

**SZOMATOSZTATIN, NOCICEPTIN ÉS A KAPSAICIN-
ÉRZÉKENY SZENZOROS IDEGVÉGZŐDÉSEK
IZGATÁSÁNAK GYULLADÁSGÁTLÓ HATÁSA**

DR. HELYES ZSUZSANNA

PH. D. HALLGATÓ

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

PROGRAM-, ALPROGRAM- ÉS TÉMA VEZETŐ: DR. SZOLCSÁNYI JÁNOS

FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET

PÉCSI ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM, PÉCS

1998.

ELŐZMÉNYEK

Klasszikus értelmezés szerint a primér afferens neuronok funkciója a külső és belső környezetből származó ingerek felvétele és a központi idegrendszer felé történő továbbítása. Perifériás nyúlványaik önmagukban vagy specializálódott érző struktúrákhoz kapcsolódóan receptoroként működnek. Századunk közepén Jancsó Miklós (1955) felismerte, hogy a kapszaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide), a paprika csípős anyaga, szenzoros receptor-blokkoló hatással rendelkezik, így hasznos farmakológiai eszközül szolgál a primér afferens neuronok funkcionális jellemzéséhez. Későbbi kutatások során kiderült, hogy kis dózisban adott kapszaicin neuropeptideket szabadít fel a C-típusú afferens rostok perifériás végződéséből, majd e kezdeti, rövid időtartamú ingerlés után „deszenzibilizáció” jön létre. Egyrost vizsgálatok alapján a kapszaicin az érzőreceptorok meghatározott csoportját, a bőrben a C-polimodális nociceptorokat, a meleg és forró receptorokat, valamint a kemonociceptorokat izgatja és deszenzibilizálja (Szolcsányi 1987, 1993, 1996b). Lokális vagy szisztémás nagy dózisú alkalmazás ezen érzőneuronok hosszan tartó funkcionális és morfológiai károsodásához vezet. A kapszaicin neuroszelektív hatása képezte alapját az érzőidegsejtek farmakológiai osztályozásának. A kapszaicin-érzékeny primér afferens neuron elnevezés (Szolcsányi 1982) ma már általánosan használatos és a kapszaicin VR-1 receptor klónozása révén biokémiai kritérium alapján is bizonyítást nyert (Caterina és mtsai. 1997). A kapszaicinnal vagy egyéb stimulánssal izgatott szenzoros idegvégződések egyrészt a központi idegrendszer felé közvetítenek idegaktivitást (*klasszikus afferens funkció*), másrészt különféle neurotranszmitterek - kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), P-anyag (SP) és egyéb tachykininek - szabadulnak fel az aktivált perifériás végződésekből, amelyek vazodilatációt és plazma extravazációt hoznak létre az általuk beidegzett területeken (*lokális efferens funkció*) (Lembeck és Holzer 1979; Szolcsányi 1984; Holzer 1988). Szenzoros idegrostok antidiromos izgatásával arteriolás vazodilatáció, érpermeabilitás fokozódás, protein exszudáció, majd később a sejtes elemek (hízósejtek, leukociták, vételemezkek) aktivációja jön létre mind a bőrben, mind a vizszerális nyálkahártya és kötőszöveti területeken, amelyet neurogén gyulladásnak nevezünk (Jancsó és mtsai. 1967, Szolcsányi 1988). Patkány bőrért beidegző afferens rostok legalább 30 %-a képes neurogén gyulladást létrehozni (Szolcsányi 1996a).

A múlt században figyelték meg, hogy az átvágott gerincvelői hátsó gyökök perifériás csomkjának elektromos ingerlése vazodilatációt okoz a bőrben (Stricker 1876). Bayliss (1901) írta le először, hogy e választ a hátsó gyöki szenzoros afferens rostok közvetítik, valószínűleg

axon reflex mechanizmussal. Elképzelése szerint a szenzoros idegrostok a perifériás végződés közelében eloszlának, az egyik ág a szenzoros célszervet (bőr, izom, stb.) idegzi be, míg a másik efferens végződésként működik az arteriolák izomrétegében. Bruce (1910) kísérletei alapján bebizonyosodott, hogy nyúl szemébe cseppentett tömény mustárolaj a n. trigeminus degenerációja vagy helyi érzéstelenítők alkalmazása után nem váltott ki gyulladást, ezért a neurogén gyulladás lehetséges magyarázatának is - az antidrómos vazodilatációhoz hasonlóan - az axon reflex teóriát tartották. Ezt az elméletet Lewis (1927) emberi bőrön végzett vizsgálatai is megerősítették, melyek szerint lokális sérülést követően érzéstelenítők alkalmazása megakadályozza a bőrpír („flare”) kialakulását. Ezen klasszikus koncepciók szerint az antidrómos vazodilatációért, illetve a neurogén gyulladásért felelős mediátorok a primér afferens neuronok specializálódott effektor végződéseiből szabadulnak fel. Ezzel szemben újabb kísérleti eredmények a szenzoros axonterminális ugyanazon régiójának kettős (afferens és efferens) működését támasztják alá (Szolcsányi 1984, 1988; Maggi és Meli 1988; Szolcsányi és mtsai. 1992). A kapszaicin-típusú irritánsok plazma extravazációt okozó hatását tetrodotoxin, illetve helyi érzéstelenítők nem gátolják, tehát axonvezetés nem szükséges a jelenséghez. Humán bőrön helyileg alkalmazott kapszaicin oldattal a szenzoros receptorok deszenzibilizálhatók, így bőrpirosodás napokig nem váltható ki. Az „afferens” és „efferens” működések visszaállása egy időben történik. A primér afferens neuronok centrális és perifériás végződésein a kapszaicin azonos koncentrációkban vált ki tüskepotenciálokat (Pethő és Szolcsányi 1996). Az axon reflexet alátámasztó szövettani bizonyítékok nem állnak rendelkezésre, viszont szaruhártyában olyan idegvégződéseket találtak, amelyek a neuroeffektor varikozitásokhoz hasonlóan mikrovezikulákat és felhalmozódott mitokondriumokat tartalmaznak (Szolcsányi és mtsai. 1975). Mindez arra utal, hogy a kapszaicin-érzékeny primér afferens neuronok efferens válasza axon reflex nélkül is létrejönnek ezen érzőreceptorok szenzoros-efferens kettős funkciója alapján. A Bayliss (1901), Bruce (1910) és Lewis (1927) által felállított klasszikus axon reflex teóriával szemben azonban szükséges volt a neuropeptid-felszabadulás *in vitro* meghatározásával is bizonyítani az érzőidegvégződések axon reflex nélküli efferens funkcióját (I. fejezet).

1995. októberében kezdtem dolgozni a POTE Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének Neurofarmakológiai Kutatócsoportjában. A munkacsoportban ezt megelőzően született az a meglepő véletlen megfigyelés, hogy gerincvelői hátsó gyökök antidrómos ingerlésével kiváltott neurogén gyulladás gátolja egy később létrehozott gyulladás kialakulását a szervezet távolabbi pontján (Pintér és Szolcsányi 1988, 1996). A szenzoros idegvégződések ilyen módon

történő izgatása kizárja az efferens rostok aktivációját és a célszerv szövetein létrejövő direkt kémiai hatást. Amikor Ph.D. hallgatóként bekapcsolódtam a munkába, ezen szisztémás gyulladásgátló effektus a hátsó gyökér ingerléses módszerrel már bizonyítást nyert. Az én feladatom az volt, hogy a szenzoros idegvégződéseknél ezt a meglepő szisztémás efferens működését további kísérletekben bizonyítsam, közelebb jussak mechanizmusának pontos megismeréséhez és felderítsem, hogy van-e mediátor szerepe a jelenségben az ópioid peptidnek és/vagy a szomatostatinnak. Ismeretes volt ugyanis, hogy a SP és a CGRP mellett ezen peptidnek is kimutathatók a kapszaicin-érzékeny neuronokban (II. és III. fejezet). Az endogén gyulladásgátló transzmitter(ek) azonosítása új típusú gyulladásgátló szer kifejlesztésére adhat lehetőséget, így a továbbiakban a szomatostatint és stabil, szintetikus analógjai (IV. fejezet), valamint egy újonnan felfedezett ópioid peptid, a nociceptin, (V. fejezet) anti-inflammációs hatásának vizsgálatát végeztem. A SP, a CGRP és a szomatostatint meghatározására használt specifikus és érzékeny radioimmunoassay (RIA) módszereket dr. Németh József vegyész dolgozta ki, ezek alkalmazásában az *in vivo* és *in vitro* kísérletek elvégzésével azonban részt vettem. A RIA metodikák leírására, mint módszertani jellegű közleményekre (I./3. és II./3.), a továbbiakban irodalmi utalásként hivatkozom.

Értekezésem alapiául szolgáló kutatási eredményeimet az alábbi közlemények foglalják össze, amelyek didaktikailag 5 fő fejezetbe sorolhatók:

I. P ANYAG (SP), KALCITONIN GÉN-ROKON PEPTID (CGRP) ÉS SZOMATOSZTATIN FELSZABADULÁSÁNAK MECHANIZMUSA A KAPSAICIN-ÉRZÉKENY PRIMÉR AFFERENS NEURONOK VÉGZŐDÉSEIBŐL (IN VITRO VIZSGÁLATOK)

I./1. Szolcsányi, J., Németh, J., Oroszi, G., Helyes, Zs., Pintér, E.: Effect of capsaicin and resiniferatoxin on the release of sensory neuropeptides in the rat's isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.* 124 Proc. Suppl., p. 8P, 1998. (előadáskivonat)

I./2. Szolcsányi, J., Németh, J., Oroszi, G., Helyes, Zs., Kocsy, T., Pintér, E., Szilvássy, Z.: Mechanism of sensory neuropeptide release by electrical field stimulation and capsaicin from isolated tracheae of the rat. (közlésre előkészített kézirat)

I./3. Németh, J., Görcs, T., Helyes, Zs., Oroszi, G., Kocsy, T., Pintér, E., Szolcsányi, J.: Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research. *Neurobiology*, közlésre elfogadva, 1998. /

II. SZENZOROS IDEGVÉGZŐDÉSEK KÉMIAI IZGATÁSÁVAL KIVÁLTOTT SZISZTÉMÁS GYULLADÁSGÁTLÓ HATÁS ÉS NEUROTRANZSMITTER HÁTTERE PATKÁNYBAN

II./1. Pintér, E., Szolcsányi, J., Helyes, Zs.: Neurotransmitter background of the anti-inflammatory effect evoked by activation of sensory nerve fibers. *Neurobiology* 4, pp. 233-235, 1996.

II./2. Szolcsányi, J., Pintér, E., Helyes, Zs., Oroszi, G., Németh J.: Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors.

Br. J. Pharmacol. 124, közlésre elfogadva, 1998.

/ II./3. Németh, J., Helyes, Zs., Görcs, T., Gardi, J., Pintér, E. and Szolcsányi, J.: Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone.

Acta Physiologica Hungarica 84 (3), pp. 313-315, 1996. /

III. ANTIDRÓMOS IDEGINGERLÉS HATÁSÁRA FELSZABADULÓ SZOMATOSZTATIN, MINT POTENCIÁLIS GYULLADÁSGÁTLÓ MEDIÁTOR

III./1. Szolcsányi, J., Helyes, Zs., Oroszi, G., Németh, J., Pintér, E.: Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of the rat sciatic nerve.

Br. J. Pharmacol. 123, pp. 936-942, 1998.

IV. SZINTETIKUS SZOMATOSZTATIN ANALÓGOK GYULLADÁSGÁTLÓ ÉS ANTINOCEPTÍV HATÁSA

IV./1. Helyes, Zs., Pintér, E., Szolcsányi, J. and Horváth, J.: Anti-inflammatory and anti-nociceptive effect of different somatostatin-analogs.

Neurobiology 4, pp. 115-117, 1996. (preliminary notes)

IV./2. Szabadalmi beadvány: Kéri Gy., Szolcsányi J., Pintér E., Helyes Zs., Érchegyi J., Horváth A., Horváth J., Teplán I., Órfi L.: Eljárás neurogén és nem neurogén gyulladásgátló, valamint fájdalomcsillapító hatású heptapeptid szomatostatin származékokat és peptidomimetikumokat tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására. 1998. 04. 24.,

Iktatószám J208/98, Ügyszám: P96 01843

IV./3. Szolcsányi, J., Pintér, E., Helyes, Zs., Oroszi, G., Németh, J.: Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of novel synthetic somatostatin analogs in the rat. (közlésre előkészített kézirat, a szabadalmi beadvány miatt jelenleg nem publikálható)

V. A NOCICEPTIN - EGY ÚJ ÓPIOID PEPTID – GYULLADÁSGÁTLÓ HATÁSA ÉS MECHANIZMUSA

V./1. Helyes, Zs., Németh, J., Pintér, E., Szolcsányi, J.: Nociceptin inhibits neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals. *Br. J. Pharmacol.* 121, pp. 613-615, 1997.

V./2. Németh, J., Helyes, Zs., Oroszi, G., Than, M., Pintér, E. and Szolcsányi, J.: Inhibition of nociceptin on sensory neuropeptide release and mast cell-mediated plasma extravasation in rats.

Eur. J. Pharmacol. 347, pp. 101-104, 1998.

I. P-ANYAG (SP), KALCITONIN GÉN-ROKON PEPTID (CGRP) ÉS SZOMATOSZTATIN FELSZABADULÁSÁNAK MECHANIZMUSA A KAPSAZICIN-ÉRZÉKENY PRIMÉR AFFERENS NEURONOK VÉGZŐDÉSEIBŐL (IN VITRO VIZSGÁLATOK)

(Előzetes adatok: előadáskivonat - *Br. J. Pharmacol.* 124 (Proc. Suppl.), p. 8P, 1998. és a teljes kísérletsorozat eredményei: közlésre előkészített kézirat)

BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A kapszaicin-érzékeny afferens neuronok perifériás végződésai kettős „szenzoros-efferens” funkcióval rendelkeznek (Szolcsányi 1984; Maggi 1995). Ezen idegvégződések kémiai vagy elektromos ingerlése szenzoros neuropeptidok (tachykininek, CGRP, szomatosztatin) felszabadulását eredményezi, amelyek mediátor szerepe testszerte kimutatható (szív, erek, légutak, gasztrointesztinális és genitourinális traktus, bőr, szem, izületek, dura mater, nyirokszervek). A kémiai stimulánsok közül a kapszaicin és analógja, a resiniferatoxin (RTX), előbb felszabadítja, majd depletálja ezeket a peptideket (Szolcsányi 1991). Irodalmi adatok azt bizonyítják, hogy e peptidfelszabadulás Ca^{2+} függő, de tetrodotoxin (TTX) és ω -conotoxin rezisztens, amely arra utal, hogy axonális vezetés illetve N-típusú Ca^{2+} csatornák részvétele nélkül jön létre (Szolcsányi 1983, 1996a; Maggi 1995). Ezzel szemben más szerzők, akik alacsony koncentrációjú kapszaicin oldatot használtak ingeranyagként, ezzel ellentétes eredményekről számoltak be (Lou és mtsai. 1992; Lundberg 1996). *In vitro* az axon reflexet és a gyors Na^+ csatornákat blokkoló TTX nem gátolta a 3.3×10^{-8} - 10^{-6} M kapszaicinnal kiváltott bronchus összehúzódást (Szolcsányi 1983), míg perfundált tüdőpreparátumon Lou és mtsai. (1992) csak 10^{-6} M-nál találtak gátlást. A kapszaicinnal kiváltott peptidfelszabadulás farmakológiai modulálását eddig *in vitro* szinte kivétel nélkül 10^{-6} - 10^{-5} M kapszaicin oldattal végezték (Maggi 1995), amely koncentrációtartományban a szer már neurotoxikus rostdegenerációt is kiválthat, így a modulációs hatások hiánya még nem tekinthető bizonyítéknak. A lokális efferens válaszokért (vazodilatáció, plazma extravazáció) felelős mediátorok (CGRP és SP) mérésén kívül a szomatosztatin felszabadulásának módosíthatóságát az irodalomban eddig még nem vizsgálták.

Jelen kísérletek célja az volt, hogy *in vitro*, perfúziós rendszerben megvizsgáljuk izolált patkány trachea afferens idegvégződéseiből elektromos téringerlés és kémiai stimuláció (10^{-8} M kapszaicin) hatására történő peptid ko-transzmitterek felszabadulásának gátlhatóságát

különféle Na^+ és Ca^{2+} csatorna blokkoló szerekkel (lidocain, TTX, ω -conotoxin, ω -agatoxin és Cd^{2+}). Eddig 4 féle neuronális Ca^{2+} csatornát ismernek, L-, N-, P- és Q-típusúakat, melyek közül az L csatorna posztjunkcionális elhelyezkedésű, így a peptidfelszabadulás szabályozásában nem jön számításba. Az ω -conotoxin szelektív N-csatorna blokkoló, az ω -agatoxin kis dózisban (< 100 nM) szelektív a P-csatornákra, míg nagy dózisban a Q-csatornákat is gátolja (Wright és Angus 1996).

MÓDSZEREK

Kísérleteinkhez nőstény Wistar patkányokat pentobarbital-lal (Nembutal, 40 mg/kg i.p.) altatásban elvéreztettünk. Tracheákat kimetszettük és szervfürdőként (1.8 ml) 2-2 szervet 37 °C-os oxigenizált (95 % O_2 és 5 % CO_2) Krebs oldattal 60 percen át perfundáltuk (1 ml/perc). Az átáramlás leállítását követően a kamrákban lévő oldatot 8 percenként 3-szor lecserélve frakciókat gyűjtöttünk (ingerlés előtti - ingerelt - ingerlés utáni).

A peptidek felszabadulását kiváltó *elektromos ingerlést* 40 V, 0.1 ms, 2 Hz paraméterekkel a második periódus 5. percétől 50 másodpercen keresztül végeztük (Szolcsányi és Barthó 1982).

Kémiai stimulációra 10^{-8} M kapszaicint használtunk, amelyet a középső periódus 5. percében adtunk a rendszerhez.

Az ingerlések hatását különféle ioncsatorna blokkoló szerek jelenlétében vizsgáltuk: lidocain (5 mM), TTX (1 μM), ω -agatoxin TK (50 és 250 nM), ω -conotoxin GVIA (100 és 300 nM) és Cd^{2+} (200 μM). A mintákat jégbe hűtött csövekbe gyűjtöttük és a kísérlet végén a légcsődarabok nedves súlyát lemértük. A frakciók SP, CGRP és szomatostatín koncentrációit intézetünkben kifejlesztett specifikus RIA módszerek segítségével határoztuk meg (Németh és mtsai. 1996, 1998), melyek érzékenysége a szomatostatín és a CGRP esetében 1 fmol/cső, a SP-nél 2 fmol/cső. A peptidek mennyiségét fmol/mg egységben, nedves szövetsúlyra vonatkoztatva fejeztük ki. A második és a harmadik frakcióbeli mennyiségekből kivontuk az első frakcióbéli és a különbségek összege adta meg az abszolút peptidfelszabadulást.

Az eredmények statisztikai értékelése Student-féle páros és páratlan t-teszttel történt.

EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az *elektromos téringelés* mindhárom peptid felszabadulásában szignifikáns növekedést eredményezett, amelyet a TTX és a lidocain kivédett. A CGRP esetében a kontroll: 0.24 ± 0.03 fmol/mg, TTX jelenlétében: -0.02 ± 0.01 fmol/mg, lidocain jelenlétében: 0.04 ± 0.01 fmol/mg. A SP kontroll: 1.05 ± 0.16 fmol/mg, TTX jelenlétében: -0.35 ± 0.07 fmol/mg, lidocain jelenlétében: 0.38 ± 0.07 fmol/mg. A szomatosztatin kontroll: 0.21 ± 0.02 fmol/mg, TTX jelenlétében: 0.08 ± 0.01 fmol/mg, lidocain jelenlétében: 0.07 ± 0.01 fmol/mg.
- A Na^+ csatorna blokkolók neuropeptid-felszabadulást gátló hatása alapján bizonyítást nyert, hogy a téringeléssel kiváltott peptidfelszabaduláshoz axonális vezetés szükséges.
2. A kapszaicin (10^{-8} M) fokozta a peptidok felszabadulását, amelyet a TTX és a lidocain nem befolyásolt, valamint az ω -agatoxin TK (50 nM) és az ω -conotoxin GVIA (100 és 300 nM) jelenlétében is változatlan maradt. Magas koncentrációjú ω -agatoxin TK (250 nM) és Cd^{2+} (200 μM) azonban szignifikánsan csökkentette a kémiai stimuláció hatására felszabaduló SP, CGRP és szomatosztatin mennyiségét. A CGRP esetében a kontroll: 0.21 ± 0.03 fmol/mg, 250 nM ω -agatoxin TK jelenlétében: 0.05 ± 0.02 fmol/mg, 200 μM Cd^{2+} jelenlétében: -0.07 ± 0.02 fmol/mg. A SP kontroll: 1.24 ± 0.12 fmol/mg, 250 nM ω -agatoxin TK jelenlétében: 0.47 ± 0.08 fmol/mg, 200 μM Cd^{2+} jelenlétében: -1.12 ± 0.09 fmol/mg. A szomatosztatin kontroll: 0.13 ± 0.03 fmol/mg, 250 nM ω -agatoxin TK jelenlétében: 0.06 ± 0.01 fmol/mg, 200 μM Cd^{2+} jelenlétében: -0.07 ± 0.03 fmol/mg.

Ezen eredmények arra utalnak, hogy a TTX-szenzitív és TTX-rezisztens gyors Na^+ csatornák az N- és P-típusú feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák, valamint az axonális vezetés (axon reflex) nem játszanak szerepet a neuropeptidok kémiai stimulus hatására történő felszabadulásában. A nagyobb koncentrációjú Cd^{2+} gátló hatása alapján a felszabadulás Ca^{2+} függő mechanizmusa a „capsaicin-hot receptor” nem szelektív kation csatorna nyitásával magyarázható (Caterina és mtsai. 1997; Bevan és Szolcsányi 1990). Mivel a nagy dózísú ω -agatoxin TK is szignifikáns gátló hatást mutatott, a Q-típusú Ca^{2+} csatornák szerepe sem zárható ki. Ennek további vizsgálata a P- és Q- csatornákat egyaránt blokkoló ω -conotoxin MVIIC (Wright és Angus 1996) alkalmazásával válna lehetővé.

II. SZENZOROS IDEGVÉGZŐDÉSEK KÉMIAI IZGATÁSÁVAL KIVÁLTOTT SZISZTÉMÁS GYULLADÁSGÁTLÓ HATÁS ÉS NEUROTRANSMITTER HÁTTERE PATKÁNYBAN

(*Neurobiology* 4, pp. 233-235, 1996. és *Br. J. Pharmacol.* 124, közlésre elfogadva, 1998.)

BEVEZETÉS

Intézetünkben dr. Pintér Erika figyelte meg néhány éve azt az érdekes jelenséget, hogy a gerincvelői hátsó gyökökerek antidiromos ingerlésével kiváltott helyi neurogén gyulladást követően egy másik hátsó gyökér ingerlésének hatása sokkal kisebb. A jelenség szisztematikus vizsgálata során kiderült, hogy az első ingerléssel a patkány egyik lábának bőrében kiváltott *primér reakció* gátolja egy későbbi akár neurogén, akár tisztán kémiai *szekunder gyulladáson alapuló reakció* kifejlődését a konjunktívában, illetve az ellenoldali lábőrbőben (Pintér és Szolcsányi 1988, 1996). Kézenfekvő volt az a feltételezés, hogy a primér gyulladás során gyulladásgátló neuromediátorok kerülnek a szisztémás keringésbe és testszerte képesek csökkenteni a későbbi folyamatot. Perineurális kapszaicin előkezelés után e szisztémás gyulladásgátló effektus elmaradt (Pintér és Szolcsányi 1996) bizonyítva azt, hogy a kapszaicin-érzékeny idegvégződésekből felszabaduló mediátor(ok) felelős(ek) a hatásért. A hátsó gyökér ingerléses módszer előnye, hogy így az érző rostok kémiai behatás nélküli, szelektív aktiválása érhető el. Hátránya viszont, hogy jelentős műtéti beavatkozást igényel és a hatást az állatok keringési viszonyainak változása befolyásolja. A jelenség további vizsgálatára két technikailag egyszerűbb kísérleti modellt dolgoztunk ki: az egyikben a nociceptorokat közvetlenül ingerlő kémiai irritánsokkal (mustárolaj és kapszaicin) ortodrómos izgatást végeztük (II. fejezet), a másikban a n. ischiadicus szenzoros rostjait antidiromosan ingereltük (III. fejezet).

Az irodalomból ismert, hogy ingerlés hatására gyulladáskeltő (P anyag, CGRP) és gyulladásgátló (szomatosztatin) neuropeptidok is felszabadulnak a kapszaicin-érzékeny primér afferens neuronok perifériás végződéseiből (Gamse és mtsai. 1981). Az ópioid peptidok és a galanin, amelyeket ugyancsak kimutattak ezen idegvégződésekben (Xu és mtsai. 1991; Carlton és Coggeshall 1997), szintén képesek gátolni a gyulladáson alapuló reakciókat.

Kísérleteink során célul tűztük ki, hogy ezt az egyedülálló, új típusú szenzoros neurohumorális effektust több oldalról alátámasszuk és felderítsük, mely mediátor(ok) felelős(ek) ezen kísérletesen kiváltott gyulladásgátló hatásért.

MÓDSZEREK

Vizsgálatainkat 200-250 g-os nőstény Wistar patkányokon végeztük, melyeket apatogén körülmények között („pathogen free conditions”, PFC), 24-25 °C-os hőmérsékleten a POTE állatházában nevelték. Alttáshoz 40 mg/kg i.p. pentobarbital-t (Nembutal) használtunk.

Ortochrómos ingerléssel kiváltott neurogén gyulladási vizsgálat:

Míndkét oldali hátsó végtagot akutan denerváltuk (n. saphenus és n. ischiadicus átvágása 30 perccel a kísérletet megelőzően), hogy megakadályozzuk a mustárolaj nociceptív hatásából adódó reflexválaszokat. A láb bőrét paraffinolajban oldott 1 %-os mustárolajjal kentük be, vagy a talpbőr alá 0.1 ml 100 mg/ml-es kapszaicin oldatot injektáltunk. A konjunktívában 1 mg/ml-es koncentrációjú kapszaicin beceppentésével hoztunk létre plazma extravazációt. Ezen kémiai ingeranyagok szelektíven a kapszaicinre érzékeny C-polimodális nociceptorokat izgatják. A plazma kiáramlás mértékét az Evans kék akkumuláció módszerével határoztuk meg. Tíz perccel a gyulladási kiváltás előtt 50 mg/kg Evans kéket adtunk i.v. A festék erősen kötődik a szérum albuminhoz, a plazma extravazáció helyén kilép az érpályából és akkumulálódik a gyulladt szövetekben. Harminc perccel a beadást követően az állatokat elvéreztettük, a kékült bőrterületeket kimetszettük, lemértük és festéktartalmukat 72 órán keresztül formamidban extraháltuk. Spektrofotométerrel 620 nm-en meghatároztuk a kioldódott festékmennyiséget, mely a plazma kiáramlás mértékével arányos. Az értékeket µg festék/g nedves szövet formában adtuk meg (Pintér és Szolcsányi 1988).

Nem neurogén gyulladási kiváltása és mérése:

Ezen kísérleteket krónikusan denervált hátsó végtagokon végeztük. Míndkét ideget 5 nappal korábban átmetszettük, így az idegek degenerációja következtében neurogén gyulladási komponenssel nem kellett számolnunk. A lábduzzadást 100 µl 5 %-os dextrán oldat szubplantáris adásával váltottuk ki, amely közvetlenül az immunocitákból, elsősorban a hiszosejtekből, szabadít fel gyulladáskeltő anyagokat (hisztamin, bradikinin, leukotriének, prosztaglandinok, vérlemezke aktiváló faktor) (Selye 1965). A lábödémát Ugo-Basile típusú pletizmométerrel mértük, melynek működése a közlekedőedények elvén alapul: az állatok hátsó lábát egy folyadékot tartalmazó tartályba helyeztük, a következményes volumenkiszorítás során kialakuló folyadékszint-változást a készülék transzducere érzékeli és az értéket térfogategység formájában kijelzi. A lábak térfogatát lemértük a s.c. dextrán injekció előtt (kontroll), majd 10, 20, 30 perccel utána. Az ödéma nagyságát a kontroll érték %-ában fejeztük ki.

Adrenalektómia:

A mellékvesekéregszteroidok szerepének vizsgálatára laterális abdominális metszéstől a mellékveséket 30 perccel a mustárolaj-kenést megelőzően eltávolítottuk, majd a sebet zártuk. A kontroll, ál-operált állatokban szintén elvégeztük a bemetszést, de a sebet a mellékvesék eltávolítása nélkül zártuk.

A vérplazma szomatosztatin koncentrációjának meghatározása:

A plazma szomatosztatin szintjének meghatározása intézetünkben kifejlesztett specifikus és érzékeny RIA segítségével történt. Tíz perccel mindkét akutan denervált hátsó végtag 1%-os mustárolajjal történő kenését követően artériás vérmintákat (3 ml/patkány) vettünk EDTA-t és Trasyolt tartalmazó, jégben lehűtött üvegcsővekbe előkezeletlen, valamint 280 mg/kg s.c. cysteaminnal 4 órával az ingerlés előtt előkezelt állatokból. A cysteamin szulfidril vegyület, amely szelektíven immunológiaiilag és funkcionálisan inaktívvá teszi a szomatosztatint (Lorenson és Jacobs 1984; Patel és mtsai. 1985), így vizsgálható, hogy e peptid szerepet játszik-e a gyulladásgátló hatásban. Az egyik kontroll csoportban a patkányok hátsó lábait paraffinolajjal kentük (a mustárolaj oldószere), a másikban krónikus denerváció után alkalmaztuk a mustárolajjal. A 4 °C-on történő centrifugálást követően a peptidet abszolút alkohol 3-szoros volumenével extraháltuk a plazmából. A precipitáció és a második centrifugálás után a mintákat nitrogén alatt beszárítottuk, majd a RIA mérések előtt pufferben oldottuk vissza (Németh és mtsai. 1996).

Statistikai értékeléshez ANOVA, többszörös összehasonlításra alkalmas módosított Student t, illetve nem parametrikus - Mann-Whitney – tesztekkel használtunk.

EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK

A./ Kémiai anyagokkal kiváltott lokális neurogén gyulladás szisztémás gyulladásgátló hatására jellemző:

1. Az első, 1%-os mustárolajjal kiváltott lokális neurogén gyulladás (*primer reakció*) 49.3 %-kal gátolta az ellenoldali hátsó végtagon 10 perccel később azonos módon létrehozott plazma extravazációt (*szekunder reakció*). A kontroll csoportban, ahol az első kezelés paraffinolajjal történt, a mustárolaj révén kiváltott szekunder reakció nem gátódott, nem különbözött szignifikánsan az első csoportban tapasztalt primer reakciótól. Amennyiben a mustárolajjal egy időben kentük be a két lábat, nem volt különbség a két oldalon

megfigyelhető Evans kék akkumuláció mértékében.

2. A patkány bal oldali konjunktíváján 0.1 % -os kapszaicin cseppentésével létrehozott Evans kék akkumulációhoz képest 44.4 %-kal csökkent a jobb szemben 7 perc múlva azonos módon kiváltott plazma extravazáció, ha köztük a 2. percben az egyik hátsó végtagon mustárolajjal neurogén gyulladást váltottunk ki. Kontroll patkányokban, ahol paraffinolajat használtunk, nem volt különbség az első és második szembe cseppentés hatása között. (A kontroll csoportban alkalmazott első kapszaicincseppentés feltehetően az irritáció kicsiny területe miatt önmagában nem csökkentette szignifikánsan az ellenoldali szemben a festékkiváramlást.)

3. Ha a primer neurogén gyulladást az akután denervált lábba szubplantárisan adott kapszaicin injekcióval váltottuk ki, a 10 perccel később mustárolajjal az ellenoldalon létrehozott szekunder reakció 57.2 %-kal volt kisebb a kontroll csoporthoz képest, ahol a patkányok 0.9 %-os NaCl oldatot kaptak a kapszaicin helyett.

Ezen eredmények azt bizonyítják, hogy a szenzoros idegvégződések ortodrómos izgatásával, azaz mustárolajjal vagy kapszaicinnel, kiváltott neurogén gyulladás során a korábbi hátsó gyöker ingerlés eredményeihez hasonlóan elegendő mennyiségű gyulladásgátló mediátor szabadítható fel a szisztémás hatás eléréséhez.

4. Mustárolajjal indukált neurogén gyulladás képes volt csökkenteni a másik oldali krónikusan denervált végtagon 5 %-os dextransz subplantáris injekciójával kiváltott ödémát is. A gátlás 58.3 %, 47.4 % és 48.2 % volt 10, 20 és 30 perccel a dextransz injekciót követően a kontroll csoporthoz viszonyítva, ahol paraffinolajat használtunk mustárolaj helyett.

Ez arra utal, hogy nem neurogén, tisztán kémiai gyulladás is gátolható mustárolajjal kiváltott neurogén gyulladás által. A feltételezett gátló neuromediátorok tehát biztosan van közvetlen vaszkuláris illetve immunsejtekre (pl. hiszós sejtekre) gyakorolt hatása, azon túl, hogy esetleg az antidrómos vazodilatációért és neurogén gyulladásért felelős SP és CGRP felszabadulását is csökkenteni képes.

5. Krónikusan denervált láb bőrében dextranszal kiváltott nem-neurogén plazma extravazáció és szöveti ödéma nem gátolta az ellenoldali, akután denervált végtagon a 10 perccel később mustárolajjal létrehozott festék akkumulációt. A szekunder reakció intenzitása hasonló volt a kontroll csoportéhoz, ahol a dextransz helyett fiziológias NaCl oldatot alkalmaztunk. Mustárolaj krónikus denerváció után nem hozott létre szignifikáns gyulladáshoz vezető reakciót és nem is gátolta az ellenoldali lábban a plazma extravazációt sem.

6. Adrenalektómia nem befolyásolta a mustárolajjal kiváltott szisztémás gyulladásgátló hatást.

Mivel a vizsgálatok során a mustárolajjat akutan denervált lábra kentük és az adrenalektómia nem gátolta a létrejött gyulladásgátló hatást, a jelenségben a szimpatikus rostok reflex aktivációja és a mellékveséből felszabaduló glukokortikoidok - melyek gyulladásgátló hatása ismert - nem játszhattak szerepet. Mindezek arra utalnak, hogy a szisztémás gyulladásgátló hatás létrejöttéért a primér reakció során a kapszaicin-szenzitív primér afferens neuronok perifériás végződéséből felszabaduló mediátorok tehetőek felelőssé, amelyek közvetlenül vagy más gyulladásgátló hatású transzmitter felszabadításával fejtik ki hatásukat.

B./ Vizsgálatok a neurogén gyulladásgátló hatás mediátorának azonosítására:

A kapszaicin-érzékeny afferens végződésekben kimutatható és azokból ingerléssel felszabadítható neuropeptidek közül az ópioid peptidek (Stein 1995; Carlton és Coggeshall 1997), a szomatosztatin (Lembeck és mtsai. 1982; Karalis és mtsai. 1994; Fioravanti és mtsai. 1995) és a galanin (Xu és mtsai. 1991; Ru-Rong és mtsai. 1995) rendelkeznek gyulladásgátló hatással.

1. Az ópioid peptidek szerepének vizsgálatára 1 mg/kg s.c. ópioid receptor antagonistá naloxonnal kezeltük elő az állatokat 1 órával a primér gyulladás kiváltása előtt. A naloxon a mustárolaj-indukálta neurogén gyulladásgátló hatását kivédte, ha a szekunder reakció is neurogén volt és a gátlást 23.4 %-kal csökkentette a dextranssal kiváltott nem neurogén második gyulladás esetén.

Indokoltnak látszott tehát az a feltételezés, hogy az endogén ópioidoknak van szerepe a gyulladásgátló hatás létrejöttében. A további kísérleteink azonban meglepő eredményeket hoztak:

2. 10 µg/kg i.p. szomatosztatin előkezelés 30.3 %-kal csökkentette a 10 perccel később mustárolajjal kiváltott neurogén gyulladást, mely hatás szignifikánsan nem változott 20 µg/kg -os dózis alkalmazása esetén sem. Az exogén szomatosztatin gátló hatása kivédhető volt poliklonális szomatosztatin antiszérummal (0.5 ml/patkány i.v. 1 órával a kísérlet előtt), de érdekes módon naloxon (1 mg/kg s.c. 1 órával korábban) előkezeléssel is.

Irodalmi adatok alapján a szomatosztatin 1-es receptor altípusa (R1) és a µ-ópioid receptor aminosav szekvenciája 40 %-ban hasonló (Yasuda és mtsai. 1993; Reisine 1995; Stein és mtsai. 1995), továbbá *in vitro* receptorkötődési vizsgálat eredményei is arra utalnak, hogy a

szomatosztatin és analógjai a naloxonnal erősebb ópoid receptor affinitást mutatnak (Maurer és mtsai. 1982; Pelton és mtsai. 1985). A fentiek alapján tehát a naloxon gátló hatása egyaránt szolgálhat bizonyítékul az ópoid peptidek és a szomatosztatin mediátor szerepére vonatkozóan is. A pontos mechanizmus megismeréséhez további kísérletek szükségesek.

3. Mustárolajjal kiváltott neurogén gyulladás ellenoldali neurogén gyulladásra gyakorolt gátló hatása megszűnt, ha az állatokat szomatosztatin antiszérummal (0.5 ml/patkány i.v. 1 órával a kísérlet előtt) vagy a szomatosztatin depletáló cysteaminnal (280 mg/kg s.c. 4 órával korábban) kezeltük elő. Amennyiben a szekunder reakció dextránnal kiváltott nem neurogén gyulladás volt, az endogén gyulladásgátló hatást szomatosztatin antiszérum előkezelés 30 %-kal csökkentette.

4. A vérplazma szomatosztatin szintje 10 perccel az akután denervált hátsó lábak mustárolajjal történő kenését követően 40.03 %-kal emelkedett a kontroll csoporthoz viszonyítva, ahol a mustárolaj helyett paraffinolajat használtunk. A mustárolaj alkalmazását megelőzően végzett krónikus denerváció a hátsó végtagon, valamint a szomatosztatin depletáló cysteaminnal történő előkezelés gátolta a plazma szomatosztatin koncentrációjának emelkedését, sőt ezen esetekben e peptid plazmaszintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a bazális érték.

Mindezen eredmények a szomatosztatin alapvető szerepét bizonyítják a kapszaicin-érzékeny idegvégződések izgatásával kiváltott gyulladásgátló hatás mediálásában, de az ópoid peptidek részvétele sem zárható ki. A neurogén gyulladásgátló mechanizmus pontosabb megismerésére, a jelenség részletesebb felderítésére és a szomatosztatin elsődleges jelentőségének megerősítésére a következő fejezetben ismertetendő, másik kísérleti modellen végeztünk vizsgálatokat.

III. ANTIDRÓMOS IDEGINGERLÉS HATÁSÁRA FELSZABADULÓ SZOMATOSZTATIN, MINT POTENCIÁLIS GYULLADÁSGÁTLÓ MEDIÁTOR

(*Br. J. Pharmacol.* 123, pp. 936-942, 1998.)

A vizgálatsorozat célja a hátsó gyökér ingerlésnél technikailag egyszerűbb és gyorsabb kísérleti elrendezés kidolgozása volt, amelyben lehetővé válik a szenzoros rostok antidiromos ingerlésével kiváltott gyulladásgátló hatás további vizsgálata. Különös hangsúlyt fektettünk az alacsony frekvenciájú elektromos ingerlés hatásosságának tanulmányozására, valamint arra, hogy kimutatható-e a jelenség az ízületben és a légutak nyálkahártyájában (interoceptív területek). További bizonyítékokat kerestünk a szomatosztatín mediátor szerepére vonatkozóan is.

MÓDSZEREK

Vizsgálatainkhoz a POTE állatházában nevelt 200-250 g súlyú nőstény Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat hosszú hatású natrium thiopental-lal (Trapanal, 100 mg/kg i.p.) altattuk.

A n. ischiadicus izgatása:

A n. ischiadicust a csípő tájékon feltártuk és proximálisan átvágtuk. A műtéti terület felett a bőrt drótkeretre erősítettük és az így keletkezett medencét testmeleg paraffinolajjal töltöttük fel. A perifériás idegsonkot platina elektródparra helyeztük és 20 V, 0.5 ms, 0.1-5 Hz paraméterekkel (C-rost erősségű áram) ingereltük. Az idegingerlést megelőzően 1 órával adrenerg neuron blokkoló guanethidint (8 mg/kg i.p.) adtunk az állatoknak, hogy kiküszöböljük a n. ischiadicusban futó szimpatikus rostok hatását. A neuromuskuláris transzmisszió gátlására pipecuronium bromidot (200 mg/kg i.v.) használtunk. Az egyik v. jugulárisba kanült vezetettünk, hogy ezen keresztül adjuk a gyógyszereket és T-tracheális tubuson keresztül mesterséges lélegeztetést végeztünk.

Amikor a plazma extravazációt carrageenin (100 µl 1 %-os szubplantáris vagy 200 µl 2 %-os intraartikuláris) injekciójával (Ferrel és Lam 1996) váltottuk ki, a kísérlet előtt 30 perccel átvágtuk a n. ischiadicust és a n. saphenust, hogy a nociceptív reflexek hatását elkerüljük. A carrageenin növényi polysacharid, amely a gyulladást részben neurogén úton, az afferens idegvégződések stimulálásával, részben nem neurogén módon, a hízósejtek degranulálásán keresztül, hozza létre (Pintér és Szolcsányi 1996).

A légső és a nyelőcső nyálkahártyájában, valamint a mediasztinális kötőszövetben a plazma extravazációt a n. vagus perifériás csomójának 20 V, 1 ms, 8 Hz paraméterekkel 10 percig történő ingerlésével váltottuk ki. A paraszimpatikus válaszok kivédésére 10 perccel az elektromos stimuláció előtt atropin szulfátot (2 mg/kg i.v.) adtunk.

Plazma extravazáció meghatározása:

A plazma albumin extravazáció mérésére az előzőekben ismertetett Evans kék akkumulációs módszert használtuk. A festéket (50 mg/kg i.v.) 30 perccel a n. ischiadicus átvágása után adtuk és az állatokat 20 perccel az utolsó gyulladáskeltő stimulus után véreztettük el. A gyulladás mértékének meghatározására a n. ischiadicus ellátási területének megfelelő talpi és laterális lábháti bőrt, illetve a n. vagus által beidegzett disztális 2/3-nyi nyelőcsőszakaszt, a nagyerek körüli mediasztinális kötőszövetet és a légcsővet távolítottuk el. A térdizületi gyulladás vizsgálatára az intenzív kékület mutató izületi tokot, kereszt- és oldalszalagokat és a duzzadt szinovialis kötőszövetet metsztettük ki. Fotometriás meghatározásra a szövetdarabok festéktartalmát 72 órán keresztül szobahőmérsékleten formamidban extraháltuk.

Bőr mikrocirkulációjának mérése:

A n. ischiadicus antidrómos stimulációjára létrejövő mikrocirkulációs változásokat a talpbőrben laser-Doppler áramlásmérővel regisztráltuk. Ezzel párhuzamosan a szisztémás vérnyomást és a szívfrekvenciát artériás kanülön keresztül számítógéphez csatlakoztatott poligráf segítségével mértük.

Plazma szomatosztatin koncentrációjának meghatározása:

A vérplazma szomatosztatin szintjének a már ismertetett RIA módszerrel történő meghatározásához mindkét oldali n. ischiadicus perifériás csomójának egyidejűleg történő stimulációja után (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 perc) 2 illetve 10 perccel 3 ml artériás vérmintát vettünk.

Az eredmények statisztikai analízise Mann-Whitney teszttel történt.

EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK

1. A jobb oldali n. ischiadicus antidrómos ingerlésével (5 Hz, 5 perc, 1500 impulzus) kiváltott neurogén gyulladás (*primér reakció*) 50.3 %-kal csökkentette az 5 perccel később a bal oldali ideg hasonló paraméterekkel végzett stimulálása következtében létrejövő plazma extravazációt (*szekunder reakció*).

Ez a hatás közel azonos mértékű a hátsó gyökér ingerlés és az ortodrómos, kémiai stimuláció

esetén tapasztalt gátlással, a jelen kísérleti modell tehát alkalmas az alapjelenség vizsgálatára.

Az antidrómos hátsó gyökér ingerléssel szemben előnye, hogy technikailag egyszerűbben kivitelezhető és a kísérlet tartós ingerlésnél is stabil keringési körülmények között végezhető.

2. Az ideg perifériás csomójának 0.5 Hz-cel 60 percen át történő stimulációja (1800 impulzus) jelentős plazma kiáramlást okozott a n. ischiadicus ellátási területén és 38.9 %-kal illetve 46.1 %-kal gátolta az ellenoldali talpbőrben és térdízületben a carrageeninel kiváltott vegyes típusú gyulladást.

3. A n. ischiadicus ingerlése 0.1 Hz-cel 4 órán keresztül (1440 impulzus) nem váltott ki lokális plazma extravazációt, viszont gátolta az ellenoldalon a carrageeninel indukált Evans kék akkumuláció a talpbőrben 52.1 %-kal, a térdízületben pedig 40.9 %-kal. A kontroll csoportban n. ischiadicust csak átvágtuk, de ingerlés nem történt.

Ezen eredményekből arra következtethetünk, hogy a szisztémás gyulladásgátló hatáshoz nem szükséges lokális neurogén gyulladás létrejötte, a gátló mediátor(ok) közvetlenül az aktivált szenzoros idegvégződésekből szabadul(nak) fel és nem a gyulladt szövetből. A gátlást kiváltó transzmitter(ek) alacsony frekvenciájú ingerlés során is felszabadul(nak), amikor plazma extravazációért felelős SP hatása még nem jön létre. Érdekes megemlíteni, hogy az antidrómos vazodilatáció frekvencia optimuma is alacsony (0.025-0.1 Hz), ami a CGRP felszabadulás hasonlóan hatékony effektor funkcióját bizonyítja (Szolcsányi és mtsai. 1992).

4. A n. ischiadicus antidrómos ingerlése a n. vagus perifériás csomójának stimulációjával 5 perccel később kiváltott Evans kék akkumulációt a nyelőcsőben 49.7 %-kal, a légsőben 32.8 %-kal, a mediaszínális kötőszövetben 37.6 %-kal gátolta a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A gyulladásgátló hatás tehát nem csak exteroceptív (bőr), hanem interoceptív területeken (ízület, viszerális nyálkahártyák és kötőszövet) is érvényesül.

5. A n. ischiadicus perifériás csomójának 4, 8, illetve 16 impulzusokkal történő ingerlése a talpbőrben 30.8 %-os, 45.4 %-os, illetve 59.4 %-os mikrocirkulációfokozódást eredményezett, amelyet azonban a kontralaterális ideg antidrómos ingerlése (5 Hz, 5 perc) sem a stimuláció alatt, sem utána nem befolyásolt szignifikánsan. Szomatostatin injekciónak (10 µg/kg i.v.) ugyancsak nem volt hatása az antidrómos vazodilatációra.

A plazma extravazáció gátlása ezek alapján nem magyarázható a szöveti véráramlás csökkenésével, valószínűleg a posztkapilláris venulákon történő hatás és a SP felszabadulás gátlásának a következménye. Hasonló hatásokkal rendelkezik a feltételezett mediátor, a szomatostatin, is.

6. Nem jött létre a n. ischiadicus antitrómos izgatásával kiváltott gátló hatás az ellenoldali talpbőrben 5 perccel később azonos módon előidézett neurogén gyulladásra, ha a patkányokat poliklonális szomatostatin antiszérummal (0.5 ml/patkány i.v. 1 órával korábban) vagy szomatostatin depléciót okozó cysteaminnal (280 mg/kg s.c. 4 órával a kísérlet előtt) kezeltünk elő.
7. Szomatostatin antiszérum előkezelés után a n. ischiadicus szenzoros rostjainak antitrómos izgatása a n. vagus ingerlésével kiváltott plazma extravazációt sem gátolta.
8. A plazma szomatostatin szint több, mint négyszeresére emelkedett 2 perccel a kétoldali n. ischiadicus ingerlés után (5 Hz, 5 perc) a kontroll csoporthoz viszonyítva, ahol az idegeket átvágtuk, de nem ingereltük. Amennyiben a vérmintákat 10 perccel az ingerlést követően vettük le, a szomatostatin plazmaszintje még mindig 142 %-kal magasabb volt. Cysteamin előkezelés megakadályozta a stimuláció hatására bekövetkező szomatostatin szint emelkedést.

Ezek az adatok az előző fejezetben vázolt eredményekkel összhangban a kapszaicin-érzékeny C-afferens rostokból felszabaduló szomatostatin mediátor szerepét bizonyítják a szisztémás neurogén gyulladásgátló hatásban. Mindemellett az ópioid peptidek és a galanin részvétele az általunk vizsgált jelenségben nem zárható ki, tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Alaputatási eredményeink gyakorlati hasznosíthatósága:

Az értekezésben ismertetett új alaputatási eredményeknek terápiás konzekvenciája lehet, hiszen a neurogén gyulladásnak több gyakori betegség (elsősorban légúti és ízületi gyulladással járó) folyamatok) patomechanizmusában kitüntetett szerepet tulajdonítanak. Jelenleg nem rendelkezőnk olyan gyógyszerrel, amely a neurogén gyulladás kezelésére alkalmas lenne, ciklooxygenáz (COX) enzim gátlók (pl. indometacin, diclofenac) kísérletesen nem bizonyultak hatásosnak. Az általunk felfedezett gyulladásgátló hatás mediátorá(i)nak identifikálása egy új típusú, hatékony gyulladáscsökkentő szer kifejlesztéséhez adhat kiindulási alapot. Ilyen irányú további kutatásainkat a következő két fejezet ismerteti:

IV. SZINTETIKUS SZOMATOSZTATIN ANALÓGOK GYULLADÁSGÁTLÓ ÉS ANTINOCICEPTÍV HATÁSA

(*Neurobiology* 4, pp.115-117, 1996.; szabadalmi beadvány, 1998. és a teljes kísérlet sorozat eredményei: közlésre előkészített kézirat)

BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK (1)

A szomatosztatin a szervezetben 14 és 28 aminosavból álló formában a központi és a perifériás idegrendszerben, a gasztrointesztinális traktusban és a belső elválasztású szervekben előforduló, sokféle hatással rendelkező peptid. Gátolja a növekedési hormon felszabadulását és számos más endokrin szekréciót (pl. glukagon, inzulin, gasztrin, prolaktin, szekretin és kolekisztokinin), továbbá a tumorsejtek osztódását. Befolyásolja a kognitív és viselkedési folyamatokat, valamint a kardiovaszkuláris rendszert. Ezen hatások 5 receptor altípuson keresztül valósulnak meg, amelyek a G-proteinhez kapcsolódó receptorcsalád tagjai (Reisine és mtsai. 1990; Patel és mtsai. 1990; Reisine 1995). A natív szomatosztatin terápiás alkalmazhatóságát jelentősen gátolja széles hatásspektruma és rövid (3 perces) felezési ideje. Szelektíven ható analógok jelentősen megkönnyítenek az egyes kórképek kezelését. Az utóbbi években számos új szomatosztatin analógot szintetizáltak és a szubsztitúciók jelentőségét vizsgálták elsősorban endokrin és antitumor hatású molekulák előállítására céljából.

Az irodalomból ismert, hogy az exogén szomatosztatin gátolja a neurogén gyulladást (Lembeck és mtsai. 1982; Karalis és mtsai. 1994; Fioravanti és mtsai. 1995) és a nocicepciót (Rezek és mtsai. 1978; Betoin és mtsai. 1994). Az előzőekben vázolt kísérleti eredményeink alapján a peptid felszabadul az aktivált kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből és a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló hatással rendelkezik. Mivel a C-rostok efferens funkciója a neurogén gyulladás, az afferens pedig a nocicepció, a szomatosztatinnak a fájdalomérzésben is szerepe lehet. Jelen kísérlet sorozatunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a szomatosztatin, az octreotide (Sandostatín), valamint 3 új, a Magyar Tudományos Akadémia Központi Kémiai Kutató Intézetében szintetizált, stabil, ciklikus analóg, a TT-250, a TT-248 és a TT-232 hatását a neurogén és nem neurogén gyulladásra, valamint a kemonocicepcióra. A TT-232 a többi 8 aminosavból álló analóggal szemben heptapeptid és előzetes vizsgálatok alapján nem rendelkezik endokrin hatással, viszont a leghatékonyabban gátolja a tumorsejtek osztódását (Kéri és mtsai. 1993, 1996).

MÓDSZEREK (I)

Neurogén gyulladási gátló hatás vizsgálata:

Pentobarbital-lal (Nembutal, 40 mg/kg i.p.) altatott, csoportonként 5-7 db, 150-200 g-os nőstény Wistar patkánynak a hátsó végtagok akut, bilaterális denerválását követően 30 perccel a plazma kiáramlás vizsgálatára Evans kék festéket adtunk i.v. (az Evans kék akkumulációs módszer részletes leírását lásd. az előző fejezetekben). Ezzel egyidőben az előkezelt állatok szomatosztatint vagy szintetikus szomatosztatint analógot kaptak 10 µg/kg dózisban i.p.. Tíz perc múlva a neurogén gyulladást 1 %-os mustárolaj ecseteléssel váltottuk ki.

Nem neurogén, tisztán kémiai gyulladást gátló hatás vizsgálata:

Mindkét krónikusan denervált hátsó végtagba szubplantárisan 100 µl 5 %-os dextránt fecskendeztünk. A szomatosztatinnal illetve az analógokkal (10 µg/kg i.p.) való előkezelés 10 perccel korábban történt. A dextrán beadása előtt, majd 10, 20 és 30 perc múlva pleizmométerrel mértük a dextrán által kiváltott lábduzzadást, amelyet a kiindulási volumenhez viszonyított %-os növekedés formájában adtunk meg.

Kemonoczeptív reflexek vizsgálata:

Uretán narkózisban (1 g/kg i.p.) kontroll patkányokban kemonoczeptív ingerek hatására (az intakt hátsó végtagok 1 %-os mustárolajjal történő ecsetelése illetve 100 µg/ml-es kapszaicoidat szembe cseppentése) jelentős szisztémás vérnyomásemelkedés (presszor válasz), szívfrekvenciánövekedés és légzésfokozódás jött létre. (Érdekes módon barbiturát narkózisban nociceptív ingerek depresszor választ váltanak ki (Lembeck és Scofitch 1982; Gebhart és Sengupta 1996).) Ezen vegetatív paramétereket artériás kanülön, valamint kettős elágazású trachea kanülön keresztül poligráfhoz csatlakoztatott számítógépen folyamatosan regisztráltuk és a fájdalomingerekre adott válaszokat speciális program segítségével értékeltük. Az előkezelt állatok a mérés megkezdése előtt 10 perccel 10 µg/kg szomatosztatint vagy analógot kaptak i.p..

A szomatosztatint szintetikus analógjait 1 csepp ecetsav hozzáadásával fiziológias NaCl-ban oldottuk, az octreotide ampullás kiszerelésben állt rendelkezésünkre.

Statisztikai értékeléshez Mann-Whitney tesztet használtunk.

EREDMÉNYEK (1)

1. A szomatostatint 24.85 %-kal gátolta a mustárolajjal indukált neurogén plazma kiáramlást és 30.96 %-kal a dextranszal kiváltott nem neurogén ödémát (dextrans adása utáni 30 perces érték).
2. Az új szintetikus, stabil, ciklikus analógok azonban ennél még hatékonyabb gyulladásgátló hatással rendelkeztek. A neurogén gyulladást 10 µg/kg i.p. adott TT-248 46.26 %-kal, TT-250 48.86 %-kal, TT-232 pedig 63.62 %-kal csökkentette. A nem neurogén gyulladásozás reakcióban a dextrans beadása után 30 perccel a TT-248 22.2 %-os, a TT-250 24.93 %-os és a TT-232 51.92 %-os gátló hatást mutatott. E 3 analóg közül leghatásosabbnak az endokrin hatással nem rendelkező heptapeptid TT-232 bizonyult.
3. Az octreotide (Sandostatint), amelyet gyógyszerként sikerrel alkalmaznak hormonszekréciók gátlására és endokrin tumorok kezelésére, nem befolyásolta sem a neurogén, sem a nem neurogén gyulladást.
4. Az antinociceptív hatás vizsgálatakor *kontroll* állatokban a kemonociceptív ingerekre adott az artériás vérnyomás átlagosan 46 (mustárolaj) illetve 55 (kapszaicin) Hgmm-rel, a szívfrekvencia 85-tel (mustárolaj) illetve 143-mal (kapszaicin) és a per centkenti légzésszám 61-gyel (mustárolaj) illetve 48-cal (kapszaicin) növekedett. Ezen efférens reflexválaszokat a natív szomatostatint, a TT-248, TT-250 és a TT-232 (10 µg/kg i.p.) szignifikánsan csökkentette. Ebben a kísérletsorozatban is a gyulladásgátló hatáshoz hasonlóan a TT-232 bizonyult a legerfektiivebbnek és az octreotide antinociceptív hatást sem mutatott. A TT-232 előkezelés a mustárolaj hatására történő vérnyomás-emelkedést 5 (mustárolaj) illetve 13 (kapszaicin) Hgmm-re, a szívfrekvencia-fokozódást 14-re (mustárolaj) illetve 23-ra (kapszaicin), a légzésszám-növekedést 12-re (mustárolaj) illetve 18-ra (kapszaicin) csökkentette.

KÖVETKEZTETÉSEK (1)

Ezen eredmények azt mutatják, hogy nem az a receptorcsalád (R2, R3 és R5) mediálja a szomatostatint és analógjainak anti-inflammációs és anti-nociceptív hatásait, amely az endokrin hatásokért felelős, mivel az octreotide, amely ezekhez kötődő, potens hormonszekréciógátló analóg, e tekintetben nem bizonyult hatásosnak (Raynor és mtsai. 1993; Hofland és mtsai.

1995). Az általunk vizsgált hatások tehát valószínűleg az irodalmi adatok alapján külön csoportba sorolható R1 és/vagy az R4 receptoro(ko)n (Reisine 1995) keresztül valósulnak meg, és a különböző szubsztitúciókkal előállított analógok ezekhez a szomatostatinnál nagyobb affinitást mutatnak. A tumorgátló hatás is feltehetőleg ezen receptorokhoz kapcsolható, hiszen a kísérleteinkben leghatékonyabbnak bizonyult heptapeptid TT- 232 a tumorsejt proliferációt is a legerfektiivebben gátolta (Kéri és mtsai. 1993, 1996). Mivel a TT-232 stabil endokrin hatásokkal nem rendelkező szintetikus peptid, a gyulladásgátló és fájdalomcsillapító terápiában ígéretes szer lehet. Ezen analóg további, részletesebb tanulmányozására irányult kísérletsorozatunk második része:

CÉLKITŰZÉSEK (2)

Az eddigi eredmények alapján jelen kísérleteinkben a következőket vizsgáltuk:

1. A TT-232 különböző dózisaival (i.p. és i.v.) gátló hatása mustárolajjal kiváltott neurogén, valamint krónikus denerváció után dextranszal illetve bradykininnel indukált nem neurogén gyulladáshoz való reakciókra (ID_{50} / ID_{35} meghatározása). Az eredmények összehasonlítása a klasszikus nem-szteroid gyulladásgátlók közül a diclofenac és a szelektív ciklooxygenáz-2 izoenzim (COX-2) gátló meloxicam hatásával.
2. A TT-232 hatástartamának meghatározása az ortodrómos neurogén gyulladás modellben az i.v. ID_{50} körüli dózissal.
3. Izolált tracheán a TT-232 hatása az elektromos téringelésrel illetve kapszaicinnel kiváltott szenzoros neuropeptidfelszabadulásra (SP, CGRP és szomatostatin).

MÓDSZEREK (2)

Az ortodrómos neurogén gyulladást 1 %-os mustárolajjal, a nem neurogén gyulladást a krónikusan denervált hátsó végtagon bradykininnel (50 μ l, 0.25 μ g s.c.) vagy 5 %-os dextranszal (100 μ l s.c.) váltottuk ki és Evans kék extravazációs módszerrel illetve pletizmométerrel mértük. A vizsgált gyulladáscsökkentőkkel dózis-hatás görbéket készítettünk és regressziós egyenes segítségével meghatároztuk az ID_{50} -t illetve az ID_{35} -t.

A neuropeptidok *in vitro* felszabadulásait elektromos téringelésrel (20 V, 0.1 ms, 10 Hz, 120 másodperc) vagy kapszaicinnel (10^{-7} M) váltottuk ki és az előző fejezetekben ismertetett módon RIA-val mértük. Statisztikai értékelésre páros és páratlan Student t-próbákat

használtunk.

A TT-232-ből Na-acetát-ecetsav pufferben 5 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk és a további oldásokat ebből 5 %-os mannitol hozzáadásával végeztük. A diclofenac 20 mg/ml-es koncentrációig fiziológias NaCl oldatban, e felett dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldódott. A kontroll csoportokban az állatokat a megfelelő oldószerrel kezeltük.

EREDMÉNYEK (2)

1. A TT-232 i.p. és i.v. adás után dózifüggő módon gátolta a mustárolajjal kiváltott neurogén gyulladást. A kétféle adásmód esetén 95 %-os konfidenciaintervallummal számolt ID_{50} értékek csaknem azonosak: ID_{50} (i.p.) = 4.34 (3.43-5.45) $\mu\text{g}/\text{kg}$, ID_{50} (i.v.) = 4.32 (2.41-8.84) $\mu\text{g}/\text{kg}$. A diclofenac (5, 10, 20 mg/kg i.v. illetve 100 mg/kg i.m.) és a meloxicam (1, 10, 20 mg/kg i.v.) nem volt hatással a mustárolajjal létrehozott plazma extravazációra 1 órával az anyag beadása után.
2. A TT-232 (2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.) gátló hatása a neurogén gyulladásra 2 órán át tartott.
3. A TT-232 (1, 2.5, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.) dózifüggő módon csökkentette a dextran nem neurogén lábduzzadást okozó hatását is. Mivel az 50 %-os gátlás nem volt elérhető, a kiszámított ID_{35} 30 percnél 1.64 (1.53-5.9) $\mu\text{g}/\text{kg}$. A dextran ödemát a diclofenac (5, 10, 20 mg/kg i.v.) és a meloxicam (0.2, 0.5, 1, 10 mg/kg i.v.) is gátolta. Diclofenac esetén 30 percnél ID_{35} = 10.89 (7.1-18.83) mg/kg, a meloxicam dózis-hatás görbéje azonban nem volt elég meredek ennek meghatározására. A bradykininnel kiváltott plazma kiáramlást csökkentette ugyan a TT-232 (1, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.), de a dózis-hatás görbe túl lapos volt és a hatás nem érte el az ID_{35} -t.
4. A SP, CGRP és szomatosztatin izolált tracheából elektomos téringelés hatására történő felszabadulását 500 nM TT-232 36.0 %-kal, 48.1 %-kal, illetve 40.6 %-kal gátolta. A kapszaicin által kiváltott peptidfelszabadulást 200 nM TT-232 44.8 %-kal (SP és szomatosztatin) és 48.5 %-kal (CGRP), míg az 500 nM dózis 79.3 %-kal (SP), 74.2 %-kal (szomatosztatin) és 27.4 %-kal (CGRP) csökkentette. A bazális, stimuláció nélküli peptidfelszabadulást a TT-232 nem befolyásolta.

KÖVETKEZTETÉSEK (2)

A TT-232, egy stabil, ciklikus, szintetikus heptapeptid szomatostatín analóg, rendkívül hatékonyan bizonyult a neurogén plazma extravazáció gátlásában, kísérleteink alapján hatása 2 óráig tart. Ezen eredmény jelentőségét az is hangsúlyozza, hogy a neurogén gyulladást sem a diclofenac, sem a COX-2 gátló meloxicam nem befolyásolta. Régóta folynak vizsgálatok az ismert nem-szteroid gyulladásgátlókkal kapcsolatban is (szalicilátok, amidopiridin, flufenamin sav, fenilbutazon, indometacin) (Jancsó-Gábor és Szolcsányi 1970), de jelenleg egyetlen olyan gyógyszer sincs, amely a neurogén gyulladáshoz szükséges reakciókat megbízhatóan gátolni tudná és ezáltal lehetőséget adna azon kórképek kezelésére, amelyekben e komponensnek kitüntetett szerepet tulajdonítanak. Ilyen betegségek pl. a légutak nyálkahártyájában létrejövő, elsősorban allergiás eredetű gyulladások (*rinitis, bronchitis, asztma bronchiale*), az ízület gyulladások (elsősorban a *rheumatoid arthritis*), a *migrén*, az *allergiás conjunctivitis*, az *urticaria* és a *psoriasis* (Geppetti és Holzer 1996). A szteroidok csak olyan nagy dózisban képesek gátolni a neurogén gyulladást, melyben a számos mellékhatás veszélye miatt nem lehet gyakorlati alkalmazással számolni (Piedimonte és mtsai. 1990) Bár a natív szomatostatín gátolja a kísérletesen kiváltott neurogén gyulladást, széles hatásspektruma és rövid felezési ideje miatt terápiaiban nem jöhet számításba. A TT-232 ezzel szemben sokkal hatékonyabb molekula és in vivo körülmények között lebomlása lassúbb, ezáltal hatása tartósabb. Szelektívebb is, mert endokrin hatásoktól mentes.

Mivel e heptapeptid gátolta *in vitro* a szenzoros neuropeptidok felszabadulását, feltételezhetjük, hogy a gyulladáscsökkentő és az anti-nociceptív hatás az afferens idegvégződések gátlásán keresztül valósul meg. A TT-232 a nem neurogén gyulladást is képes volt gátolni. Ebből következően hatásmechanizmusának egyéb komponensei is vannak, pl. direkt az ereken és/vagy a gyulladáshoz vezető sejteken - elsősorban hízósejteken - is gátlást okoz.

A jövőben további hatástani és toxikológiai kísérleteket tervezünk, melyek elősegíthetik, hogy ezen analógból új gyulladásgátló és esetleg fájdalomcsillapító gyógyszer váljék.

V. A NOCICEPTIN - EGY ÚJ ÓPIOID PEPTID – GYULLADÁSGÁTLÓ HATÁSA ÉS MECHANIZMUSA

(*Br. J. Pharmacol.* 121, pp. 613-615, 1997. és *Eur. J. Pharmacol.* 347, pp. 101-104, 1998.)

BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

Az ópioid peptidok gátolják a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből a gyulladáskeltő neurotranszmitterek (CGRP, SP) felszabadulását (Maggi 1991) és a neurogén gyulladást (Barthó és Szolcsányi 1981). Valószínűleg a mediátorfelszabadulás gátlásán alapul gerincvelői szinten az analgetikus hatásuk is.

Az utóbbi években két munkacsoport egymástól függetlenül felfedezett egy új, biokémiaiilag az ópioidok közé sorolható 17 aminosavból álló neuropeptidet. Egyikük (Meunier és mtsai. 1995) **nociceptin** névvel illette, mert intracerebrovaszkulárisan beadva - a morfinnal és az enkefalinnal ellentétben - egér tail-flick tesztnben nociceptív hatásúnak bizonyult. Másikuk az **orphanin FQ** elnevezést adta (Reinscheid és mtsai. 1995), mivel receptorát már a ligand azonosítása előtt felfedezték („orphan” azaz árva receptor / ORL₁, opioid receptor like 1). Bár a nociceptin a klasszikus opioid peptidokkal - elsősorban a dinorfin A-val - nagy fokú szerkezeti hasonlóságot mutat, funkcionálisan a kezdeti kutatások alapján azoktól több szempontból eltérően viselkedik. Giuliani és Maggi (1996) közölte, hogy a nociceptin prejunkcionális gátló hatást fejt ki a szenzoros rostok izgatásával kiváltott tachykinin-mediálta kontrakciókra tengerimalac izolált vesemedence simaizmán. Érdekesnek és ígéretesnek látszott ezért megvizsgálni, hogy képes-e a nociceptin gátolni a neurogén gyulladáshoz vezető folyamatokat *in vivo* és biokémiai módszerekkel kimutathatóan a szenzoros neuropeptidok felszabadulását *in vitro*.

Jelen kísérlet sorozatunkban a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Gátolja-e a szisztémásan (i.p.) adott nociceptin az ortodromos és antiodromos neurogén, valamint a nem neurogén gyulladáshoz vezető reakciókat *in vivo*?
2. Befolyásolja-e a nociceptin a mast cell degranulating peptide (MCDP) (Ziai és mtsai. 1990), 5-hydroxytryptamin (5-HT) illetve hisztamin okozta plazma extravazációt?
3. Milyen hatása van a nociceptinnek az elektromos téringerlés és a kémiai stimulánsok (kapszaicin és bradikinin) által kiváltott gyulladáskeltő (SP és CGRP) valamint gyulladásgátló (szomatostatatin) neuropeptidok afferens idegvégződésekből történő felszabadulására *in vitro*?

MÓDSZEREK

Kísérleteinkhez 40 mg/kg i.p. pentobarbital-lal (Nembutal) altatott 200-250 g súlyú nőstény Wistar patkányokat használtunk.

In vivo kísérletek:

A plazma extravazáció detektálására és kvantifikálására az Evans kék módszert használtuk. A nociceptint (20 µg/kg i.p.) vagy kontroll állatokban azonos volumenű izotóniás NaCl oldatot 10 perccel a gyulladás kiváltása előtt adtuk.

Neurogén gyulladás kiváltása: Az antidrómos neurogén gyulladást a bal oldali n. saphenus perifériás csomjának 20 V, 0.5 ms, 5 Hz paraméterekkel 5 percig történő ingerlésével váltottuk ki. Az ortodrómos stimulációkor az akutan denervált hátsó végtagok bőrét 1 %-os mustárolajjal ecseteltük.

Nem neurogén gyulladás kiváltása: A krónikusan denervált hátsó végtagok talpbőre alá az egyik kísérlet sorozatban 50 µl-nyi térfogatban 0.25 µg bradykinint, a másikban MCDDP-t (0.25 µg 100 µl-ben), 5-HT-t (0.5 µg 100 µl-ben) vagy hisztamint (1 µg 100 µl-ben) fecskendeztünk.

Az állatokat 15 illetve a mustárolaj kenés esetében 20 perccel a gyulladás kiváltása után elvéreztettük és a gyulladt szövetekben akkumulálódott festékmennyiséget spektrofotométeres módszerrel mértük.

In vitro vizsgálatok:

A patkányokat elvéreztettük és 2-2 kímetszett tracheát 1.8 ml-es szervfűrdőben 37 °C-os oxigenizált (95 % O₂ és 5 % CO₂) Krebs oldattal 60 percen át perfundáltunk (1 ml/perc). Az áramlás leállítása után a szervfűrdőben lévő oldatot 3-szor 5 (elektromos téringerlés esetén) illetve 8 (kémiai stimulációnál) percenként lecseréltük (ingerlés előtti - ingerelt - ingerlés utáni frakciók).

A peptidek felszabadulását kiváltó *elektromos téringerlés* a második 5 perces periódus elején történt 50 másodpercig 40 V, 0.1 ms, 2 Hz paraméterekkel (Szolcsányi and Barthó 1982) 100 nM nociceptin jelenlétében vagy anélkül.

Kémiai izgatásra kapszaicint (10⁻⁸ M) vagy bradykinint (10⁻⁷ M) használtunk a második 8 perces periódusban. A nociceptint (100 vagy 300 nM) e középső frakció elején adtuk az inkubációs médiumhoz.

Az eredmények statisztikai értékelése Mann-Whitney teszttel (*in vivo* kísérletek) illetve páros és páratlan t-teszttel (*in vitro* adatok) történt.

EREDMÉNYEK

In vivo kísérletek:

1. Nociceptin előkezelés a n. saphenus antidrómos ingerlésével kiváltott plazma extravazációt 51.4 %-kal, a mustárolaj ecseteléssel indukált ortodrómos neurogén gyulladást 35.7 %-kal gátolta.
2. A krónikusan denervált végtagon MCDP-vel illetve hisztaminnal kiváltott nem neurogén gyulladást ugyancsak szignifikánsan (53.7 és 19.5 %-kal) csökkentette a nociceptin, ezzel szemben nem befolyásolta a bradykinin és az 5-HT Evans kék akkumulációt okozó hatását.

In vitro adatok:

3. Az elektromos téringelés az izolált légsódarabokból 103.9 %-os SP és 146.7 %-os CGRP felszabadulást eredményezett a stimuláció előtti értékekhez viszonyítva. A bazális peptidfelszabadulást 100 nM nociceptin jelenléte nem változtatta meg, de az ingerlés által kiváltott emelkedést a SP esetén 63.1 %-kal, a CGRP esetén 44.1 %-kal csökkentette.
4. Kontroll mintákból a kapszaicin (10^{-8} M) a SP, CGRP és szomatosztatin felszabadulását 53.2 %-kal, 114.3 %-kal és 91.3 %-kal növelte. Nociceptin jelenlétében (100 és 300 nM) ez az emelkedés csupán 47.2 % és 14.7 % (SP), 52.4 % és 15.8 % (CGRP), valamint 40.9 % és 18.8 % (szomatosztatin) volt. Az utóbbi nociceptin dózis mellett kapszaicin hatására a neuropeptidek felszabadulása nem fokozódott szignifikánsan.
5. A bradykinin (10^{-7} M) által kiváltott 53.3 %-os SP, 78.9 %-os CGRP és 68.0 %-os szomatosztatin emelkedést 100 nM nociceptin 24.7 %-ra, 47.4 %-ra és 33.3 %-ra gátolta. A 300 nM-os nociceptin hatására a peptidek felszabadulásának fokozódása csupán 13.2 % (SP), 33.3 % (CGRP) illetve 11.1 % (szomatosztatin) volt, amely már nem jelentett szignifikáns emelkedést a bazális értékekhez képest.

KÖVETKEZTETÉSEK

Jelen *in vivo* eredmények szolgáltatják az első bizonyítékot arra, hogy a szisztémás nociceptin kezelés csökkenteni képes a bőrben mind az antidrómos, mind az ortodrómos neurogén plazma extravazációt. Ezzel szemben nem befolyásolja a direkt vaszkuláris permeabilitás fokozódást okozó bradykinin és 5-HT által kiváltott nem neurogén gyulladós

folyamatokat. Mindez arra utal, hogy ez az újonnan felfedezett ópioid peptid gyulladásgátló hatását nem az ereken, hanem az aktivált érzőidegvégződésekből történő gyulladáskeltő neuropeptid-felszabadulás gátlásán keresztül fejtí ki. Ezt az elképzelést megerősítik az izolált légsóvel kapott *in vitro* adataink, melyek szerint a nociceptin a szenzoros rostok perifériás végződéseinek elektromos téringérésével illetve kémiai izgatásával kiváltott SP és CGRP felszabadulást csökkenti. Ez az eredmény azért is érdekes, mert az irodalomból ismert, hogy a klasszikus μ - és δ -ópioid receptor agonisták csak az afferens rostok elektromos stimulációjával indukált peptidfelszabadulást gátolják, a kémiai ingerlés hatását nem (Barthó és mtsai. 1987; Maggi 1995). Ezen felül a nociceptin csökkenti a gyulladásgátló hatású szomatostatint felszabadulását is, amelyet kapszaicinnel vagy bradykininnel váltottunk ki. A kapszaicin-érzékeny afferensekben a SP és a CGRP részben ko-lokalizáltan fordul elő, míg a szomatostatint ezen neuronok egy másik alcsoportjában raktározódik (Maggi 1995; Szolcsányi 1996a) Jelen adataink alapján a nociceptin mindhárom peptidet tartalmazó vezikula kiürülését képes gátolni.

A nociceptin gátló hatása a MCDP által kiváltott nem-neurogén gyulladásra feltehetően a hiszóséjmembránban lévő kation csatornákon keresztül valósul meg. A hiszóséjtek degranulációja, excitózisa a citoszol szabad Ca^{2+} tartalmának emelkedése következtében jön létre, amelyben a csatornák megnyílása és az extracelluláris térből a sejbe történő Ca^{2+} áramlás döntő szerepet játszik (Kuno és mtsai. 1989). A MCDP egy 22 aminosavból álló, erősen kationos peptid, amely a hiszóséjteket a Ca^{2+} csatornák megnyitására és a K^+ csatornák blokkolásán keresztül aktiválja (Ziai és mtsai. 1990). Irodalmi adatok utalnak arra, hogy a nociceptin fokozza a K^+ áramot patkány központi idegrendszerében (Vaughan és Christie 1996) és a morfinnal ellentétben gátolja neuronokban az alacsony feszültségű T-típusú Ca^{2+} csatornák működését (Connor és mtsai. 1996). A nociceptin valószínűleg ezeken a csatornákon hatva gátolja mind a hiszóséjtek degranulációját, mind az idegvégződésekből történő neurotranszmitter-felszabadulást.

Ezen újonnan felfedezett ópioid peptiddel kapcsolatos eredményeinknek **gyakorlati jelentősége** is lehet. Szintetikus nociceptin analógok, vagyis ORL₁ receptor agonisták, előállítására új farmakológiai profilú, a hiszóséjteken és a nociceptív idegvégződéseken egyaránt gátló hatással rendelkező gyulladásgátló szer kifejlesztésére nyújthat lehetőséget.

IRODALOMJEGYZÉK

- BARTHÓ, L. & SZOLCSÁNYI, J. (1981). Opiate agonists inhibit neurogenic plasma extravasation in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **73**, 101-104.
- BARTHÓ, L., AMANN, R., SARIA, A., SZOLCSÁNYI, J. & LEMBECK, F. (1987). Peripheral effects of opioid drugs on capsaicin-sensitive neurones of the guinea pig bronchus and ear. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **336**, 316-320.
- BAYLISS, W.M. (1901). On the origin from the spinal cord of the vaso-dilator fibres of the hindlimb, and on the nature of these fibres. *J. Physiol.* **26**, 173-180.
- BETOIN, F., ARDID, D., HERBET, A., AUMAITRE, O., KEMÉNY, J.L., DUCHENE-MARULLAZ, P., LAVARANNE, J. & ESCHALIER, A. (1994). Evidence for a central long-lasting effect of vapreotide, an analog of somatostatin, involving an opioidergic mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**, 7-14.
- BEVAN, S. & SZOLCSÁNYI, J. (1990). Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *TIPS* **11**, 330-333.
- BRUCE, A.N. (1910). Über die Beziehungen der sensiblen Nervenendigungen zum Entzündungsvorgang. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **63**, 424-432.
- CARLTON, S.N. & COGGESHALL, R.E. (1997). Immunohistochemical localisation of enkephalin in peripheral sensory axons in the rat. *Neurosci. Lett.* **221**, 121-124.
- CATERINA, M.J., SCHUMACHER, M.A., TOMINAGA, M., ROSEN, T.A., LEVINE, J.D. & JULIUS, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816-824.

- CONNOR, M., YEO, A. & HENDERSON, G. (1996). The effect of nociceptin on Ca^{2+} channel current and intracellular Ca^{2+} in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 205-207.
- FERREL, W.R. & LAM, F.Y. (1996). Sensory neuropeptides in arthritis. In *Neurogenic Inflammation*. ed. Gepetti, G. & Holzer, P., pp. 33-42. Boca Raton, U.S.A.: CRC Press.
- FIORAVANTI, A., GOVONI, M., LA MONTAGNA, G., PERPIGNANO, G., TIRRI, G., TROTTA, F., BOGLIOLO, A., CIOCCI, A., TAUCERI, M.T., & MARCOLONGO, R. (1995). Somatostatin-14 and joint inflammation: evidence for intraarticular efficacy of prolonged administration in rheumatoid arthritis. *Drugs Exp. Clin. Res.* **21**, 97-103.
- GAMSE, R., LEEMAN, S.E., HOLZER, P. & LEMBECK, F. (1981). Differential effect of capsaicin on the content of somatostatin, substance P and neurotensin in the nervous system of the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **317**, 140-148.
- GEBHART, G.F. & SENGUPTA, J.N. (1996). Evaluation of visceral pain. In *Methods in Gastrointestinal Pharmacology*, pp. 359-373. Boca Raton, U.S.A.: CRC Press.
- GEPPETTI, P. & HOLZER, P. (eds.) (1996). *Neurogenic Inflammation*. Boca Raton, U.S.A.: CRC Press.
- GIULIANI, S. & MAGGI, C.A. (1996). Inhibition of tachykinin release from peripheral endings of sensory nerves by nociceptin, a novel opioid peptide. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 1567-1569.
- HOFLAND, L.J., VISSER-WISSELAAR, H.A. & LAMBERTS, S.W. (1995). Somatostatin analogs: clinical application in relation to human somatostatin receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 287-297.
- HOLZER, P. (1988). Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins and other neuropeptides. *Neuroscience* **24**, 739-768.

- JANCSÓ, N. (1955). Speicherung. Stoffanreicherung in Retikuloendothel und in der Niere. Budapest: Akadémiai Kiadó.
- JANCSÓ, N., JANCsó-GÁBOR, A. & SZOLCSÁNYI, J. (1967). Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pre-treatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* **31**, 138-151.
- JANCSÓ-GÁBOR, A. & SZOLCSÁNYI, J. (1970). Action of rare earth metal complexes on neurogenic as well as on bradykinin-induced inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.* **22**, 366-371.
- KARALIS, K., MASTOKAROS, G., CHROUSOS, G.P. & TOLIS, G. (1994). Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo. *J. Clin. Invest.* **93**, 2000-2006.
- KÉRI, GY., MEZÓ, I., VADÁSZ, ZS., HORVÁTH, A., IDEI, M., VÁNTUS, Á., BALOGH, G., BÖKÖNYI, G., BAJOR, T., TEPLÁN, I., TAMÁS, J., MÁK, M., HORVÁTH, J. & CSUKA, O. (1993). Structure-activity relationship studies of novel somatostatin analogs with antitumor activity. *Peptide Research* **6**, 281-288.
- KÉRI, GY., ÉRCHEGYI, J., HORVÁTH, A., MEZÓ, I., IDEI, M., VÁNTUS, T., BALOGH, Á., VADÁSZ, ZS., BÖKÖNYI, GY., SEPRÓDI, J., TEPLÁN, I., CSUKA, O., TEJEDA, M., GAÁL, D., SZEGEDI, ZS., SZENDE, B., ROZE, C., KALTHOFF, H. & ULLRICH, A. (1996). A tumor-selective somatostatin analog (TT-232) with strong *in vitro* and *in vivo* anti-tumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 12513-12518.
- KUNO, M., OKADA, T., SHIBATA, T. (1989). A patch-clamp study: secretagogue-induced currents in rat peritoneal mast cells. *Am. J. Physio.* **256**, C560-C568.
- LEMBECK, F. & HOLZER, P. (1979). Substance P as neurogenic mediator of vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **310**, 175-183.
- LEMBECK, F. & SKOFITSCH, G. (1982). Visceral pain reflex after pretreatment with capsaicin and morphine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **321**, 116-121.

- LEMBECK, F., DONNERER, J. & BARTHÓ, L. (1982). Inhibition of neurogenic vasodilatation by substance P antagonists, somatostatin and (D-met², pro⁵)enkephalinamide. *Eur. J. Pharmacol.* **85**, 171-176.
- LEWIS, T. (1927). *The Blood Vessels of the Human Skin and Their Responses*. Shaw, London.
- LORENSON, M.Y. & JACOBS, L.S. (1984). Depletion of bovine pituitary prolactin of cysteamine involves a thiol-disulfide mechanism. *Endocrinology* **115**, 1492-1495.
- LOU, Y.-P., FRANCO-CERECEDA, A. & LUNDBERG, J.M. (1992). Different ion channel mechanisms between low concentrations of capsaicin and high concentrations of capsaicin and nicotine regarding peptide release from pulmonary afferents. *Acta Physiol. Scand.* **142**, 119-127.
- LUNDBERG, J.M. (1996). Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: Integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol. Rev.* **48**, 113-178.
- MAGGI, C. A. (1991). The pharmacology of the efferent function of sensory nerves. *J. Auton. Pharmacol.*, **11**, 173-208.
- MAGGI, C.A. (1995). Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog. Neurobiol.*, **45**, 1-98.
- MAGGI, C.A. & MELI, A. (1988). The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol.*, **19**, 1-43.
- MAURER, R., GAEHWILER, B.H., BUESCHER, H.H., HILL, R.C. & ROEMER, D. (1982). Opiate antagonistic properties of an octapeptide somatostatin analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4815-4817.

- MEUNIER, J.-C., MOLLEREAU, C., TOLL, L., SUAUDEAU, C., MOISAND, C., ALVNERIE, P., BUTOUR, J.-L., GUILLEMOT, J.-C., FERRARA, P., MONSARRAT, B., MAZARGUIL, H., VASSART, G., PARMENTIER, M. & COSTENTIN, J. (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL₁ receptor. *Nature*, **377**, 532-535.
- NÉMETH, J., HELYES, ZS., GÖRCS, T., GARDI, J., PINTÉR, E. & SZOLCSÁNYI, J. (1996). Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone. *Acta Physiologica Hungarica* **84** (3), 313-315.
- NÉMETH, J., GÖRCS, T., HELYES, ZS., OROSZI, G., KOCSY, T., PINTÉR, E. AND SZOLCSÁNYI, J. (1998). Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research. *Neurobiology, közlésre elfogadva*.
- PATEL, Y.C. & PIERZCHALA, I. (1985). Cysteamine induces a loss of tissue somatostatin-28 when as somatostatin-28_{(11-28)}}-like immunoreactivity but not when assayed as somatostatin-28_{(1-14)}}-like immunoreactivity: evidence for the importance of the disulfide bond for cysteamine action. *Endocrinology*, **116**, 1699-1702.
- PATEL, Y.C., MURTHY, K.K., ESCHER, E.E., BANVILLE, D., SPIESS, J. & SRIKANT, C.B. (1990). Mechanism of action of somatostatin: an overview of receptor function and studies of the molecular characterization and purification of somatostatin receptor proteins. *Metabolism*, **39** (Suppl. 2), 63-69.
- PELTON, J.T., GULYA, K., HRUBY, W.J., PIPERDUCKLES, S. & YAMAMURA, H.I. (1985). Conformationally restricted analogs of somatostatin with high μ -opiate receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 236-239.
- PETHŐ, G. & SZOLCSÁNYI, J. (1996). Excitation of central and peripheral terminals of primary afferent neurons by capsaicin in vivo. *Life Sci.*, **58**, PL47-53.

- PIEDIMONTE, G., McDONALD, D.M. & NADEL, J.A. (1990). Glucocorticoids inhibit neurogenic plasma extravasation and prevent virus-potentiated extravasation in the rat trachea. *J. Clin. Invest.*, **86**, 1409-1415.
- PINTÉR, E. & SZOLCSÁNYI, J. (1988). Inflammatory and antiinflammatory effects of antidromic stimulation of the dorsal roots in the rat. *Agents Actions*, **25**, 240-241.
- PINTÉR, E. & SZOLCSÁNYI, J. (1996). Systemic anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of the dorsal roots in the rat. *Neurosci. Lett.*, **212**, 33-36.
- RAYNOR, K., O'CARROLL, A.-M., KONG, H., YASUDA, K., MAHAN, L.C., BELL, G.I. & REISINE, T. (1993). Characterization of cloned somatostatin receptors SST4 and SST5. *Mol. Pharmacol.*, **44**, 385-392.
- REINSCHIED, R.K., NOTHACKER, H.-P., BOURSON, A., ARDATI, A., HENNINSEN, R.A., BUNZOW, J.R., GRANDY, D.K., LANGEN, H., MONSMA, F.J. & CIVELLI, O. (1995). Orphanin FQ: A neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*, **270**, 792-794.
- REISINE, T. (1995). Review: Neurotransmitter receptors V., Opiate Receptors. *Neuropharmacology*, **34**, 463-472.
- REISINE, T., He, H., RENS-DOMIANO, S., MARTIN, J., RAYNOR, K., BORISLOW, S. & THERMOS, K. (1990). Biochemical properties of somatostatin receptors. *Metabolism*, **39** (Suppl. 2), 70-73.
- REZEK, M., HAVLICEK, V., LEYBIN, L., LABELLA, F.S. & FRIESEN, H. (1978). Opiate-like naloxone-reversible actions of somatostatin given intracerebrally. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **56**, 227-231.
- RU-RONG, J.I., ZHANG, X., ZHANG, Q., DAGERLIND, A., NILSSON, S. & WIESENFELD-HALLIN, ZS. (1995). Central and peripheral expression of galanin in response to inflammation. *Neuroscience*, **68**, 563-576.

- SELYE, H. (1965). The mast cells. Washington, Butterworths.
- STEIN, C. (1995). The control of pain in peripheral tissue by opioids. *New England J. Med.* **332**, 1685-1690.
- STEIN, C., SCHAFER, M., HASSAN, A.H. (1995). Peripheral opioid receptors. *Ann. Med.*, **27**, 219-221.
- STRICKER, S. (1876). Untersuchung über die Gefäßwurzeln des Ischiadicus. *Sitz. Kaiserl. Akad. Wiss. (Wien)* **3**, 173-180.
- SZOLCSÁNYI, J. (1982). Capsaicin type pungent agents producing pyrexia. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. ed. Milton, A.S., Vol. 60., *Pyretics and Antipyretics*, pp. 437-478. Springer-Verlag, Berlin.
- SZOLCSÁNYI, J. (1983). Tetrodotoxin-resistant non-cholinergic neurogenic contraction evoked by capsaicinoids and piperine on the guinea-pig trachea. *Neurosci Lett.* **42**, 83-88.
- SZOLCSÁNYI, J. (1984). Capsaicin-sensitive chemoceptive neural system with dual sensory-efferent function. In *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation*. eds. Chahl, L.A., Szolcsányi, J. and Lembeck, F., pp. 27-53. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- SZOLCSÁNYI, J. (1987). Selective responsiveness of polymodal nociceptors of the rabbit ear to capsaicin, bradykinin and ultra-violet irradiation. *J. Physiol.* **388**, 9-23.
- SZOLCSÁNYI, J. (1988). Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. *Agents Actions* **23**, 4-11.
- SZOLCSÁNYI, J. (1991). Perspectives of capsaicin-type agents in pain therapy and research. In *Contemporary Issues in Chronic Pain Management*. ed. Paris, W.C.V., pp. 97-122. Kluwer Academic Publishers, Boston.

- SZOLCSÁNYI, J. (1993). Actions of capsaicin on sensory receptors. In *Capsaicin in the Study of Pain*. ed. J.N. Wood., pp. 1-26. Academic Press, London.
- SZOLCSÁNYI, J. (1996a). Neurogenic inflammation: reevaluation of axon reflex theory. In *Neurogenic Inflammation*. eds. Gepetti, G. & Holzer, P., pp. 33-42. Boca Raton, U.S.A.: CRC Press.
- SZOLCSÁNYI, J. (1996b). Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. In *Progress in Brain Research*. eds. Kumazawa, T., Kruger, L. & Mizumura, K., Vol. 113., pp. 343-359. Amsterdam: Elsevier.
- SZOLCSÁNYI, J. & BARTHÓ, L. (1982). Capsaicin-sensitive noncholinergic innervation of the guinea pig tracheobronchial smooth muscle. *Neurosci. Lett.* **34**, 247-251.
- SZOLCSÁNYI, J., JANCÓS-GÁBOR, A. & JOÓ, F. (1975). Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **287**, 157-169.
- SZOLCSÁNYI, J., PINTÉR, E. & PETHÓ, G. (1992). Role of unmyelinated afferents in regulation of microcirculation and its chronic distorsion after trauma and damage. In *Reflex Sympathetic Distrophy: Pathophysiological Mechanisms and Clinical Implications*. ed. Janig, W. & Schmidt, R.F., pp. 245-264. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- VAUGHAN, C.W. & CHRISTIE, M.J. (1996). Increase by ORL₁ receptor (opioid receptor-like₁) ligand, nociceptin, of inwardly rectifying K⁺-conductance in dorsal raphe nucleus neurones. *Br. J. Pharmacol.* **117**, 1609-1621.
- WRIGHT, F. & ANGUS, T. (1996). Effects of N-, P- and Q-type neuronal calcium channel antagonists on mammalian peripheral neurotransmission. *Br. J. Pharmacol.* **119**, 49-56.

- ZHAI, M.R., RUSSEK, S., WANG, H.-C., BEER, B. & BLUME, A.J. (1990). Mast cell degranulating peptide: a multi-functional neurotoxin. *J. Pharm. Pharmacol.* **42**, 457-461.
- XU, X.J., HAO, J.X., WIESENFELD-HALLIN, ZS., HAKANSON, R., FOLKERS, K. & HÖKFELT, T. (1991). Spantide II, a novel tachykinin antagonist, and galanin inhibit plasma extravasation induced by antidromic C-fiber stimulation in rat hindpaw. *Neuroscience* **42**, 731-737.
- YASHUDA, K., RAYNOR, K., KONG, H., BREDER, C., TAKEDA, J., REISINE, T. & BELL, G. (1993). Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6736-6740.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik Ph.D. értekezésem elkészítésében segítségemre voltak: *Prof. Szolcsányi Jánosnak*, hogy bevezetett a neurofarmakológia érdekes világába és kutatómunkámat logikus gondolkodásával, kiemelkedő kreativitásával mindvégig irányította. Köszönet munkatársaimnak, *Dr. Pintér Erikának, Dr. Németh Józsefnek és Dr. Oroszi Gábornak* a kísérletek elvégzésében és eredményeink közlésében való közreműködésükért, barátságukért. Külön köszönet *Dr. Pintér Erikának*, aki a kísérleti módszereket és a tudományos publikáció szabályait megtanította, és precízitásával követendő példát mutatott. Asszisztensnőinknek, *Olasz Istvánné, Csillának és Zöldhegyi Józsefné, Marának*, gondos, megbízható és készleges segítségükért. Köszönet a *POTE Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden dolgozójának*, hogy nyugodt és kiegyensúlyozott körülményeket teremtettek. Végül köszönöm *családomnak*, hogy támogatással hozzájárultak ahhoz, hogy a munkámat hatékonyan végezhessem és a disszertációt elkészíthessem.

PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

LEFETI KÖZLEMÉNYEK:

A/ Külföldi folyóiratok:

1. Pintér, E., Helyes, Zs., Pethó, G. and Szolcsányi, J.: Noradrenergic and peptidergic regulation of cutaneous microcirculation in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **325**, pp. 57-64, 1997.
2. Helyes, Zs., Németh, J., Pintér, E. and Szolcsányi, J.: Nociceptin inhibits neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals. *Br. J. Pharmacol.* **121**, pp. 613-615, 1997.
3. Szolcsányi, J., Helyes, Zs., Oroszi, G., Németh, J., Pintér, E.: Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of the rat sciatic nerve. *Br. J. Pharmacol.* **123**, pp. 936-942, 1998.
4. Szolcsányi, J., Pintér, E., Helyes, Zs., Oroszi, G. and Németh J.: Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br. J. Pharmacol.* **124**, közlésre elfogadva, 1998.
5. Németh, J., Helyes, Zs., Oroszi, G., Than, M., Pintér, E. and Szolcsányi, J.: Inhibition of nociceptin on sensory neuropeptide release and mast cell-mediated plasma extravasation in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **347**, pp. 101-104, 1998.
6. Szolcsányi, J., Németh, J., Oroszi, G., Helyes, Zs., Kocsy, T. and Pintér, E.: Mechanism of sensory neuropeptide release by electrical field stimulation and capsaicin in isolated trachea of the rat.

(Közlésre előkészített kézirat)

7. Szolcsányi, J., Pintér, E., Helyes, Zs., Oroszi, G. and Németh, J.: Inhibition of inflammation and nociception by novel synthetic somatostatin analogs in the rat.
(Közlésre előkészített kézirat, a szabadalmi beadvány miatt jelenleg az eredmények nem publikálhatók.)

B/ Angol nyelvű hazai folyóiratok:

1. Helyes, Zs., Pintér, E., Szolcsányi, J. and Horváth, J.: Anti-inflammatory and antinociceptive effect of different somatostatin-analogs.
Neurobiology 4, pp.115-117, 1996.
2. Pintér, E., Szolcsányi, J. and Helyes, Zs.: Neurotransmitter background of the anti-inflammatory effect evoked by activation of sensory nerve fibers.
Neurobiology 4, pp.233-235, 1996.
3. Pintér, E., Helyes, Zs., Pethő, G. and Szolcsányi, J.: Non-adrenergic regulation of microcirculation evoked by antidromic stimulation of the saphenous nerve in the rat.
Acta Physiologica Hungarica 84 (3), pp.239-240, 1996.
4. Németh, J., Helyes, Zs., Görcs, T., Gardi, J., Pintér, E. and Szolcsányi, J.: Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone.
Acta Physiologica Hungarica 84 (3), pp.313-315, 1996.
5. Horváth, J., Helyes, Zs., Flerkó, B.: Gonadectomy modifies the gender specific pattern of desensitization of pituitary cells by gonadotropin-releasing hormone in the superfusion system.
Acta Biologica Hungarica 47, pp.329-339, 1996.
6. Németh, J., Görcs, T., Helyes, Zs., Oroszi, G., Kocsy, T., Pintér, E. and Szolcsányi, J.: Development of a new sensitive radioimmunoassay for neuropharmacological research.
Neurobiology, közlésre elfogadva, 1998.

II. FOLYÓIRATBAN MEGJELENT ELŐADÁSKIVONATOK:

A./ Külföldi folyóiratok, kongresszusi kiadványok:

1. Szolcsányi, J., Pintér, E., Pethő, G., Helyes, Zs., Pórszász, R.: Pain and modulation of inflammation by afferent fibers. *Proceedings of International Symposium on the Pain Sensory System*, pp.30-36. (Seoul, Korea), 1996.

2. Pintér, E., Helyes, Zs., Németh, J., Oroszi, G. and Szolcsányi, J.: Somatostatin as anti-inflammatory neuromediator: in vivo and in vitro evidences.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **365** (4) Suppl. 1, p. 44., 1997.

3. Szolcsányi, J., Németh, J., Oroszi, G., Helyes, Zs. and Pintér, E.: Effect of capsaicin and resiniferatoxin on the release of sensory neuropeptides in the rat's isolated trachea.

Br. J. Pharmacol. **124** Proc. Suppl., p. 8P, 1998.

B./ Angol nyelvű hazai folyóiratok:

1. Pintér, E., Szolcsányi, J. and Helyes, Zs.: Anti-inflammatory mediators released by activation of capsaicin-sensitive sensory nerve fibres.

Neurobiology **4**, p. 165., 1996.

2. Helyes, Zs., Pintér, E., Szolcsányi, J., Horváth, J. and Kéri, Gy.: New perspectives of somatostatin analogs as anti-inflammatory and anti-nociceptive drugs.

Neurobiology **4**, p.146., 1996.

3. Helyes, Zs., Pintér, E. and Szolcsányi, J.: Mechanism of systemic anti-inflammatory effect induced by orthodromic and antidromic stimulation of the capsaicin sensitive nerve endings.

Neurobiology **5** (1), p. 145., 1996.

4. Pintér, E., Helyes, Zs., Pethő, G. and Szolcsányi, J.: Role of neuropeptide Y and noradrenaline in sympathetic regulation of microcirculation of the skin.

Neurobiology **5** (1), p. 201., 1996.

5. Oroszi, G., Helyes, Zs., Pintér, E. and Szolcsányi, J.: Neuropharmacological evidence for a recently discovered systemic anti-inflammatory mechanism. *Neurobiology*, közlésre elfogadva, 1998.

III. SZABADALMI BEADVÁNY:

Kéri Gy., Szolcsányi J., Pintér E., Helyes Zs., Érchegyi J., Horváth A., Horváth J., Teplán I., Vadász Zs.: Eljárás neurogén és nem neurogén gyulladásgátló, valamint fájdalomcsillapító hatású heptapeptid szomatostatin származékokat tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására. 1998. 04. 24., Iktatószám J208/98.

ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK LISTÁJA

I. NEMZETKÖZI KONFERENCIÁK:

1. **Helyes, Zs., Pintér, E., Szolcsányi, J., Horváth, J., Kéri, Gy.:** Mediation of inflammation and pain by somatostatin and its analogs
3rd Congress of the Society for Developmental Pharmacology, Pécs, 1996.
2. **Helyes, Zs., Pintér, E., Szolcsányi, J., Horváth, J., Kéri, Gy.:** New perspectives of somatostatin analogs as anti-inflammatory and anti-nociceptive drugs
European Neuropeptide Club, 6th Annual Meeting, Pécs, 1996.
3. **Pintér, E., Helyes, Zs., Szolcsányi, J.:** Anti-inflammatory mediators released by activation of capsaicin-sensitive sensory nerve fibres
European Neuropeptide Club, 6th Annual Meeting, Pécs, 1996.
4. **Helyes, Zs., Pintér, E., Szolcsányi, J., Horváth, J., Kéri, Gy.:** Cyclic synthetic somatostatin analogs with anti-inflammatory and anti-nociceptive action
5th Joint Meeting of Hungarian, Italian and Polish Pharmacological Societies, Pécs, 1996.
5. **Pintér, E., Helyes, Zs., Pethő, G., Szolcsányi, J.:** Non-adrenergic regulation of microcirculation evoked by antidromic stimulation of saphenous nerve stimulation in the rat skin
5th Joint Meeting of Hungarian, Italian and Polish Pharmacological Societies, Pécs, 1996.
6. **Helyes, Zs., Pintér, E., Oroszi, G., Szolcsányi, J.:** Endogenous anti-inflammatory mediators released by activation of the capsaicin-sensitive sensory nerve terminals
13th International Medical Sciences Student Congress, Isztambul, Törökország, 1997.
7. **Németh, J., Helyes, Zs., Pintér, E., Szolcsányi, J.:** Inhibitory effect of nociceptin on SP, CGRP and somatostatin release from sensory nerve terminals in vitro
European Neuropeptide Club, 7th Annual Meeting, Marburg, Németország, 1996.; **I. díj**

8. Szolcsányi, J., Pintér, E., Helyes, Zs., Oroszi, G.: Somatostatin and the neurohumoral role of capsaicin-sensitive sensory nerve endings
European Neuropeptide Club, 7th Annual Meeting, Marburg, Németország, 1996.
9. Szolcsányi, J., Pintér, E., Németh, J., Helyes, Zs., Oroszi, G.: Reguloceptor function of capsaicin-sensitive nociceptors
XXXIII International Congress of Physiological Sciences IUPS, St. Peterburg, Oroszország, 1997.
10. Szolcsányi, J., Németh, J., Pintér, E., Helyes, Zs., Oroszi, G.: Systemic and local effects of sensory neuropeptides in inflammation
„Tachykinins in Health and Disease” International Tachykinin Conference, Cairns, Ausztrália, 1997.
11. Pintér, E., Németh, J., Helyes, Zs., Szolcsányi, J.: Effect of nociceptin on the release of inflammatory neuropeptides in vivo and in vitro
„Tachykinins in Health and Disease” International Tachykinin Conference, Cairns, Ausztrália, 1997.
12. Helyes, Zs., Oroszi, G., Pintér, E., Szolcsányi, J.: Systemic anti-inflammatory effect evoked by antidromic stimulation of sensory fibres of the sciatic nerve
„Tachykinins in Health and Disease” International Tachykinin Conference, Cairns, Ausztrália, 1997.
13. Pintér, E., Helyes, Zs., Németh, J., Oroszi, G., Szolcsányi, J.: Somatostatin as anti-inflammatory neuromediator: in vivo and in vitro evidences
Fall Meeting of the Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmacologie und Toxicologie, Bécs, Ausztria, 1997.
14. J. Szolcsányi, J. Németh, G. Oroszi, Zs. Helyes, E. Pintér : Effect of capsaicin and resiniferatoxin on the release of sensory neuropeptides in the rat's isolated trachea
British Pharmacological Society Spring Meeting, Chester, U.K., 1998.

15. G. Oroszi, J. Németh, E. Pintér, T. Kocsy, **Zs. Helyes**, J. Szolcsányi: Mechanism of calcitonin gene-related peptide (CGRP) release from sensory nerve terminals in isolated trachea of the rat
The Third International Symposium on Calcitonine Gene-Related Peptide, Shaftesbury, Dorset, U.K., 1998.

II. HAZAI KONFERENCIÁK:

1. **Helyes, Zs.**, Pintér, E., Szolcsányi, J., Horváth, J.: Somatostatin analógok gyulladásgátló és anti-nociceptív hatása
Magyar Idegtudományi Társaság III.. Kongresszusa, Balatonfüred, 1996.
2. Pintér, E., Szolcsányi, J., **Helyes, Zs.**: Szenzoros idegvégződések aktiválásával kiváltott gyulladásgátló hatás neurotranszmitter háttere
Magyar Idegtudományi Társaság III.. Kongresszusa, Balatonfüred, 1996.
3. **Helyes, Zs.**, Pintér, E., Szolcsányi, J.: Mustárolajjal kiváltott lokális neurogén gyulladás szisztémás gyulladásgátló hatása
POTE Tudományos Szakosztály Ülése, 1996.
4. **Helyes, Zs.**, Pintér, E., Szolcsányi, J.: A capsaicin-érzékeny érzőidegvégződések ortodrómos és antidrómos izgatásával kiváltott szisztémás gyulladásgátló hatás mechanizmusa
Magyar Idegtudományi Társaság IV. Kongresszusa, Gödöllő, 1997.
5. Pintér, E., **Helyes, Zs.**, Pethő, G., Szolcsányi, J.: A neuropeptid Y és a noradrenalin szerepe a bőr mikrocirkulációjának szimpatikus szabályozásában
Magyar Idegtudományi Társaság IV. Kongresszusa, Gödöllő, 1997.
6. **Helyes, Zs.**, Németh, J., Pintér, E., Szolcsányi, J.: Nociceptin hatása a gyulladáskeltő neuropeptidek felszabadulására in vivo és in vitro
I. Korányi Frigyes Tudományos Fórum, Budapest, 1997.; **I. díj**

7. **Oroszi, G., Helyes, Zs., Pintér, E., Szolcsányi, J.:** N. ischiadicus szenzoros rostjainak antidiromos ingerlésével kiváltott szisztémás gyulladásgátló hatás vizsgálata I. Korányi Frigyes Tudományos Fórum, Budapest, 1997.
8. **Helyes, Zs., Németh, J., Pintér, E., Szolcsányi, J.:** A nociceptin - egy új ópioid peptid - hatása a szenzoros idegvégződésekre Magyar Élettani Társaság LXII. Vándorgyűlése, Pécs, 1997.
9. **Pintér, E., Helyes, Zs., Oroszi, G., Szolcsányi, J.:** A szomatosztatin, mint potenciális gyulladásgátló neuromediátor Magyar Élettani Társaság LXII. Vándorgyűlése, Pécs, 1997.
10. **Oroszi, G., Helyes, Zs., Pintér, E., Szolcsányi, J.:** Antidiromos idegingerlés szisztémás hatása a plazma extravazációra és a mikrocirkulációs változásokra Magyar Élettani Társaság LXII. Vándorgyűlése, Pécs, 1997.
11. **Németh, J., Helyes Zs., Kocsy T., Pintér E., Szolcsányi J.:** Szomatosztatin, P-anyag és CGRP felszabadulásának mechanizmusa a kapszaicin-érzékeny idegvégződésekből Magyar Élettani Társaság LXII. Vándorgyűlése, Pécs, 1997.
12. **Oroszi, G., Helyes, Zs., Németh, J., Pintér, E., Szolcsányi J.:** Neurofarmakológiai bizonyítékok egy újonnan felfedezett szisztémás gyulladásgátló mechanizmusra Magyar Idegtudományi Társaság V. Konferenciája, Debrecen, 1998.
13. **Németh, J., Helyes, Zs., Oroszi, G., Kocsy, T., Pintér, E., Szolcsányi, J.:** Specifikus CGRP radioimmunoassay kifejlesztése neurofarmakológiai kutatásokra Magyar Idegtudományi Társaság V. Konferenciája, Debrecen, 1998.