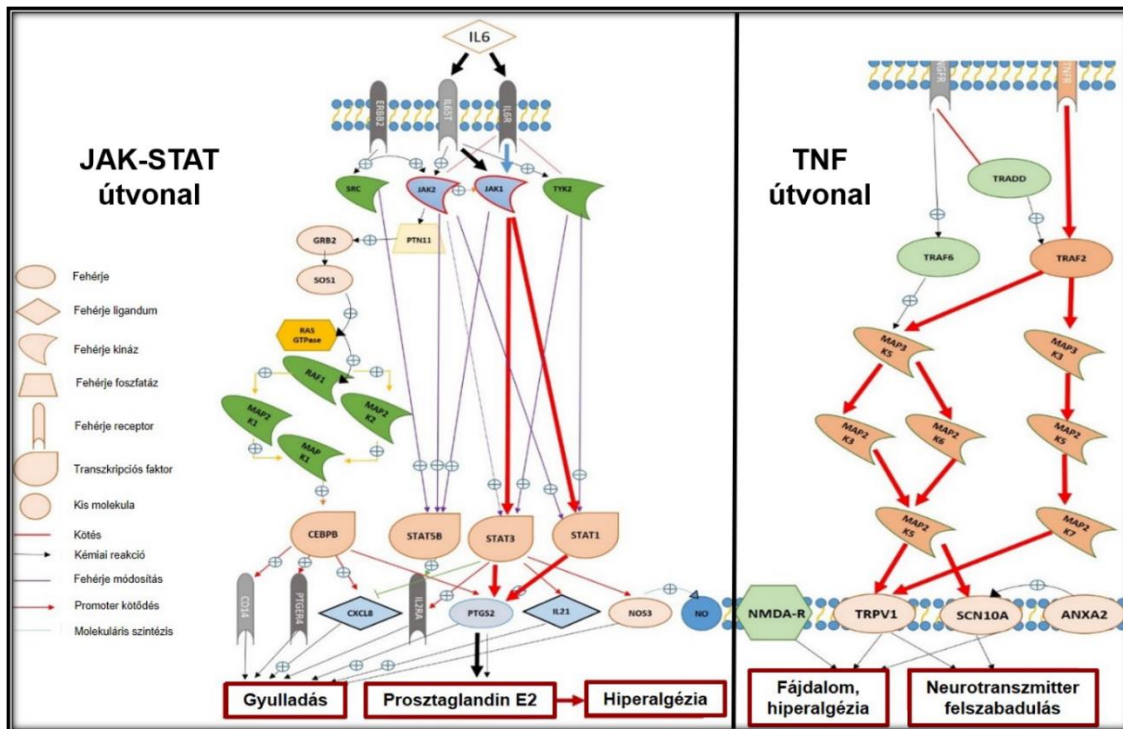
A *Ranked list enrichment/KEGG* adatbázis magába foglalta többek között a citokin-citokin receptor kölcsönhatást, a GO adatbázis pedig a citokin aktivitást, a neuropeptid receptor és a feszültség függő csatorna aktivitást, valamint a leukocita kemotaxis, és még sok más folyamatot. A DE gének listája/GO adatbázisba a peptidáz szabályozás és a gyulladáshoz vezető válasz pozitív szabályozása is a feltételezett mechanizmusok között volt (**2. táblázat**).

KEGG ID	Ranked list enrichment /KEGG	Annotált	P érték
04060	citokin-citokin receptor kölcsönhatás	182	5.80E-04
04020	kalcium jelátvitel	166	9.94E-03
GO.ID	Ranked list enrichment/ Gén ontológia	Annotált	P érték
	Molekuláris funkció		
0005125	citokin aktivitás	131	3.05E-11
0001653	peptid receptor aktivitás	117	2.93E-10
0005201	extracelluláris mátrix szerkezeti alkotóeleme	130	7.13E-06
0030414	peptidáz inhibitor	134	7.55E-05
0008188	neuropeptid receptor aktivitás	35	1.31E-04
0004896	citokin receptor aktivitás	83	3.29E-04
0022832	feszültség-függő csatorna aktivitás	181	3.29E-04
	Biológiai folyamat		
0035456	interferon-béta válasz	52	5.35E-06
0002819	adaptív immunválasz szabályozása	170	1.92E-05
0007218	neuropeptid jelátvitel	57	2.57E-05
0006959	humorális immunitás	113	5.36E-05
0046631	alfa-béta T-sejt aktiváció	144	8.50E-05
0030595	leukocita kemotaxis	187	8.96E-05
GO.ID	DE list enrichment / Gén ontológia	Annotált / Szignifikáns	P érték
	Molekuláris funkció		
0061134	peptidáz szabályozás	164/4	4.91E-03
0004540	ribonukleáz aktivitás	95/3	7.35E-03
0038023	receptor jelátvitel	818/8	2.02E-02
0001067	szabályozó régió nukleinsavkötése	848/8	2.45E-02
0004857	enzim gátlás	295/4	3.49E-02
	Biológiai folyamat		
0050729	gyulladáshoz vezető válasz pozitív szabályozása	120/5	1.00E-04
0006952	védelmi válasz	1194/13	5.80E-04
0002376	immunfolyamatok	2032/15	9.94E-03
0050900	leukocita migráció	306/6	1.20E-03
0002274	leukocita aktiváció	192/4	6.66E-03

2. táblázat: A DE gének által befolyásolt funkciók a *Ranked/DE list enrichment* analízisek alapján.
KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, GO: Gén Ontológia, ID: *identifier of the respective functional term* (azonosító), Annotált: annotált detektált gének száma, Annotált/Szignifikáns: szignifikáns DE gének száma.

4.1.7. A CRPS IgG neuroinflammációs változásokat idéz elő a DRG-ben, amelyben a TNF és a JAK-STAT jelátvitel aktiválása kulcsszerepet játszik

A transzkriptomikai vizsgálatban a TNF és a Janus kináz-szignál transzducer és transzkripció aktivátor (JAK-STAT) jelátviteli útvonalakat azonosítottuk génexpressziós szinten CRPS IgG-vel kezelt egércsoport DRG mintáit összehasonlítva az egészséges IgG-vel kezeltékével. A TNF géntermék aktiválja a TNFRSF1B-t, mely up-regulálja a mitogén által aktivált protein-kináz kaszkádokat neurotranszmitter felszabadulást, fájdalomreakciót és hiperalgéziát eredményezve. Az IL-6-JAK1/2 szignál transzducer és transzkripció aktivátor 3 (STAT3) jelátviteli út érintett volt. Aktiválódnak az IL-6 és az IL6ST receptork, továbbá pozitívan szabályozza a JAK1/2, tirozin-kináz 2 (TYK2) és SRC Proto-Onkogén (SRC) géneket, amelyek STAT3/1/5B aktivációt eredményeztek. Ezen citokin jelátviteli kaszkádok során a prosztaglandin E2 felszabadulása gyulladást és hiperalgéziát vált ki (**20. ábra**).

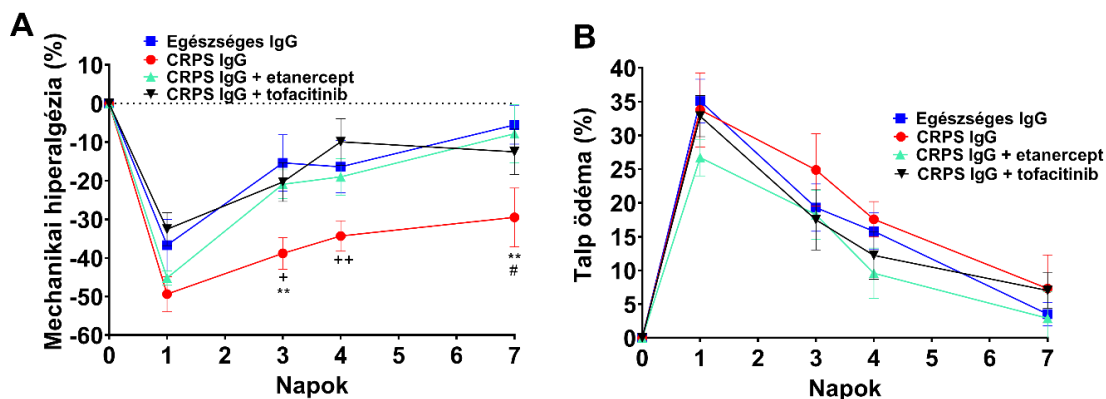


20. ábra: JAK-STAT (A) és TNF (B) citokin jelátviteli kaszkád interakciós hálózata a hátsó gyöki ganglionok transzkriptomikai elemzése során. IL6: Interleukin-6; ERBB2: Erb-B2 receptor tirozin-kináz 2; IL65T: Interleukin-65T, IL6R: Interleukin-6 receptor; SRC: SRC proto-onkogén, nem-receptor-tirozin-kináz; JAK1/2: Janus kináz 1/2; TYK2: Tirozin-kináz 2; PTN11: Fehérje-tirozin-foszfatáz 11. típusú nem-receptor; GRB2: Növekedési faktor receptorral kötött fehérje 2; SOS: SOS Ras/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor 1; RAS: Patkány szarkóma (géncsalád); RAF1: Raf-1 proto-onkogén, szerin/reonin kináz; MAPK: Mitogénnel aktivált protein-kináz (géncsalád); CEBPB: CCAAT Enhancer Binding Protein Beta; STAT: Szignál transzducer és transzkripció aktivátor (géncsalád); PTGER4: Prostaglandin E receptor 4; CXCL8: C-X-C motívum kemokin-ligandum 8; IL2RA: Interleukin 2 receptor alfa alegység; PTGS2: Prostaglandin-endoperoxid-szintáz 2; IL21: Interleukin 21; NOS3: Nitrogén-oxid-szintáz 3; TNF: Tumor nekrozis faktor; NGFR: Idegnövekedési faktor receptor; TNFRSF1B: TNF receptor szupercsalád tag 1B; TRADD: TNFRSF1A Associated Via Death Domain; TAF: TNF-receptor-asszociált faktor (géncsalád); NMDA-R: Glutamát-ionotróp receptor NMDA-típus (géncsalád); TRPV1: Tranziens receptor potenciál vanilloid 1; SCN10A: Nátrium csatorna fehérje 10 alfa alegységgel; ANXA2: Annexin A2 (módosítva az eredeti *Pathway Studio*™ elemzéssel).

4.1.8. A TNF és JAK szignalizáció gátlása csökkenti a CRPS IgG-vel kiváltott mechanikai hiperalgémia-fokozódást

Az érintett végtag átlagos mechanonociceptív kontroll értékei: az egészséges IgG csoportban $8,84 \pm 0,11$ g, a CRPS IgG csoportban $8,64 \pm 0,24$ g, a CRPS + etanercept csoportban $8,41 \pm 0,24$ g és a CRPS + tofacitinib $8,14 \pm 0,28$ g volt (**21/A ábra**). Minden csoportban 37-49% relatív mechanikai fájdalomküszöb-csökkenést tapasztaltunk 1 nappal a talpbőr-izom incízió után. A kialakuló mechanikai hiperalgémia $49,38 \pm 6,67\%$ volt a CRPS IgG-vel kezelt csoportban, ami nagyrészt a kísérlet végéig fennmaradt. Az egészséges IgG-vel injektált egereknél szignifikánsan alacsonyabb volt a mechanonociceptív küszöbérték-csökkenés összehasonlítva a CRPS IgG kezelt egerekkel ($15,39 \pm 7,31\%$ vs. $38,81 \pm 4,08\%$ a kísérlet 3. napján; $5,55 \pm 4,99\%$ vs. $29,49 \pm 7,50\%$ a kísérlet 7. napján). A tofacitinib napi adása szignifikánsan enyhítette a kialakuló mechanikai hiperalgémiát a 3. naptól kezdve a CRPS IgG-vel kezelt csoporthoz képest ($20,30 \pm 5,03\%$ vs. $38,81 \pm 4,08\%$ a kísérlet 3. napján; $9,92 \pm 6,02\%$ vs. $34,31 \pm 3,93\%$ a kísérlet 4. napján). Az egerek egy csoportja a CRPS IgG mellett naponta etanercept kezelésben is részesült, melynek hatására csökkent az érintett végtagok mechanikai fájdalomküszöb értéke, azonban ez a csökkenés csak a 7. napon volt szignifikáns a CRPS IgG-vel kezelt csoporthoz képest ($7,81 \pm 7,50\%$ vs. $29,49 \pm 7,50\%$).

Az incízió utáni napra 27-35%-os lábduzzadás alakult ki az érintett hátsó végtagon mindegyik csoport esetében, mely a kísérlet végére normalizálódott. A mechanikai hiperalgémiával ellentétben, a CRPS IgG kezelés nem befolyásolta az ödéma mértékét tekintve, hogy a mintát szolgáltató CRPS-ben szenvedő betegnél a mintavétel idején nem állt fent végtag duzzadás (**21/B ábra**).

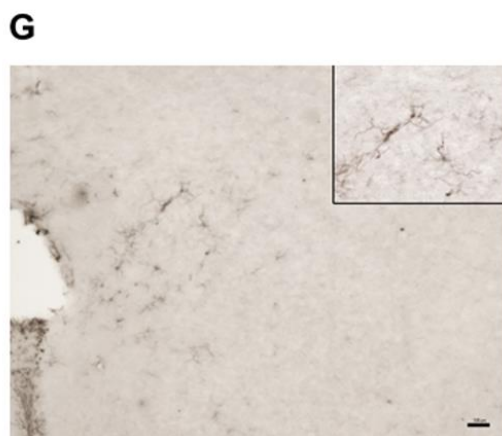
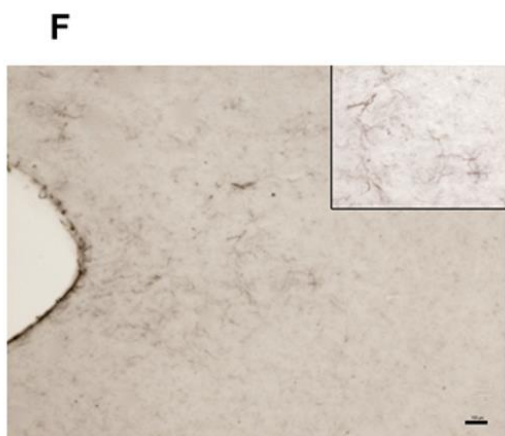
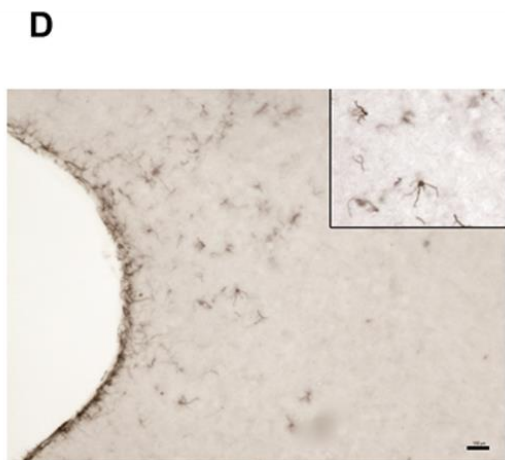
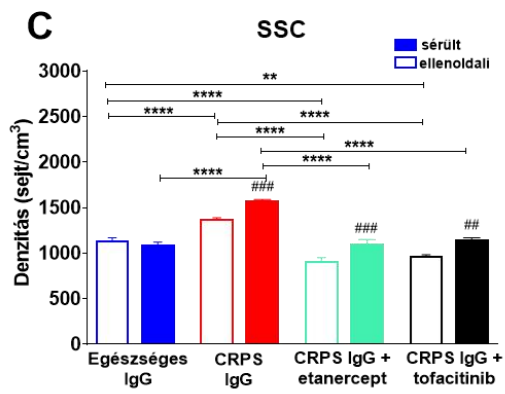
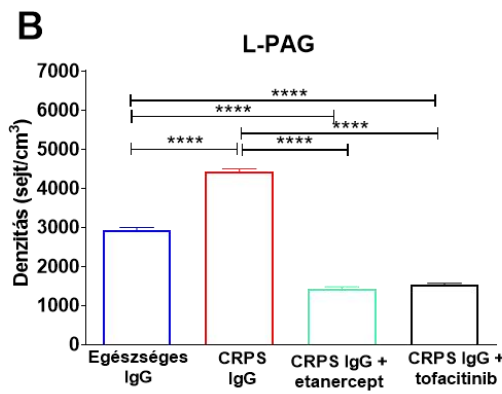
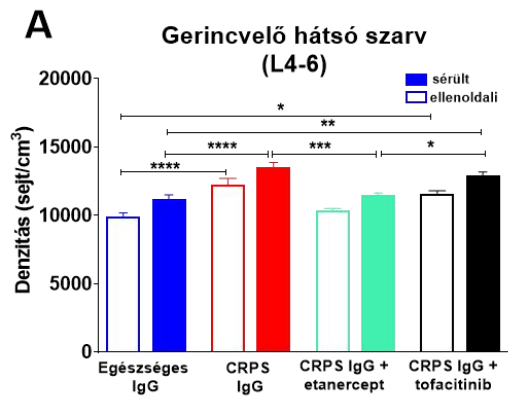


21. ábra: Az etanercept vagy tofacitinib kezelés hatása a mechanikai hiperalgémia (A) és lábduzzadásra (B). CRPS vagy egészséges humán IgG-t naponta i.p. adtunk az egereknek. CRPS IgG mellett naponta etanercepttel (5 mg/kg i.p.) kezeltük az egereket, vagy tofacitinibbel (30 mg/kg

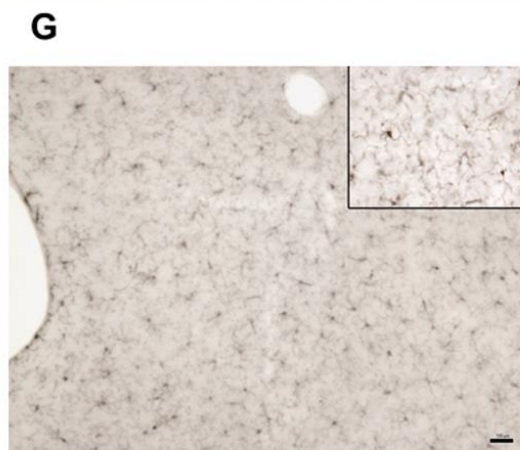
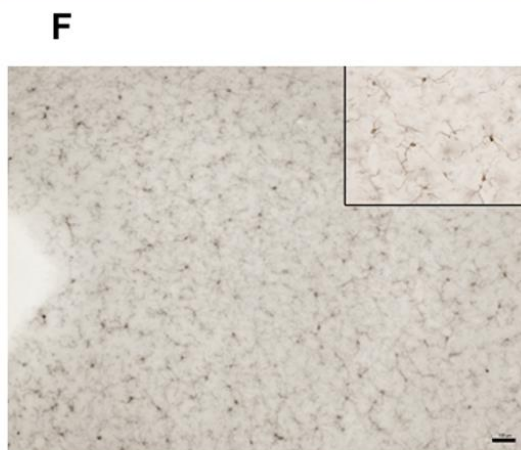
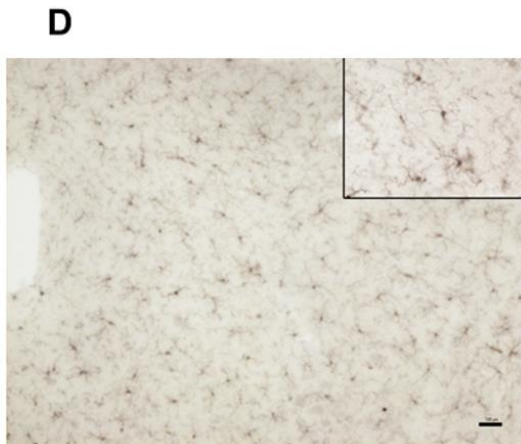
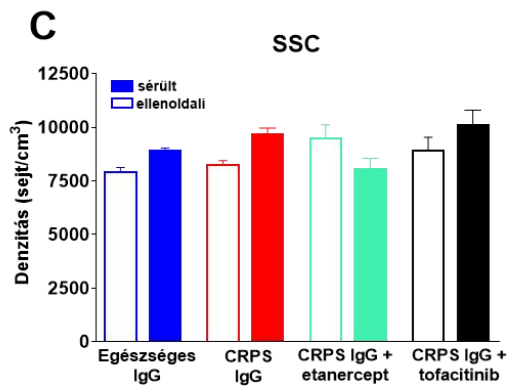
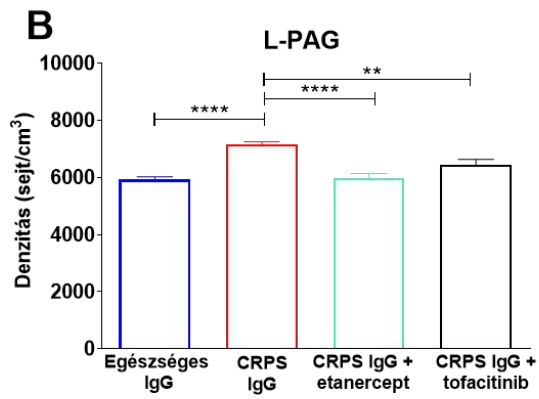
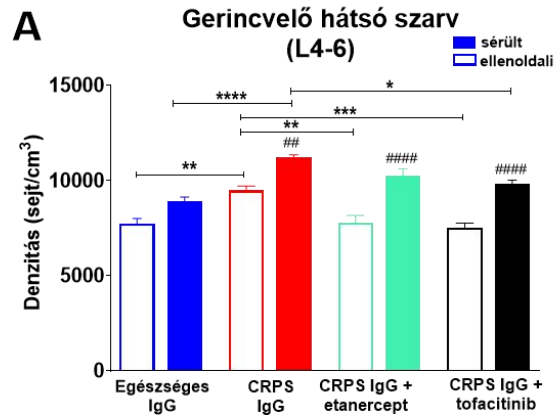
subcutan) naponta kétszer az egész kísérleti periódus alatt. *Kétutas ANOVA Bonferroni többszörösen összehasonlító teszt; adatok átlaga ± SEM; ** $p < 0,01$ (CRPS IgG vs. Egészséges IgG); # $p < 0,05$ (CRPS IgG vs. CRPS IgG + etanercept); + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ (CRPS IgG vs. CRPS IgG + tofacitinib); $n = 6$ egér/csoport.*

4.1.9. A TNF és a JAK szignalizáció gátlása csökkenti a CRPS IgG által kiváltott neuroinflammációt a fájdalommal kapcsolatos központi idegrendszeri területeken

A GFAP immunaktivitás szignifikánsan emelkedett a gerincvelő hátsó szarvában, a PAG-ban és az SSC-ben a CRPS IgG-vel kezelt csoportban az egészséges IgG-vel kezelt állatokhoz képest 7 nappal a sérülés után. Ez az emelkedés a gerincvelő hátsó szarvában csökkent az etanercept kezelés hatására, míg a tofacitinib kezelés nem befolyásolta a GFAP pozitív sejtek számát (**22/A ábra**). A PAG-ban és az SSC-ben is csökkent sejtszámot figyeltünk meg az etanercept és a tofacitinib kezelés hatására. Az SSC-ben a GFAP pozitivitás szignifikánsan magasabb volt a sérült oldalon (**22/B, C ábra**). Az Iba1 fehérje expressziójának növekedését detektáltuk a CRPS-el kezelt állatok esetében a gerincvelő hátsó szarvában, melyben az etanercept kezelés enyhe csökkenést eredményezett. A tofacitinib azonban szignifikánsan csökkentette az Iba1 fehérje expressziót mind a gerincvelő sérült, mind kontralaterális oldalon (**23/A ábra**). A PAG-ban a CRPS IgG hatására megnövekedett Iba1 immunpozitivitást az etanercept és tofacitinib is sikeresen enyhítette. Az SSC-ben csak kismértékű volt az Iba1 immunreaktivitás növekedés a CRPS IgG kezelt csoportban és sem az etanercept, sem a tofacitinib nem volt képes csökkenteni az immunpozitivitást (**23/B, C ábra**).



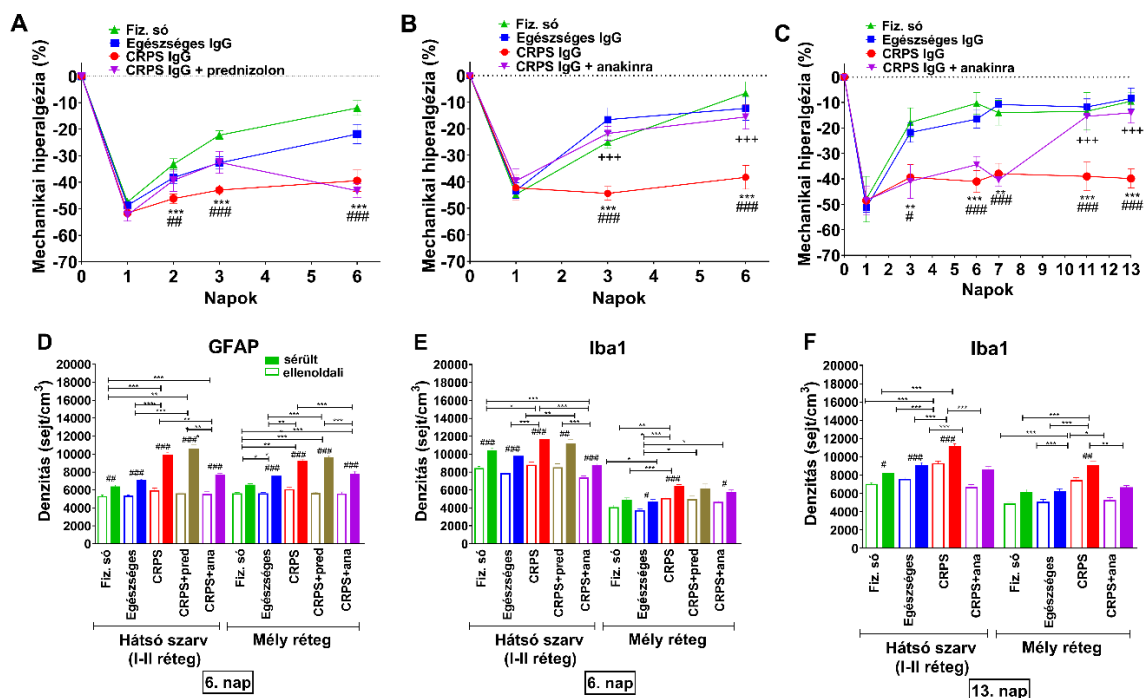
22. ábra: A GFAP immunpozítív asztrociták mennyiségi meghatározása (A - C) és a reprezentatív mikroszkópos felvételei (D - G). Az ábrák a GFAP denzitását mutatják (A - C) az L4-L6 gerincvelő hátsó szarvának I-II lamelláiban (A), a laterális periakveduktális szürkeállományban (L-PAG) (B) és az SSC-ben (C) az incízió utáni 7. napon. *Egyutas ANOVA Bonferroni többszörösen összehasonlító teszt; adatok átlaga ± SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (vs. megfelelő kontroll csoport); # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (vs. megfelelő ellenoldal); $n = 6-7$ egér/csoport.* Reprezentatív képek: egészséges IgG-vel (D), CRPS IgG-vel (E), CRPS IgG + etanercepttel (F) és CRPS IgG + tofacitinibbel kezelt egerek (G) GFAP immunpozítív asztrocitái az L-PAG-ban. A skálásávkok 100 μm -t jelentenek, a nagyítások 10-szeresek a főábrákon és 20-szorosak az inset-ekben.



23. ábra: Az Iba1 immunpozitív mikroglia mennyiségi meghatározása (A - C) és reprezentatív mikroszkópos felvételei (D - G). Az ábrák az Iba1 denzitását mutatják (A - C) az L4-L6 gerincvelő hátsó szarvának I-II lamelláiban (A), az L-PAG-ban (B) és az SSC-ben (C) az incízió utáni 7. napon. Egyutas ANOVA Bonferroni többszörösen összehasonlító teszt; adatok átlaga \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (vs. megfelelő kontroll csoport); ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (vs. megfelelő ellenoldal); $n = 6-7$ egér/csoport. Reprezentatív képek: egészséges IgG-vel (D), CRPS IgG-vel (E), CRPS IgG + etanercepttel (F) és CRPS IgG + tofacitinibbel kezelt egerek (G) Iba1 immunpozitív mikroglia az L-PAG-ban. A skálásávok 100 μ m-t jelentenek, a nagyítások 10-szeresek a főábrákon és 20-szorosak az inset-ekben.

4.1.10. Az IL-1 receptor blokkolás megelőzi és csökkenti a CRPS-hez kapcsolódó hiperalgéziát és gliózt

Vizsgáltuk a glükokortikoid, a prednizolon és az interleukin-1 receptor antagonist (anakinra) hatásait a CRPS IgG által kiváltott tünetekre és a gyulladással változó állapotokra. Egyes kísérletsorozatok alkalmával a CRPS IgG napi adása mellett prednizolon (4 mg/kg) vagy anakinra (10 mg/kg) kezelést is alkalmaztunk. A 0. napon (a talp bemetszés előtt 5 órával), majd ezután az egész kísérlet alatt naponta kezeltük az egereket a prednizolonnal vagy anakinrával (0,1 ml/10 g). A műtét után egy nappal a mechanikai hiperalgézia egyformán kialakult minden csoportban (24/A, B ábra). A 2. és 3. napon a glükokortikoid kezelés átmenetileg csökkentette a CRPS IgG által kiváltott mechanikai hiperalgéziát, de ez a hatás a 7. napra már nem volt kimutatható (24/A ábra). Az anakinra kezelés azonban megakadályozta a CRPS IgG hatásának kialakulását a kísérleti idő alatt (24/B ábra) és szinte teljesen megfordította a gliosejtek aktiválódását a gerincvelő hátsó szarvában a kísérlet 6. napjára a sérült oldalon (24/D, E ábra). A prednizolon kezelés azonban nem okozott ilyen változásokat. A perifériás mediátorok szintjét vizsgálva az anakinra a 3. napon jelentősen csökkentette a láb szövetében az MCP-1 szintjét, azonban más különbség nem volt a két kezelés tekintetében. Ezenkívül az anakinra késleltetett beadása (8. naptól kezdve adva) csökkentette a CRPS IgG hatására kialakult mechanikai hiperalgéziát (24/C ábra), és az ezzel járó fokozott mikroglia aktivációt is a hátsó szarvban a kísérlet 13. napjára (24/F ábra).



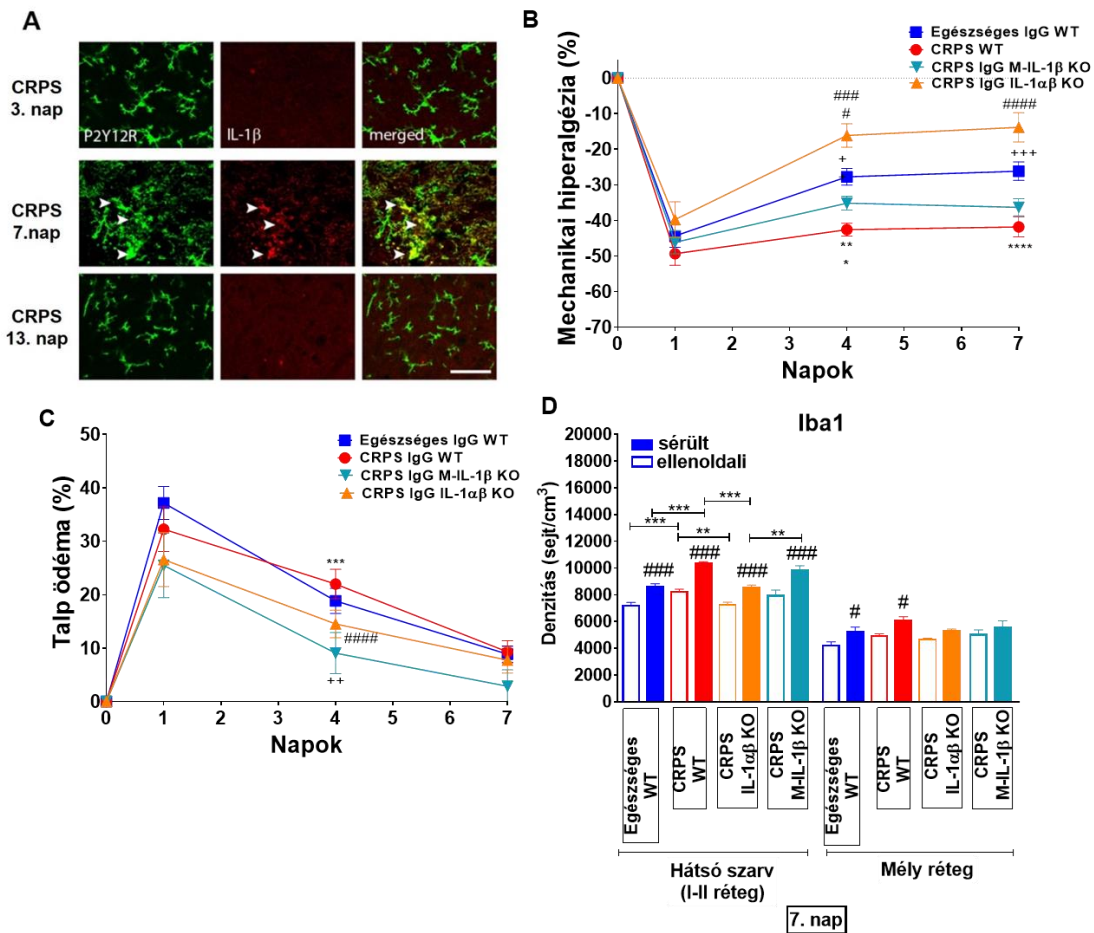
24. ábra: Profilaktikus prednizolon vagy anakinra, valamint a késői anakinra kezelések hatása a CRPS IgG-vel kiváltott mechanikai hiperalgéziára és az L4-6 gerincvelő hátsó szarvi glia aktivációra. Mechanikai hiperalgézia a kísérleti csoportokban (fiziológias sóoldat, az egészséges IgG, a CRPS IgG), valamint a beteg IgG mellett minden nap i.p. prednizolon (4 mg/kg) vagy anakinra (10 mg/kg) kezelés 0. és 6. nap között (**A, B**). Ugyanezen egerek gliasejtjeinek aktiválódását (**D, E**) mutatják az ábrák a gerincvelő hátsó szarvában (6. napon): GFAP - asztrocita (**D**) és Iba1 - mikroglia (**E**). Az eredmények a kapott átlagértékeket mutatják. Az ábrák négy kísérlet eredményeinek az összevonásával készültek a fiziológias sóoldat, az egészséges IgG és a CRPS IgG csoportokban. A 8. napon kezdődő késői anakinra kezelés (**C, F**): mechanikai hiperalgézia (**C**) és a gerincvelő hátsó szarv mikroglia sejtjeinek száma (**F**) a 13. napon. *Mechanikai hiperalgézia statisztikai adatai (A-C): Kétutas ANOVA Bonferroni többszörösen összehasonlító teszt; adatok átlaga ± SEM; Egészséges IgG (egészséges IgG-vel kezelt csoport), CRPS IgG (CRPS IgG-vel kezelt csoport); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (CRPS IgG vs. Fiziológias sóoldat); # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (CRPS IgG vs. Egészséges IgG); +++ $p < 0,001$ (CRPS IgG vs. CRPS IgG + anakinra). Gliasejt számok statisztikai adatai (D-F): Egyutas ANOVA Bonferroni többszörösen összehasonlító teszt; adatok átlaga ± SEM; Egészséges (egészséges IgG-vel kezelt csoport), CRPS (CRPS IgG-vel kezelt csoport); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (vs. megfelelő kontroll csoport); # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (vs. megfelelő ellenoldal).*

4.1.11. A mikroglia szelektív IL-1 β deléciója enyhíti, míg a teljes IL-1 $\alpha\beta$ kiütése kivédi a CRPS kialakulását

A CRPS IgG megnövekedett gliaaktivációt eredményezett a hátsó szarvban anélkül, hogy láb szövetéből mért IL-1 szintje növekedett volna. Az IL-1 blokkolása pedig megakadályozta a CRPS tüneteinek kialakulását, ezért megvizsgáltuk, hogy a glia IL-1 fokozott termelése a hátsó szarvban összefüggésben van-e a CRPS kialakulásával.

Az immunfluoreszcenciás mérés során csak a CRPS csoportban volt megnövekedett mikroglia IL-1 β termelés az L4/L5 gerincvelő hátsó szarvában (**25/A ábra**), az IL-1 α nem volt kimutatható. Megvizsgáltuk, hogy a CRPS során kialakult tüneteket megváltoztatja-e az IL-1 génkiütés. A CRPS IgG-t kapott IL-1 $\alpha\beta$ KO egerek esetében csak enyhe mechanikai hiperalgémia alakult ki, valamint az incízió után is kevésbé tapasztaltuk a láb duzzadását az egészséges IgG-vel kezeltékhez képest (**25/B, C ábra**).

IL-1 β flox-olt (fl/fl) egereket annak megállapítására hoztuk létre, hogy a megnövekedett mikroglia IL-1 β hatással van-e a CRPS során kialakult fokozott mechanikai hiperalgémiaira. A mikroglia IL-1 β eliminációja szignifikánsan csökkentette a mechanikai hiperalgémiait és a talp ödémát a CRPS IgG-vel kezelt egerek esetében, bár ez a hatás kisebb volt, mint az IL-1 $\alpha\beta$ KO egerekben (**25/B, C ábra**). Az Iba1 aktivációja csökkent az IL-1 $\alpha\beta$ KO egerekben, de a mikroglia IL-1 β KO-k esetében nem változott a CRPS IgG hatására (**25/D ábra**). Mindez arra utal, hogy míg a mikroglia IL-1 β sejtek fontos részei a tartós fájdalomhoz kapcsolódó krónikus neuroinflammációnak, addig más IL-1 β -termelő sejtek vagy az IL-1 α által közvetített folyamatok is hozzájárulhatnak a CRPS tüneteikhez. *(Az egereket biztosította a kísérletekhez: Dr. Dénes Ádám, Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet MTA, Molekuláris Neuroendokrinológia Kutatócsoport, Budapest)*



25. ábra: Az *IL-1αβ* vagy a mikroglia eredetű *IL-1β* delécioja teljesen vagy részben megakadályozta a CRPS IgG által kiváltott tünetek kialakulását az egerekben. A P2Y12 (egy specifikus mikroglia marker) (173) elleni immunfestéssel azonosított mikroglia populáció aktivált sejtformáját és IL-1β immunpozitivitást mutatott az L4 - L5 gerincvelő mély rétegében a 7. napon (A). (Méretarány: 50 μm.) Az *IL-1αβ* KO egerek teljesen, míg az *M-IL-1β* KO egerek részben akadályozták meg a CRPS IgG által kiváltott tünetek kialakulását (B, C): hiperalgézia (B) és talp ödéma (C). Szignifikancia a B és C ábrák esetében: Kéttutas ANOVA Bonferroni többszörösen összehasonlító teszt; adatok átlaga ± SEM; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (CRPS IgG WT vs. Egészséges IgG WT); ##### $p < 0,0001$ (CRPS IgG M-IL-1β KO vs. CRPS IgG WT); ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ (CRPS IgG *IL-1αβ* KO vs. CRPS IgG M-IL-1β KO); $n = 8-26$ egér/csoport.

A CRPS IgG által kiváltott mikroglia aktiváció megszűnik az *IL-1αβ* KO-ban, azonban a *M-IL-1β* KO egerekben nem (D). Az adatokat két kísérletből és különféle CRPS IgG készítményekből vannak összesítve. Szignifikancia a D ábra esetében: Egyutas ANOVA Bonferroni többszörösen összehasonlító teszt; adatok átlaga ± SEM; Egészséges (egészséges IgG-vel kezelt csoport), CRPS (CRPS IgG-vel kezelt csoport); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (vs. megfelelő kontroll csoport); # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ (vs. megfelelő ellenoldal); $n = 6-15$ egér/csoport. (Az immunfluoreszcenciás mérést végezte és az A ábrát készítette: Dr. Dénes Ádám és kutatócsoportja, Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet MTA, Molekuláris Neuroendokrinológia Kutatócsoport, Budapest)

4.2. A szomatosztatin 4 receptor szerepének vizsgálata tanulás és memória egérmodelljeiben

A fejezet alapjául szolgáló közlemény adatai:

Exploratory and locomotor activity, learning and memory functions in somatostatin receptor subtype 4 gene-deficient mice in relation to aging and sex

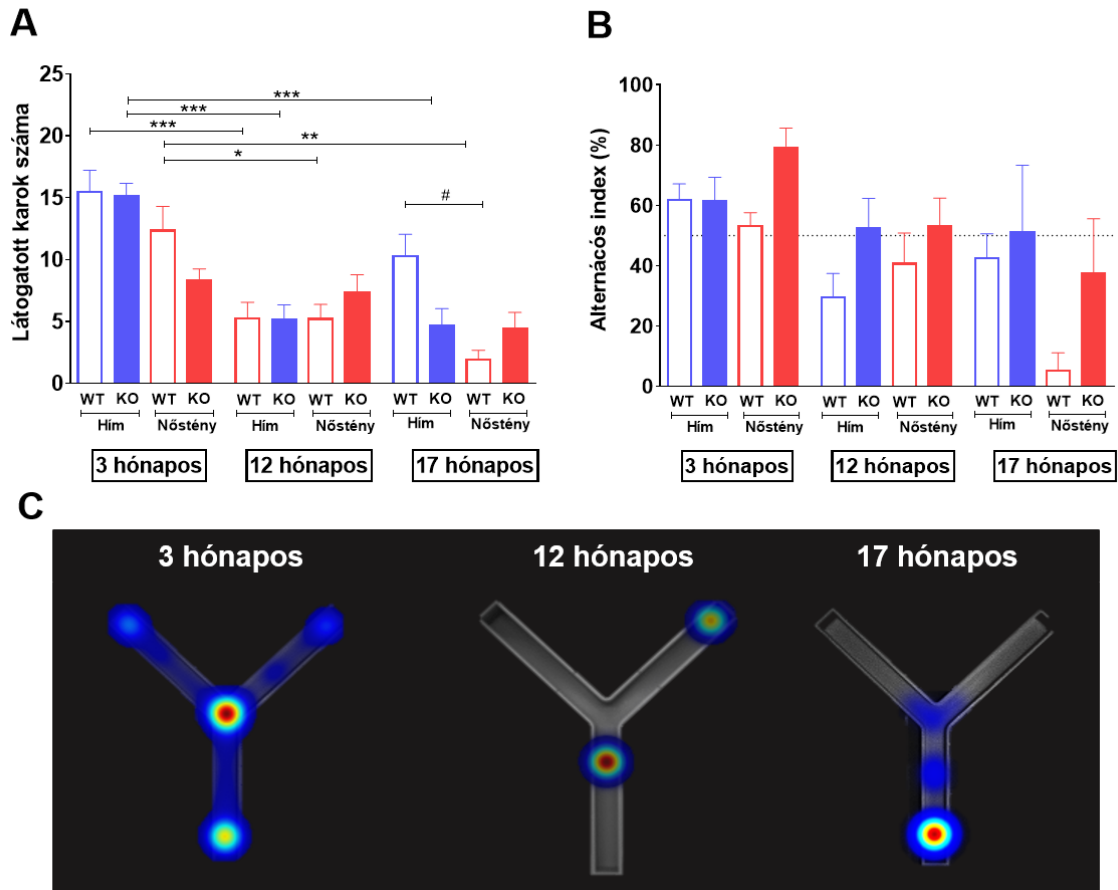
Szentes N, Tékus V, Mohos V, Borbély É, Helyes Zs

GeroScience (2019) 41:631–641

doi: 10.1007/s11357-019-00059-1.

4.2.1. Az *Sstr4* génhiány nincs hatással a térbeli memóriára, amely az életkorral csökken

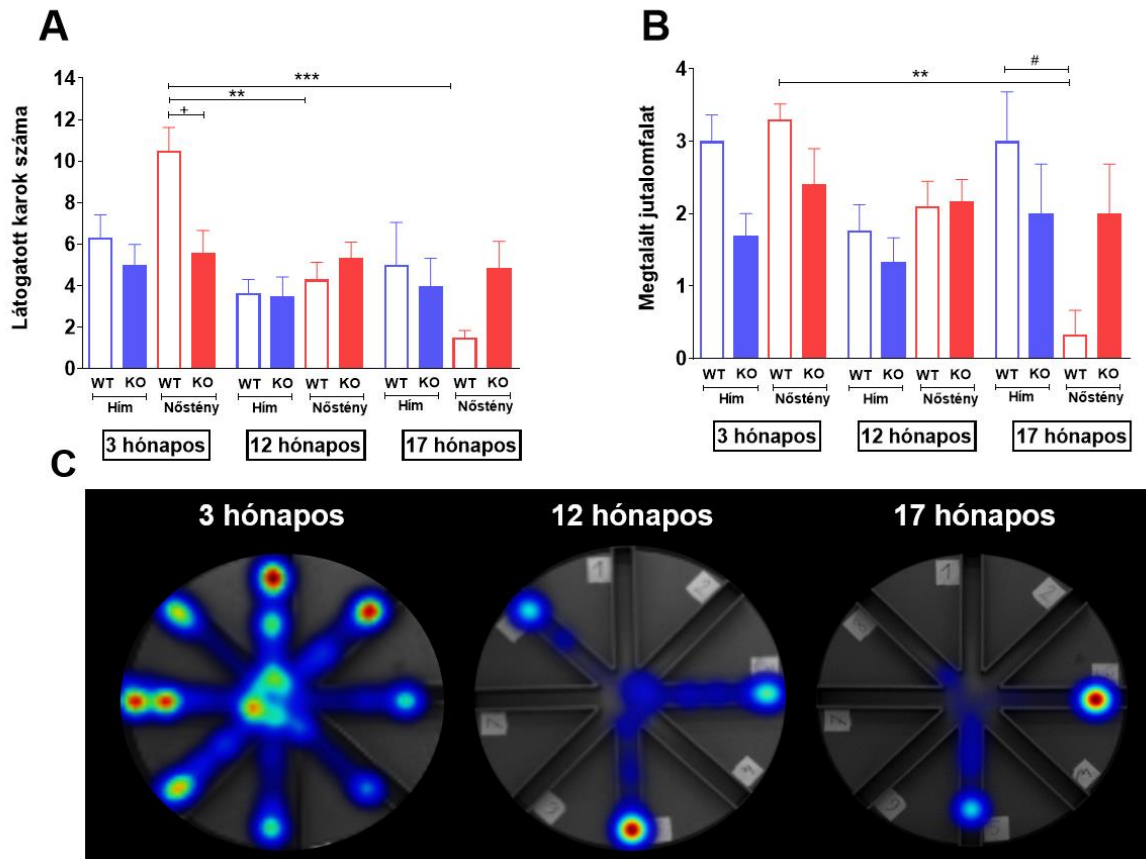
Az Y-útvesztőben a fiatal hím és nőstény, WT és *Sstr4* KO egerek szignifikánsan több kart látogattak meg, mint idősebb társaik. A 17 hónapos WT nőstények esetében csökkent az új útkereső magatartás a KO és a hím társaikhoz képest. A kar-kombinációk vizsgálatában nem volt szignifikáns különbség az életkor, a nem és az SST₄ receptor hiánya szempontjából (**26. ábra**). Az SST₄ receptor hiánya tehát nem változtatta meg az egerek viselkedését egyik csoportban sem.



26. ábra: A látogatott karok száma (A) és a karkombinációk (%) (B) az *Y-maze* tesztben. A spontán alternáció során mutatja az egerek térbeli munkamemóriáját hím és nőstény, *Sstr4* KO és WT megfelelőiket összehasonlítva három különböző korban (3, 12, 17 hónapos). Reprezentatív hőtérkép a hím KO egerek vizsgálatáról három különböző korcsoportban (C). *Faktoriális ANOVA Tukey HSD post hoc* teszt; adatok átlaga \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (vs. kor); # $p < 0,05$ (vs. nem); $n = 6-18$ egér/csoport.

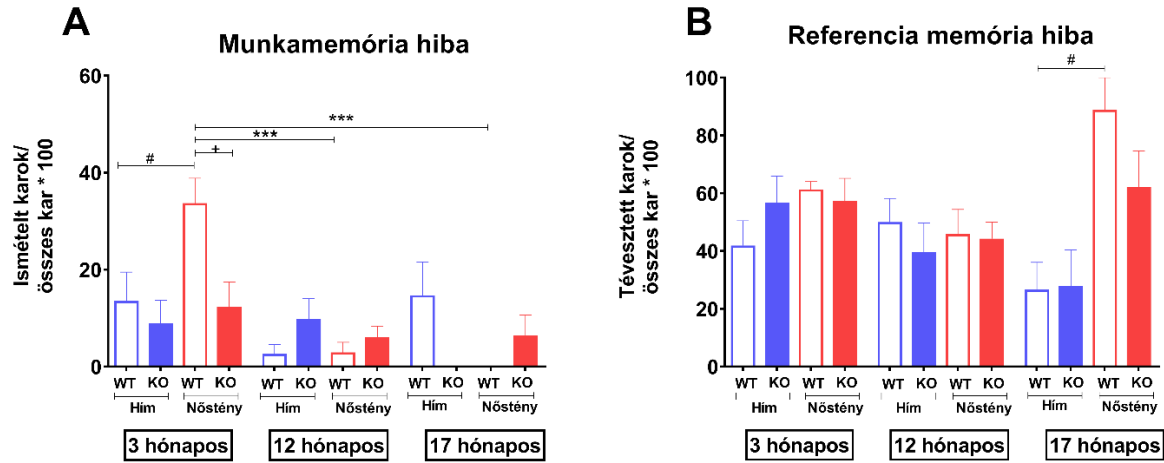
4.2.2. Az *Sstr4* génihiány és az öregedés rontja a nőstény egerek felfedező aktivitását, amely korlátozza a munkamemória megítélését

A RAM tesztben a fiatal *Sstr4* KO nőstény egerek látogatták, ismételték és tévesztettek szignifikánsan kevesebb kart, mint a WT társaik. Megfigyelhető volt a nemek közti különbség a fiatal egerekben, a nőstények ismételték szignifikánsan több kart, és több kart is látogattak, mint a hímek, bár ez a paraméter nem volt statisztikailag szignifikáns. A fiatal hím és nőstény WT egerek látogattak, ismételték és tévesztettek több kart, és több jutalomfalatot találtak meg, mint az idősebb társaik (27. ábra).



27. ábra: A látogatott karok száma (A) és a megtalált jutalomfalatok száma (B) a RAM testben. Reprezentatív hőterkép a nőstény WT egerek vizsgálatáról három különböző korcsoportban (C). Faktoriális ANOVA Tukey HSD post hoc teszt; adatok átlaga \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (vs. kor); # $p < 0,05$ (vs. nem); $n = 6-18$ egér/csoport.

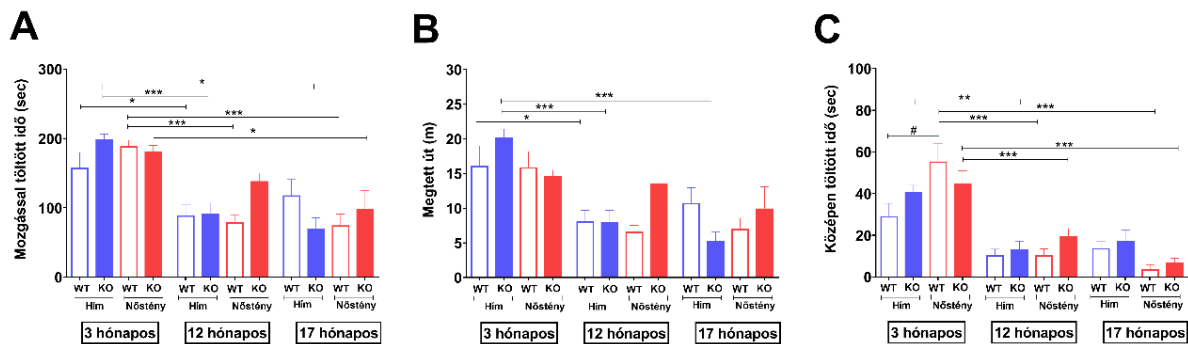
Meglepő módon mind az öregedés, mind az SST₄ receptor hiánya szignifikánsan javította a nőstények munkamemóriáját, a hím egerek esetében azonban nem. Ugyanakkor a fiatalok munkamemóriája rosszabb volt, mint az idősebb társaiké. Az idős WT hím egerek referencia memóriája, míg a fiatalok munkamemóriája javult szemben a korban megegyező nőstény kontrollok funkciójával (28. ábra).



28. ábra: A munka (A) és a referencia memória (B) funkciók. Faktoriális ANOVA Tukey HSD post hoc teszt; adatok átlaga \pm SEM; *** $p < 0,001$ (vs. kor); # $p < 0,05$ (vs. nem); + $p < 0,05$ (vs. gén); $n = 6-18$ egér/csoport.

4.2.3. Az öregedéssel csökken a spontán lokomotoros aktivitás és növekszik a szorongási szint mindkét nemből és genotípusban

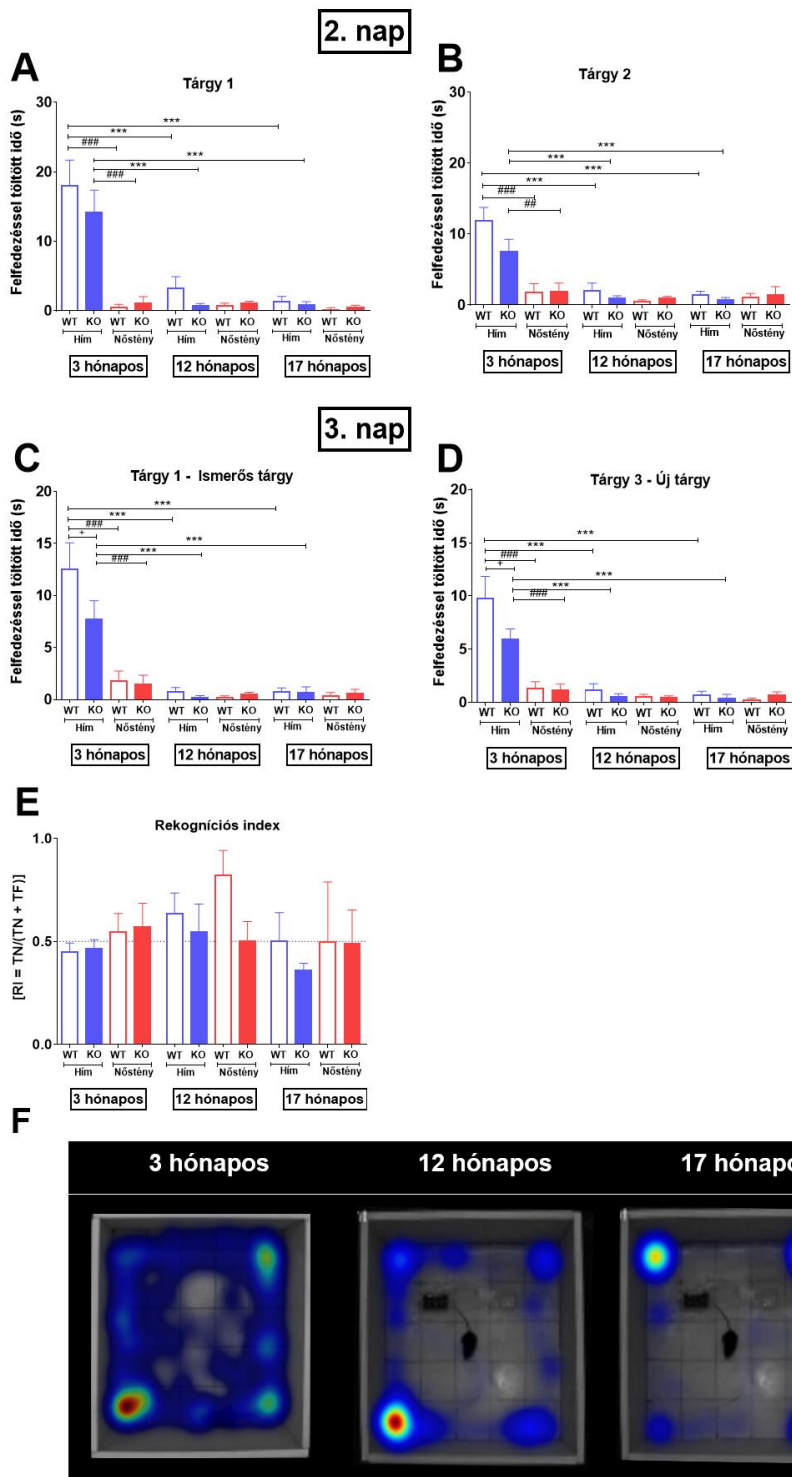
Az OF tesztben 12 és 17 hónapos egerek mindkét nem és genotípus esetében szignifikánsan kevesebbet mozogtak az 5 perces mérés során, és kevesebb időt töltöttek a doboz közepén. A fiatal WT csoportban a nőstények szignifikánsan több időt töltöttek az OF doboz közepén és kevesebbet a periférián, mint a velük megegyező korú hímek (29. ábra).



29. ábra: A mozgással töltött idő (A), a megtett távolság (B) és az OF doboz közepén töltött idő (C). Faktoriális ANOVA Tukey HSD post hoc teszt; adatok átlaga \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (vs. kor); # $p < 0,05$ (vs. nem); $n = 6-18$ egér/csoport.

4.2.4. Csökken a felfedező viselkedés az Sstr4 génhiányos fiatal és öreg egerekben

A NOR tesztben a fiatal hím *Sstr4* KO egerek szignifikánsan kevesebb időt töltöttek, mind az ismerős, mind az új tárgyak felfedezésével, mint a WT társaik. A fiatal hímek pedig szignifikánsan többet érdeklődtek a tárgyak felfedezése iránt, mint a nőstény és idősebb társaik. Az 12 és 17 hónapos egerek nemtől és genotípustól függetlenül kevésbé voltak érdeklődők **(30/A-D ábra)**. A rekogníciós index az ismerős és az új tárgy felfedezésének arányát mutatta meg. A kapott eredmények alapján a memória funkció egyik csoportban sem mutatott különbséget **(30/E ábra)**.



30. ábra: A tárgyak felfedezése a NOR testben. A két azonos tárgy (Tárgy 1, Tárgy 2) felfedezésével töltött idő (sec) (**A**, **B**), valamint az ismerős (Tárgy 1) és az új tárgy (Tárgy 3) felfedezésével töltött idő (sec) (**C**, **D**). A rekoncziós index (**E**) értéke az új, ismeretlen tárgy felfedezéséig eltelt idő (TN - *novel time*) és az új tárgy (TN) plusz a régi, ismert tárgy (TF - *familiar time*) felfedezésével töltött idő hányadosa százalékos arányban. A reprezentatív hőtérkép a hím WT egerek esetében három különböző korcsoportban (**F**). *Faktoriális ANOVA Tukey HSD post hoc teszt; adatok átlaga ± SEM; *** $p < 0,001$ (vs. kor); ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (vs. nem); + $p < 0,05$ (vs. gén); $n = 6-18$ egér/csoport.*

5. Megbeszélés

A munkám során bemutatásra került egy passzív transzfer-trauma egérmodell, melyen keresztül vizsgáltuk a CRPS-ben szenvedő betegekből nyert szérum IgG hatását egerek naponta történő kezelésével. Modellünkben igazoltuk, hogy az egerekben kiváltott tünetek korreláltak a CRPS-ben szenvedő betegek tüneteivel. A mechanikai hiperalgécia az incíziót követően végig fennmaradt a kísérleti időszak alatt a CRPS IgG hatására, azonban a kialakult ödéma idővel megszűnt. Az eredményeink alátámasztják a modell transzlációs jelentőségét és a betegség kialakulásában szerepet játszó autoimmun mechanizmusok fontosságát (14,25,26). Az egér lábak homogenizátumaiból mért gyulladáshoz köthető citokin és szenzoros neuropeptid szintek nem mutattak szignifikáns eltérést. A kialakult gyulladás mértéke nem korrelált a CRPS IgG által kiváltott hiperalgécia növekedésével. A korai időszakban a SP-termelődése megnőtt, mely összhangban állt a CRPS páciensek esetében mért eredményekkel (11), valamint az egérkísérletek során kapott korábbi eredményeinkkel (25). Modellünkben az egerek intakt lábain mért értékek nem mutattak eltérést, hasonlóan ahhoz, hogy a humán páciensek körülbelül 90% -ánál is csak a sérült végtagban jelentkeztek a tünetek (174). A keringő patogén IgG antitestek betegségben betöltött szerepének pontos meghatározása nem tisztázott. A neuropátiában szenvedő betegek esetében nagyon fontos a gyulladás mechanizmusok feltérképezése és az immunterápia korai megkezdése, mely a neurológiai tünetek javulásához vezet (175). A gyulladáshoz köthető mechanizmusok jelentőségét támasztják alá az *in vivo* képzés során kapott eredményeink is. Az MPO aktivitás eltérően fokozódott a különböző CRPS IgG készítményekkel kezelt egerekben, azonban ezen eredmények nem korreláltak az ugyanezen állatokban mért növekvő hiperalgéciaival és ödémáival, viszont összefüggtek a CRPS pácienseknél tapasztalt tünetekkel (végtagok duzzadása, színváltozása, hőmérsékletváltozása) (176).

Betegekben tapasztalt eltérések	Vizsgált paraméterek az egérmodellben	Módszer/készülék	CRPS IgG hatására
Tartós fájdalom, mechanikai hiperalgészia	Mechanikai fájdalomküszöb csökkenés	Dinamikus plantáris észteziométer	↑
Ödéma	Lábtérfogat	Pletizmométer	↑
Neuropeptid koncentráció növekedés a bőrben (SP, CGRP) (11)	SP, CGRP koncentráció (hátsó láb homogenizátum)	Radioimmunoassay	↑
Citokin koncentráció növekedés ödéma folyadékban és plazmában (IL-6, TNF- α , IL-1 β) (21,27)	IL-6, TNF- α , MCP-1, IL-1 β koncentráció (hátsó láb homogenizátum)	Multiplex mikrogyöngy mátrix	—
Vazodilatáció, gyulladáshoz sejtaktivitás: perifériás gyulladás	Plazmafehérje extravazáció	<i>In vivo</i> fluoreszcens optikai képalkotás	—
	Mieloperoxidáz enzimaktivitás	<i>In vivo</i> lumineszcens optikai képalkotás	↑
Neuroinflammáció (gliasejt aktiváció a gerincvelőben)	Asztrocita aktiváció	Immunhisztokémia (GFAP marker)	↑
	Mikroglia aktiváció	Immunhisztokémia (Iba1 marker)	↑

3. táblázat: CRPS passzív transzfer-trauma egérmodellünkben kiváltott tünetek

A CRPS IgG adás mellett szintetikus glükokortikoid kezelést is alkalmaztunk nagy dózisu **prednizolonnal** a gyulladás csökkentésére és a fájdalom enyhítésére. A szisztémás glükokortikoidok potenciálisan hatékonyak bizonyultak a nagyon korai CRPS-ben (57). Eredményeink arra utalnak, hogy a prednizolon átmenetileg megállította az autoantitest-függő szenzibilizáció folyamatát, de a betegség progresszióját nem lassította. Mivel nem találtunk eltérést a gyulladáshoz citokin és szenzoros neuropeptid szintek között, és az alkalmazott prednizolon kezelés sem bizonyult hatásosnak, a betegség lefolyásában feltételezhetően nem a perifériás szenzitivizációs mechanizmusok dominálnak. A centrális szenzitivizációs mechanizmusok feltérképezéséhez immunhisztokémiával vizsgáltuk a glia aktiváció szerepét a

gerincvelőben és a fájdalommal kapcsolatos agyi területeken. A CRPS IgG mikroglia és asztrocita aktiváció növekedést váltott ki a gerincvelő hátsó szarvában, szemben a kontroll csoporttal, mely eredmény az egerekbe átvitt IgG erőteljes központi idegrendszeri hatását feltételezi. A glia aktiválódása valószínűleg egyes mediátorok felszabadulását eredményezi, mint az IL-1 β , TNF- α vagy agyi eredetű neurotrófikus faktor (177,178).

A CRPS transzkriptomikai vizsgálata során azonosítottuk a neuroinflammációval és a citokin szignalizációval kapcsolatos lehetséges fő patofiziológiai útvonalakat a DRG-kben. A DRG primer szenzoros neuronjai (34,35) kulcsfontosságúak a CRPS szenzitizációs és neuroinflammációs folyamataiban (34), melyek mechanikus, termikus és kémiai ingerek hatására aktiválódnak (179). Az RNS szekvenálást széles körben alkalmazzák a szenzoros ganglionok és a gerincvelő hátsó szarvának transzkriptomikai elemzésére rágcsáló kísérletekben (34,39,180–183), valamint emberi mintákon is (184), mely a fájdalom modellekben hasznos, új információkat nyújthat. A kísérletünkben a transzkriptomikai elemzés során 125 DE gént azonosítottunk, melyek főleg gyulladáshoz, immun- és/vagy szignáltranszdukciós folyamatokhoz járulnak hozzá, valamint a molekuláris és sejtes funkcióknak további elemzése feltárta a citokin aktiváció potenciális szerepét is, például a JAK-STAT és a TNF jelátviteli útvonalakat. A TNF- α és az IL-6 aktivációját kimutatták CRPS-betegek perifériás vérsejtjeiben az L4 DRG stimulációja után (185). Az érintett biológiai folyamatok és molekuláris funkciók (pl. citokin aktivitás, peptidáz szabályozás és a gyulladáshoz válasz pozitív szabályozása) alapján a KEGG és GO adatbázisok elemzése a neuroinflammáció szerepét feltételezték a CRPS modellünkben, mely eredmények egybeesnek azokkal a neuropátiás fájdalomról szóló korábbi vizsgálatokkal, melyeket a CPIP patkány modellben találtak (34,39). Továbbá a GO adatbázisban még a leukocita migrációt és az endopeptidáz aktivitást találtuk, mint biológiai és molekuláris folyamatok, melyek szintén hasonlóak voltak a patkánymodellben leírtakkal. A CPIP modellben a KEGG elemzése további metabolikus utak feltérképezését eredményezte, melyek főleg immun- vagy autoimmun-eredetű patofiziológiával társultak (34). Megállapítottuk, hogy a TNF receptor szupercsaládnak a fehérjét kódoló Cd27 génje up-regulálódott, melyről expresszálandó receptor szerepét leírták a T-sejt függő immunitásban és neuroinflammációban (186,187). Ezen útvonalak potenciális megcélzása enyhítheti a CRPS során kialakult tüneteket (34,39).

Bizonyítottuk a TNF útvonal funkcionális relevanciáját azáltal, hogy a **szolubilis TNF receptor etanercept** (188) megszüntette a CRPS IgG által kiváltott hiperalgéziát és neuroinflammációt. Az elmúlt években számos klinikai vizsgálatban kimutatták az etanercept hatékonyságát reumatoid artritiszben (189), valamint állatkísérletekben más gyulladáshoz

folyamatokban is (190), mint a szaglószeri gyulladás (191), a japán enkefalitisz (192), a gerincvelő sérülés (193) és a szisztémás lupus erithematózus (194). A kapott eredményinket alátámasztja számos újabb adat is, mely a neuroinflammáció szerepét feltételezi a CRPS-el kapcsolatos fájdalom kialakulásában (34,195,196). Az etanercept kompetitív módon gátolja a TNF kötődését a sejtmembránban lévő receptorokhoz, ezáltal megakadályozza a gyulladásos kaszkádot (197,198) a mitogén-aktivált protein-kináz szignalizáció útján. Immunhisztokémiai kiértékelés során az etanercept szignifikánsan csökkentette a Iba1 pozitív mikroglia és a GFAP-t expresszáló asztrocita sejtek aktivitásának növekedését a fájdalommal kapcsolatos régiókban, mint a gerincvelő hátsó szarvában, a PAG-ban és az SSC-ben. Korábban bizonyították, hogy az etanercept csökkenti az asztrocita és mikroglia aktivációt és egyes gyulladásos mediátorok, mint a TNF- α , az IL-1 β és az IL-6 szintjét agysérült patkányokban (199). Egér agyvelőgyulladásban pedig csökkentette a neuroinflammációt és a mortalitást azáltal, hogy gátolta a gliasejtek aktivációját és az idegsejtek károsodását (192). Az adalimumab egy anti-TNF- α monoklonális antitest, amely enyhítette az CRPS I-ben szenvedő betegeknél a mechanikai hiperalgéziát, ezáltal a TNF- α bizonyítottan részt vesz ebben fájdalomállapotban (200).

A másik feltételezett szignalizációs útvonal, a **JAK-STAT jelátviteli** út kritikus szerepet játszik a gyulladásos- és immunfolyamatokban. **Tofacitinib** okozta gátlás megakadályozza a STATS foszforilációját és aktiválódását (201). Potenciális terápiaként alkalmazták reumatoid artritisz, pikkelysömör, foltos hajhullás, atópiás dermatitisz és Bechterew-kór kezelésére (202–204). Egér kísérletekben is vizsgálták hatásosságát számos betegség esetében, mint a reumatoid artritisz (205), a lisztérzékenység (206), az autoimmun limfoproliferatív szindróma (207) és a tuberkulózis (208) esetében. Kísérleteinkben a szisztémás tofacitinib adása megakadályozta a CRPS IgG által kiváltott hiperalgéziát és neuroinflammációt, melyet bizonyít a csökkent asztrocita és mikroglia aktiváció a gerincvelő hátsó szarvában és a PAG-ban. A JAK-útvonalon keresztüli jelátvitel egy asztrocita-specifikus fájdalomút, mely változatos körülmények között aktiválható. Hasonlóan a mi eredményeinkhez, Tian és munkatársai egy másik JAK inhibitor (SP600125) intratekális adásával enyhítették a fellépő allodíniát CPIP-indukált CRPS egér modelljében (209).

A gyulladásos citokinek köztük az IL-1 is szerepet játszik mind a helyi, mind a szisztémás gyulladásban, valamint immunfolyamatokban (177,210). Az IL-1 által mediált folyamatok részt vesznek az idegsejtek, a mikroglia és az asztrocita sejtek aktivációs mechanizmusában, azaz a neuroinflammáció kialakulásában (211,212). Az IL-1 expresszió megcélzása, valamint IL-1 blokkolása megfelelő terápiás lehetőség az akut és krónikus gyulladásos betegségek,

valamint a stroke kezelésében (213–215). A CRPS modellünkben az **IL-1 antagonistáknak** kezelés megakadályozta a CRPS tüneteinek kialakulását. A késői időpontban megkezdett anakinra kezelés -ekkor feltételezhetően a sérülés által indukált perifériás gyulladáshoz már lezajlottak- is hatékonyan bizonyult a CRPS tüneteinek csökkentésére. A gerincvelő hátsó szarv gliasejtjeinek fokozott aktivációját az anakinra kezelés teljesen visszafordította a CRPS IgG-vel kezelt csoportban.

A mikroglia IL-1 β funkcionális szerepének feltérképezése során, a CRPS IgG kezelés hatására a génihiányos egerekben csak enyhe mechanikai hiperalgémia csökkenés és mérsékelt duzzadás alakult ki. Az *IL-1 $\alpha\beta$ KO* és a mikroglia *IL-1 β KO* egerek esetében is alacsonyabb mechanikai hiperalgémia alakult ki a CRPS IgG hatására, valamint az *IL-1 $\alpha\beta$ KO* egerek gerincvelő hátsó szarvában csökkent a gliasejtek aktivációja. Az eredményeink a mikroglia IL-1 β jelentős szerepét mutatják a CRPS-ben, de az IL-1 α részvéte is feltételezhető (211).

A kísérleteink során alkalmazott gyulladáscsökkentő beavatkozások hatékonyak voltak a CRPS kezelésére, megakadályozva a betegségre jellemző tünetek kialakulását.

A **szomatosztatin 4 receptor** szerepének vizsgálata során megállapítottuk, hogy az SST₄ receptor csak fiatal egerek esetében vett részt a lokomotoros aktivitásban és a felfedező magatartásban, az öregedés nem befolyásolta a viselkedést. Azonban, mind az öregedés, mind pedig a nemi különbségek fontos tényezők a viselkedési paramétereknek, melyekre jelentős figyelmet kell fordítani, ugyanis befolyásolhatják az egyes vizsgálatok kimenetelét. Rágcsálók *Sstr4* expressziós vizsgálatai során kimutatták, hogy jelen van a viselkedéssel és memóriával kapcsolatos agyterületeken, mint a hippokampuszban és a striátumban (99–102). Fontos gátló funkcióval rendelkezik számos élettani és patofiziológiai folyamatban, mint az érzékelés, a mozgás és motoros koordináció (68,164), valamint a stressz, a tanulási tevékenységek (69), hangulatszabályozás (70,71), a kognitív teljesítmény és a neurodegeneráció (72), melyeket állatmodellekben is igazoltak. A jelen eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy az SST₄ hiánya csak a fiatal egerek esetében befolyásolta a lokomotoros aktivitást és a felfedező viselkedést. A fiatal nőstény KO egerek szignifikánsan kevesebb kart látogattak, ismételték és tévesztettek a RAM tesztben, mint a WT kontrolljaik. A fiatal *Sstr4* KO hímek csökkent explorációs magatartást mutattak a NOR tesztben, összehasonlítva a WT egerekkel. Mivel korábbi kísérleteinkben a KO egerek szorongás és depresszió szerű viselkedését írtuk le (63), e hangulatszabályozási tényezők is befolyásolhatják az általunk végzett kognitív tesztjeink eredményeit. Patkány kísérletekben kimutatták, hogy a tárgyfelismerő tesztekben vizsgált memóriefunkciókban számos agyi régió, például a hippokampusz, valamint peririnalis és

mediális prefrontális kéreg funkcionális kölcsönhatása játszik szerepet (216,217). Egerek labirintus tesztekben vizsgált térbeli memória funkcióiban a prefrontális és az elülső cinguláris kéreg szerepét azonosították (218). Egerek mozgás koordinációjában szintén kimutatták a hippocampusz aktivációjának szerepét a *Rotarod* tesztben (219).

Az öregedés és a nemi különbségek is jelentős hatással vannak az állatkísérletekben a viselkedési paraméterekre (220), ezért vizsgáltuk ezen tényezők szerepét. Az *open field* teszt (170) és az *Y-maze* teszt alkalmas a spontán lokomotoros aktivitás, a felfedező viselkedés és a szorongás szintjének meghatározására (135). Az utóbbi tesztben a kar kombináció meghatározása a munkamemória funkcióra utal, mert az állatnak emlékeznie kell arra a két karra, amit már korábban meglátogatott, hogy ezáltal legyen lehetősége egy új alternatíva választására (221). Vizsgálatainkban a lokomotoros aktivitás, a felfedezéssel töltött idő hanyatlott a korról mindkét nemből. A fiatal egerek többet mozogtak, több időt töltöttek az OF doboz közepén, és több kart látogattak meg az *Y-maze* tesztben, mint az idősebb társaik. A fiatal WT hímek kevésbé voltak aktívak és nagyobb mértékben szorongtak, azonban jobb volt a munkamemóriájuk, a legidősebbek egerek pedig több jutalomfalatot találtak meg és jobb volt a referencia memóriájuk is, mint a velük megegyező korú nőstényeknek. A nemi különbségeket illetően tehát azt találtuk, hogy a fiatal nőstények aktívabbak, mint a hímek. A kor és nembeli különbségeket érintő viselkedési és memória paramétereket már korábban vizsgálták C57BL/6NIA egerekben, és azt tapasztalták, hogy a memória romlik a kor előrehaladtával mindkét nemből a 25 hónapnál idősebb állatok esetében a Morris-féle vízi labirintus (*Morris water maze*), az emelt keresztpalló és az *open field* tesztekben (164). Ezen eredmények korrelálnak a mi mérési eredményeinkkel is, miszerint 12 és 17 hónapos egereknek alacsonyabb mértékű volt a felfedező (explorációs) viselkedésük. Kognitív tesztekben vizsgálták a lokomotoros aktivitást, a megtett távolságot, a sebességet és a gyorsulást a fiatal és idősebb (C57B1/6J hím 6, 21 és 27 hónapos) egerekben. A memória hanyatlását azonban idősebb egerekben nem mutatták ki (134). Patkányok és emberek esetében is bizonyították, hogy a tanulási képesség és a lokomotoros aktivitás az életkorral csökken. A kognitív hanyatlást C57BL/6J egerekben vizsgálták teljes agyi gamma besugárzás után, és meghatározták a térbeli memória teljesítményt a sugárkaros víz labirintus tesztben. Három hónap elteltével romlott teljesítményt tapasztaltak, a 6. hónap után pedig a motoros koordináció is károsodott (133). Az eredmények megerősítették, hogy a teszt alkalmas módszer rágcsálók memóriefunkciójának vizsgálatára (133). Kísérleteinkben a fiatal WT nőstények a RAM tesztben látogattak, ismételték és tévesztettek több kart, azonban az idős hímek több jutalomfalatot találtak meg. A NOR-ban a fiatal hímek több időt töltöttek a tárgyak felfedezésével, mint a fiatal nőstények és

az idősebb hímek. Hasonlóan az általunk bemutatott egerek eredményeivel, a hím patkányokról is kimutatták, hogy jobban teljesítenek a rekogníciós tesztben (220).

A szintetikus SST₄ agonisták gátolták a fájdalmat, a gyulladást (96,104) és a depressziós viselkedést (63), valamint a neurodegeneráció és kognitív diszfunkció során nőtt a neprilizin aktivitása, ami csökkent kortikális A β 1-42 képződést eredményezett a rágszálómodellekben (114,222).

6. Új eredmények összefoglalása

1. CRPS betegektől származó IgG ismételt szisztémás injekciója egerekben kis talpi bemetszést követően szignifikáns mechanikai hiperagézia fokozódást váltott ki perifériás gyulladáshoz vezető jelek nélkül, valamint a gerincvelő hátsó szarvban és a fájdalom feldolgozásban szerepet játszó agyi régiókban (PAG és SSC) gliassejt aktivációt (neuroinflammációt) eredményezett. A neuroinflammációs mechanizmusokban bizonyítottuk az elsősorban mikroglia eredetű IL-1 β szerepét.
2. Ebben az új, transzlációs jelentőségű passzív transzfer-trauma CRPS egérmódelünkben a hátsó gyöki ganglionok hipotézismentes transzkriptomikai vizsgálatával a primer szenzoros neuronokban neuroinflammációs mechanizmusokat és gyulladáshoz vezető citokin szignallizációval kapcsolatos folyamatokat azonosítottunk.
3. A glükokortikoid prednizolon csak a korai fázisban, azonban IL-1 receptor antagonistáknak, a szolubilis TNF receptor etanercept és a JAK-STAT jelátvitel gátló tofacitinib kivédte a CRPS IgG-vel kiváltott hiperagézia fokozódást és gliasejt aktivációt a kísérlet teljes időtartama alatt.
4. Egérkísérleteinkben igazoltuk, hogy a spontán lokomotoros aktivitás, a felfedező magatartás és a térbeli memória funkció az életkor előrehaladtával csökken. Érdekes nemi különbségeket tapasztaltunk az életkor függvényében: a fiatal nőstények aktívabbak voltak, mint a hímek a spontán motoros aktivitásban, azonban gyengébb felfedező magatartást mutattak az új tárgyfelismerési tesztben. A legidősebb nőstények térbeli memória funkciója rosszabb volt, mint a hímeké. Az új fájdalomcsillapító célmolekula, az SST₄ receptor, hiánya csak fiatal nőstény egerekben csökkentette a spontán lokomotoros aktivitást, míg a fiatal hímeknél a felfedező magatartást (új tárgy felismerés).

7. Következtetések

1. Az általunk kidolgozott, jellemzett és farmakológiai eszközökkel validált új CRPS passzív transzfer-trauma transzlációs egérmodell hasznos a betegség kórélettani folyamatainak azonosítására. A hátsó gyöki ganglionok hipotézismentes transzkriptomikai vizsgálata alkalmas megközelítés a primer szenzoros neuronok szintjén szerepet játszó fájdalom érzékenyítő mechanizmusainak meghatározására.
2. CRPS-hez kapcsolódó krónikus fájdalomban nem a perifériás gyulladás, hanem a szenzoros ganglionokban és a központi idegrendszerben zajló neuroinflammációs mechanizmusok (perifériás és centrális szenzitivizáció) játszanak döntő szerepet a gyulladásos citokin jelátvitelen keresztül.
3. Az IL-1, TNF és JAK-STAT szignalizációs útvonalak gátlása új fájdalomcsillapító lehetőséget jelenthet, többek közt más indikációval (elsősorban reumatoid artritisz kezelésére) forgalomban lévő gyógyszerek (anakinra, etanercept, tofacitinib) alkalmazhatóságának bővítésével.
4. Az új fájdalomcsillapító és antidepresszáns célpontnak tartott SST₄ receptor valószínűleg nem befolyásolja a spontán lokomotoros aktivitást és a tanulási képességet az öregedéssel összefüggésben sem, nemi különbségek nélkül, amely SST₄ agonista gyógyszerjelöltek kedvező mellékhatás spektrumára utalhat.

Támogatások: National Brain Research Program: 2017-1.2.1-NKP-2017-00002; GINOP-2.3.2-15-2016-00050 „PEPSYS”; EFOP-3.6.1-16-2016-00004, EFOP-3.6.2-16-2017-00006; EFOP 3.6.2-17-2017-00008 N (2017-2019), EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017- 00009, FIKPII-17886-4/23018/FEKUTSTRAT; PTE ÁOK Dr. Szolcsányi János Kutatási Alap: PTE ÁOK_KA-2020-18, Felsőoktatási hallgatók tudományos műhelyeinek és programjainak támogatása: EFOP-3.6.3-VEKOP -16-2017-00009.

8. Irodalomjegyzék

1. Treede R-D. The International Association for the Study of Pain definition of pain: as valid in 2018 as in 1979, but in need of regularly updated footnotes. *PR9*. 2018. március;3(2):e643.
2. Merskey H, Bogduk N, International Association for the Study of Pain, szerkesztő. *Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms*. 2nd ed. Seattle: IASP Press; 1994. 222 o.
3. Patetsos E, Horjales-Araujo E. Treating Chronic Pain with SSRIs: What Do We Know? *Pain Research and Management*. 2016;2016:1–17.
4. Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev*. 1991. június;43(2):143–201.
5. Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother*. 1967. szeptember;31(1):138–51.
6. Szolcsányi J. Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. *Agents and Actions*. 1988. február;23(1–2):4–11.
7. Szolcsányi J, Helyes Z, Oroszi G, Németh J, Pintér E. Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *Br J Pharmacol*. 1998. március;123(5):936–42.
8. Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z, Oroszi G, Németh J. Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors: Anti-inflammatory effect of counter-irritation. *British Journal of Pharmacology*. 1998. október;125(4):916–22.
9. Birklein F, Riedl B, Claus D, Neundörfer B, Handwerker HO. Cutaneous norepinephrine application in complex regional pain syndrome. *European Journal of Pain*. 1997. június;1(2):123–32.
10. Birklein F, Schmelz M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neuroscience Letters*. 2008. június;437(3):199–202.
11. Weber M, Birklein F, Neundörfer B, Schmelz M. Facilitated neurogenic inflammation in complex regional pain syndrome. 2001;7.
12. Goebel A. Complex regional pain syndrome in adults. *Rheumatology*. 2011. október 1.;50(10):1739–50.
13. Blaes F, Tschernatsch M, Braeu ME, Matz O, Schmitz K, Nascimento D, és mtsai. Autoimmunity in Complex-Regional Pain Syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007. június 1.;1107(1):168–73.
14. Harden NR, Bruehl S, Perez RSGM, Birklein F, Marinus J, Maihofner C, és mtsai. Validation of proposed diagnostic criteria (the “Budapest Criteria”) for Complex Regional Pain Syndrome. *Pain*. 2010. augusztus;150(2):268–74.

15. Goebel A. Intravenous Immunoglobulin Treatment of the Complex Regional Pain Syndrome: A Randomized Trial. *Ann Intern Med.* 2010. február 2.;152(3):152.
16. Kohr D, Singh P, Tschernatsch M, Kaps M, Pouokam E, Diener M, és mtsai. Autoimmunity against the β_2 adrenergic receptor and muscarinic-2 receptor in complex regional pain syndrome. *Pain.* 2011. december;152(12):2690–700.
17. Marinus J, Moseley GL, Birklein F, Baron R, Maihöfner C, Kingery WS, és mtsai. Clinical features and pathophysiology of complex regional pain syndrome. *The Lancet Neurology.* 2011. július;10(7):637–48.
18. Maihofner C, Handwerker HO, Neundorfer B, Birklein F. Patterns of cortical reorganization in complex regional pain syndrome. *Neurology.* 2003. december 23.;61(12):1707–15.
19. Zyluk A. The Natural History of Post-Traumatic Reflex Sympathetic Dystrophy. *Journal of Hand Surgery.* 1998. február;23(1):20–3.
20. de Mos M, Huygen FJPM, van der Hoeven-Borgman M, Dieleman JP, Ch. Stricker BH, Sturkenboom MCJM. Outcome of the Complex Regional Pain Syndrome. *The Clinical Journal of Pain.* 2009. szeptember;25(7):590–7.
21. Huygen FJPM, de Bruijn AGJ, de Bruin MT, Groeneweg JG, Klein J, Zijlstra FJ. Evidence for local inflammation in complex regional pain syndrome type 1. *Mediators of Inflammation.* 2002;11(1):47–51.
22. Guo T-Z, Offley SC, Boyd EA, Jacobs CR, Kingery WS. Substance P signaling contributes to the vascular and nociceptive abnormalities observed in a tibial fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. *Pain.* 2004. március;108(1):95–107.
23. Kingery WS. Role of Neuropeptide, Cytokine, and Growth Factor Signaling in Complex Regional Pain Syndrome. *Pain Med.* 2010. augusztus;11(8):1239–50.
24. Massaad CA, Safieh-Garabedian B, Poole S, Atweh SF, Jabbur SJ, Saadé NE. Involvement of substance P, CGRP and histamine in the hyperalgesia and cytokine upregulation induced by intraplantar injection of capsaicin in rats. *Journal of Neuroimmunology.* 2004. augusztus;153(1–2):171–82.
25. Tékus V, Hajna Z, Borbély É, Markovics A, Bagoly T, Szolcsányi J, és mtsai. A CRPS-IgG-transfer-trauma model reproducing inflammatory and positive sensory signs associated with complex regional pain syndrome. *Pain.* 2014. február;155(2):299–308.
26. Helyes Z, Tékus V, Szentes N, Pohóczky K, Botz B, Kiss T, és mtsai. Transfer of complex regional pain syndrome to mice via human autoantibodies is mediated by interleukin-1–induced mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019. június 25.;116(26):13067–76.
27. Chopra P, Cooper MS. Treatment of Complex Regional Pain Syndrome (CRPS) Using Low Dose Naltrexone (LDN). *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013. június;8(3):470–6.
28. Del Valle L, Schwartzman RJ, Alexander G. Spinal cord histopathological alterations in a patient with longstanding complex regional pain syndrome. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2009. január;23(1):85–91.

29. Littlejohn G. Neurogenic neuroinflammation in fibromyalgia and complex regional pain syndrome. *Nat Rev Rheumatol*. 2015. november;11(11):639–48.
30. Cairns BE, Arendt-Nielsen L, Sacerdote P. Perspectives in Pain Research 2014: Neuroinflammation and glial cell activation: The cause of transition from acute to chronic pain? *Scandinavian Journal of Pain*. 2015. január 1.;6(1):3–6.
31. Kim J-H, Park J-S, Park D. Anti-allodynic effect of interleukin 10 in a mouse model of complex regional pain syndrome through reduction of NK1 receptor expression of microglia in the spinal cord. *JPR*. 2018. szeptember;Volume 11:1729–41.
32. Oaklander AL, Fields HL. Is reflex sympathetic dystrophy/complex regional pain syndrome type I a small-fiber neuropathy? *Ann Neurol*. 2009. június;65(6):629–38.
33. Martucci C, Trovato AE, Costa B, Borsani E, Franchi S, Magnaghi V, és mtsai. The purinergic antagonist PPADS reduces pain related behaviours and interleukin-1 β , interleukin-6, iNOS and nNOS overproduction in central and peripheral nervous system after peripheral neuropathy in mice. *Pain*. 2008. június;137(1):81–95.
34. Yin C, Hu Q, Liu B, Tai Y, Zheng X, Li Y, és mtsai. Transcriptome profiling of dorsal root ganglia in a rat model of complex regional pain syndrome type-I reveals potential mechanisms involved in pain. *JPR*. 2019. április;Volume 12:1201–16.
35. Kream RM. Epigenetic modification of DRG neuronal gene expression subsequent to nerve injury: Etiological contribution to Complex Regional Pain Syndromes (Part II). *Med Sci Monit*. 2014;20:1188–200.
36. Garg A, Danesh H. Neuromodulation of the Cervical Dorsal Root Ganglion for Upper Extremity Complex Regional Pain Syndrome-Case Report: Spinal Cord Stimulator for CRPS in the Right Arm. *Neuromodulation: Technology at the Neural Interface*. 2015. december;18(8):765–8.
37. Van Buyten J-P, Smet I, Liem L, Russo M, Huygen F. Stimulation of Dorsal Root Ganglia for the Management of Complex Regional Pain Syndrome: A Prospective Case Series. *Pain Pract*. 2015. március;15(3):208–16.
38. Mazzardo-Martins L, Salm DC, Winkelmann-Duarte EC, Ferreira JK, Lüdtke DD, Frech KP, és mtsai. Electroacupuncture induces antihyperalgesic effect through endothelin-B receptor in the chronic phase of a mouse model of complex regional pain syndrome type I. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2018. december;470(12):1815–27.
39. Hu Q, Zheng X, Li X, Liu B, Yin C, Li Y, és mtsai. Electroacupuncture Alleviates Mechanical Allodynia in a Rat Model of Complex Regional Pain Syndrome Type-I via Suppressing Spinal CXCL12/CXCR4 Signaling. *The Journal of Pain*. 2020. szeptember;21(9–10):1060–74.
40. Gilron I, Baron R, Jensen T. Neuropathic Pain: Principles of Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. 2015. április;90(4):532–45.
41. Resmini G. Treatment of complex regional pain syndrome. *ccmbm* [Internet]. 2015 [idézi 2021. február 13.]; Elérhető:

<http://www.ccmbm.com/common/php/portiere.php?ID=32ebf01afbf1d1709beb36071af91c26>

42. Dunn KM. Opioid Prescriptions for Chronic Pain and Overdose: A Cohort Study. *Ann Intern Med.* 2010. január 19.;152(2):85.
43. Mackey S, Feinberg S. Pharmacologic therapies for complex regional pain syndrome. *Curr Pain Headache Rep.* 2007. március;11(1):38–43.
44. Baltenberger EP, Buterbaugh WM, Martin BS, Thomas CJ. Review of antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Mental Health Clinician.* 2015. május 1.;5(3):123–33.
45. Wesseldijk F, Huygen FJPM, Heijmans-Antonissen C, Niehof SP, Zijlstra FJ. Six Years Follow-up of the Levels of TNF- α and IL-6 in Patients with Complex Regional Pain Syndrome Type 1. *Mediators of Inflammation.* 2008;2008:1–7.
46. Lenz M, Üçeyler N, Frettlöh J, Höffken O, Krumova EK, Lissek S, és mtsai. Local cytokine changes in complex regional pain syndrome type I (CRPS I) resolve after 6 months. *Pain.* 2013. október;154(10):2142–9.
47. Atalay NS, Ercidogan O, Akkaya N, Sahin F. Prednisolone in Complex Regional Pain Syndrome. *Pain Physician.* :8.
48. Jamroz A, Berger M, Winston P. Prednisone for Acute Complex Regional Pain Syndrome: A Retrospective Cohort Study. *Pain Research and Management.* 2020. február 25.;2020:1–10.
49. Braus DF, Krauss JK, Strobel J. The shoulder-hand syndrome after stroke: A prospective clinical trial. *Ann Neurol.* 1994. november;36(5):728–33.
50. Kalita J, Vajpayee A, Misra UK. Comparison of prednisolone with piroxicam in complex regional pain syndrome following stroke: a randomized controlled trial. *QJM: An International Journal of Medicine.* 2006. február 1.;99(2):89–95.
51. Manicourt D-H, Brasseur J-P, Boutsen Y, Depreseux G, Devogelaer J-P. Role of alendronate in therapy for posttraumatic complex regional pain syndrome type I of the lower extremity. *Arthritis & Rheumatism.* 2004. november;50(11):3690–7.
52. Breuer B, Pappagallo M, Ongseng F, Chen C-I, Goldfarb R. An Open-label Pilot Trial of Ibandronate for Complex Regional Pain Syndrome. *The Clinical Journal of Pain.* 2008. október;24(8):685–9.
53. Simm PJ, Briody J, McQuade M, Munns CF. The successful use of pamidronate in an 11-year-old girl with complex regional pain syndrome: Response to treatment demonstrated by serial peripheral quantitative computerised tomographic scans. *Bone.* 2010. április;46(4):885–8.
54. Varenna M, Crotti C. Bisphosphonates in the treatment of complex regional pain syndrome: is bone the main player at early stage of the disease? *Rheumatol Int.* 2018. november;38(11):1959–62.

55. Sindrup SH, Bach FW, Madsen C, Gram LF, Jensen TS. Venlafaxine versus imipramine in painful polyneuropathy: A randomized, controlled trial. *Neurology*. 2003. április 22.;60(8):1284–9.
56. Rowbotham MC. Pharmacologic Management of Complex Regional Pain Syndrome. *Clin J Pain*. 2006;22(5):5.
57. O’Connell NE, Wand BM, McAuley JH, Marston L, Moseley GL. Interventions for treating pain and disability in adults with complex regional pain syndrome- an overview of systematic reviews. *Cochrane Pain, Palliative and Supportive Care Group, szerkesztő. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]*. 2013. április 30. [idézi 2021. február 13.]; Elérhető: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD009416.pub2>
58. Pintér E, Helyes Z, Németh J, Pórszász R, Pethő G, Thán M, és mtsai. Pharmacological characterisation of the somatostatin analogue TT-232: effects on neurogenic and non-neurogenic inflammation and neuropathic hyperalgesia. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*. 2002. augusztus 1.;366(2):142–50.
59. Szolcsányi J, Bölcsei K, Szabó Á, Pintér E, Pethő G, Elekes K, és mtsai. Analgesic effect of TT-232, a heptapeptide somatostatin analogue, in acute pain models of the rat and the mouse and in streptozotocin-induced diabetic mechanical allodynia. *European Journal of Pharmacology*. 2004. szeptember;498(1–3):103–9.
60. Helyes Z, Pinter E, Sandor K, Elekes K, Banvolgyi A, Keszthelyi D, és mtsai. Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. augusztus 4.;106(31):13088–93.
61. Kecskés A, Pohóczky K, Kecskés M, Varga ZV, Kormos V, Szőke É, és mtsai. Characterization of Neurons Expressing the Novel Analgesic Drug Target Somatostatin Receptor 4 in Mouse and Human Brains. *IJMS*. 2020. október 21.;21(20):7788.
62. Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z, Peth G. Inhibition of the Function of TRPV1-Expressing Nociceptive Sensory Neurons by Somatostatin 4 Receptor Agonism: Mechanism and Therapeutical Implications. :11.
63. Scheich B, Gaszner B, Kormos V, László K, Ádori C, Borbély É, és mtsai. Somatostatin receptor subtype 4 activation is involved in anxiety and depression-like behavior in mouse models. *Neuropharmacology*. 2016. február;101:204–15.
64. Kántás B, Börzsei R, Szőke É, Bánhegyi P, Horváth Á, Hunyady Á, és mtsai. Novel Drug-Like Somatostatin Receptor 4 Agonists are Potential Analgesics for Neuropathic Pain. *IJMS*. 2019. december 11.;20(24):6245.
65. Clinical Development Pipeline | Science | Eli Lilly and Company [Internet]. [idézi 2021. február 13.]. Elérhető: <https://www.lilly.com/discovery/clinical-development-pipeline>
66. Szőke É, Bálint M, Hetényi C, Markovics A, Elekes K, Pozsgai G, és mtsai. Small molecule somatostatin receptor subtype 4 (sst4) agonists are novel anti-inflammatory and analgesic drug candidates. *Neuropharmacology*. 2020. november;178:108198.

67. admin. Home [Internet]. Algonist Biotechnologies. [idézi 2021. február 13.]. Elérhető: <https://algonist.com/>
68. Zeyda T, Diehl N, Paylor R, Brennan MB, Hochgeschwender U. Impairment in motor learning of somatostatin null mutant mice. *Brain Research*. 2001. július;906(1–2):107–14.
69. Viollet C, Lepousez G, Loudes C, Videau C, Simon A, Epelbaum J. Somatostatinergic systems in brain: Networks and functions. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2008. május;286(1–2):75–87.
70. Engin E, Stellbrink J, Treit D, Dickson CT. Anxiolytic and antidepressant effects of intracerebroventricularly administered somatostatin: Behavioral and neurophysiological evidence. *Neuroscience*. 2008. december;157(3):666–76.
71. Lin LC, Sibille E. Somatostatin, neuronal vulnerability and behavioral emotionality. *Mol Psychiatry*. 2015. március;20(3):377–87.
72. Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang S-M, és mtsai. Somatostatin regulates brain amyloid β peptide A β 42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med*. 2005. április;11(4):434–9.
73. Parsons JA, Erlandsen SL, Hegre OD, McEvoy RC, Elde RP. Central and peripheral localization of somatostatin. Immunoenzyme immunocytochemical studies. *J Histochem Cytochem*. 1976. július;24(7):872–82.
74. Reichlin S. Somatostatin. *N Engl J Med*. 1983. december 15.;309(24):1495–501.
75. Brazeau P. Somatostatin: A peptide with unexpected physiologic activities. *The American Journal of Medicine*. 1986. december;81(6):8–13.
76. de Lecea L, Criado JR, Prospero-García Ó, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE, és mtsai. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature*. 1996. május;381(6579):242–5.
77. Epelbaum J. Somatostatin in the central nervous system: Physiology and pathological modifications. *Progress in Neurobiology*. 1986. január;27(1):63–100.
78. Martel G, Dutar P, Epelbaum J, Viollet C. Somatostatinergic systems: an update on brain functions in normal and pathological aging. *Front Endocrin* [Internet]. 2012 [idézi 2021. február 13.];3. Elérhető: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2012.00154/abstract>
79. Leblanc H, Anderson JR, Sigel MB, Yen SSC. Inhibitory Action of Somatostatin on Pancreatic α and β Cell Function. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1975. április;40(4):568–72.
80. Helyes Z, Pintér E, Németh J, Sándor K, Elekes K, Szabó Á, és mtsai. Effects of the somatostatin receptor subtype 4 selective agonist J-2156 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rodents: Effect of J-2156 on inflammatory reactions. *British Journal of Pharmacology*. 2006. október;149(4):405–15.

81. Gulyás AI, Hájos N, Katona I, Freund TF. Interneurons are the local targets of hippocampal inhibitory cells which project to the medial septum: Targets of hippocampo-septal GABAergic neurons. *European Journal of Neuroscience*. 2003. május;17(9):1861–72.
82. Tomioka R, Okamoto K, Furuta T, Fujiyama F, Iwasato T, Yanagawa Y, és mtsai. Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. *European Journal of Neuroscience*. 2005. március;21(6):1587–600.
83. Guilloux J-P, Douillard-Guilloux G, Kota R, Wang X, Gardier AM, Martinowich K, és mtsai. Molecular evidence for BDNF- and GABA-related dysfunctions in the amygdala of female subjects with major depression. *Mol Psychiatry*. 2012. november;17(11):1130–42.
84. Sibille E, Morris HM, Kota RS, Lewis DA. GABA-related transcripts in the dorsolateral prefrontal cortex in mood disorders. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2011. július;14(6):721–34.
85. Tripp A, Kota RS, Lewis DA, Sibille E. Reduced somatostatin in subgenual anterior cingulate cortex in major depression. *Neurobiology of Disease*. 2011. április;42(1):116–24.
86. Baraban SC, Tallent MK. Interneuron Diversity series: Interneuronal neuropeptides – endogenous regulators of neuronal excitability. *Trends in Neurosciences*. 2004. március;27(3):135–42.
87. Thán M, Németh J, Szilvássy Z, Pintér E, Helyes Z, Szolcsányi J. Systemic anti-inflammatory effect of somatostatin released from capsaicin-sensitive vagal and sciatic sensory fibres of the rat and guinea-pig. *European Journal of Pharmacology*. 2000. július;399(2–3):251–8.
88. Schindler M, Humphrey PPA, Emson PC. Somatostatin receptors in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*. 1996. szeptember;50(1):9–47.
89. Vezzani A, Hoyer D. Brain somatostatin: a candidate inhibitory role in seizures and epileptogenesis: Brain somatostatin. *European Journal of Neuroscience*. 1999. november;11(11):3767–76.
90. Lin L-C, Sibille E. Reduced brain somatostatin in mood disorders: a common pathophysiological substrate and drug target? *Front Pharmacol* [Internet]. 2013 [idézi 2021. február 13.];4. Elérhető: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2013.00110/abstract>
91. Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PPA, és mtsai. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1995. március;16(3):86–8.
92. Selmer I-S, Schindler M, Allen JP, Humphrey PPA, Emson PC. Advances in understanding neuronal somatostatin receptors. *Regulatory Peptides*. 2000. június;90(1–3):1–18.
93. Engin E, Treit D. Anxiolytic and antidepressant actions of somatostatin: the role of sst2 and sst3 receptors. *Psychopharmacology*. 2009. október;206(2):281–9.

94. Prévôt TD, Gastambide F, Viollet C, Henkous N, Martel G, Epelbaum J, és mtsai. Roles of Hippocampal Somatostatin Receptor Subtypes in Stress Response and Emotionality. *Neuropsychopharmacol.* 2017. július;42(8):1647–56.
95. Scheich B, Csekő K, Borbély É, Ábrahám I, Csernus V, Gaszner B, és mtsai. Higher susceptibility of somatostatin 4 receptor gene-deleted mice to chronic stress-induced behavioral and neuroendocrine alterations. *Neuroscience.* 2017. március;346:320–36.
96. Sándor K, Elekes K, Szabó Á, Pintér E, Engström M, Wurster S, és mtsai. Analgesic effects of the somatostatin sst4 receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models. *European Journal of Pharmacology.* 2006. június;539(1–2):71–5.
97. Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1992. december 1.;89(23):11151–5.
98. Santis S, Kastellakis A, Kotzamani D, Pitarokoili K, Kokona D, Thermos K. Somatostatin increases rat locomotor activity by activating sst2 and sst4 receptors in the striatum and via glutamatergic involvement. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* 2009. február;379(2):181–9.
99. Viollet C, Bodenant C, Prunotto C, Roosterman D, Schaefer J, Meyerhof W, és mtsai. Differential Expression of Multiple Somatostatin Receptors in the Rat Cerebellum During Development. *Journal of Neurochemistry.* 2002. november 18.;68(6):2263–72.
100. Gastambide F, Lepousez G, Viollet C, Loudes C, Epelbaum J, Guillou J-L. Cooperation between hippocampal somatostatin receptor subtypes 4 and 2: Functional relevance in interactive memory systems. *Hippocampus.* 2009;NA-NA.
101. Nakagawasai O, Hozumi S, Tan-No K, Nijima F, Arai Y, Yasuhara H, és mtsai. Immunohistochemical fluorescence intensity reduction of brain somatostatin in the impairment of learning and memory-related behaviour induced by olfactory bulbectomy. *Behavioural Brain Research.* 2003. június;142(1–2):63–7.
102. Schreff M, Schulz S, Händel M, Keilhoff G, Braun H, Pereira G, és mtsai. Distribution, Targeting, and Internalization of the sst 4 Somatostatin Receptor in Rat Brain. *J Neurosci.* 2000. május 15.;20(10):3785–97.
103. Nemes B, Bölskei K, Kecskés A, Kormos V, Gaszner B, Aczél T, és mtsai. Human Somatostatin SST4 Receptor Transgenic Mice: Construction and Brain Expression Pattern Characterization. *IJMS.* 2021. április 4.;22(7):3758.
104. Schuelert N, Just S, Kuelzer R, Corradini L, Gorham LCJ, Doods H. The somatostatin receptor 4 agonist J-2156 reduces mechanosensitivity of peripheral nerve afferents and spinal neurons in an inflammatory pain model. *European Journal of Pharmacology.* 2015. január;746:274–81.
105. Shenoy PA, Kuo A, Khan N, Gorham L, Nicholson JR, Corradini L, és mtsai. The Somatostatin Receptor-4 Agonist J-2156 Alleviates Mechanical Hypersensitivity in a Rat Model of Breast Cancer Induced Bone Pain. *Front Pharmacol.* 2018. május 15.;9:495.

106. Fent T. Department of Economic and Social Affairs, Population Division, United Nations Expert Group Meeting on Social and Economic Implications of Changing Population Age Structures: New York, 2007, 386 pp. *Eur J Population*. 2008. december;24(4):451–2.
107. Beard JR, Officer AM, Cassels AK. *The World Report on Ageing and Health*. GERONT. 2016. április;56(Suppl 2):S163–6.
108. Schaie KW. *Developmental Influences on Adult Intelligence* [Internet]. Oxford University Press; 2005 [idézi 2021. február 14.]. Elérhető: <https://oxford.universitypressscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780195156737.01.0001/acprof-9780195156737>
109. Lloyd P. *The Psychology of Ageing: An Introduction*, * Ian Stuart-Hamilton, * London, Jessica Kingsley Publishers, 4th edn, 2006, pp. 352, ISBN 1843104261, 19.99. *British Journal of Social Work*. 2007. március 17.;37(3):584–6.
110. Larson EB, Yaffe K, Langa KM. *New Insights into the Dementia Epidemic*. *N Engl J Med*. 2013. december 12.;369(24):2275–7.
111. Florio T, Ventra C, Postiglione A, Schettini G. Age-related alterations of somatostatin gene expression in different rat brain areas. *Brain Research*. 1991. augusztus;557(1–2):64–8.
112. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, és mtsai. Identification of the major A β 1–42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med*. 2000. február;6(2):143–50.
113. Hellström-Lindahl E, Ravid R, Nordberg A. Age-dependent decline of neprilysin in Alzheimer's disease and normal brain: Inverse correlation with A β levels. *Neurobiology of Aging*. 2008. február;29(2):210–21.
114. Sandoval KE, Farr SA, Banks WA, Niehoff ML, Morley JE, Crider AM, és mtsai. Chronic peripheral administration of somatostatin receptor subtype-4 agonist NNC 26-9100 enhances learning and memory in SAMP8 mice. *European Journal of Pharmacology*. 2011. március;654(1):53–9.
115. Ruan Q, D'Onofrio G, Sancarlo D, Greco A, Lozupone M, Seripa D, és mtsai. Emerging biomarkers and screening for cognitive frailty. *Aging Clin Exp Res*. 2017. december;29(6):1075–86.
116. Kuwahara S, Kesuma Sari D, Tsukamoto Y, Tanaka S, Sasaki F. Age-related changes in growth hormone (GH)-releasing hormone and somatostatin neurons in the hypothalamus and in GH cells in the anterior pituitary of female mice. *Brain Research*. 2004. október;1025(1–2):113–22.
117. Kim K, Choe HK. Role of hypothalamus in aging and its underlying cellular mechanisms. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2019. január;177:74–9.
118. Giustina A, Veldhuis JD. *Pathophysiology of the Neuroregulation of Growth Hormone Secretion in Experimental Animals and the Human*. 1998;19(6):81.

119. Vedovelli K, Giacobbo BL, Corrêa MS, Wieck A, Argimon II de L, Bromberg E. Multimodal physical activity increases brain-derived neurotrophic factor levels and improves cognition in institutionalized older women. *GeroScience*. 2017. augusztus;39(4):407–17.
120. Tenk J, Rostás I, Füredi N, Mikó A, Solymár M, Soós S, és mtsai. Age-related changes in central effects of corticotropin-releasing factor (CRF) suggest a role for this mediator in aging anorexia and cachexia. *GeroScience*. 2017. február;39(1):61–72.
121. Ashpole NM, Logan S, Yabluchanskiy A, Mitschelen MC, Yan H, Farley JA, és mtsai. IGF-1 has sexually dimorphic, pleiotropic, and time-dependent effects on healthspan, pathology, and lifespan. *GeroScience*. 2017. április;39(2):129–45.
122. Fang Y, McFadden S, Darcy J, Hill CM, Huber JA, Verhulst S, és mtsai. Differential effects of early-life nutrient restriction in long-lived GHR-KO and normal mice. *GeroScience*. 2017. június;39(3):347–56.
123. Reglodi D, Atlasz T, Szabo E, Jungling A, Tamas A, Juhasz T, és mtsai. PACAP deficiency as a model of aging. *GeroScience*. 2018. december;40(5–6):437–52.
124. Spik K, Sonntag WE. Increased Pituitary Response to Somatostatin in Aging Male Rats: Relationship to Somatostatin Receptor Number and Affinity. *Neuroendocrinology*. 1989;50(5):489–94.
125. Ungvari Z, Valcarcel-Ares MN, Tarantini S, Yabluchanskiy A, Fülöp GA, Kiss T, és mtsai. Connective tissue growth factor (CTGF) in age-related vascular pathologies. *GeroScience*. 2017. december;39(5–6):491–8.
126. Bouton ME. Extinction of instrumental (operant) learning: interference, varieties of context, and mechanisms of contextual control. *Psychopharmacology*. 2019. január;236(1):7–19.
127. Clark RE. A History and Overview of the Behavioral Neuroscience of Learning and Memory. In Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018 [idézi 2021. február 13.]. (Current Topics in Behavioral Neurosciences). Elérhető: http://link.springer.com/10.1007/7854_2017_37
128. Thompson RF, Kim JJ. Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996. november 26.;93(24):13438–44.
129. Cowan N. Chapter 20 What are the differences between long-term, short-term, and working memory? In: *Progress in Brain Research* [Internet]. Elsevier; 2008 [idézi 2021. február 14.]. o. 323–38. Elérhető: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079612307000209>
130. Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain: Animal models of neuropathic pain. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2011. február;25(1):1–28.
131. Challa SR. Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. *International Journal of Neuroscience*. 2015. március 4.;125(3):170–4.

132. Wahl D, Coogan S, Solon-Biet S, de Cabo R, Haran J, Raubenheimer D, és mtsai. Cognitive and behavioral evaluation of nutritional interventions in rodent models of brain aging and dementia. *CIA*. 2017. szeptember;Volume 12:1419–28.
133. Ungvari Z, Tarantini S, Hertelendy P, Valcarcel-Ares MN, Fülöp GA, Logan S, és mtsai. Cerebromicrovascular dysfunction predicts cognitive decline and gait abnormalities in a mouse model of whole brain irradiation-induced accelerated brain senescence. *GeroScience*. 2017. február;39(1):33–42.
134. Logan S, Owen D, Chen S, Chen W-J, Ungvari Z, Farley J, és mtsai. Simultaneous assessment of cognitive function, circadian rhythm, and spontaneous activity in aging mice. *GeroScience*. 2018. április;40(2):123–37.
135. Borbély É, Scheich B, Helyes Z. Neuropeptides in learning and memory. *Neuropeptides*. 2013. december;47(6):439–50.
136. Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet* [Internet]. 2014. április 23. [idézi 2021. február 13.];5. Elérhető: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2014.00088/abstract>
137. Yan H-C, Cao X, Das M, Zhu X-H, Gao T-M. Behavioral animal models of depression. *Neurosci Bull*. 2010. augusztus;26(4):327–37.
138. Burke SN, Ryan L, Barnes CA. Characterizing cognitive aging of recognition memory and related processes in animal models and in humans. *Front Ag Neurosci* [Internet]. 2012 [idézi 2021. február 13.];4. Elérhető: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2012.00015/abstract>
139. Engle JR, Barnes CA. Characterizing cognitive aging of associative memory in animal models. *Front Ag Neurosci* [Internet]. 2012 [idézi 2021. február 13.];4. Elérhető: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2012.00010/abstract>
140. Foster TC, DeFazio RA, Bizon JL. Characterizing cognitive aging of spatial and contextual memory in animal models. *Front Ag Neurosci* [Internet]. 2012 [idézi 2021. február 13.];4. Elérhető: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2012.00012/abstract>
141. Kosik KS, Rapp PR, Raz N, Small SA, Sweatt JD, Tsai L-H. Mechanisms of Age-Related Cognitive Change and Targets for Intervention: Epigenetics. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2012. július 1.;67(7):741–6.
142. Toyka K, Brachman D, Pestronk A, Kao I. Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse. *Science*. 1975. október 24.;190(4212):397–9.
143. Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, és mtsai. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*. 2013. január;38(1):79–91.

144. Goebel A, Jacob A, Frank B, Sacco P, Alexander G, Philips C, és mtsai. Mycophenolate for persistent complex regional pain syndrome, a parallel, open, randomised, proof of concept trial. *Scandinavian Journal of Pain*. 2018. január 26.;18(1):29–37.
145. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. 1996. március;64(3):493–502.
146. Banik RK, Woo YC, Park SS, Brennan TJ. Strain and Sex Influence on Pain Sensitivity after Plantar Incision in the Mouse. *Anesthesiology*. 2006. december 1.;105(6):1246–53.
147. Füredi R, Bölcseki K, Szolcsányi J, Pethő G. Effects of analgesics on the plantar incision-induced drop of the noxious heat threshold measured with an increasing-temperature water bath in the rat. *European Journal of Pharmacology*. 2009. március;605(1–3):63–7.
148. Szabó Á, Helyes Z, Sándor K, Bite A, Pintér E, Németh J, és mtsai. Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptors in Adjuvant-Induced Chronic Arthritis: In Vivo Study Using Gene-Deficient Mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005. július;314(1):111–9.
149. Horváth Á, Tékus V, Boros M, Pozsgai G, Botz B, Borbély É, és mtsai. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: in vivo study using TRPA1-deficient mice. *Arthritis Res Ther*. 2016. december;18(1):6.
150. Imada I, Sato EF, Miyamoto M, Ichimori Y, Minamiyama Y, Konaka R, és mtsai. Analysis of Reactive Oxygen Species Generated by Neutrophils Using a Chemiluminescence Probe L-012. *Analytical Biochemistry*. 1999. június;271(1):53–8.
151. Aczél T, Kun J, Szőke É, Rauch T, Junttila S, Gyenesei A, és mtsai. Transcriptional Alterations in the Trigeminal Ganglia, Nucleus and Peripheral Blood Mononuclear Cells in a Rat Orofacial Pain Model. *Front Mol Neurosci*. 2018. június 26.;11:219.
152. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, és mtsai. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013. január;29(1):15–21.
153. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Research*. 2019. május 7.;47(8):e47–e47.
154. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010. január 1.;26(1):139–40.
155. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol*. 2014;15(2):R29.
156. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, és mtsai. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*. 2015. április 20.;43(7):e47–e47.
157. Gene Ontology Resource [Internet]. Gene Ontology Resource. [idézi 2021. február 14.]. Elérhető: <http://geneontology.org/>

158. KEGG Database [Internet]. [idézi 2021. február 14.]. Elérhető: <https://www.genome.jp/kegg/kegg1.html>
159. Home - Reactome Pathway Database [Internet]. [idézi 2021. február 14.]. Elérhető: <https://reactome.org/>
160. Luo W, Brouwer C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics*. 2013. július 15.;29(14):1830–1.
161. Scheich B, Vincze P, Szőke É, Borbély É, Hunyady Á, Szolcsányi J, és mtsai. Chronic stress-induced mechanical hyperalgesia is controlled by capsaicin-sensitive neurones in the mouse. *Eur J Pain*. 2017. szeptember;21(8):1417–31.
162. Holcomb LA, Gordon MN, Jantzen P, Hsiao K, Duff K, Morgan D. Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: Lack of association with amyloid deposits. :9.
163. Hullmann M, Albrecht C, van Berlo D, Gerlofs-Nijland ME, Wahle T, Boots AW, és mtsai. Diesel engine exhaust accelerates plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Part Fibre Toxicol*. 2017. december;14(1):35.
164. Frick KM, Burlingame LA, Arters JA, Berger-Sweeney J. Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience*. 1999. november;95(1):293–307.
165. Gresack JE, Frick KM. Male mice exhibit better spatial working and reference memory than females in a water-escape radial arm maze task. *Brain Research*. 2003. augusztus;982(1):98–107.
166. Zhang H-T, O'Donnell JM. Effects of rolipram on scopolamine-induced impairment of working and reference memory in the radial-arm maze tests in rats. *Psychopharmacology*. 2000. június;150(3):311–6.
167. Astur RS, Tropp J, Sava S, Constable RT, Markus EJ. Sex differences and correlations in a virtual Morris water task, a virtual radial arm maze, and mental rotation☆. *Behavioural Brain Research*. 2004. május 5.;151(1–2):103–15.
168. Crusio WE, Schwegler H. [No title found]. *Behav Brain Funct*. 2005;1(1):3.
169. Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study „recognition memory”. *Nat Protoc*. 2006. augusztus;1(3):1306–11.
170. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural Brain Research*. 2002. augusztus;134(1–2):49–57.
171. Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglodi D, Helyes Z. The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger–Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*. 2012. január;202:283–99.

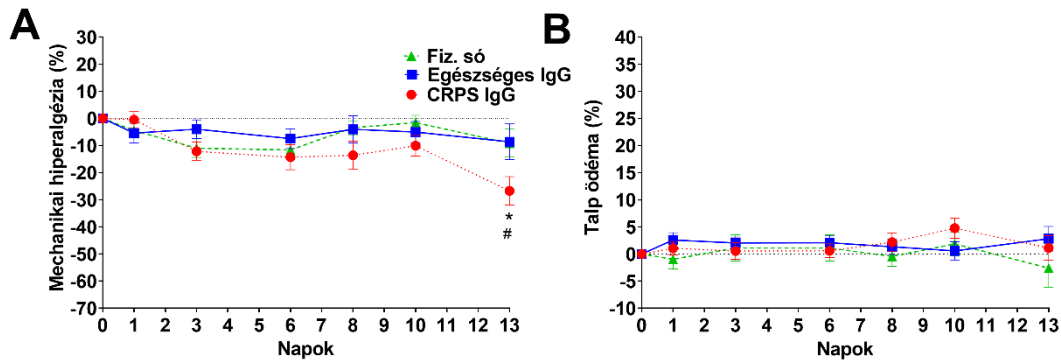
172. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*. 2012. május;13(2):93–110.
173. Fekete R, Cserép C, Lénárt N, Tóth K, Orsolits B, Martinecz B, és mtsai. Microglia control the spread of neurotropic virus infection via P2Y12 signalling and recruit monocytes through P2Y12-independent mechanisms. *Acta Neuropathol*. 2018. szeptember;136(3):461–82.
174. Veldman PHJM, Reynen HM, Arntz IE, Goris RJA. Signs and symptoms of reflex sympathetic dystrophy: prospective study of 829 patients. *The Lancet*. 1993. október;342(8878):1012–6.
175. Staff NP, Engelstad J, Klein CJ, Amrami KK, Spinner RJ, Dyck PJ, és mtsai. Post-surgical inflammatory neuropathy. *Brain*. 2010. október 1.;133(10):2866–80.
176. Birklein F, Ajit SK, Goebel A, Perez RSGM, Sommer C. Complex regional pain syndrome — phenotypic characteristics and potential biomarkers. *Nat Rev Neurol*. 2018. május;14(5):272–84.
177. Guo W, Wang H, Watanabe M, Shimizu K, Zou S, LaGraize SC, és mtsai. Glial-Cytokine-Neuronal Interactions Underlying the Mechanisms of Persistent Pain. *Journal of Neuroscience*. 2007. május 30.;27(22):6006–18.
178. Inoue K, Tsuda M. Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Neurosci*. 2018. március;19(3):138–52.
179. Matsuda M, Huh Y, Ji R-R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. *J Anesth*. 2019. február;33(1):131–9.
180. Chen R, Yin C, Hu Q, Liu B, Tai Y, Zheng X, és mtsai. Expression profiling of spinal cord dorsal horn in a rat model of complex regional pain syndrome type-I uncovers potential mechanisms mediating pain and neuroinflammation responses. *J Neuroinflammation*. 2020. december;17(1):162.
181. Manteniotis S, Lehmann R, Flegel C, Vogel F, Hofreuter A, Schreiner BSP, és mtsai. Comprehensive RNA-Seq Expression Analysis of Sensory Ganglia with a Focus on Ion Channels and GPCRs in Trigeminal Ganglia. Zhang Z, szerkesztő. *PLoS ONE*. 2013. november 8.;8(11):e79523.
182. Gong L, Wu J, Zhou S, Wang Y, Qin J, Yu B, és mtsai. Global analysis of transcriptome in dorsal root ganglia following peripheral nerve injury in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016. szeptember;478(1):206–12.
183. Stephens KE, Zhou W, Ji Z, Chen Z, He S, Ji H, és mtsai. Sex differences in gene regulation in the dorsal root ganglion after nerve injury. *BMC Genomics*. 2019. december;20(1):147.
184. Ray P, Torck A, Quigley L, Wangzhou A, Neiman M, Rao C, és mtsai. Comparative transcriptome profiling of the human and mouse dorsal root ganglia: an RNA-seq-based resource for pain and sensory neuroscience research. *Pain*. 2018. július;159(7):1325–45.

185. Kinfe T, Buchfelder M, Chaudhry S, Chakravarthy K, Deer T, Russo M, és mtsai. Leptin and Associated Mediators of Immunometabolic Signaling: Novel Molecular Outcome Measures for Neurostimulation to Treat Chronic Pain. *IJMS*. 2019. szeptember 24.;20(19):4737.
186. Chen D, Gerasimčik N, Camponeschi A, Tan Y, Wu Q, Brynjolfsson S, és mtsai. CD27 expression and its association with clinical outcome in children and adults with pro-B acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J*. 2017. június;7(6):e575–e575.
187. Niemelä V, Burman J, Blennow K, Zetterberg H, Larsson A, Sundblom J. Cerebrospinal fluid sCD27 levels indicate active T cell-mediated inflammation in premanifest Huntington’s disease. *Trullas R, szerkesztő. PLoS ONE*. 2018. február 23.;13(2):e0193492.
188. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*. 2008. február;117(2):244–79.
189. Haraoui B, Bykerk V. Etanercept in the treatment of rheumatoid arthritis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. :8.
190. Grounds MD, Davies M, Torrasi J, Shavlakadze T, White J, Hodgetts S. Silencing TNF α activity by using Remicade or Enbrel blocks inflammation in whole muscle grafts: an in vivo bioassay to assess the efficacy of anti-cytokine drugs in mice. *Cell Tissue Res*. 2005. június;320(3):509–15.
191. Jung YG, Lane AP. Inhibition of Inflammation-Associated Olfactory Loss by Etanercept in an Inducible Olfactory Inflammation Mouse Model. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2016. június;154(6):1149–54.
192. Ye J, Jiang R, Cui M, Zhu B, Sun L, Wang Y, és mtsai. Etanercept Reduces Neuroinflammation and Lethality in Mouse Model of Japanese Encephalitis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014. szeptember 15.;210(6):875–89.
193. Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, Di Paola R, Muià C, Bramanti P, és mtsai. Immunomodulatory Effects of Etanercept in an Experimental Model of Spinal Cord Injury. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006. március;316(3):1006–16.
194. Venegas-Pont M, Manigrasso MB, Grifoni SC, LaMarca BB, Maric C, Racusen LC, és mtsai. Tumor Necrosis Factor- α Antagonist Etanercept Decreases Blood Pressure and Protects the Kidney in a Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus. *Hypertension*. 2010. október;56(4):643–9.
195. Jung Y-H, Kim H, Jeon SY, Kwon JM, Lee WJ, Kim YC, és mtsai. Brain Metabolites and Peripheral Biomarkers Associated with Neuroinflammation in Complex Regional Pain Syndrome Using [11C]-(R)-PK11195 Positron Emission Tomography and Magnetic Resonance Spectroscopy: A Pilot Study. *Pain Medicine*. 2019. március 1.;20(3):504–14.
196. De Logu F, De Prá SD-T, de David Antoniazzi CT, Kudsi SQ, Ferro PR, Landini L, és mtsai. Macrophages and Schwann cell TRPA1 mediate chronic allodynia in a mouse model of complex regional pain syndrome type I. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2020. augusztus;88:535–46.

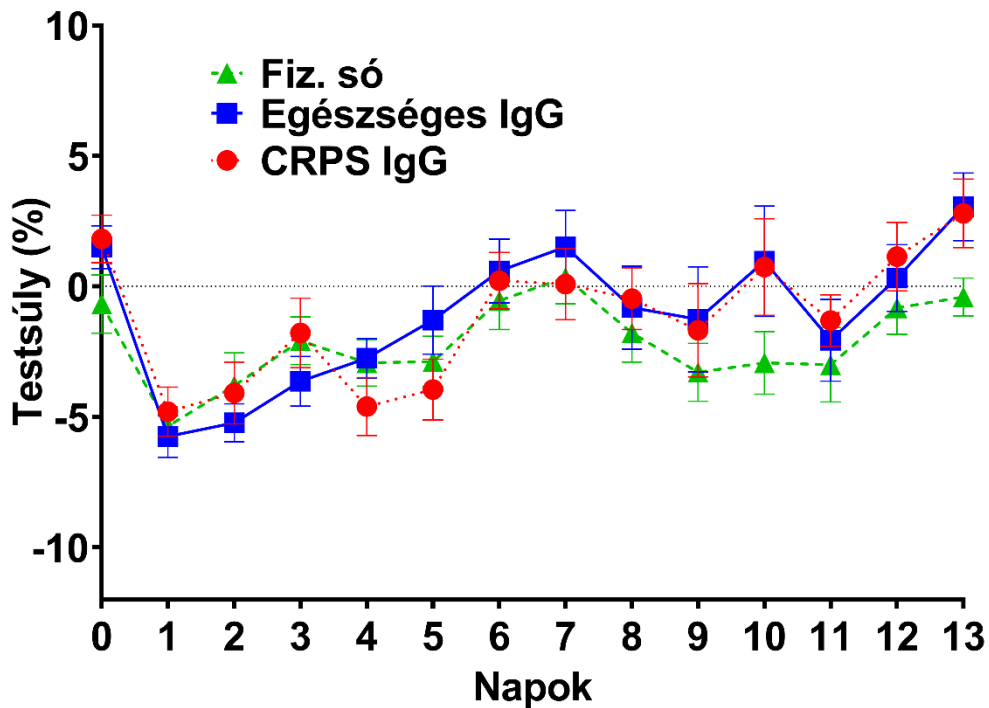
197. Mpofo S. Anti-TNF- therapies: they are all the same (aren't they?). *Rheumatology*. 2005. január 5.;44(3):271–3.
198. Langley RG, Kasichayanula S, Trivedi M, Aras GA, Kaliyaperumal A, Yuraszeck T, és mtsai. Pharmacokinetics, Immunogenicity, and Efficacy of Etanercept in Pediatric Patients With Moderate to Severe Plaque Psoriasis. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2018. március;58(3):340–6.
199. Chio C-C, Lin J-W, Chang M-W, Wang C-C, Kuo J-R, Yang C-Z, és mtsai. Therapeutic evaluation of etanercept in a model of traumatic brain injury: Etanercept in a traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry*. 2010. november;115(4):921–9.
200. Eisenberg E, Sandler I, Treister R, Suzan E, Haddad M. Anti tumor Necrosis Factor - Alpha Adalimumab for Complex Regional Pain Syndrome Type 1 (CRPS-I): A Case Series. *Pain Pract*. 2013. november;13(8):649–56.
201. Ghoreschi K, Jesson MI, Li X, Lee JL, Ghosh S, Alsup JW, és mtsai. Modulation of Innate and Adaptive Immune Responses by Tofacitinib (CP-690,550). *J*. 2011. április 1.;186(7):4234–43.
202. Hodge JA, Kawabata TT, Krishnaswami S, Clark JD, Dowty ME, Menon S, és mtsai. The mechanism of action of tofacitinib – an oral Janus kinase inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. :11.
203. Levy LL, Urban J, King BA. Treatment of recalcitrant atopic dermatitis with the oral Janus kinase inhibitor tofacitinib citrate. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2015. szeptember;73(3):395–9.
204. Jabbari A, Nguyen N, Cerise JE, Ulerio G, de Jong A, Clynes R, és mtsai. Treatment of an alopecia areata patient with tofacitinib results in regrowth of hair and changes in serum and skin biomarkers. *Exp Dermatol*. 2016. augusztus;25(8):642–3.
205. Dowty ME, Jesson MI, Ghosh S, Lee J, Meyer DM, Krishnaswami S, és mtsai. Preclinical to Clinical Translation of Tofacitinib, a Janus Kinase Inhibitor, in Rheumatoid Arthritis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014. január;348(1):165–73.
206. Yokoyama S, Perera P-Y, Waldmann TA, Hiroi T, Perera LP. Tofacitinib, a Janus Kinase Inhibitor Demonstrates Efficacy in an IL-15 Transgenic Mouse Model that Recapitulates Pathologic Manifestations of Celiac Disease. *J Clin Immunol*. 2013. április;33(3):586–94.
207. Yokoyama S, Perera P-Y, Terawaki S, Watanabe N, Kaminuma O, Waldmann TA, és mtsai. Janus Kinase Inhibitor Tofacitinib Shows Potent Efficacy in a Mouse Model of Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS). *J Clin Immunol*. 2015. október;35(7):661–7.
208. Maiga M, Ahidjo BA, Maiga MC, Cheung L, Pelly S, Lun S, és mtsai. Efficacy of Adjunctive Tofacitinib Therapy in Mouse Models of Tuberculosis. *EBioMedicine*. 2015. augusztus;2(8):868–73.

209. Tian G, Luo X, Tang C, Cheng X, Chung SK, Xia Z, és mtsai. Astrocyte contributes to pain development via MMP2-JNK1/2 signaling in a mouse model of complex regional pain syndrome. *Life Sciences*. 2017. február;170:64–71.
210. Chiang C-Y, Sessle BJ, Dostrovsky JO. Role of Astrocytes in Pain. *Neurochem Res*. 2012. november;37(11):2419–31.
211. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, és mtsai. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017. január;541(7638):481–7.
212. Liu W, Tang Y, Feng J. Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sciences*. 2011. augusztus;89(5–6):141–6.
213. Denes A, Pinteaux E, Rothwell NJ, Allan SM. Interleukin-1 and Stroke: Biomarker, Harbinger of Damage, and Therapeutic Target. *Cerebrovasc Dis*. 2011;32(6):517–27.
214. Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat Rev Drug Discov*. 2010. szeptember;9(9):703–18.
215. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol*. 2005. augusztus;5(8):629–40.
216. Norman G, Eacott MJ. Impaired object recognition with increasing levels of feature ambiguity in rats with perirhinal cortex lesions. *Behavioural Brain Research*. 2004. január;148(1–2):79–91.
217. Barker GRI, Warburton EC. When Is the Hippocampus Involved in Recognition Memory? *Journal of Neuroscience*. 2011. július 20.;31(29):10721–31.
218. Maviel T. Sites of Neocortical Reorganization Critical for Remote Spatial Memory. *Science*. 2004. július 2.;305(5680):96–9.
219. Rhodes JS, Garland T, Gammie SC. Patterns of Brain Activity Associated With Variation in Voluntary Wheel-Running Behavior. *Behavioral Neuroscience*. 2003;117(6):1243–56.
220. Sutcliffe JS, Marshall KM, Neill JC. Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. *Behavioural Brain Research*. 2007. február;177(1):117–25.
221. Hughes RN. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2004. szeptember;28(5):497–505.
222. Sandoval KE, Farr SA, Banks WA, Crider AM, Morley JE, Witt KA. Somatostatin receptor subtype-4 agonist NNC 26–9100 decreases extracellular and intracellular A β 1–42 trimers. *European Journal of Pharmacology*. 2012. május;683(1–3):116–24.

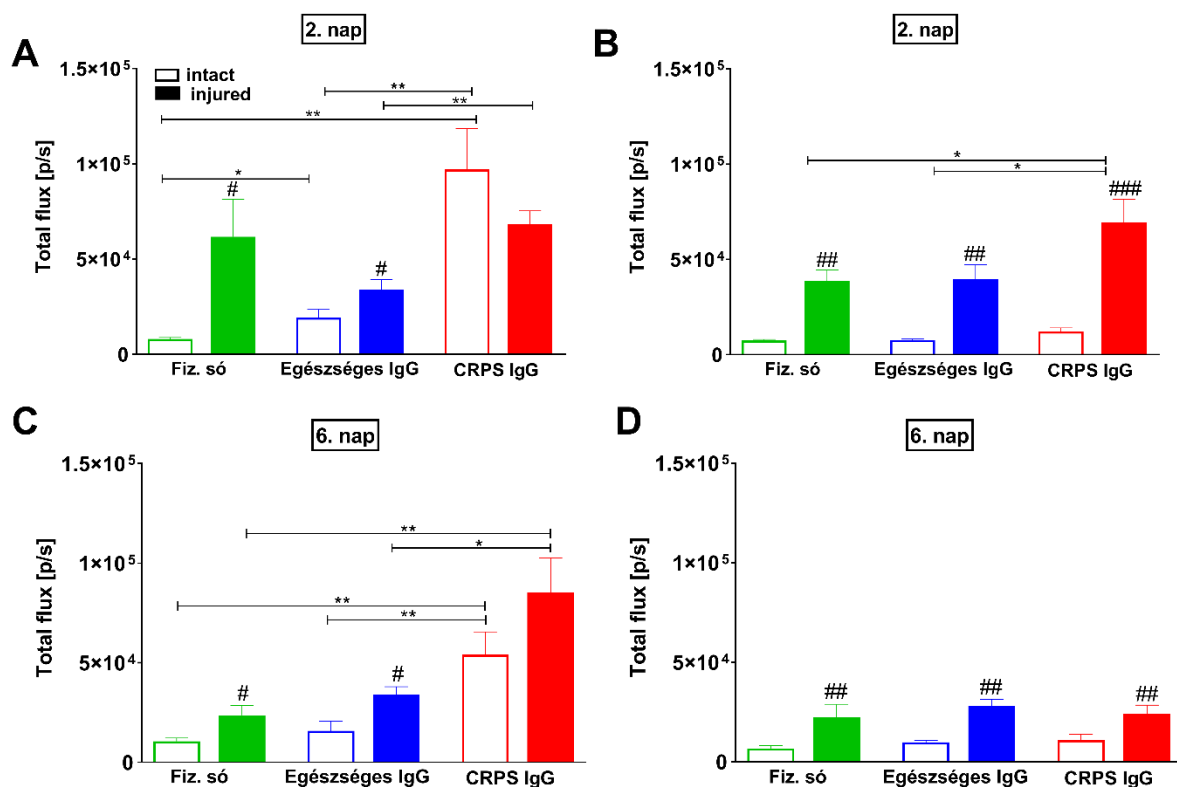
9. Mellékletek



1. ábra: CRPS betegekből és egészséges kontrollokból származó szérum IgG vagy fiziológias sóoldat kezelés hatása az ép (intakt) láb mechanikai hiperalgéria (A) és a talp ödéma mérése (B) során. A hosszú távú kísérletek összesített eredményeit mutatja az ábra (#2, #3, #4 IgG preparátumokból, sérült láb eredmények: 15. ábra). *Kétutas ANOVA Bonferroni többszörösen összehasonlító teszt; adatok átlaga \pm SEM.*



2. ábra: Testsúly változás az idő múlásával. A súlyokat minden reggel, az injekciós kezelés és / vagy a műtét előtt mértük. Az ábra két kísérletsorozat átlag értékeiből készült és a kezelés két CRPS IgG (#3, #4) vagy egészséges IgG készítményekkel történt. *Kétutas ANOVA Bonferroni többszörösen összehasonlító teszt; adatok átlaga \pm SEM.*



3. ábra: Kemilumineszcenciás mérés L-012-vel, a CRPS /egészséges IgG készítményekkel történő kezelés során a kísérlet 2. és 6. napján. A különböző IgG készítményekkel vagy fiziológiás sóoldattal kezelt egerek mérése általános érzéstelenítéssel történt az incízió utána 2. és 6. napon. Az #1. páciens IgG eredményei a 2. napon (A), két ismételt kísérlet összesített eredményeit a #3 számú IgG preparátummal a 2. napon (B), Az #1 és #4 páciens kemilumineszcenciás eredményei a 6. napon (C, D). Egyutas ANOVA Bonferroni többszörösen összehasonlító teszt; adatok átlaga \pm SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (vs. megfelelő kontroll csoport); # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ (vs. megfelelő ellen oldali (intakt) láb); $n = 6-12$ egér/csoport.

Páciensek	Napok						
	1	2	3	5	6	10	13
#2						7 ^c	
#1					7 ^c		
#5			6 ^c				
#3			6 ^{b,c}				
#3	6 ^c						
#3		6 ^c					
#3					6 ^c		
#3		6 ^c					
#3					6 ^{b,c}		
#3			6 ⁺				
#3			6 ^{b,c}				
#3							6 ^{b,c}
#4			6 ^c				
#4		6 ^c					
#4					6 ^{b,c}		
#3			7 ⁺				
#4							6 ^{b,c}
#4	6 ^c						
#4					5 ⁺		
#4					6 [*]		
#3					6 [*]		
#3							6 ^{* b,c}
#4					6-6 ^{b,c}		
#7				6 ^c			
#6					6 ^{b,c}		
Összegyűjtött szérumok					6 ^c		
#4 <i>IL-1αβ</i> KO					6 ^{b,c}		
#3 <i>IL-1αβ</i> KO					6 ^{b,c}		
#8 <i>M-IL-1β</i> KO					4 ^{b,c}		
#3 <i>M-IL-1β</i> KO					4 ^{b,c}		

1. táblázat: A kísérletek felsorolása az elvégzésük sorrendjében, csoportonként állatszámmal. #1 - #7 jelöli a betegek IgG készítményeit; +/* szteroid/anakinra kísérlet; „b” jelölés esetében történt a központi idegrendszer immunhisztokémiája, „c” jelölést használtunk, amikor funkcionális mérések és csak a mediátor szintek értékelése történt (nem volt terápia).

10. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

Transfer of complex regional pain syndrome to mice via human autoantibodies is mediated by interleukin-1-induced mechanisms

Helyes Zs, Tékus V, Szentes N, Pohóczky K, Botz B, Kiss T, Kemény Á, Környei Zs, Tóth K, Lénárt N, Ábrahám H, Pinteaux E, Francis S, Sensi S, Dénes Á, and Goebel A
PNAS (2019), 116(26)13067-13076
doi.org/10.1073/pnas.1820168116

Discovery of novel targets in a CRPS mouse model by transcriptomics: TNF and JAK - STAT pathway

Pohóczky K, Kun J, Szentes N, Aczel T, Urbán P, Gyenesei A, Bölcskei K, Szőke É, Sensi S, Dénes Á, Goebel A, Tékus V, Helyes Zs (beküldött kézirat, 2021)

Exploratory and locomotor activity, learning and memory functions in somatostatin receptor subtype 4 gene-deficient mice in relation to aging and sex

Szentes N, Tékus V, Mohos V, Borbély É, Helyes Zs
GeroScience (2019) 41:631–641
doi: 10.1007/s11357-019-00059-1.

11. Egyéb publikációk és konferencia elismerések

Egyéb publikációim:

Beküldve: Biomedicines, 2021

Proof-of concept for the analgesic effect and thermoregulatory safety of orally administered multi-target compound SZV 1287 in mice: a novel drug candidate for neuropathic pain

Ádám István Horváth, **Nikolett Szentes**, Valéria Tékus, Maja Payrits, Éva Szőke, Emőke Oláh, András Garami, Eszter Fliszár-Nyúl, Miklós Poór, Cecília Sár, Tamás Kálai, Szilárd Pál, Krisztina Percze, Éva Nagyné Scholz, Tamás Mészáros, Blanka Tóth, Péter Mátyus, Zsuzsanna Helyes

Pharmacological Research, Volume 131, May 2018, Pages 231-243

Analgesic effects of the novel semicarbazide-sensitive amine oxidaseinhibitor SZV 1287 in mouse pain models with neuropathicmechanisms: Involvement of transient receptor potential vanilloid 1and ankyrin 1 receptors

Ádám Horváth, Valéria Tékus, Noémi Bencze, **Nikolett Szentes**, Bálint Scheich, Kata Bölcskei, Éva Szőke, Attila Mócsaid, Éva Tóth-Sarudye, Péter Mátyus, Erika Pintér, Zsuzsanna Helyes

BioMed Research International, Volume 2018, Article ID 7569645, 8 pages

Kinetics of Targeted Phage Rescue in a Mouse Model of Systemic *Escherichia coli* K1

György Schneider, **Nikolett Szentes**, Marianna Horváth, Ágnes Dorn és mtsai.

Frontiers in Immunology, 05 February 2018

The neurokinin-1 receptor contributes tothe early Phase of lipopolysaccharide-induced Fever via stimulation of Peripheral cyclooxygenase-2 Protein expression in Mice

Eszter Pakai, Valeria Tekus, Csaba Zsiboras, Zoltan Rumbus1, Emoke Olah, Patrik Keringer, Nora Khidhi, Robert Matics, Laszlo Deres, Katalin Ordog, **Nikolett Szentes**, Krisztina Pohoczky, Agnes Kemeny, Peter Hegyi, Erika Pinter and Andras Garami

Journal of neuroinflammation 2018 Dec 3;15(1):335.

Regulatory role of capsaicin-sensitive peptidergic sensory nerves in the proteoglycan-induced autoimmune arthritis model of the mouse

Horváth Ádám, Borbély Éva, Bölcskei Kata, **Szentes Nikolett**, Kiss Tamás és mtsai.

PhD hallgatóként elért díjak, kitüntetések

2017.06.13-16. A Magyar Élettani Társaság, A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság közös Vándorgyűlése (Debrecen) - Különdíjas helyezés

Poszter bemutató címe: A szomatosztatin 4 receptor szerepének vizsgálata tanulás és memória egérmodelljeiben

Szentes Nikolett, Tékus Valéria, Mohos Violetta, Helyes Zsuzsanna

2018.07.07-11. 11th FENS Forum of Neuroscience Konferencia (Berlin) - Poszter bizonyítvány

Poszter bemutató címe: Investigation of learning, memory, locomotor activity and anxiety in somatostatin receptor 4 deficient mice, interactions with aging and sex

Nikolett Szentes, Valéria Tékus, Violetta Mohos, Zsuzsanna Helyes

2019.06.05-08. FAMÉ 2019 - Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság, Magyar Anatómus Társaság, Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság, Magyar Élettani Társaság Közös Vándorgyűlése (Budapest) - Poszter prezentációért járó első helyezett

Poszter címe: Neuroinflammációs mechanizmusok szerepe a centrális szenzitizációban
Komplex Regionális Fájdalom Szindróma passzív transzfer-trauma egérmodelljében

Szentes Nikolett, Tékus Valéria, Pohóczky Krisztina, Botz Bálint, Kiss Tamás, Kemény Ágnes, Dénes Ádám, Környei Zsuzsanna, Tóth Krisztina, Sensi S., Hawkes J., Andreas Goebel, Helyes Zsuzsanna

2019.09.04-07. European Pain Federation (Valencia) - Fiatal kutatók első helyezett poszter díja a fájdalom szindrómák poszter szekcióban

Neuroinflammatory mechanisms of central sensitization are mediated by TNF- and IL1-driven pathways in a passive transfer-trauma mouse model of Complex Regional Pain Syndrome (CRPS)

Nikolett Szentes, Krisztina Pohóczky, Valéria Tékus, Bálint Botz, Ágnes Kemény, Tamás Kiss, Zsuzsanna Környei, Krisztina Tóth, Serena Sensi, Jenny Hawkes, Ádám Dénes, Andreas Goebel, Zsuzsanna Helyes

2019.11.08-09. MOFT - Magyarországi Fájdalom Társaság 2019. évi Konferenciája, (Szeged) - Poszter prezentációért járó első helyezett, mely előadás formájában került bemutatásra

Poszter címe: Neuroinflammációs mechanizmusok szerepe a centrális szenzitizációban Komplex Regionális Fájdalom Szindróma (CRPS) passzív transzfer-trauma egérmodelljében **Szentes Nikolett**, Tékus Valéria, Pohóczky Krisztina, Botz Bálint, Kiss Tamás, Kemény Ágnes, Dénes Ádám, Környei Zsuzsanna, Tóth Krisztina, Sensi S., Hawkes J., Andreas Goebel, Helyes Zsuzsanna

2020.04.03. Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Ifjúsági Pályázat 2019 - Első helyezett díj

Transfer of complex regional pain syndrome to mice via human autoantibodies is mediated by interleukin-1-induced mechanisms

Zsuzsanna Helyes, Valéria Tékus, **Nikolett Szentes**, Krisztina Pohóczky, Bálint Botz, Tamás Kiss, Ágnes Kemény, Zsuzsanna Környei, Krisztina Tóth, Nikolett Lénárt, Hajnalka Ábrahám, Emmanuel Pinteaux, Sheila Francis, Serena Sensi, Ádám Dénes, and Andreas Goebel

12. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném hálás köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának és Dr. Tékus Valériának a sok támogatásért és a kiváló kutatóként mutatott szakmai segítségükért, melyben már egészen a Mester képzésemről kezdve, a TDK, majd végül PhD képzésem folyamán részesültem.

Köszönettel tartozom intézetvezetőinknek, és egyben a Doktori Iskola vezetőjének Prof. Dr. Pintér Erikának, hogy támogatta a kutatómunkám, továbbá, Prof. Dr. Helyes Zsuzsannával együtt, a folyamatos fejlődésemet és a lehetőséget, hogy továbbtanulási terveim megvalósulhattak.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Andreas Goebel kollaborációs partnerünknek, a Liverpooli Egyetem Fájdalom Központ által, hogy részt vehettem a Komplex Regionális Fájdalom Szindróma vizsgálatában, és hogy az egész kutatómunkám során értékes szakmai segítséggel és tanácsokkal látott el. Továbbá Serena Sensi liverpool-i Egyetem PhD hallgatójának, aki a szakmai és technikai segítséggel hozzájárult munkám kivitelezéséhez.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Bölcskei Katának és Öböli Dórának, hogy a kezdetektől fogva mindenben segítettek a fejlődésemet és megtanították, a kísérletes munka során elengedhetetlen, precíz és szakszerű munkavégzést.

Köszönöm továbbá Rajnai Tündének, Öböli Dórának és Draskóczy Lillának, hogy nemcsak a munkában nyújtott segítséggel, de barátságukkal is támogattak.

Köszönöm a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben dolgozó kollégáimnak, Dr. Aczél Timeának, Dr. Borbély Évának, Dr. Horváth Ádám Istvánnak, Dr. Kun Józsefnek, Dr. Pohóczky Krisztinának, Dr. Szőke Évának, Kiss Tamásnak és Nemes Balázsnak a kutatómunkám során nyújtott szakmai és technikai segítséget, valamint az intézet minden dolgozójának, hogy egy emberileg is jó közösségbe tartozhatom.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Dénes Ádámnak és Dr. Gyenesei Attilának, valamint kutatócsoportjaiknak a munkám során nyújtott szakmai és technikai segítséget.

Köszönet Bagoly Teréz, Fábíán Ildikó, Perkecz Anikó kolléganőimnek a professzionális asszisztensi munkáért, mellyel hozzájárultak a kísérletek sikerességéhez.

Végül szeretném megköszönni Családomnak és Páromnak, hogy támogatták tanulmányaimat és a munkámat, valamint a rengeteg bátorítást és szeretetet, mellyel ösztönöztek a legjobb eredmények elérésére.

Transfer of complex regional pain syndrome to mice via human autoantibodies is mediated by interleukin-1-induced mechanisms

Zsuzsanna Helyes^{a,b,c,1,2}, Valéria Tékus^{a,b,1}, Nikolett Szentes^{a,b,1}, Krisztina Pohóczky^{a,b,d}, Bálint Botz^{a,b}, Tamás Kiss^{a,b}, Ágnes Kemény^{a,b,e}, Zsuzsanna Környei^f, Krisztina Tóth^f, Nikolett Lénárt^f, Hajnalka Ábrahám^e, Emmanuel Pinteaux^g, Sheila Francis^h, Serena Sensiⁱ, Ádám Dénes^{f,g,2,3}, and Andreas Goebel^{i,j,2,3}

^aDepartment of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, H-7624, Pécs, Hungary; ^bJános Szentágotthai Research Centre & Centre for Neuroscience, University of Pécs, H-7624, Pécs, Hungary; ^cPharmInVivo Ltd., H-7629, Pécs, Hungary; ^dFaculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, University of Pécs, H-7624, Pécs, Hungary; ^eDepartment of Biology and Electron Microscopy, Medical School, University of Pécs, H-7624, Pécs, Hungary; ^fMomentum Laboratory of Neuroimmunology, Institute of Experimental Medicine, H-1083, Budapest, Hungary; ^gDivision of Neuroscience and Experimental Psychology, University of Manchester, Manchester M13 9PT, United Kingdom; ^hDepartment of Infection, Immunity and Cardiovascular Disease, University of Sheffield, Sheffield S10 2RX, United Kingdom; ⁱDepartment of Translational Medicine, University of Liverpool, Liverpool L9 7AL, United Kingdom; and ^jDepartment of Pain Medicine, The Walton Centre National Health Service Foundation Trust, Liverpool L9 7LJ, United Kingdom

Edited by David Julius, University of California, San Francisco, CA, and approved May 13, 2019 (received for review December 1, 2018)

Neuroimmune interactions may contribute to severe pain and regional inflammatory and autonomic signs in complex regional pain syndrome (CRPS), a posttraumatic pain disorder. Here, we investigated peripheral and central immune mechanisms in a translational passive transfer trauma mouse model of CRPS. Small plantar skin-muscle incision was performed in female C57BL/6 mice treated daily with purified serum immunoglobulin G (IgG) from patients with longstanding CRPS or healthy volunteers followed by assessment of paw edema, hyperalgesia, inflammation, and central glial activation. CRPS IgG significantly increased and prolonged swelling and induced stable hyperalgesia of the incised paw compared with IgG from healthy controls. After a short-lasting paw inflammatory response in all groups, CRPS IgG-injected mice displayed sustained, profound microglia and astrocyte activation in the dorsal horn of the spinal cord and pain-related brain regions, indicating central sensitization. Genetic deletion of interleukin-1 (IL-1) using IL-1 α knockout (KO) mice and perioperative IL-1 receptor type 1 (IL-1R1) blockade with the drug anakinra, but not treatment with the glucocorticoid prednisolone, prevented these changes. Anakinra treatment also reversed the established sensitization phenotype when initiated 8 days after incision. Furthermore, with the generation of an IL-1 β floxed^(fl/fl) mouse line, we demonstrated that CRPS IgG-induced changes are in part mediated by microglia-derived IL-1 β , suggesting that both peripheral and central inflammatory mechanisms contribute to the transferred disease phenotype. These results indicate that persistent CRPS is often contributed to by autoantibodies and highlight a potential therapeutic use for clinically licensed antagonists, such as anakinra, to prevent or treat CRPS via blocking IL-1 actions.

CRPS | autoantibody | complex regional pain syndrome | interleukin-1 | anakinra

Complex regional pain syndrome (CRPS), with a prevalence of about 1:2,000, is a chronic pain condition experienced by humans. CRPS is usually triggered by trauma to the distal regions of a limb and is further associated with limb-restricted edema; sensory, vasomotor, sudomotor, motor, and trophic abnormalities; and profound sensory central nervous system (CNS) reorganization (1). In CRPS, typically no or only minimal tissue destruction occurs (2), and although morphological change, such as disuse atrophy, can sometimes be observed, this is not thought to explain the experienced intense pain (3). The underlying pathophysiological mechanisms are poorly understood. Systemic inflammatory markers remain normal in CRPS patients, but regional inflammatory mediators and autoimmunity are suggested to contribute to the manifestation of the symptoms (4). Furthermore, neuroplasticity mechanisms within the spinal cord and the brain are believed to sustain persistent pain (5).

While most patients with CRPS show an improvement within months, either with or without treatment (6), 20% of patients develop persistent pain, often lasting for years or even through their lifetime (7). This type of persistent pain is intrusive and results in among the lowest quality of life scores in medical conditions (8). Among the few drug trials performed to date (9), neither conventional drugs used to relieve pain, (i.e., nonsteroidal antiinflammatory drugs, opioids, antidepressants, or anticonvulsants) nor steroids have shown significant efficacy in persistent CRPS. Implantation of a spinal cord stimulator, which delivers electrical impulses to the dorsal column, can override CRPS pain in about 50% of patients, but the duration of the optimum effect is limited (9). Since many patients cannot be successfully treated, the treatment of CRPS remains an important unresolved problem and is still an unmet medical need (10). Thus, to better understand the peripheral and

Significance

Complex regional pain syndrome (CRPS) is a poorly understood painful condition, which typically arises after distal limb trauma; 20% of patients may develop lifelong severe incessant pain with few therapeutic options. In this study, we show that immunoglobulin G autoantibodies from patients with severe, persistent CRPS, on transfer to hind paw-injured mice, elicit important features of the clinical condition and profound glial activation in pain-related brain regions. Blockade of the proinflammatory cytokine interleukin-1 (IL-1) both prevents and reverses these changes. Our findings suggest that antibody-mediated autoimmunity contributes to the development of severe CRPS after injury and that blockade of IL-1 actions may be an attractive therapeutic prospect. Investigation of autoantibody contribution to other unexplained chronic pain syndromes seems warranted.

Author contributions: Z.H., V.T., E.P., Á.D., and A.G. designed research; Z.H., V.T., N.S., K.P., B.B., T.K., Á.K., Z.K., K.T., N.L., H.Á., S.F., S.S., Á.D., and A.G. performed research; Z.K., K.T., N.L., E.P., S.F., and Á.D. contributed new reagents/analytic tools; Z.H., V.T., N.S., K.P., B.B., H.Á., E.P., Á.D., and A.G. analyzed data; and Z.H., N.S., K.P., E.P., S.F., Á.D., and A.G. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Published under the PNAS license.

¹Z.H., V.T., and N.S. contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. Email: zsuzsanna.helyes@aok.pte.hu, denes.adam@koki.mta.hu, or andreasgoebel@rocketmail.com.

³Á.D. and A.G. contributed equally to this work.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1820168116/-DCSupplemental.

Published online June 10, 2019.

central pathophysiological mechanisms underlying CRPS, reliable and validated animal models are desperately needed (2).

We have recently shown that passive transfer of serum immunoglobulin G (IgG) from CRPS patients to hind paw-injured rodents elicits key features (unilateral hyperalgesia and edema) of the clinical condition (11). This suggests a “two-hit” process, where circulating IgG autoantibodies (i.e., the first hit) are rendered pathogenic in the context of paw injury (the second hit)-related regional or central modifications (2). Although these behavioral results indicated that serum IgG autoantibodies contribute to the disease pathophysiology and thus, provided first evidence for the construct validity of the transfer model, the observed abnormalities were modest and short-lasting, and the mechanisms mediating them have remained unknown.

Using samples available from patients who consented to repeat donation of larger blood volumes or who had received plasma exchange treatment (12), we have now developed an enhanced passive IgG transfer trauma model and have examined its translational validity. We investigated (i) whether and how the transferred behavioral signs in rodents are augmented and sustained with daily human IgG injections and whether there are differences between preparations from different patients; (ii) the degree of regional posttraumatic immune activation in the paw given that mild, transient immune activation in the affected skin is sometimes detected in patients (13) and its correlation to behavioral parameters; (iii) the degree and mechanisms of posttraumatic glial activation in the spinal dorsal horn, since strong CNS reorganization is recognized in the clinical cases (5); and finally, (iv) whether targeting specific inflammatory pathways at the time of or after trauma can prevent or reverse transferred complex regional pain syndrome (tCRPS) to provide a translatable therapeutic approach.

Results

Daily Administration of Serum IgG from CRPS Patients Induces Profound and Persistent Postincisional Mechanical Hyperalgesia.

The preoperation mechanonociceptive threshold values of the affected limbs were 8.65 ± 0.08 , 8.69 ± 0.09 , and 8.60 ± 0.07 in the saline, healthy IgG-, and CRPS IgG-treated mice, respectively (not significantly different) (Fig. 1A). Plantar skin and muscle incision induced a 45–50% relative decrease of the mechanonociceptive threshold in all groups 1 d after the surgery. On daily injections, paw sensitivity quickly recovered to mild hyperalgesia in both saline and healthy IgG-injected animals, with mild, nonsignificantly enhanced values remaining in the healthy IgG group vs. the saline group throughout the experimental period. Injection of IgG from CRPS patients caused significantly augmented hyperalgesia compared with IgG from healthy volunteers, which seemed to be further enhanced toward the end of the experimental period. This effect was evident in the IgG preparations from each individually tested patient ($n = 7$) as well as a preparation pooled from seven separate patients (SI

Appendix, Fig. S1). The observed 15–32% absolute threshold reduction was twofold compared with that seen in our previously published experimental model (injections on days –1, 0, 5, and 6) (11). Contralateral paws retained normal sensitivity in all groups (SI Appendix, Fig. S2).

In all groups, injured paws developed about 30% relative paw swelling (defined as edema) on day 1, but there were no changes in contralateral paws (SI Appendix, Fig. S3). Edema resolved in healthy IgG and saline groups, but CRPS IgG injection significantly slowed edema resolution (Fig. 1B). While the pattern of transferred hyperalgesia was uniform, there was important variability in the degree and pattern of transferred swelling between different patient preparations, with no correlation between these two parameters (SI Appendix, Figs. S2 and S3). Postsurgery minimal weight loss was observed compared with baseline for a few days, and the weights of the animal then fully recovered without significant differences between groups (SI Appendix, Fig. S4). We observed no spontaneous nocifensive behaviors, such as paw biting, lifting, or licking.

CRPS IgG Does Not Alter Vascular Plasma Leakage but Increases Neutrophil Myeloperoxidase Activity Early After Paw Incision.

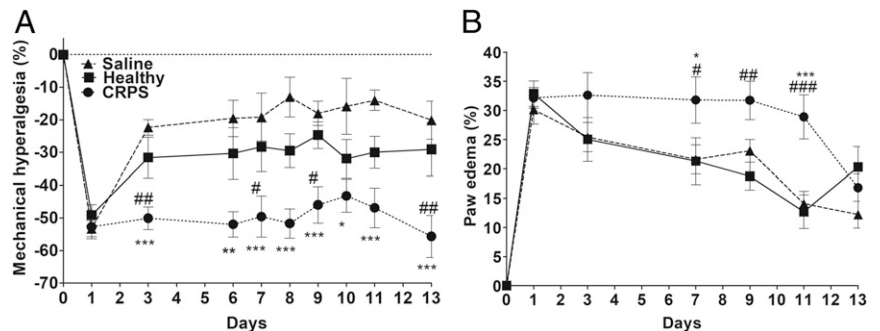
Indocyanin green (ICG)-derived fluorescence detecting vascular leakage showed a nonsignificant trend to increase in the injured paws in all groups 2 d after paw incision; CRPS IgG did not specifically affect plasma extravasation [saline injured: $1.52 \times 10^9 \pm 1.11 \times 10^8$; healthy IgG injured: $1.42 \times 10^9 \pm 1.54 \times 10^8$; CRPS IgG injured: $1.70 \times 10^9 \pm 2.2 \times 10^8$; fluorescence intensity: (photons per second per 1 cm^2 per steradian) per microwatt per 1 cm^2].

As expected, in vivo imaging of 8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazine-1,4(2H,3H) dione (L-012)-derived bioluminescence, used as a sensitive marker of inflammatory cell activity [most prominently neutrophil-derived myeloperoxidase (MPO)], showed increased signal in response to limb trauma alone (Fig. 2). We found a significant increase in neutrophil MPO activity in the CRPS IgG-treated animals on the affected side 2 d after the incision compared with in the control groups. Differences in MPO activity in CRPS IgG vs. healthy IgG groups had disappeared by day 6, although significant increases in the injured paw were still present compared with the intact side on day 13. Importantly, while strong variability was observed between different IgG preparations in influencing MPO activity (SI Appendix, Fig. S5 and Table S2), bioluminescence measured on day 2 or 6 did not correlate with either maximal paw swelling or hyperalgesia on day 6. This suggests that altered MPO activity in the injured paw of tCRPS mice is an unrelated IgG effect that is unlikely to explain the marked impact of CRPS IgG on paw hypersensitivity.

CRPS IgG Does Not Promote Inflammation or Neuropathy in the Paw.

We further examined whether the tCRPS behavioral signs were related to locally augmented inflammatory responses or to neuropathic changes. In successive experiments, animals were

Fig. 1. Effect of intraperitoneal injection of serum IgG derived from CRPS patients or healthy controls on plantar incision-induced mechanical hyperalgesia (A) and swelling (B) of the injured mouse hind paw. IgG was administered daily starting on day 0. The right hind paws were incised on day 0 about 6 h after Ig injection. Shown are pooled results from all three long-term experiments to either day 10 or 13 with three different IgG preparations (2–4) (individual results are in Fig. 2, and patients details are in SI Appendix, Table S1). Data are means \pm SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni's multiple comparison test. Healthy indicates the healthy control IgG-injected group, and CRPS indicates the CRPS IgG-injected group. * $P < 0.05$ (vs. saline-treated control mice); ** $P < 0.01$ (vs. saline-treated control mice); *** $P < 0.001$ (vs. saline-treated control mice); # $P < 0.05$ (vs. healthy IgG-treated mice); ## $P < 0.01$ (vs. healthy IgG-treated mice); ### $P < 0.001$ (vs. healthy IgG-treated mice).



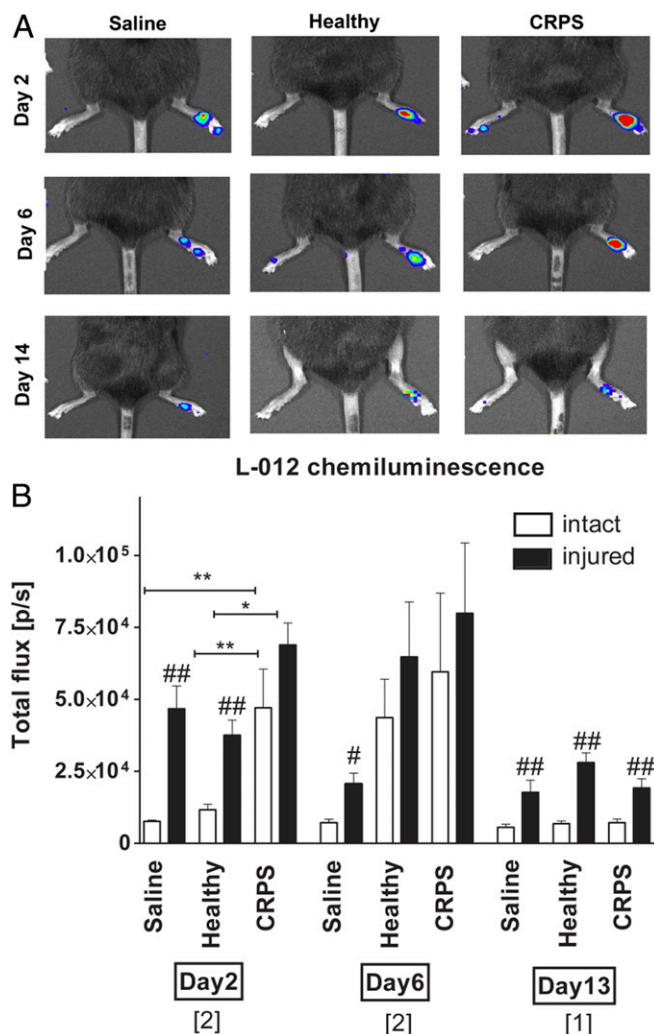


Fig. 2. Imaging ROS demonstrates the development of inflammation in the injured hind paws of mice. In vivo images of L-012–derived bioluminescence were obtained during general anesthesia on days 2, 6, and 13 after paw incision. Typical images, with red color indicating strong bioluminescence, are shown in *A*, and quantification of the bioluminescence intensity is in *B*. Data at each time point represent the pooled results from experiments conducted with separate CRPS/healthy control IgG preparations (numbers of preparations per time point are in brackets) (details are in *SI Appendix, Fig. S4 and Table S2*) and are shown as means \pm SEM of $n = 6$ –18 mice per group. One-way ANOVA was followed by Bonferroni's multiple comparison test. Healthy indicates the healthy control IgG-injected group, and CRPS indicates the CRPS IgG-injected group. * $P < 0.05$ vs. respective control groups; ** $P < 0.01$ vs. respective control groups; # $P < 0.05$ vs. respective intact side; ## $P < 0.01$ vs. respective intact side.

killed between experimental days 1 and 13, and paw tissues were harvested to assess various inflammatory changes (animal numbers and preparations are in *SI Appendix, Table S3*).

Substance P (SP) levels increased in the injured paw, with higher levels in the CRPS IgG group on day 6 (Fig. 3*A*), whereas calcitonin gene-related peptide (CGRP) levels were not significantly altered (Fig. 3*B*), consistent with earlier findings (11). Increased levels of inflammatory mediators were seen in the injured paws, with gradual decrease over time [shown in Fig. 3 *C–F* for interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and IL-1 β and in *SI Appendix, Fig. S6* for additional mediators]. We detected no differences in the levels of inflammatory mediators between the CRPS and healthy IgG groups (Fig. 3 *C–F* and *SI Appendix, Fig. S6*) at any

time point, except for a mild CRPS IgG-induced MCP-1 increase at day 13 (Fig. 3*E*). Notably, at the time of maximum hyperalgesia (13 d postinjury), most mediators were undetectable. There were no significant changes in plasma concentrations of any cytokines after correction for multiple testing (*SI Appendix, Fig. S7*).

Histological examination revealed moderate infiltration of inflammatory cells into areas immediately adjacent to the incision early after surgery, with no obvious difference between groups; there was no evidence of infiltration by inflammatory cells on day 13 in any experimental group. Since some patients with persistent CRPS exhibit mild small fiber neuropathy (14), we also examined mouse paw biopsies from CRPS IgG-injected animals for any evidence of structural changes to small skin nerves with both light and electron microscopy. The morphology of the axons in the right (injured) and left (intact) paws as well as the ultrastructure of nonmyelinated and thin-myelinated axons in the dermis appeared very similar on aspect, and there were no significant differences between sides on quantification of axon numbers and diameters (*SI Appendix, Table S4*).

CRPS IgG Facilitates Sustained Microglia Activation in the CNS. We next investigated whether altered activity of microglia or astrocytes in pain-related circuits (15) would reflect the marked effects of CRPS IgG on pain sensitivity responses. In CNS areas receiving input from the injured paw, CRPS IgG induced remarkable increases in both astrocyte and microglia cell activities compared with both saline and healthy IgG groups. In the dorsal horn, this response was sometimes much stronger than the increases representing the incision trauma (Fig. 4). Astrocyte reactivity in the CRPS IgG animals was augmented in all CNS areas at early time points (days 3 and 6), whereas microglia staining was enhanced throughout the experimental period (including day 13) (Fig. 4 and *SI Appendix, Fig. S9*), indicating that increased mechanical hypersensitivity in this model is associated with transient astrocyte and persistent microglial activation in the CNS.

Early IL-1 Receptor Blockade with Anakinra Prevents the Development of tCRPS, While Delayed Anakinra Treatment Reverses Established tCRPS and Reduces Glial Activation.

Since both microglia and astrocytes are important sources of proinflammatory cytokines that are known to contribute to pain hypersensitivity responses (16, 17) and IL-1 is a key mediator that influences neuronal activity (18, 19), we investigated the effects of glucocorticoid (prednisolone) treatment or interleukin-1 receptor (IL-1R) antagonist (anakinra) treatment on CRPS IgG-induced behavioral signs and inflammatory changes. Prednisolone (4 mg/kg) or anakinra (10 mg/kg) was daily administered intraperitoneally, starting 5 h before surgery (day 0) and extending throughout the experimental period. One day after surgery, mechanical hyperalgesia developed equally in all groups (Fig. 5*A* and *B*). Glucocorticoid treatment transiently reduced CRPS IgG-induced mechanical hyperalgesia (between days 2 and 3), but this effect was lost by day 7. In contrast, anakinra prevented all CRPS IgG-induced effects throughout the experimental period (Fig. 5*B*). Anakinra, but not prednisolone treatment, almost completely reversed glia cell activation in the ipsilateral dorsal horn on day 6 (Fig. 5*D* and *E*). Notably, anakinra treatment also significantly reduced paw MCP-1 levels on day 3; however, there were no other differential effects on levels of peripheral mediators between these two treatments (*SI Appendix, Fig. S10*). Furthermore, delayed administration of anakinra starting from day 8 onward reversed the established tCRPS phenotype (Fig. 5*C*) and completely reversed the associated increased dorsal horn microglia activation on day 13 (Fig. 5*F*).

Selective Deletion of Microglial IL-1 β Ameliorates While Ubiquitous Deletion of IL-1 α Completely Prevents tCRPS. Given that CRPS IgG caused significant dorsal horn glia cell activation without influencing paw IL-1 levels and that blockade of IL-1 prevented

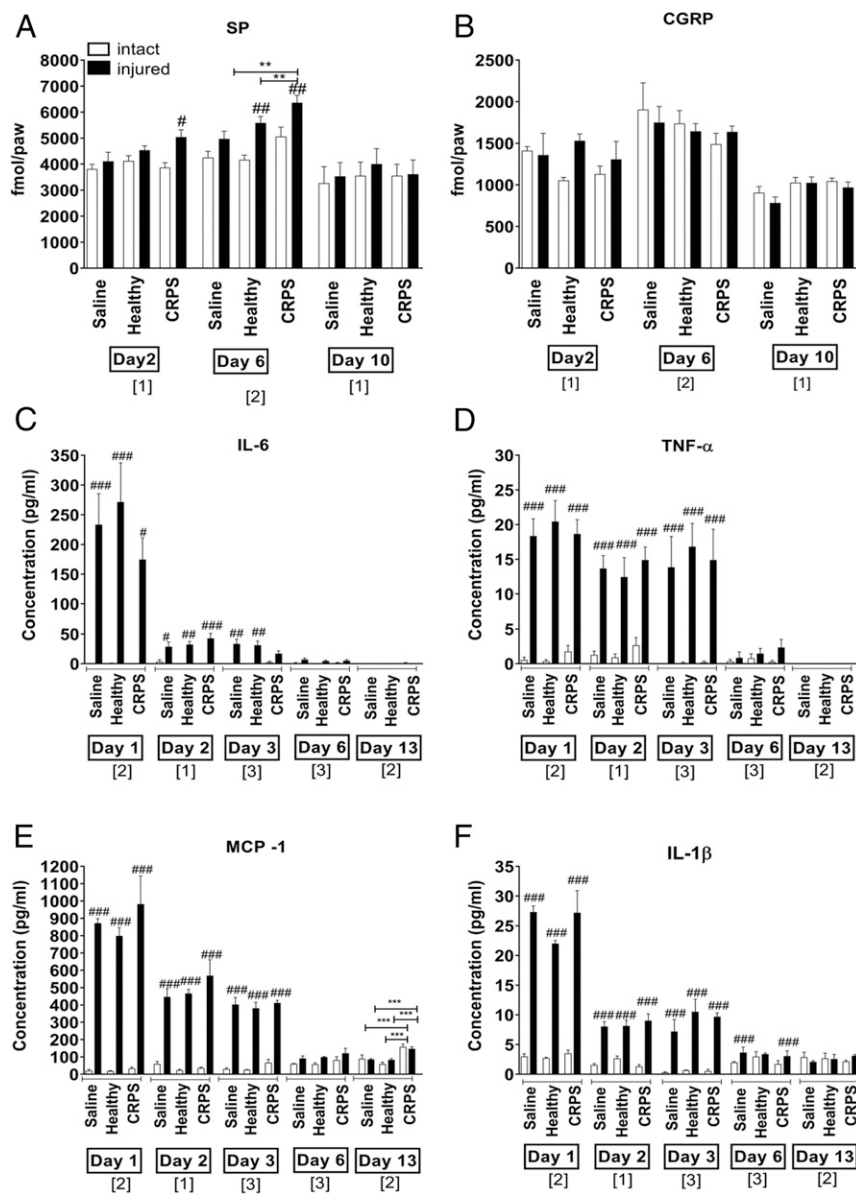


Fig. 3. Effects of human IgG transfer on sensory neuropeptide and inflammatory cytokine concentrations in the hind paws. Concentrations of (A) SP and (B) CGRP were measured by RIA in hind paw homogenates excised after they were killed. Concentrations of (C) IL-6, (D) TNF- α , (E) MCP-1, and (F) IL-1 β were measured by cytometric bead array from the same samples. Data are from one to three experiments per time point (brackets below x axes) each with different patient preparations. Shown are means \pm SEM. One-way ANOVA was followed by Bonferroni's multiple comparison test. Healthy indicates the healthy control IgG-injected group, and CRPS indicates the CRPS IgG-injected group. ** $P < 0.01$ vs. respective control groups; # $P < 0.05$ vs. respective intact side; ## $P < 0.01$ vs. respective intact side; ### $P < 0.001$ vs. respective intact side;

the tCRPS phenotype, we then investigated whether tCRPS was associated with enhanced glial IL-1 production in the dorsal horn. Immunofluorescence revealed increased microglial IL-1 β production in lumbar (L)4/L5 dorsal horn microglia cells only in the tCRPS group (Fig. 6A), while IL-1 α was not detected. We then examined whether the tCRPS phenotype would be altered by genetic knockout (KO) of IL-1. We found that CRPS IgG-injected IL-1 $\alpha\beta$ KO mice failed to develop enhanced hyperalgesia and showed even less posttraumatic paw swelling (Fig. 6B and C) than mice treated with healthy IgG. To investigate whether increased microglial IL-1 β production is sufficient to mediate the effects of CRPS IgG on increased mechanical hyperalgesia, we generated an IL-1 β floxed^(fl/fl) mouse line. Exons 4 and 5 of the *IL-1B* gene were flanked with loxP sites, resulting in the generation of IL-1 β ^{fl/fl} allele (SI Appendix, Fig. S11). IL-1 β ^{fl/fl} mice were crossed with Cx3cr1^{CreER} mice (20), resulting in microglial deletion of IL-1 β on tamoxifen administration (M-IL-1 β KO), while most peripheral Cx3cr1-positive cells recovered IL-1 β production due to their higher turnover as shown by using other cre-dependent reporter lines previously (20). In fact, IL-1 β protein levels were markedly reduced in IL-1 β

KO microglia after repeated intraperitoneal injections of bacterial lipopolysaccharide compared with wild-type (WT) microglia, but no changes were seen in splenic macrophages derived from tamoxifen-treated Cx3cr1^{CreER} \times IL-1 β ^{fl/fl} mice compared with controls (SI Appendix, Fig. S12). Elimination of microglial IL-1 β significantly reduced mechanical hyperalgesia and paw edema in mice treated with CRPS IgG, although this effect was smaller than in the case of IL-1 $\alpha\beta$ KO mice (Fig. 6B and C). Total numbers of microglia were reduced in IL-1 $\alpha\beta$ KO mice but were not altered in response to microglial IL-1 β deletion in the CRPS group (Fig. 6D), suggesting that, while microglial IL-1 β is an important driver of chronic neuroinflammation contributing to persistent pain, other IL-1 β -producing cells or actions mediated by IL-1 α could also contribute to CRPS symptoms in mice.

Discussion

Here, we show in an enhanced passive transfer trauma model that daily administration of IgG from patients with persistent CRPS to mice elicits intense, unilateral static mechanical hyperalgesia after hind paw injury, which remains stable through the experimental period. This is associated with increased paw edema

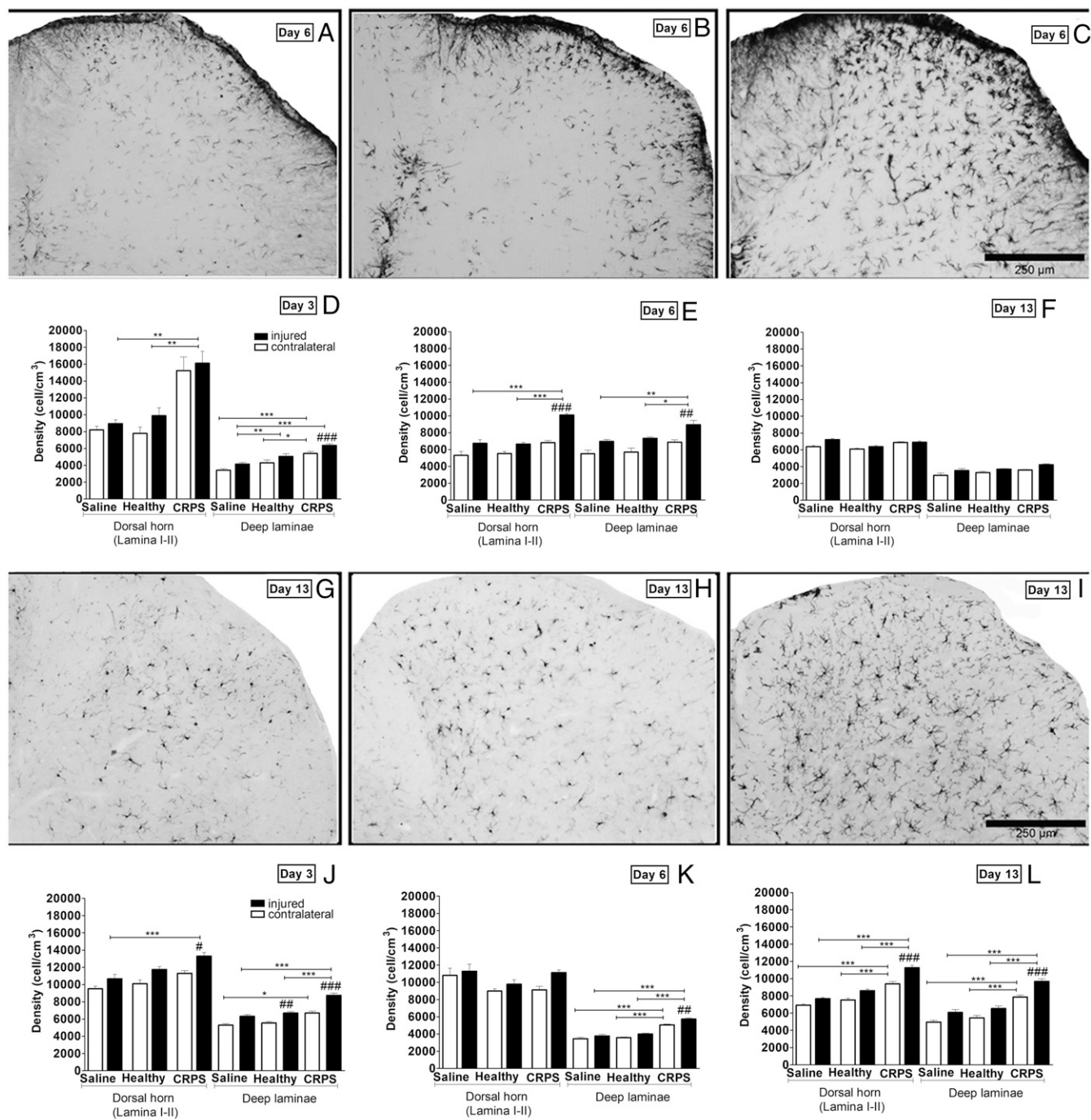


Fig. 4. Glial activation in the L5 spinal cord dorsal horn ipsilateral to the paw injury. A–C show GFAP immunopositivity marking astrocytes, and G–I show Iba1 immunopositivity marking microglia cells, with (A and G) saline, (B and H) healthy control IgG, and (C and I) CRPS IgG injections. The GFAP-immunopositive sections shown are from day 6, and Iba1 sections are from day 13 after paw incision. Quantification of astrocyte reactivity (D–F) and microglia staining (J–L) in lamina I–II dorsal horn of the L4–L6 spinal cord and deeper laminae at 3, 6, and 13 d after hind paw incision. Each panel represents the pooled results from two experiments with two different samples (3 and 4). Shown are means \pm SEM of six to seven mice per group. One-way ANOVA was followed by Bonferroni’s modified post hoc test. Healthy indicates the healthy control IgG-injected group, and CRPS indicates the CRPS IgG-injected group. * $P < 0.05$ vs. respective control groups; ** $P < 0.01$ vs. respective control groups; *** $P < 0.001$ vs. respective control groups; # $P < 0.05$ vs. respective contralateral side; ## $P < 0.01$ vs. respective contralateral side; ### $P < 0.001$ vs. respective contralateral side.

that resolves over time. Collectively, these features resemble the course and pathophysiology of the clinical disease (1). In these extensive integrative studies, a uniform pattern of transferred static mechanical hyperalgesia was seen with all patient preparations, highlighting that seronegativity is unlikely to be common in patients with severe, persistent CRPS. The results emphasize

the translational validity of the model and the importance of autoimmune mechanisms underpinning the pathophysiology of both clinical CRPS and experimental transferred tCRPS.

We found that the normal posttraumatic inflammatory response in the incised paws rapidly declined and fully settled by days 6–13 postincision; the paw inflammation did not correlate

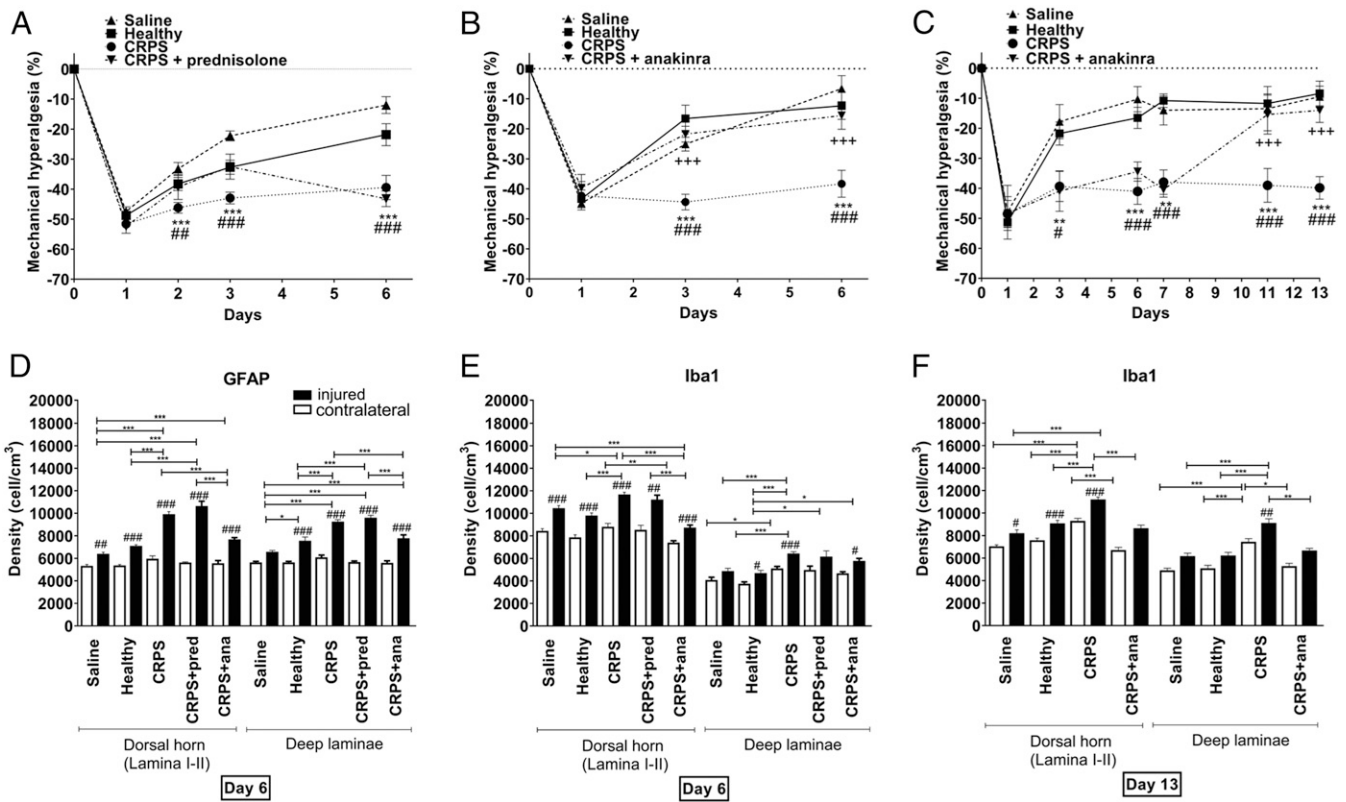


Fig. 5. Effects of prophylactic steroid or anakinra treatment (days 0–6) and delayed (therapeutic) anakinra treatment on CRPS IgG-induced mechanical hyperalgesia and glial activation in the spinal cord. *A* and *B* show mechanical hyperalgesia in groups of animals injected intraperitoneally first with human IgG or saline and 3 h later with 4 mg/kg prednisolone, 10 mg/kg anakinra, or saline vehicle on each day between days 0 and 6. *D* and *E* show dorsal horn glia cell activation in these mice on day 6: (*D*) GFAP (astrocyte) and (*E*) Iba-1 (microglia). Results represent the average values derived from two independent experiments with different preparations for each treatment, with four experiments in total; saline, healthy control IgG, and CRPS IgG outcomes are pooled from these experiments. (*C* and *F*) Late anakinra treatment starting on day 8: (*C*) behavioral outcome and (*F*) dorsal horn microglia cell count on day 13. Data are shown as means \pm SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni's multiple comparison test. One-way ANOVA was followed by Bonferroni's modified post hoc test. Healthy indicates the healthy control IgG-injected group, and CRPS indicates the CRPS IgG-injected group. Significance symbols for the behavioral data as follows: * $P < 0.05$ (CRPS IgG vs. saline-treated control mice); ** $P < 0.01$ (CRPS IgG vs. saline-treated control mice); *** $P < 0.001$ (CRPS IgG vs. saline-treated control mice); # $P < 0.05$ (CRPS IgG vs. healthy control IgG-treated mice); ### $P < 0.001$ (CRPS IgG vs. healthy control IgG-treated mice); +++ $P < 0.001$ (anakinra plus CRPS IgG vs. CRPS IgG-injected mice). Significance immunohistochemistry data: * $P < 0.05$ vs. respective control groups; ** $P < 0.01$ vs. respective control groups; *** $P < 0.001$ vs. respective control groups; # $P < 0.05$ vs. respective contralateral side; ## $P < 0.01$ vs. respective contralateral side; ### $P < 0.001$ vs. respective contralateral side.

with the degree of CRPS IgG-induced paw hyperalgesia. We found little evidence for any CRPS IgG-related enhanced paw inflammation. Our results thus demonstrate that static mechanical hyperalgesia may not depend on persistent inflammatory mediator release, highlighting that tCRPS is not a model of enhanced posttraumatic inflammatory pain. There was, however, some evidence for abnormal production of two specific mediators in the CRPS group: SP production was increased at early time points, in line with some clinical observations (21) and our earlier results (11), and there was also a mild but significant bilateral increase in MCP-1 on day 13, the role of which will require additional investigations. Although we measured common mediators of inflammation in the injured paws and these were normal, the involvement of additional mediators cannot be excluded.

In mice, the development of tCRPS remained restricted to the injured paw, consistent with the clinical situation, where about 90% of the cases show symptoms in only one traumatized limb (22). The precise mechanisms through which circulating pathogenic IgG antibodies mediate both the regionally restricted posttraumatic clinical CRPS and tCRPS are presently unclear. Early transient trauma-induced inflammatory changes or regional opening of blood–nerve and blood–brain barriers may play a role by promoting the expression of neoantigens or by

providing IgG access to privileged sites (23). The presence of such facilitating mechanisms is supported by our *in vivo* imaging results, which showed plasma leakage and increased MPO activity in the injured paw.

Interestingly, MPO activity was variably enhanced in the animal groups injected with different CRPS IgG preparations, and there was no correlation with mechanical hyperalgesia or swelling in these same animals. These findings may resemble the strong heterogeneity seen between patients in the extent of their limb swellings, color changes, or temperature changes and may also reflect the observation that these clinical parameters do not necessarily correlate with the patients' perceived pain intensities or recorded skin sensitivities (2).

Since inflammatory changes in the paw did not seem to explain the increased mechanical hyperalgesia in the tCRPS mice, we investigated the potential role of glial responses in pain-related neuronal circuits, which have been suggested to contribute to chronification processes in posttraumatic pain models (15, 24, 25). We found that tCRPS was associated with strong microglia and astrocyte activation at all three tested levels of the nociceptive pathway, the ipsilateral spinal cord dorsal horn, the periaqueductal gray, and the contralateral somatosensory cortex. In the dorsal horn, the increases in glial responses in the tCRPS

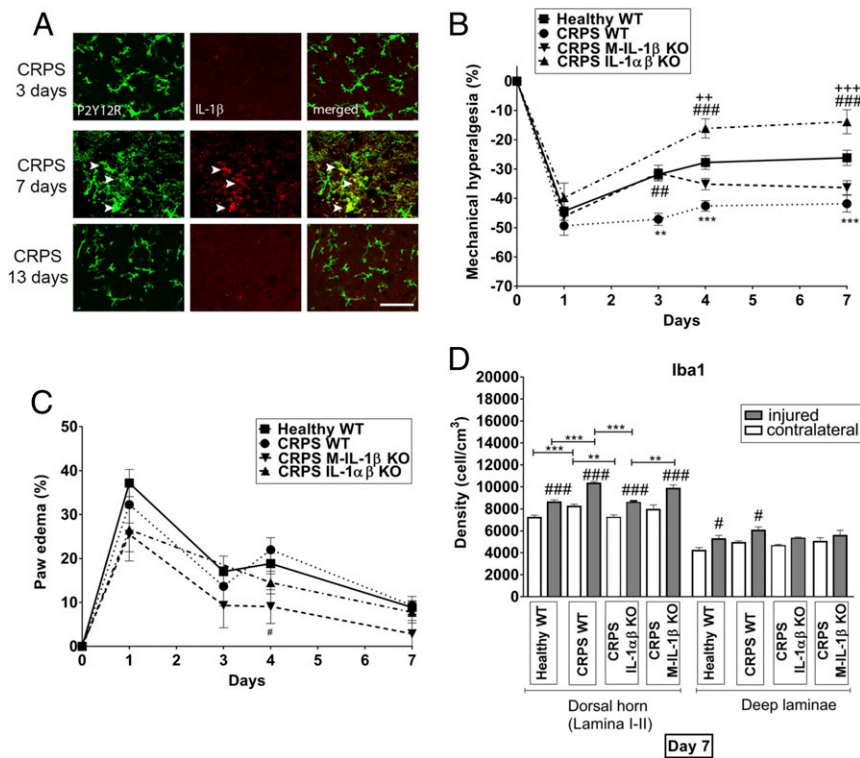


Fig. 6. Deletion of IL-1 β or microglia-derived IL-1 β fully or partially prevents development of the CRPS IgG-induced phenotype in mice. (A) A population of microglia identified by immunostaining against P2Y12, a specific microglial marker in the brain (59), displays a morphologically activated phenotype and shows immunopositivity for IL-1 β at day 7 in the deep laminae of the L4–L5 spinal cord near the central canal. (Scale bar: 50 μ m.) (B and C) IL-1 $\alpha\beta$ KO mice are fully protected and M-IL-1 β KO mice are partially protected from the development of the CRPS IgG-induced phenotype: (B) paw hyperalgesia and (C) paw edema. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni’s multiple comparison test. Significance in B and C: ** P < 0.01 (CRPS IgG WT vs. healthy IgG WT); *** P < 0.001 (CRPS IgG WT vs. healthy IgG WT); # P < 0.05 (CRPS IgG M-IL-1 β KO vs. CRPS IgG WT); ### P < 0.001 (CRPS IgG IL-1 $\alpha\beta$ KO vs. CRPS IgG WT); ++ P < 0.01 (CRPS IgG IL-1 $\alpha\beta$ KO vs. CRPS IgG M-IL-1 β KO); +++ P < 0.001 (CRPS IgG IL-1 $\alpha\beta$ KO vs. CRPS IgG M-IL-1 β KO). (D) CRPS IgG-induced microglia activation is abrogated in IL-1 $\alpha\beta$ KO but not in M-IL-1 β KO mice. Data are pooled from two experiments with different CRPS IgG preparations for each mouse type and are shown as means \pm SEM. Healthy indicates the healthy control IgG-injected group, and CRPS indicates the CRPS IgG-injected group. One-way ANOVA was followed by Bonferroni’s modified post hoc test. Significance values in D: ** P < 0.01 vs. respective control groups; *** P < 0.001 vs. respective control groups; # P < 0.05 vs. respective contralateral side; ### P < 0.001 vs. respective contralateral side.

vs. control groups were sometimes severalfold larger than the extent of glia activation caused by the paw incision (Fig. 4), suggesting a powerful central effect of the transferred IgG.

These results raise the question of how the observed profound central glial cell activation is mediated. Possible mechanisms may include (i) modification of nociceptor function after direct antibody binding in the periphery as an “autoimmune channelopathy” (26), (ii) release of yet undetermined peripheral mediators (27), (iii) direct binding in the dorsal horn after temporary post-traumatic opening of the blood spinal cord barrier (28), or (iv) a missing link. Independent of the nature of these upstream mechanisms, glial activation is likely to result in the release of mediators, such as IL-1 β , TNF- α , or brain-derived neurotrophic factor, with consequent modification of central pain processing (15, 29).

We hypothesized that perioperative antiinflammatory interventions might be effective, and we initially thought that such interventions might act through the blockade of perioperative regional facilitatory factors required to render circulating CRPS autoantibodies pathogenic (4). To investigate whether such interventions could prevent the disease phenotype, we treated mice peritraumatically with high-dose prednisolone. Prednisolone treatment temporarily interrupted the process of autoantibody-dependent sensitization, but it did not stop it. Systemic glucocorticoids are considered potentially effective in very early CRPS based on the results of one preliminary trial (9). These data suggest that, where patients produce harmful autoantibodies, the peritraumatic application of glucocorticoids is unlikely to stop disease progression. In contrast, perioperative treatment with the IL-1R antagonist anakinra in this CRPS model consistently prevented the tCRPS phenotype. Notably, we found that there were only minor differences in the regional paw inflammatory environment based on the production of cytokines and chemokines after treatment with (ineffective) prednisolone and (effective) anakinra (SI Appendix, Fig. S10); furthermore, even delayed blockade of IL-1 actions with anakinra starting on day 8 after the incision trauma, when trauma-induced peripheral inflammatory responses had largely resolved, was highly effective,

suggesting that the pertinent biological effect of anakinra treatment was not restricted to the injured paw.

IL-1 is a potent activator of astrocytes through actions via IL-1R1, whereas both activated microglia and astrocytes can contribute to painful central sensitization through secreting IL-1 (29, 30). These actions can be effectively blocked by anakinra (31–34). In our model, augmented dorsal horn glia cell activation in the tCRPS group was fully reversed by anakinra. Since IL-1-mediated actions are involved in the cross-talk between neurons, microglia, and astrocytes in promoting neuroinflammation (35, 36), we assessed glial IL-1 β and IL-1 α production in the spinal cord and found that microglial IL-1 β production was increased on day 7 in the CRPS IgG-treated group. In agreement with these data, we found that IL-1 $\alpha\beta$ KO mice were fully protected from developing the tCRPS phenotype and associated glial activation. To specifically assess the functional role of microglial IL-1 β in tCRPS-associated hyperalgesia and swelling, we generated a mouse strain (IL-1 β ^{fl/fl} mice), enabling the deletion of IL-1 β from microglia. Consistent with earlier data showing prolonged cre-dependent transgene expression in long-lived microglia but not in peripheral macrophage populations with short turnover (20), tamoxifen treatment of Cx3cr1^{CreER} \times IL-1 β ^{fl/fl} mice resulted in a marked reduction of microglial, but not splenic, IL-1 β production (SI Appendix, Fig. S12). As seen in IL-1 $\alpha\beta$ KO mice, the absence of microglial IL-1 β production fully protected from tCRPS-associated mechanical hyperalgesia up to day 3, whereas it had a weaker effect thereafter. This highlights the importance of microglial IL-1 β in the tCRPS disease process but also, the likely involvement of other cells and/or IL-1 α (35).

Strengths of our study include the robust, multidimensional evaluation of an enhanced CRPS disease transfer model with preparations from patients whose clinical presentations differed using outcomes designed to provide translational validity. Additional strengths are the comprehensive assessment of both peripheral and central markers of immune activation and of several antiinflammatory treatments as well as gene KO strategies, which

have allowed an informed suggestion for clinical studies with a licensed drug not previously reported in this patient group.

Limitations include the upper transfer limit cutoff at 13 d, which was necessary to avoid the adverse effects of serum sickness (37). However, it may be argued that the “chronic phase” in this disease model starts from the second week after incision, when peripheral inflammation and symptoms in the control group resolve. As is often observed with IgG disease transfer in other disease models, tCRPS does not fully match the symptoms of clinical CRPS (38). For example, overt motor dysfunction was not detected, and commonly encountered central features, such as body perception abnormalities, were not revealed. In line with most behavioral studies in animal models of chronic pain (39), we did not demonstrate the presence of spontaneous pain but ascertained nociceptor hypersensitivity by assessing stimulus-evoked pain (mechanical hypersensitivity). Independently, we only transferred serum IgG that was derived from patients suffering from persistent (7) Budapest CRPS with high pain intensities (numeric rating scale > 7); however, these are also the patients who present the most difficult situation in the clinical practice. We cannot rule out the possibility that some patients in this group do not have these antibodies. Since each of the seven individually tested serum IgG preparations induced the abnormal phenotype (*SI Appendix, Fig. S1*), the likelihood that we have missed the absence of such antibodies in more than one-half of patients of a similar population seems very low (<1%) (*Patients, Healthy Controls, and Serum Preparation*); the development of serum diagnostic tests will be required to further detail the proportion of seronegative patients. We did not measure epidermal nerve fiber density or length in the mouse paw skin; therefore, our studies may not fully rule out mild small fiber neuropathy.

In summary, we have devised a robust translational model reproducing pertinent aspects of an “idiopathic,” posttraumatic chronic pain condition. The consistent pathogenicity of various serum IgG preparations indicates that, among patients who have severe forms of this condition, autoantibody contribution is ubiquitous. Since abnormal signs were entirely confined to the injured side, we also established a general principle suggesting that pathogenic circulating autoantibodies can cause regionally restricted disease when triggered by local trauma.

Our results support previous clinical observations that patients with persistent CRPS should respond to immune treatments with a reduction of at least some of their disease features (12). The clinical use of IL-1R antagonists in CRPS has a broad therapeutic potential. Anakinra is clinically licensed both in the United States and in Europe, and short-term use has an acceptable side effect profile (40, 41). Since CRPS regularly develops in the context of elective operations, such as arthroscopy or bunion surgery, prevention of such cases would have very important implications for both patients and procedure-related health care as well as societal costs (42). As our results also suggest that treatment initiated after injury resolution reverts the established transferred phenotype, clinical treatment of patients with persistent CRPS could now be tested in a trial setting.

The cellular and molecular targets of the patient autoantibodies need to be clarified; recent results in other conditions that are not associated with trauma (26, 27) have indicated that pain-sensitizing autoantibodies may directly bind to sensory neurons or indirectly bind to juxtapositioned cells, which then release nerve-sensitizing mediators. The duration of beneficial effects after the drug is withdrawn should be investigated in this experimental model. In addition, identifying the exact cellular targets for IL-1 actions in the pathophysiology of tCRPS could facilitate the development of alternative IL-1 targeting approaches in the prevention or treatment of the clinical disease. The results of this study highlight the important role that auto-

antibodies can play in causing detrimental symptoms, absent tissue destruction and systemic inflammation.

Materials and Methods

Patients, Healthy Controls, and Serum Preparation. NorthWest Ethics Haydock UK approved serum donations. Written informed consent was obtained from all patients. Serum or plasma samples were obtained (*i*) via a dedicated study designed to repeatedly acquire large volumes, (*ii*) from waste plasma after patients’ plasma exchange treatment, and (*iii*) from patients participating in a clinical trial who never had plasma exchange (43)—the latter samples were pooled to minimize animal use. Details are provided in *SI Appendix*. The patients’ baseline characteristics are provided in Table 1. We calculated the probability that we missed an event rate of >50% of patients having no pain-sensitizing autoantibodies by $[0.5^{(\text{number of experiments} \times \text{fraction of positive experiments})}]$; $0.5^7 = 0.008125$ (i.e., <1%). IgG was prepared from plasma or serum of patients as previously described using Protein G columns for affinity purification followed by elution, buffering, dialysis in normal saline, and concentration to about 8 mg/mL IgG for injection (pooled preparations 12 mg/mL) (11).

Animals. The Ethics Committee on Animal Research of the University of Pecs approved experiments involving rodents. Since CRPS affects women two to three times more frequently than men, experiments were carried out on female mice on C57BL/6 background (10–12 wk old, 18–22 g). Breeding, maintenance, and ethical procedures were as previously described (11) (details are in *SI Appendix*).

Experimental Design. After acclimatization and conditioning, three control measurements of nociception and paw volume were performed on days –4, –3, and –2. Day 0 was the starting day of intraperitoneal injections (*SI Appendix, Fig. S13*). Mice (five to seven per group) were treated daily to compensate for rapid metabolism of human IgG in the mouse (*SI Appendix, Methods*) with 1 mL of IgG fractions (8 mg/mL) obtained from CRPS patients or healthy volunteers or saline.

Six hours after the injection on day 0, a standardized incision trauma was applied to the right hind paw as described below. All mice removed their stitches within 16 h postsurgery. Measurements (see below) were performed repeatedly starting on day 1 until the respective termination day.

Animals were killed at various time points, and tissues were harvested as previously described (11). In some experiments, animals were perfused transcardially with phosphate buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde as previously described, and the whole brains and spinal cords were excised and prepared for additional immunohistochemistry analyses.

Plantar Skin and Muscle Incision. To model a CRPS-triggering injury, we used the hind paw plantar skin muscle incision method under general anesthesia as described earlier (11, 44) and detailed in *SI Appendix*. This model evokes a significant decline of the mechanonociceptive threshold, with a maximum 1 d after surgery, which persists for 7–8 d; the model’s early threshold normalization was considered advantageous, minimizing any animal suffering and allowing for early assessment of IgG-induced changes. All measurements were carried out by two investigators (V.T. and N.S.) who were blinded to treatment assignment. Blinding was performed by the technicians who performed all injections but were otherwise not involved in the study; they differentially coded the animal cages and provided the decoding key after completion of the last measurements.

Determination of the Mechanosensitivity of the Paw. Most patients with CRPS have, in addition to their spontaneous pain, pain with the application of pressure to the CRPS-affected limb (“mechanical hyperalgesia”) (45, 46), and all patients included in this study experienced this feature. The corresponding mechanonociceptive threshold of the plantar surface of the mouse hind paw was determined with a dynamic plantar aesthesiometer (Ugo Basile 37400)—a modified electronic von Frey technique—as previously described (11). The blunt-end needle exerting an increasing force to the mouse paw provides a mild but basically painful stimulus activating A δ and C fibers (47). Threshold decreases are considered as mechanical hyperalgesia and are expressed as percentage decrease of the mechanonociceptive thresholds compared with the baseline values (48, 49).

Paw Volume Measurement. Limb swelling is a common feature of CRPS-affected limbs, and all included patients reported intermittent limb swelling. Mouse paw volume was measured using plethysmometry (Ugile Basile

Table 1. Baseline characteristics of the patient serum donors

No.	Sex/age	Limb/DD	Pain	Dx	Plex
1	M/62	U/9	10	+II	Y
2	F/37	L/15	7.5	+I	N
3	F/38	L/10	9.5	+I	Y
4	F/36	L/10	7	+I	Y
5	F/40	L/5	7.5	+I	Y
6	F/51	L/8	8	+I	N
7	F/49	L/7	8	+I	Y

Age indicates age in years at the time of plasma/serum acquisition. Limb indicates the affected limb. DD is the disease duration in years. Pain indicates 24-h average pain intensity on a 11-point numeric rating scale (0–10, with 10 = pain as bad as you can imagine). Dx indicates diagnosis, with + indicating that the patient fulfills Budapest research diagnostic criteria (new International Association for the Study of Pain criteria); II denotes trigger injury to a major nerve, and I denotes no trigger injury to a major nerve. Plex indicates plasma derived from plasma exchange. N, no; Y, yes; U, upper limb; L, lower limb.

Plethysmometer 7140). Edema was expressed as a percentage increase compared with the baseline paw volume (48).

In Vivo Optical Imaging of Plasma Leakage and Neutrophil MPO Activity. The mechanisms underpinning CRPS IgG-enhanced paw swelling are unknown, but one possibility is augmented plasma extravasation. Intravenous injected ICG, a fluorescent cyanine dye, binds to plasma proteins and remains in the healthy vasculature. Under inflammatory conditions, it can be used to evaluate capillary leakage. ICG (0.5 mg/kg) was dissolved freshly in 5% (wt/vol) aqueous solution of Kolliphor HS 15 and a macrogol-based surfactant and injected intravenously (retrobulbar sinus) under ketamine (100 mg/kg; Calypsol; Gedeon Richter Plc.) and xylazine (10 mg/kg; Sedaxylan; Eurovet Animal Health B.V.) anesthesia 2 d after the paw incision. Fluorescence imaging was performed 20 min postinjection using an IVIS Lumina II in vivo optical imaging system (PerkinElmer; autoacquisition time, $f/\text{stop} = 1$, binning = 2, excitation: 745 nm, emission filter: >800 nm) (50).

A luminol analog chemiluminescent probe, L-012 (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) was used for in vivo visualization of reactive oxygen species (ROS)/reactive nitrogen species (RNS) produced by MPO in neutrophils and macrophages; L-012 has a high sensitivity toward ROS/RNS (51). Mouse preparation, injection, imaging, and analysis procedures were conducted as previously described and highlighted in *SI Appendix* (52).

Measurement of Inflammatory Mediators. Proinflammatory neuropeptides peripherally released from sensory nerves and inflammatory cytokines released by perineuronal cells are abnormal in some patients with CRPS, and we measured their concentrations in the model.

The preserved frozen paws (see above) were thawed, chopped, and then homogenized in Triton X-100 and Calbiochem Protease Inhibitor Cocktail containing Tris-HCl homogenization buffer at 0 °C. Additional processing details are provided in *SI Appendix*. We measured CGRP- and SP-like immunoreactivities in the paws by a sensitive radioimmunoassay (RIA) technique developed in our laboratory as previously described (11, 53, 54).

Concentrations of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , KC (CXCL1), MCP-1, G-CSF, RANTES (CCL5), interferon- γ , IL-4, and IL-10 in mouse plasma and the paw homogenates were measured by cytometric bead array (BD Biosciences) as previously described (34, 55), and transforming growth factor- β and NGF were measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay according to the manufacturers' instructions (56).

Paw Skin Light and Electron Microscopy. After biopsy, samples were immersed into a fixative containing 2.5% glutaraldehyde buffered with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) overnight at 4 °C, fixed in 1% osmium tetroxide for 35 min, and dehydrated with increasing concentration of ethanol. After complete dehydration, they were transferred to propylene oxide before being placed into aluminum foil boats and then embedded into gelatin capsule containing Durcupan resin (Sigma).

Semithin and ultrathin sections were cut with Leica ultramicrotome. Semithin sections were mounted on glass slides, stained with toluidine blue, and examined under a light microscope. Ultrathin sections were mounted on collodion-coated (Parlodion; Electron Microscopy Sciences) single-slot copper grids contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and were examined in a

JEOL 1200EX-II electron microscope. Small nerve fiber quantification methods are detailed in *SI Appendix, Methods*.

Immunohistochemistry. Brains and L4–L6 segments of the spinal cord were removed and postfixed for 4 h in 4% paraformaldehyde before being placed into 30% sucrose (Duchefa Biochemie) in 0.1 M PBS overnight at 4 °C. Sections (30 μm) were prepared using a freezing microtome (Leica Biosystems Nussloch GmbH) as free-floating sections (57, 58), and they were stained and mounted as described in *SI Appendix*. The sections ($n = 3$ –4 animal per group) were examined by NeuroLucida software (v07; MBF Bioscience) using a Nikon Eclipse Ni-E bright-field microscope with a computer-controlled stage. A modified unbiased stereology protocol was used for quantification of glial fibrillary acidic protein (GFAP) or Iba1 immunoreactive cells along the nociceptive pathway as previously described (50).

Immunofluorescence. Immunofluorescence to detect microglial P2Y₁₂ (59) and the production of IL-1 α and IL-1 β was performed on free-floating brain sections. Images were captured with a Nikon Ni-E C2+ confocal microscope.

Antiinflammatory Interventions. We investigated whether early immune suppression would alter the disease course in the model. We administered the synthetic glucocorticoid prednisolone (4 mg/kg intraperitoneally) (60, 61) or the IL-1R antagonist anakinra [10 mg/kg intraperitoneally; Swedish Orphan Biovitrum AB (publ), SE-112 76]. This prednisolone dose corresponds to the highest dose range used in humans [pulse therapy (62)], and the anakinra dose is known to be pharmacologically active in mice and und is comparable with human therapeutic dosages (63–65). Control animals received respective vehicles. The first drug injection was 3 h before the plantar skin and muscle incision and at least 4 h after IgG or control treatment. Drug treatment was then repeated daily through the experimental period. Delayed anakinra treatment was administered daily between days 8 and 13.

Generation of IL-1 β Floxed Mice and Microglial IL-1 β KO Mice. Il1b^{tm1a(EUCOMM)Hmgu} embryonic stem cells (66) were purchased from the European Mouse Mutant Cell Repository. Cells from clone HEPD0840-8-E03 were prepared for microinjection according to previously published protocols (67) with minor modifications (*SI Appendix, Methods*) and then microinjected into four- to eight-cell B6N-Ty^{c-Brd}/BrdCrCl embryos. Surviving embryos were surgically implanted into the oviduct of day 0.5 postcoitum pseudopregnant mice. Resulting black/white C57BL/6N chimeras were backcrossed onto C57BL/6N WT mice to assess germline penetrance. Potential founder mice were screened by PCR for LacZ, Neo, and LoxP sites. This line was further crossed with C57BL/6N-Tg(CAG-Flp)1Afst/Mmud mice. The flip recombinase expression provided by this line resulted in a "conditional ready" (floxed) Il1b^{tm1c(EUCOMM)Hmgu} allele where exons 4 and 5 are flanked by loxP sites. To generate microglial IL-1 β KO mice, IL-1 β floxed mice were crossed with tamoxifen-inducible B6.129P2(C)-CX3CR1^{tm2.1(Cre/ERT2)Jung/J} mice (JAX stock 020940) (20).

Statistical Analysis. Data shown are means \pm SEM, and two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test was used for comparison of threshold values between groups at respective timepoints. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test was used for analysis of the immunohistochemistry and cytokine results. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS. This research was supported by National Brain Research Program 2017-1.2.1-NKP-2017-00002 (NAP-2; Chronic Pain Research Group), the Pain Relief Foundation Liverpool, Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Program (Economy Development and Innovation Operative Programme) (GINOP)-2.3.2-15-2016-00050 (Peptidergic Signaling in Health and Disease; PEPSYS), Emberi Erőforrás Operatív Program (Human Resource Operative Programme) (EFOP) 3.6.2-17-2017-00008 N (2017-2019), and Társadalmi Megújulás Operatív Program (Social Renewal Operative Programme) (TAMOP) 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 "National Excellence Program—Elaborating and operating an inland student and researcher personal support system convergence program." A.D. is supported by Hungarian Brain Research Program KTIA_13_NAP-A-1/2, the "Momentum" Program of the Hungarian Academy of Sciences, European Research Council (ERC)-CoG 724994, and TÉT_16-1-2016-0104. The generation of IL-1 β fl/fl mouse line was funded by British Heart Foundation Grant PG/13/55/30365 (to E.P. and S.F.). We thank Dóra Önböli and Lilla Draskóczi for their expert technical assistance in the animal experiments and tissue preparation; Jenny Hawkes for her expert technical assistance in the IgG preparation; and Deborah Bently for proofreading the manuscript.

1. R. N. Harden *et al.*, Validation of proposed diagnostic criteria (the "Budapest criteria") for complex regional pain syndrome. *Pain* **150**, 268–274 (2010).
2. F. Birklein, S. K. Ajit, A. Goebel, R. S. G. M. Perez, C. Sommer, Complex regional pain syndrome—Phenotypic characteristics and potential biomarkers. *Nat. Rev. Neuro.* **14**, 272–284 (2018).
3. M. Nicholas *et al.*; IASP Taskforce for the Classification of Chronic Pain, The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic primary pain. *Pain* **160**, 28–37 (2019).
4. A. Goebel, F. Blaes, Complex regional pain syndrome, prototype of a novel kind of autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* **12**, 682–686 (2013).
5. C. Maihöfner, H. O. Handwerker, B. Neundörfer, F. Birklein, Patterns of cortical reorganization in complex regional pain syndrome. *Neurology* **61**, 1707–1715 (2003).
6. A. Zyluk, The natural history of post-traumatic reflex sympathetic dystrophy. *J. Hand Surg. [Br.]* **23**, 20–23 (1998).
7. M. de Mos *et al.*, Outcome of the complex regional pain syndrome. *Clin. J. Pain* **25**, 590–597 (2009).
8. M. A. Kemler, C. A. Furnée, Economic evaluation of spinal cord stimulation for chronic reflex sympathetic dystrophy. *Neurology* **59**, 1203–1209 (2002).
9. N. E. O'Connell, B. M. Wand, J. McAuley, L. Marston, G. L. Moseley, Interventions for treating pain and disability in adults with complex regional pain syndrome. *Cochrane Database Syst. Rev.* **4**, CD009416 (2013).
10. A. B. Ch. Goebel *et al.*, *Complex Regional Pain Syndrome in Adults* (Royal College of Physicians, London, ed. 2, 2018).
11. V. Tékus *et al.*, A CRPS-IgG-transfer-trauma model reproducing inflammatory and positive sensory signs associated with complex regional pain syndrome. *Pain* **155**, 299–308 (2014).
12. J. Schwartz *et al.*, Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice—evidence-based approach from the writing committee of the American Society for apheresis: The seventh special issue. *J. Clin. Apher.* **31**, 149–162 (2016).
13. F. J. Huygen *et al.*, Evidence for local inflammation in complex regional pain syndrome type 1. *Mediators Inflamm.* **11**, 47–51 (2002).
14. A. L. Oaklander *et al.*, Evidence of focal small-fiber axonal degeneration in complex regional pain syndrome-I (reflex sympathetic dystrophy). *Pain* **120**, 235–243 (2006).
15. K. Inoue, M. Tsuda, Microglia in neuropathic pain: Cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat. Rev. Neurosci.* **19**, 138–152 (2018).
16. Z. J. Zhang, B. C. Jiang, Y. J. Gao, Chemokines in neuron-glia cell interaction and pathogenesis of neuropathic pain. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 3275–3291 (2017).
17. K. Popiolek-Barczyk, J. Mika, Targeting the microglial signaling pathways: New insights in the modulation of neuropathic pain. *Curr. Med. Chem.* **23**, 2908–2928 (2016).
18. S. M. Allan, P. J. Tyrrell, N. J. Rothwell, Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 629–640 (2005).
19. A. Denes, E. Pinteaux, N. J. Rothwell, S. M. Allan, Interleukin-1 and stroke: Biomarker, harbinger of damage, and therapeutic target. *Cerebrovasc. Dis.* **32**, 517–527 (2011).
20. S. Yona *et al.*, Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* **38**, 79–91 (2013).
21. M. Weber, F. Birklein, B. Neundörfer, M. Schmelz, Facilitated neurogenic inflammation in complex regional pain syndrome. *Pain* **91**, 251–257 (2001).
22. P. H. Veldman, H. M. Reynen, I. E. Arntz, R. J. Goris, Signs and symptoms of reflex sympathetic dystrophy: Prospective study of 829 patients. *Lancet* **342**, 1012–1016 (1993).
23. N. P. Staff *et al.*, Post-surgical inflammatory neuropathy. *Brain* **133**, 2866–2880 (2010).
24. M. R. Suter, Microglial role in the development of chronic pain. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **29**, 584–589 (2016).
25. E. D. Milligan, L. R. Watkins, Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 23–36 (2009).
26. J. M. Dawes *et al.*, Immune or genetic-mediated disruption of CASPR2 causes pain hypersensitivity due to enhanced primary afferent excitability. *Neuron* **97**, 806–822.e10 (2018).
27. G. Wigerblad *et al.*, Autoantibodies to citrullinated proteins induce joint pain independent of inflammation via a chemokine-dependent mechanism. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 730–738 (2016).
28. L. S. Cahill *et al.*, Quantifying blood-spinal cord barrier permeability after peripheral nerve injury in the living mouse. *Mol. Pain* **10**, 60 (2014).
29. W. Guo *et al.*, Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. *J. Neurosci.* **27**, 6006–6018 (2007).
30. C. Y. Chiang, B. J. Sessle, J. O. Dostrovsky, Role of astrocytes in pain. *Neurochem. Res.* **37**, 2419–2431 (2012).
31. J. M. Pradillo *et al.*, Delayed administration of interleukin-1 receptor antagonist reduces ischemic brain damage and inflammation in comorbid rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, 1810–1819 (2012).
32. A. Denes, P. Thornton, N. J. Rothwell, S. M. Allan, Inflammation and brain injury: Acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain Behav. Immun.* **24**, 708–723 (2010).
33. A. Denes *et al.*, Interleukin-1 mediates neuroinflammatory changes associated with diet-induced atherosclerosis. *J. Am. Heart Assoc.* **1**, e002006 (2012).
34. Á. Dénes *et al.*, Streptococcus pneumoniae worsens cerebral ischemia via interleukin 1 and platelet glycoprotein Iba. *Ann. Neurol.* **75**, 670–683 (2014).
35. S. A. Liddelow *et al.*, Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* **541**, 481–487 (2017).
36. W. Liu, Y. Tang, J. Feng, Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci.* **89**, 141–146 (2011).
37. K. V. Toyka, D. B. Brachman, A. Pestronk, I. Kao, Myasthenia gravis: Passive transfer from man to mouse. *Science* **190**, 397–399 (1975).
38. P. Silveius Smitt *et al.*, Paraneoplastic cerebellar ataxia due to autoantibodies against a glutamate receptor. *N. Engl. J. Med.* **342**, 21–27 (2000).
39. J. S. Mogil *et al.*, Hypolocomotion, asymmetrically directed behaviors (licking, lifting, flinching, and shaking) and dynamic weight bearing (gait) changes are not measures of neuropathic pain in mice. *Mol. Pain* **6**, 34 (2010).
40. G. Lopalco *et al.*, Safety profile of anakinra in the management of rheumatologic, metabolic and autoinflammatory disorders. *Clin. Exp. Rheumatol.* **34**, 531–538 (2016).
41. M. T. Nurmohamed, B. A. Dijkmans, Efficacy, tolerability and cost effectiveness of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in rheumatoid arthritis. *Drugs* **65**, 661–694 (2005).
42. SUVA, *CRPS (Complex Regional Pain Syndrome)*, W. Jänig, R. Schaumann, W. Vogt, Eds. (SUVA, 2013).
43. A. Goebel *et al.*, Mycophenolate for persistent complex regional pain syndrome, a parallel, open, randomised, proof of concept trial. *Scand. J. Pain* **18**, 29–37 (2018).
44. E. M. Pogatzki, S. N. Raja, A mouse model of incisional pain. *Anesthesiology* **99**, 1023–1027 (2003).
45. J. Gierthmühlen *et al.*; German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS) Study Group Sensory signs in complex regional pain syndrome and peripheral nerve injury. *Pain* **153**, 765–774 (2012).
46. V. Hugel *et al.*, Complex interaction of sensory and motor signs and symptoms in chronic CRPS. *PLoS One* **6**, e18775 (2011).
47. S. Ventéo *et al.*, Fxyd2 regulates A δ - and C-fiber mechanosensitivity and is required for the maintenance of neuropathic pain. *Sci. Rep.* **6**, 36407 (2016).
48. A. Szabó *et al.*, Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: In vivo study using gene-deficient mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 111–119 (2005).
49. K. Bölskei *et al.*, Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* **117**, 368–376 (2005).
50. Á. Horváth *et al.*, Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: In vivo study using TRPA1-deficient mice. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 6 (2016).
51. I. Imada *et al.*, Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012. *Anal. Biochem.* **271**, 53–58 (1999).
52. B. Botz *et al.*, Differential regulatory role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the serum-transfer arthritis model. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 2739–2750 (2014).
53. J. Németh *et al.*, Substance P radioimmunoassay for quantitative characterization of sensory neurotransmitter release. *Neurobiology (Bp.)* **7**, 437–444 (1999).
54. J. Németh *et al.*, Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research. *Neurobiology (Bp.)* **6**, 473–475 (1998).
55. A. Denes *et al.*, AIM2 and NLR4 inflammasomes contribute with ASC to acute brain injury independently of NLRP3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 4050–4055 (2015).
56. J. B. Davis, ELISA for monitoring nerve growth factor. *Methods Mol. Biol.* **1606**, 141–147 (2017).
57. M. G. Giovannini *et al.*, Mitogen-activated protein kinase regulates early phosphorylation and delayed expression of Ca $^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II in long-term potentiation. *J. Neurosci.* **21**, 7053–7062 (2001).
58. F. Cerbai *et al.*, The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus. *PLoS One* **7**, e45250 (2012).
59. R. Fekete *et al.*, Microglia control the spread of neurotropic virus infection via P2Y $_{12}$ signalling and recruit monocytes through P2Y $_{12}$ -independent mechanisms. *Acta Neuropathol.* **136**, 461–482 (2018).
60. L. He *et al.*, Methylprednisolone prevents nerve injury-induced hyperalgesia in neprilysin knockout mice. *Pain* **155**, 574–580 (2014).
61. M. Suzuki, H. Yoshida, M. Hashizume, K. Tanaka, Y. Matsumoto, Blockade of interleukin-6 receptor enhances the anti-arthritis effect of glucocorticoids without decreasing bone mineral density in mice with collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **182**, 154–161 (2015).
62. F. Buttgerit *et al.*, Standardised nomenclature for glucocorticoid dosages and glucocorticoid treatment regimens: Current questions and tentative answers in rheumatology. *Ann. Rheum. Dis.* **61**, 718–722 (2002).
63. R. G. Iannitti *et al.*, IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human cystic fibrosis. *Nat. Commun.* **7**, 10791 (2016).
64. A. de Luca *et al.*, IL-1 receptor blockade restores autophagy and reduces inflammation in chronic granulomatous disease in mice and in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 3526–3531 (2014).
65. J. Petrasek *et al.*, IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 3476–3489 (2012).
66. M. Gertsenstein *et al.*, Efficient generation of germ line transmitting chimeras from C57BL/6N ES cells by aggregation with outbred host embryos. *PLoS One* **5**, e11260 (2010).
67. W. C. Skarnes *et al.*, A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* **474**, 337–342 (2011).

Correction

NEUROSCIENCE

Correction for “Transfer of complex regional pain syndrome to mice via human autoantibodies is mediated by interleukin-1–induced mechanisms,” by Zsuzsanna Helyes, Valéria Tékus, Nikolett Szentes, Krisztina Pohóczky, Bálint Botz, Tamás Kiss, Ágnes Kemény, Zsuzsanna Környei, Krisztina Tóth, Nikolett Lénárt, Hajnalka Ábrahám, Emmanuel Pinteaux, Sheila Francis, Serena Sensi, Ádám Dénes, and Andreas Goebel, which was first published June 10, 2019; 10.1073/pnas.1820168116 (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 13067–13076).

The authors note that, due to a printer’s error, the affiliations for Ádám Dénes appeared incorrectly. They should instead appear as Momentum Laboratory of Neuroimmunology, Institute of Experimental Medicine, H-1083, Budapest, Hungary; and Division of Neuroscience and Experimental Psychology, University of Manchester, Manchester M13 9PT, United Kingdom. The corrected author and affiliation lines appear below. The online version has been corrected.

Zsuzsanna Helyes^{a,b,c}, Valéria Tékus^{a,b}, Nikolett Szentes^{a,b}, Krisztina Pohóczky^{a,b,d}, Bálint Botz^{a,b}, Tamás Kiss^{a,b}, Ágnes Kemény^{a,b,e}, Zsuzsanna Környei^f, Krisztina Tóth^f, Nikolett Lénárt^f, Hajnalka Ábrahám^e, Emmanuel Pinteaux^g, Sheila Francis^h, Serena Sensiⁱ, Ádám Dénes^{f,g}, and Andreas Goebel^{i,j}

^aDepartment of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, H-7624, Pécs, Hungary; ^bJános Szentágothai Research Centre & Centre for Neuroscience, University of Pécs, H-7624, Pécs, Hungary; ^cPharmInVivo Ltd., H-7629, Pécs, Hungary; ^dFaculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, University of Pécs, H-7624, Pécs, Hungary; ^eDepartment of Biology and Electron Microscopy, Medical School, University of Pécs, H-7624, Pécs, Hungary; ^fMomentum Laboratory of Neuroimmunology, Institute of Experimental Medicine, H-1083, Budapest, Hungary; ^gDivision of Neuroscience and Experimental Psychology, University of Manchester, Manchester M13 9PT, United Kingdom; ^hDepartment of Infection, Immunity and Cardiovascular Disease, University of Sheffield, Sheffield S10 2RX, United Kingdom; ⁱDepartment of Translational Medicine, University of Liverpool, Liverpool L9 7AL, United Kingdom; and ^jDepartment of Pain Medicine, The Walton Centre National Health Service Foundation Trust, Liverpool L9 7LJ, United Kingdom

Published under the [PNAS license](#).

Published online July 8, 2019.

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1910290116



Exploratory and locomotor activity, learning and memory functions in somatostatin receptor subtype 4 gene-deficient mice in relation to aging and sex

Nikolett Szentes · Valéria Tékus · Violetta Mohos ·
Éva Borbély · Zsuzsanna Helyes

Received: 3 December 2018 / Accepted: 8 March 2019 / Published online: 22 March 2019
© The Author(s) 2019

Abstract The inhibitory neuropeptide somatostatin regulates several functions in the nervous system including memory. Its concentrations decrease by age leading to functional alterations, but there are little known about the receptorial mechanism. We discovered that somatostatin receptor 4 (sst_4) mediates analgesic, anti-depressant, and anti-inflammatory effects without endocrine actions, and it is a unique target for drug development. We investigated the exploratory and locomotor activities and learning and memory functions of male and female sst_4 gene-deficient mice compared with their wild-types (WT) at ages of 3, 12, 17 months in the Y-maze test, open field test (OFT), radial-arm maze (RAM) test and novel object recognition (NOR) test. Young sst_4 gene-deficient females visited, repeated, and missed significantly less arms than the WTs in the RAM; males showed decreased exploration in the NOR. Young mice moved significantly more, spend longer time in OFT center, and visited more arms in the Y-maze than older ones. Young WT females spend significantly longer

time in the OFT center, visited, missed and repeated more arms of the RAM than males. Old males found more rewards than females. Young males explored longer the novel object than young females and older males in the NOR; the recognition index was smaller in females. We conclude that aging and sex are important factors of behavioral parameters that should be focused on in such studies. Sst_4 is likely to influence locomotion and exploratory behavior only in young mice, but not during normal aging, which is a beneficial feature of a good drug target focusing on the elderly.

Keywords Somatostatin · sst_4 receptor · Behavior · Exploratory · Memory · Locomotion

Introduction

Aging strongly influences cognitive functions, memory, and learning. Learning slows down, but memory does not necessarily worsen in the aging population that is continuously increasing in the twenty-first century. Identifying targets for cognitive impairment and memory deficits is in the focus of drug development (Martel et al. 2012). Besides aging, sex is also a crucial factor of cognitive performance (Ruan et al. 2017); therefore, it is important to analyze the differences in preclinical models. It is well established in a variety of species including humans (Vedovelli et al. 2017), rats (Casad 1990; Tenk et al. 2017), and mice (Ashpole et al. 2017; Fang et al. 2017; Reglodi et al. 2018; Spik and Sonntag 1989; Ungvari et al. 2017a) that peptide neurotransmitters, such as

N. Szentes · V. Tékus · É. Borbély · Z. Helyes (✉)
Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of
Medicine, János Szentágothai Research Centre & Centre for
Neuroscience, University of Pécs, Szigeti u. 12, Pécs H-7624,
Hungary
e-mail: zsuzsanna.helyes@aok.pte.hu

Z. Helyes
PharmInVivo Ltd., Pécs, Hungary

V. Mohos
Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of
Pécs, Pécs, Hungary

somatostatin, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, corticotropin-releasing factor, insulin-like growth factor 1, growth hormone (GH), neurotrophic factor, connective tissue growth factor, play important regulatory roles in age-related diseases, and both their brain and peripheral concentrations change throughout aging.

Somatostatin is a 14 or 28 amino acid-containing peptide with a disulfide bridge discovered in the hypothalamus (Guillemin 1972) and originally described as a GH or somatotropin inhibiting factor (SRIF). Later it was characterized to be a broad spectrum inhibitory neurotransmitter with a complex effect throughout the central nervous system (CNS) (Epelbaum 1986; Martel et al. 2012; Viollet et al. 2008), as well as the periphery to mediate a variety of auto-, para- or endocrine actions (Leblanc et al. 1975; Pintér et al. 2006). Two subpopulations of somatostatinergic neurons can be distinguished in the CNS, long-protruding somatostatinergic neurons and short-proximal glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA)-ergic interneurons (Epelbaum 1986; Gulyás et al. 2003; Tomioka et al. 2005). Somatostatin inhibits the release of several excitatory and inhibitory neurotransmitters, such as serotonin, acetylcholine, glutamate, and GABA (Baraban and Tallent 2004). It plays a role in sensory perception and pain, motor functions, sleep, cognitive performance (Helyes et al. 2009; Matsuoka et al. 1994), and neurodegenerative disorders (Martel et al. 2012; Tuboly and Vecsei 2013), neuroendocrine and emotional regulation, anxiety and depression (Engin et al. 2008; Lin and Sibille 2015). Our team has provided strong proof-of-concept evidence for systemic anti-inflammatory and analgesic effects of somatostatin released from the activated capsaicin-sensitive peptidergic sensory nerves at the periphery called “sensocrine” function (Szolcsányi et al. 2004; Thán et al. 2000).

Brain somatostatin concentrations and its functions are strongly influenced by aging. Early gene expression studies demonstrated a significant reduction of somatostatin mRNA in the striatum, frontal, and parietal cortex, without significant changes in the hypothalamus of female Wistar rats (Florio et al. 1991). Furthermore, hypothalamic somatostatin immunoreactivity significantly decreases in aged female mice (Kuwahara et al. 2004) and rats (Kim and Choe 2018). In the frontal cortex, a certain somatostatinergic neuronal population is remarkably down-regulated (French et al. 2017). Somatostatin-induced GH-release inhibition was more sensitive in old animals (Kim and Choe 2018). Moreover, genetic deletion of somatostatin leads to reduced hippocampal neprilysin

inactivity and increased A β ₄₂-formation also in young animals, which suggests a potential protective role of somatostatin in the development of Alzheimer’s disease and cognitive deficits (Saito et al. 2005). Despite all these data about the expressional and functional alterations of the somatostatinergic systems in the aging brain, very little is known about the regulation, sensitivity, and mechanisms of its receptors (Kim and Choe 2018).

The broad range of actions of somatostatin is mediated by its 5 G_i protein-coupled receptors (sst_{1–5}) categorized into SRIF1 (sst_{2, 3, 5}) and SRIF2 (sst_{1, 4}) groups on the basis of synthetic agonist binding potentials (Hoyer et al. 1995). The SRIF2 receptors mediate the endocrine effect of somatostatin, while the SRIF1 ones are responsible for the anti-inflammatory, analgesic, anti-anxiety and anti-depressant actions (Prévôt et al. 2017; Scheich et al. 2016, 2017a). We discovered that the sst₄ receptor is a very promising target to inhibit neurogenic inflammation, neuropathic pain, and depression (Scheich et al. 2016, 2017b), which was supported by others (Schuelert et al. 2015; Shenoy et al. 2018). Therefore, small molecule sst₄ agonists are potential drug candidates as novel analgesic drugs with simultaneous anti-depressant activity (Botz et al. 2017; Scheich et al. 2016, 2017b). It is very important to elucidate the complex CNS functions of the sst₄ receptor from this drug development point of view as well.

Although the precise expression of sst₄ is not known due to the lack of reliable antibodies, data suggest that it is present in the hippocampus, striatum related to behavior, cognition, and memory (Gastambide et al. 2010; Nakagawasai et al. 2003; Schreff et al. 2000; Viollet et al. 1997), and a small molecule agonist was described to improve long-term and short-term learning in a mouse model of neurodegeneration (Gastambide et al. 2009; Sandoval et al. 2011).

Therefore, in the present study, we investigated the locomotor activity, anxiety, and memory functions in male and female mice throughout aging, as well as the role of the sst₄ receptor on these parameters.

Materials and methods

Animals

We examined male and female sst₄ gene-deficient mice (knockout, KO) (Helyes et al. 2009; Scheich et al. 2016, 2017b) and wild-type (WT) counterpart of three different ages (3, 12, 17-month-old) in different behavioral tests.

They were bred and kept in the Laboratory Animal House of the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy of the University of Pécs, Medical School. All animals were in standard plastic cages at 24–25 °C, under a 12–12 h light-dark cycle and provided by standard rodent chow and water ad libitum.

All experiments were carried out in accordance with the recommendations of the 1998/XXVIII Act of the Hungarian Parliament on Animal Protection (243/1988) and were approved by the Ethics Committee on Animal Research of Pécs University (license no. BA02/2000-76/2017).

Y-maze test

This test is suitable for rodent memory and route-learning capabilities, where we investigated the exploratory behavior of the mice for new ways (Holcomb et al. 1999; Hullmann et al. 2017). They were placed in the upper arm of the Y-shaped maze, each arm having the same length (35 cm), width (5 cm) and height (6 cm). Mice could freely move within the 5-min-period, the number of visited arms and the alternation index (%) ($(n(\text{arm combination}))/n(\text{total number of visited arms}-2) \times 100$) were determined.

Radial arm maze (RAM) test

This test is appropriate for investigating both short-term (working memory) and long-term (reference memory) memory functions (Frick et al. 1999; Gresack and Frick 2003).

It is constructed of eight arms with a well-defined central region where the mice start from. Each arm is 25 cm long, 7.5 cm wide, and 6 cm tall, the central part is 20 cm in diameter. Four sugar pellets (rewards) were placed in four defined arms, their locations did not change during the experiment. The entire study lasted for 4 days, the measurement time was 5 min every day in the arena. Mice were conditioned on the first 3 days, without and with rewards on the first and second/third days, respectively. The measurement used for evaluation was performed on the fourth day. The test lasted until the animal found all the four sugar pellets, but it was maximized for 5 min (Zhang and O'Donnell 2000). The number of visited, repeated (when the animal reentered a previously visited reward-containing arm), and missed arms (when the animal entered an arm that does not contain rewards), as well as the number of the found rewards and the time to

find all the rewards were measured (Astur et al. 2004; Crusio and Schwegler 2005).

We determined the spatial working (the number of repeated arms divided by all visits, then multiplied by 100) and reference (the number of missed arms divided by all visits, then multiplied by 100) memory errors.

Novel object recognition (NOR) test

This test was carried out in a 40 × 40 cm high-walled box (open-field box) divided into 20 sections and lasted for 3 days. On the first day, the animals are habituated for 5 min, and the test served as an open field test (OFT) when the spontaneous locomotor activity and anxiety (time spent by moving, in the middle and at the periphery) were evaluated (Carola et al. 2002; Gaszner et al. 2012; Scheich et al. 2016). On the second day, two identical objects (smaller than the mouse) were placed in the test area, and the mice were allowed to familiarize with these objects for 5 min. On the third day (after 24 h), one object was replaced with a new one of different shape and color, and the animals have observed it for 5 min. We detected how much time the mice spend with the discovery of the familiar and the novel objects; the ratio of which was determined as the recognition index (Antunes and Biala 2012).

All experiments were recorded by the Noldus system and evaluated by the EthoVision XT software.

Statistical evaluation

Data are shown as means ± SEM, and factorial ANOVA followed by Tukey's HSD post hoc test was used for statistical evaluation. Significant differences were highlighted in all figures as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (related to age; older groups vs. young ones); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ (relates to sex; females vs. males); + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ (related to genotype; KO vs. WT).

Results

Behavior of male and female *sst4* KO mice of different ages in comparison with respective WT to controls in the Y-maze

Young male and female WT and *sst4* gene-deficient mice visited significantly more arms than their older

counterparts. Furthermore, the 17-month-old female WTs visited significantly less arms compared with males. Deletion of the *sst*₄ receptor did not alter the behavior in this test in any age groups either in males or females. There were no significant differences in arm combinations in relation to age, sex, and *sst*₄ receptor deletion (Fig. 1).

*Sst*₄ deficiency and aging worsen the RAM performance of female but not male mice

Young *sst*₄ gene-deficient female mice visited, repeated, and missed significantly less arms than the WT counterparts. There was a remarkable sex difference in young mice, females repeated and missed significantly more arms than the males, and also visited more arms, although this parameter was not statistically significant. In the female, but not in the male WT group, young mice visited, repeated and missed more and found significantly more rewards than the respective old ones (Fig. 2).

Working and reference memory functions of male and female *sst*₄ KO mice of different ages in comparison with respective WT controls in the RAM

Surprisingly, both aging and *sst*₄ deletion significantly improved the working memory of female but not of male mice. However, the working memory of young and the reference memory of old WT female mice were worse than these functions of age-matched male controls, respectively (Fig. 3).

Aging decreases spontaneous locomotor activity and increases anxiety level in both sexes independently of the *sst*₄ receptor in the OFT

The 12- and 17-month-old mice of both sexes and genotypes moved significantly less during the 5-min measurement, spend less time in the middle and more at the periphery of the OF box than their young controls.

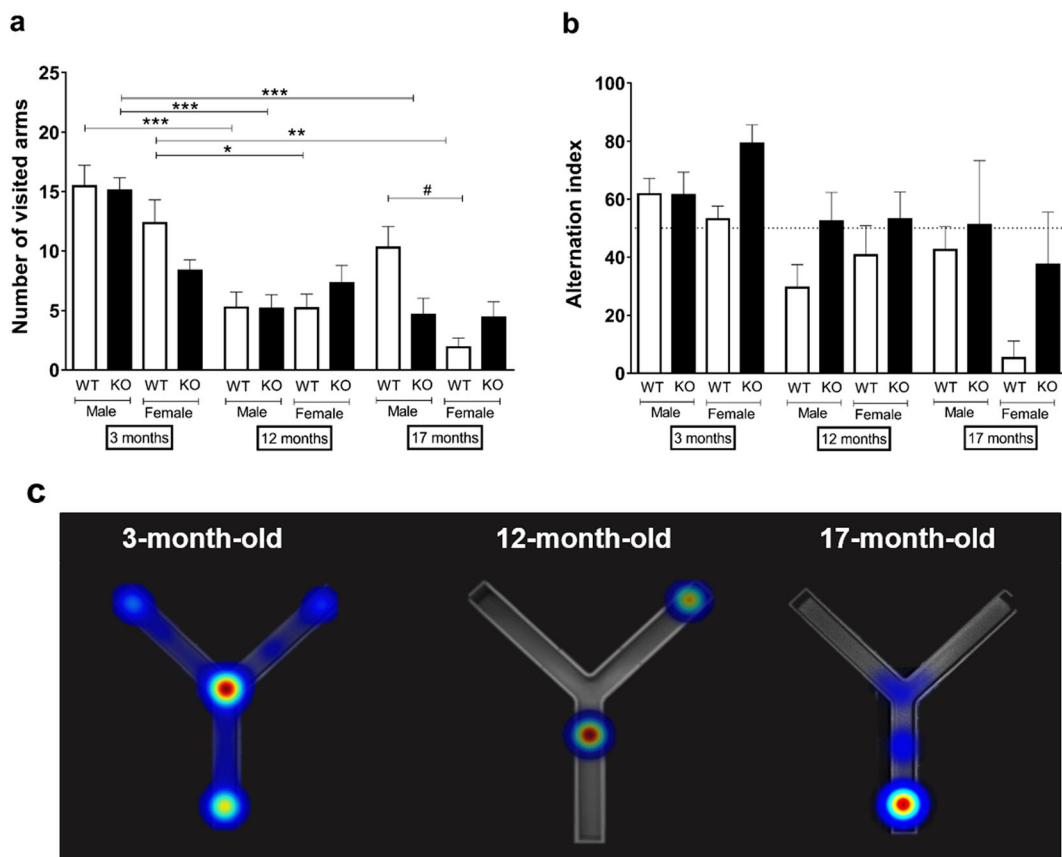


Fig. 1 **a** The total number of visited arms and **b** arm combination in the Y-maze test showing spatial working memory of mice by spontaneous alternation of male and female *sst*₄ gene-deficient mice and WT counterparts of three different ages (3-, 12-, 17-

months-old). **c** Representative heatmap pictures of male KO in the three different age groups. Data are means \pm SEM, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 (vs. age); # p < 0.05 (vs. sex); factorial ANOVA followed by Tukey's HSD post hoc test

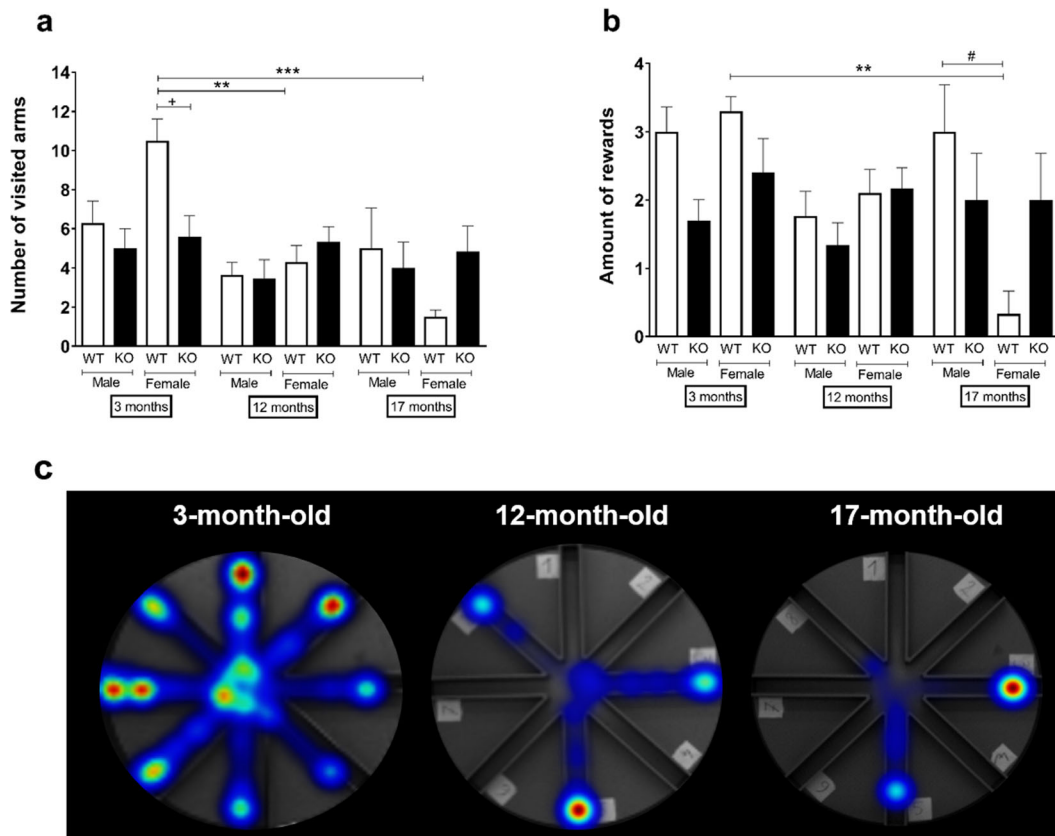


Fig. 2 **a** The number of visited, **b** amount of reward found in the RAM. **c** Representative heatmap pictures of female WT in the three different age groups. Data are means \pm SEM, $**p < 0.01$,

$***p < 0.001$ (vs. age); $\#p < 0.05$ (vs. sex); $+p < 0.05$ (vs. gene); factorial ANOVA followed by Tukey’s HSD post hoc test

It is also important to note that in the young WT group, females spend significantly more time in the middle and

less at the periphery than the age-matched males (Fig. 4).

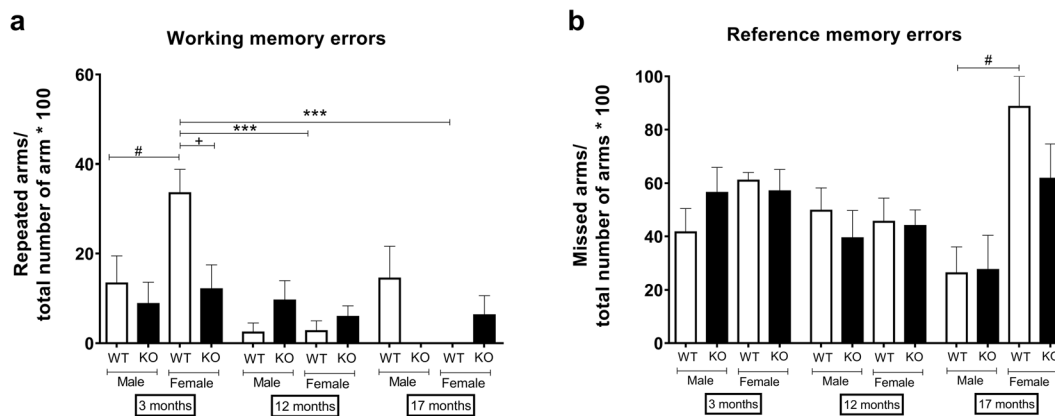


Fig. 3 **a** Working and **b** reference memory functions. Data are means \pm SEM, $***p < 0.001$ (vs. age); $\#p < 0.05$ (vs. sex); $+p < 0.05$ (vs. gene); factorial ANOVA followed by Tukey’s HSD post hoc test

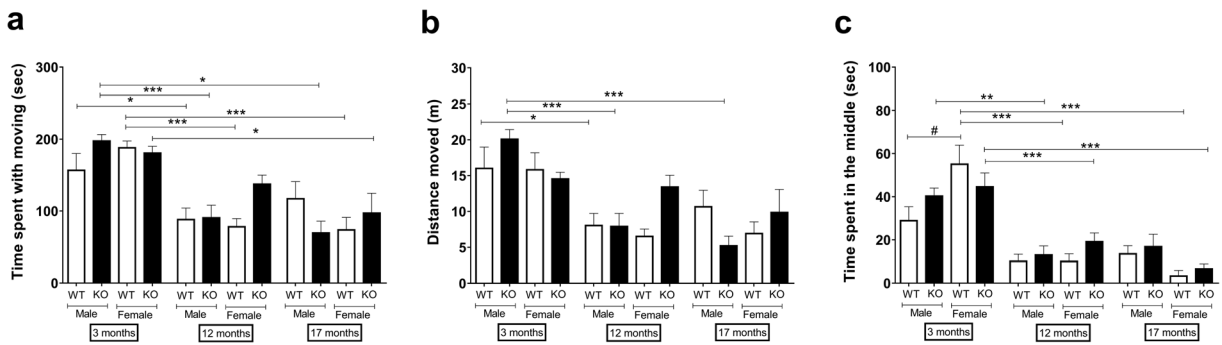


Fig. 4 **a** Time spend with moving, **b** distance moved, and **c** time spend in the middle in the open field box. Data are means \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (vs. age); # $p < 0.05$ (vs. sex); factorial ANOVA followed by Tukey's HSD post hoc test

Decreased exploratory behavior in *sst*₄-deficient young male, female and aged mice, but unaltered novelty detection and recognition memory functions in the NOR test

Young WT male mice spend significantly more time with both the familiar and novel objects than the *sst*₄ gene-deficient ones, as well as the female counterparts and old ones both in cases of the first test (day 2) and the repeated test (day 3) (Fig. 5a–d).

The older, 12-, and 17-month-old mice of both sexes and genotypes were much less interested in exploring both objects. The recognition index determined by the ratio of the novel and the familiar object investigations showing the memory function did not show any difference in any groups (Fig. 5e).

Discussion

We show here that aging and sex are very important factors of behavioral parameters that have to be focused on in such studies. Furthermore, the somatostatin *sst*₄ receptor is likely to be involved in locomotion and exploratory behaviors only in young mice and does not influence behavior during normal aging.

Somatostatin is expressed in brain regions related to pain and mood regulation like the dorsolateral prefrontal, cingulate cortex, and amygdala (Guilloux et al. 2012; Sibille et al. 2011; Tripp et al. 2011). Its important inhibitory functions in several physiological and pathophysiological processes, such as sensory, locomotion and motor coordination (Zeyda et al. 2001), stress-related and learning activities (Viollet et al. 2008), mood regulation (Engin et al. 2008; Lin and Sibille 2015), cognitive performance, and neurodegeneration (Saito

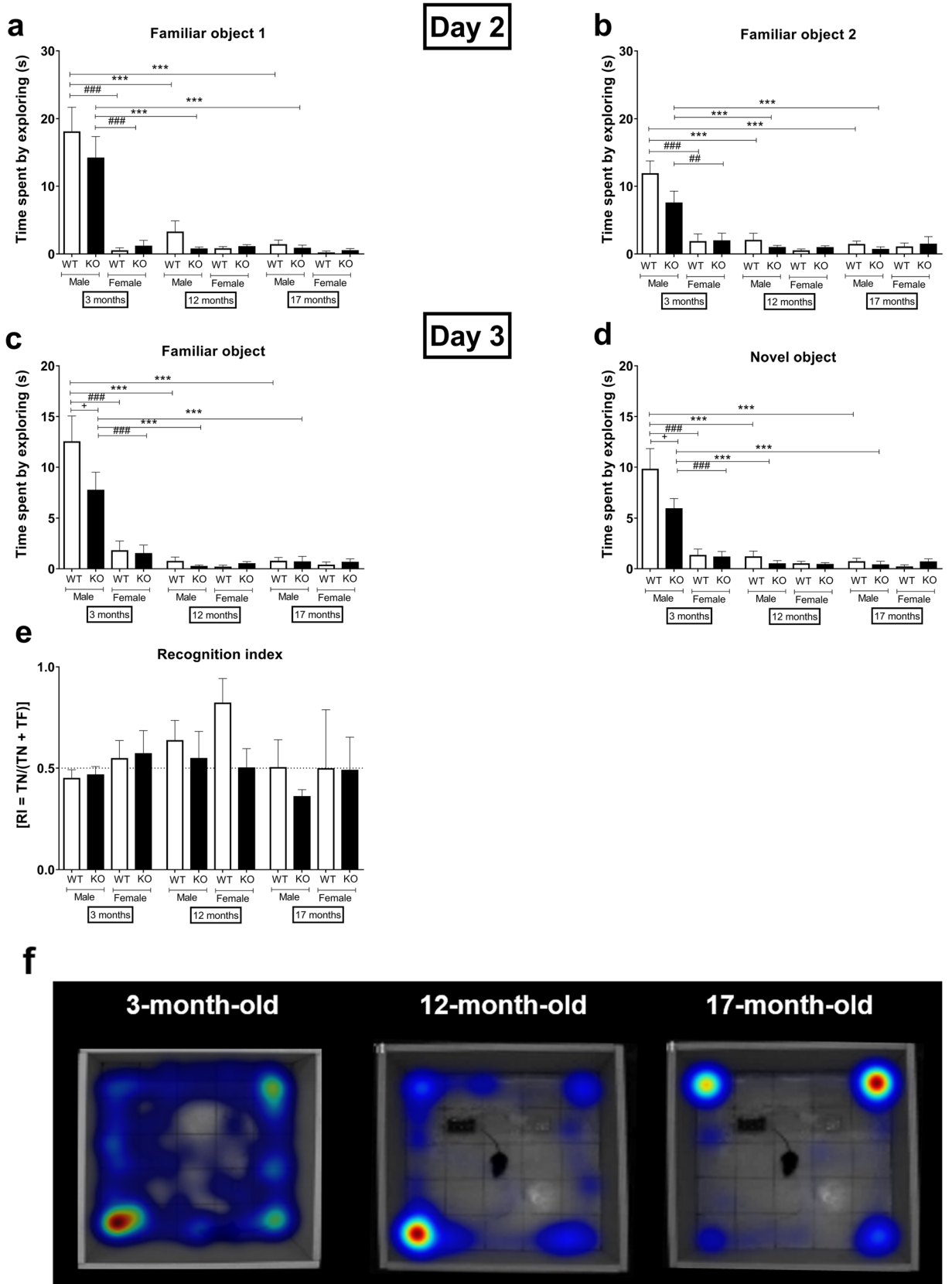
et al. 2005) has also been evidenced in animal models. Furthermore, lower somatostatin levels were measured in the cerebrospinal fluid and the brain areas of patients with major and bipolar depressive disorders, schizophrenia, Alzheimer's, and Parkinson's diseases (Lin and Sibille 2013).

Somatostatin levels strongly decrease in the aging brain to that mRNA and protein levels (Florio et al. 1991; Kuwahara et al. 2004), and its functions are also altered (French et al. 2017; Kim and Choe 2018).

The expression of the *sst*₄ receptor in the brain is similar to that of somatostatin (Martel et al. 2012), but there are no data about its functions and changes in aging. We earlier found enhanced inflammatory and neuropathic hyperalgesia in *sst*₄-deleted mice (Helyes et al. 2009). Increased depression-like behaviors and anxiety, as well as altered neuronal activation in the central and basolateral amygdaloid nuclei, were detected in *sst*₄ gene-deficient mice upon both acute and chronic stress (Scheich et al. 2017b).

The present results clearly demonstrate that the lack of *sst*₄ only influences some behaviors of young mice: females visited, repeated, and missed significantly less arms than the WT in the RAM, while males showed decreased exploration in the NOR. Since the outcomes of these behavioral tests are greatly modified by the anxiety level of the animals, and the *sst*₄-deficient mice have more anxious and depressive-like phenotype (Scheich et al. 2016), our findings might not only be

Fig. 5 **a–b** Time spend of familiar/familiar object, **c–d** the time of familiar/novel object zone, and **e** recognition index in the NOR test. **f** Representative heatmap pictures of male WT in the three different age groups. Data are means \pm SEM, *** $p < 0.001$ (vs. age); ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ (vs. sex); + $p < 0.05$ (vs. gene); factorial ANOVA followed by Tukey's HSD post hoc test



explained by the direct inhibition of learning and locomotion by somatostatin via this receptor, but higher stress level could also be an influencing factor.

Since substantial influence of aging and sex on the behavioral parameters in rodent experiments is well-established (Frick et al. 1999; Sutcliffe et al. 2007), we investigated the impact of these factors in our test systems in order to get a complex picture. The OFT (Carola et al. 2002) and the spontaneously alternating Y-maze test are suitable for determining spontaneous locomotor activity, exploratory behavior, and anxiety level (Borbély et al. 2013). Furthermore, the arm combination in the latter test also refers to working memory functions, since the animal has to remember the two arms that visited for the previous time to get the opportunity to choose and create a new alternative (Hughes 2004). Locomotor activity, anxiety, exploration time in both sexes, but working memory of females declined with age. Young males showed worse locomotor activity, higher anxiety, and better recognition memory, but old ones better working memory than females. Young mice moved significantly more, spend longer time in OFT center, and visited more arms in the Y-maze than older ones of both sexes. As for sex differences, we found that young females were more active than males, but the oldest females were less active and anxious than the respective males.

The influence of aging and sex on behavioral and memory parameters was investigated by others earlier with C57BL/6NIA mice. They found deteriorated memory with aging in both sexes up to 25 months in the Morris water maze, elevated plus maze, OFT that are in agreement with our findings. The 17-month-old mice showed less exploratory behavior, females had higher anxiety level and better spatial reference memory than males (Frick et al. 1999). Cognitive tests were performed in order to assess spontaneous movement, daily activity, distance moved, velocity, and acceleration in a 90-h period of time in young and old (C57B1/6J male 6, 21 and 27 months old) mice. Learning abilities and locomotor activity decreased age dependently and similarly to rats and humans. However, memory decline was not observed in all elderly mice (Logan et al. 2018). Furthermore, in a recent study, cognitive decline was investigated in C57BL/6J mice in the RAM test after brain irradiation which showed that this test is suitable method for assessing memory function in rodents (Ungvari et al. 2017b).

In both the RAM and NOR tests, the working and recognition memory of young animals were better, respectively. The NOR is widely used to examine memory processes (Bevins and Besheer 2006). Young WT females visited, missed, and repeated more arms of the RAM, but old males found more rewards. In the NOR, young males spend longer time by exploring the novel object than both young females and older males, the recognition index was smaller in females. Similarly to our mouse results here, male rats were shown to perform better in the recognition test (Sutcliffe et al. 2007).

There is a strong proof-of-concept that sst_4 is a valuable target for the development of analgesic and antidepressant, as well as anti-inflammatory drugs providing a unique tool for the treatment of these common comorbidities particularly in the elderly. Therefore, small molecule sst_4 agonists with a completely new mechanism of action are under development for chronic neuropathic pain, concomitant mood disorders, and neurogenic inflammation that are still important unmet medical needs (Botz et al. 2017; Pintér et al. 2006; Scheich et al. 2016).

Synthetic sst_4 agonists inhibit pain, inflammation (Sándor et al. 2006; Schuelert et al. 2015), depression-like behavior (Scheich et al. 2016), and as neurodegeneration and cognitive dysfunction via increasing neprilysin activity leading to decreased cortical $A\beta_{1-42}$ formation in rodent models (Sandoval et al. 2011, 2012). We can conclude from the present results, that sst_4 does not influence these functions during normal aging without more severe neuronal damage. Therefore, sst_4 agonists, as novel drug candidates, are not likely to have a major influence on locomotion and learning ability.

Funding Information Open access funding provided by University of Pécs (PTE). This research was supported by the National Brain Research Program (20017-1.2.1-NKP-2017-00002), 17886-4/2018/FEKUTSTRAT, GINOP-2.3.2-15-2016-00050 (“PEPSYS Complexity of peptidergic signalization and its role in systemic diseases”), EFOP-3.6.2-16-2017-00008 (“The role of neuro-inflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics”), EFOP-3.6.1-16-2016-00004, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009.

Compliance with ethical standards All experiments were carried out in accordance with the recommendations of the 1998/XXVIII Act of the Hungarian Parliament on Animal Protection (243/1988) and were approved by the Ethics Committee on Animal Research of Pécs University (license no. BA02/2000-76/2017).

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Antunes M, Biala G (2012) The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13:93–110
- Ashpole NM, Logan S, Yabluchanskiy A, Mitschelen MC, Yan H, Farley JA, Hodges EL, Ungvari Z, Csiszar A, Chen S, Georgescu C, Hubbard GB, Ikeno Y, Sonntag WE (2017) IGF-1 has sexually dimorphic, pleiotropic, and time-dependent effects on healthspan, pathology, and lifespan. *Geroscience* 39:129–145
- Astur R, Tropp J, Sava S, Constable RT, Markus EJ (2004) Sex differences and correlations in a virtual Morris water task, a virtual radial arm maze, and mental rotation. *Behav Brain Res* 151:103–115
- Baraban SC, Tallent MK (2004) Interneuron diversity series: Interneuronal neuropeptides - endogenous regulators of neuronal excitability. *Trends Neurosci* 27:135–142
- Bevins RA, Besheer J (2006) Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study “recognition memory”. *Nat Protoc* 1:1306–1311
- Borbély É, Scheich B, Helyes Z (2013) Neuropeptides in learning and memory. *Neuropeptides* 47:439–450
- Botz B, Bölcskei K, Helyes Z (2017) Challenges to develop novel anti-inflammatory and analgesic drugs. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 9:1–30
- Carola V, D’Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P (2002) Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mic. *Behav Brain Res* 134:49–57
- Casad RC (1990) Studies with somatostatin and aging. Dissertation, Jr University of Michigan
- Crusio WE, Schwegler H (2005) Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. *Behav Brain Funct* 1:3
- Engin E, Stellbrink J, Treit D, Dickson CT (2008) Anxiolytic and antidepressant effects of intracerebroventricularly administered somatostatin: behavioral and neurophysiological evidence. *Neuroscience* 157:666–676
- Epelbaum J (1986) Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol J Ep* 271:63–100
- Fang Y, McFadden S, Darcy J, Hill CM, Huber JA, Verhulst S, Kopchick JJ, Miller RA, Sun LY, Bartke A (2017) Differential effects of early-life nutrient restriction in long-lived GHR-KO and normal mice. *Geroscience* 39:347–356
- Florio T, Ventra C, Postiglione A, Schettini G (1991) Age-related alterations of somatostatin gene expression in different rat brain areas. *Brain Res* 557:64–68
- French L, Ma TZ, Oh H, Tseng GC, Sibille E (2017) Age-related gene expression in the frontal cortex suggests synaptic function changes in specific inhibitory neuron subtypes. *Front Aging Neurosci* 9:1–14
- Frick KM, Burlingame LA, Arters JA, Berger-Sweeney J (1999) Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience* 95:293–307
- Gastambide F, Viollet C, Lepousez G, Epelbaum J, Guillou JL (2009) Hippocampal SSTR4 somatostatin receptors control the selection of memory strategies. *Psychopharmacology* 202:153–163. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1204-x>
- Gastambide F, Lepousez G, Viollet C, Loudes C, Epelbaum J, Guillou JL (2010) Cooperation between hippocampal somatostatin receptor subtypes 4 and 2: functional relevance in interactive memory systems. *Hippocampus* 20:745–757
- Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglodi D, Helyes Z (2012) The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 202:283–299
- Gresack JE, Frick KM (2003) Male mice exhibit better spatial working and reference memory than females in a water-escape radial arm maze task. *Brain Res* 982:98–107
- Guillemin R (1972) Physiology and chemistry of the hypothalamic releasing factors for gonadotropins: a new approach to fertility control. *Contraception* 5:1–19
- Guilloux J, Douillard-Guilloux G, Kota R, Wang X, Martinowich K, Tseng GC, Lewis DA, Sibille E (2012) Molecular evidence for BDNF- and GABA-related dysfunctions in the amygdala of female subjects with major depression. *Mol Psychiatry* 17:1130–1142
- Gulyás AI, Hájos N, Katona I, Freund TF (2003) Interneurons are the local targets of hippocampal inhibitory cells which project to the medial septum. *Eur J Neurosci* 17:1861–1872
- Helyes Z, Pintér E, Sándor K, Elekes K, Bánvölgyi Á, Keszthelyi D, Szóke É, Tóth DM, Sándor Z, Kereskai L, Pozsgai G, Allen JP, Emson PC, Markovics A, Szolcsányi J (2009) Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc Natl Acad Sci* 106:13088–13093
- Holcomb LA, Gordon MN, Jantzen P, Hsiao K, Duff K, Morgan D (1999) Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behav Genet* 29:177–185. <https://doi.org/10.1023/A:1021691918517>
- Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE (1995) Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 16:86–88
- Hughes RN (2004) The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev* 28:497–505
- Hullmann M, Albrecht C, van Berlo D, Gerlofs-Nijland ME, Wahle T, Boots AW, Krutmann J, Cassee FR, Bayer TA, Schins RPF (2017) Diesel engine exhaust accelerates plaque formation in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Part Fibre Toxicol* 14:1–14

- Kim K, Choe HK (2018) Role of hypothalamus in aging and its underlying cellular mechanisms. *Mech Ageing Dev* 177:74–79
- Kuwahara S, Kesuma Sari D, Tsukamoto Y, Tanaka S, Sasaki F (2004) Age-related changes in growth hormone (GH)-releasing hormone and somatostatin neurons in the hypothalamus and in GH cells in the anterior pituitary of female mice. *Brain Res* 1025:113–122
- Leblanc H, Anderson JR, Sigel MB, Yen SSC (1975) Inhibitory action of somatostatin on pancreatic α and β cell function. *J Clin Endocrinol Metab* 40:568–572
- Lin LC, Sibille E (2013) Reduced brain somatostatin in mood disorders: a common pathophysiological substrate and drug target? *Front Pharmacol* 4:1–12
- Lin LC, Sibille E (2015) Somatostatin, neuronal vulnerability and behavioral emotionality. *Mol Psychiatry* 20:377–387
- Logan S, Owen D, Chen S, Chen WJ, Ungvari Z, Farley J, Csizsar A, Sharpe A, Loos M, Koopmans B, Richardson A, Sonntag WE (2018) Simultaneous assessment of cognitive function, circadian rhythm, and spontaneous activity in aging mice. *Geroscience* 40:123–137
- Martel G, Dutar P, Epelbaum J, Viollet C (2012) Somatostatinergic systems: an update on brain functions in normal and pathological aging. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:154
- Matsuoka N, Maeda N, Yamaguchi I, Satoh M (1994) Possible involvement of brain somatostatin in the memory formation of rats and the cognitive enhancing action of FR121196 in passive avoidance task. *Brain Res* 642:11–19
- Nakagawasai O, Hozumi S, Tan-No K, Niijima F, Arai Y, Yasuhara H, Tadano T (2003) Immunohistochemical fluorescence intensity reduction of brain somatostatin in the impairment of learning and memory-related behaviour induced by olfactory bulbectomy. *Behav Brain Res* 142:63–67
- Pintér E, Helyes Z, Szolcsányi J (2006) Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther* 112:440–456
- Prévôt TD, Gastambide F, Viollet C, Henkous N, Martel G, Epelbaum J, Béracochéa D, Guillou JL (2017) Roles of hippocampal somatostatin receptor subtypes in stress response and emotionality. *Neuropsychopharmacology* 42:1647–1656
- Reglodi D, Atlasz T, Szabo E, Jungling A, Tamas A, Juhasz T, Fulop BD, Bardosi A (2018) PACAP deficiency as a model of aging. *Geroscience* 40:437–452
- Ruan Q, D'Onofrio G, Sancarolo D, Greco A, Lozupone M, Seripa D, Panza F, Yu Z (2017) Emerging biomarkers and screening for cognitive frailty. *Aging Clin Exp Res* 29:1075–1086
- Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang SM, Suemoto T, Higuchi M, Saido TC (2005) Somatostatin regulates brain amyloid β peptide A β 42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med* 11:434–439
- Sándor K, Elekes K, Szabó Á, Pintér E, Engström M, Wurster S, Szolcsányi J, Helyes Z (2006) Analgesic effects of the somatostatin sst4 receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models. *Eur J Pharmacol* 539:71–75
- Sandoval KE, Farr SA, Banks WA, Niehoff ML, Morley JE, Crider AM, Witt KA (2011) Chronic peripheral administration of somatostatin receptor subtype-4 agonist NNC 26-9100 enhances learning and memory in SAMP8 mice. *Eur J Pharmacol* 654:53–59
- Sandoval KE, Farr SA, Banks WA, Crider AM, Morley JE, Witt KA (2012) Somatostatin receptor subtype-4 agonist NNC 26-9100 decreases extracellular and intracellular A β 1-42 trimers. *Eur J Pharmacol* 683(1–3):116–124
- Scheich B, Gaszner B, Kormos V, László K, Ádori C, Borbély É, Hajna Z, Tékus V, Bölskei K, Ábrahám I, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z (2016) Somatostatin receptor subtype 4 activation is involved in anxiety and depression-like behavior in mouse models. *Neuropharmacology* 101:204–215
- Scheich B, Cseko K, Borbély E, Abraham I, Csernus V, Gaszner B, Helyes Z (2017a) Higher susceptibility of somatostatin 4 receptor gene-deleted mice to chronic stress-induced behavioral and neuroendocrine alterations. *Neuroscience* 346:320–336
- Scheich B, Vincze P, Szőke É, Borbély É, Hunyady Á, Szolcsányi J, Dénes Á, Környei Z, Gaszner B, Helyes Z (2017b) Chronic stress-induced mechanical hyperalgesia is controlled by capsaicin-sensitive neurones in the mouse. *Eur J Pain (United Kingdom)* 21:1417–1431
- Schreff M, Schulz S, Händel M, Keilhoff G, Braun H, Pereira G, Klutzny M, Schmidt H, Wolf G, Höllt V (2000) Distribution, targeting, and internalization of the sst4 somatostatin receptor in rat brain. *J Neurosci* 20:3785–3797
- Schuelert N, Just S, Kuelzer R, Corradini L, Gorham LCJ, Doods H (2015) The somatostatin receptor 4 agonist J-2156 reduces mechanosensitivity of peripheral nerve afferents and spinal neurons in an inflammatory pain model. *Eur J Pharmacol* 746:274–281
- Shenoy PA, Kuo A, Khan N, Gorham L, Nicholson JR, Corradini L, Vetter I, Smith MT (2018) The somatostatin receptor-4 agonist J-2156 alleviates mechanical hypersensitivity in a rat model of breast cancer induced bone pain. *Front Pharmacol* 9:495
- Sibille E, Morris HM, Kota RS, Lewis DA (2011) GABA-related transcripts in the dorsolateral prefrontal cortex in mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* 14:721–734
- Spik K, Sonntag WE (1989) Increased pituitary response to somatostatin in aging male rats: relationship to somatostatin receptor number and affinity. *Neuroendocrinology* 50:489–494
- Sutcliffe JS, Marshall KM, Neill JC (2007) Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. *Behav Brain Res* 177:117–125
- Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z (2004) Sensocrine function of capsaicin-sensitive nociceptors mediated by somatostatin regulates against inflammation and hyperalgesia. Hyperalgesia: molecular mechanisms and clinical implication. In: Handwerker HO, Brune K (eds) *Process in pain research and Management*, vol 30. IASP Press, Seattle, pp 113–128
- Tenk J, Rostás I, Füredi N, Mikó A, Solymár M, Soós S, Gaszner B, Feller D, Székely M, Pétervári E, Balaskó M (2017) Age-related changes in central effects of corticotropin-releasing factor (CRF) suggest a role for this mediator in aging anorexia and cachexia. *Geroscience* 39:61–72
- Thán M, Németh J, Szilvássy Z, Pintér E, Helyes Z, Szolcsányi J (2000) Systemic anti-inflammatory effect of somatostatin released from capsaicin-sensitive vagal and sciatic sensory fibres of the rat and Guinea-pig. *Eur J Pharmacol* 399:251–258

- Tomioka R, Okamoto K, Furuta T, Fujiyama F, Iwasato T, Yanagawa Y, Obata K, Kaneko T, Tamamaki N (2005) Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. *Eur J Neurosci* 21: 1587–1600
- Tripp A, Kota RS, Lewis DA, Sibille E (2011) Reduced somatostatin in subgenual anterior cingulate cortex in major depression. *Neurobiol Dis* 42:116–124
- Tuboly G, Vecsei L (2013) Somatostatin and cognitive function in neurodegenerative disorders. *Mini-Rev Med Chem* 13:34–46
- Ungvari Z, Valcarcel-Ares MN, Tarantini S, Yabluchanskiy A, Fülöp GA, Kiss T, Csiszar A (2017a) Connective tissue growth factor (CTGF) in age-related vascular pathologies. *Geroscience* 39:491–498
- Ungvari Z, Tarantini S, Hertelendy P, Valcarcel-Ares MN, Fülöp GA, Logan S, Kiss T, Farkas E, Csiszar A, Yabluchanskiy A (2017b) Cerebromicrovascular dysfunction predicts cognitive decline and gait abnormalities in a mouse model of whole brain irradiation-induced accelerated brain senescence. *Geroscience* 39:33–42
- Vedovelli K, Giacobbo BL, Corrêa MS, Wieck A, de Argimon III, Bromberg E (2017) Multimodal physical activity increases brain-derived neurotrophic factor levels and improves cognition in institutionalized older women. *Geroscience* 39:407–417
- Viollet C, Bodenat C, Prunotto C, Roosterman D, Schaefer J, Meyerhof W, Epelbaum J, Vaudry H, Leroux P (1997) Differential expression of multiple somatostatin receptors in the rat cerebellum during development. *J Neurochem* 68: 2263–2272
- Viollet C, Lepousez G, Loudes C, Videau C, Simon A, Epelbaum J (2008) Somatostatinergetic systems in brain: networks and functions. *Mol Cell Endocrinol* 286:75–87
- Zeyda T, Diehl N, Paylor R, Brennan MB, Hochgeschwender U (2001) Impairment in motor learning of somatostatin null mutant mice. *Brain Res* 906:107–114
- Zhang HT, O'Donnell JM (2000) Effects of rolipram on scopolamine-induced impairment of working and reference memory in the radial-arm maze tests in rats. *Psychopharmacology* 150:311–316

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.