

NEUROFARMAKOLÓGIA PROGRAM

PROGRAMVEZETŐ: DR. SZOLCSÁNYI JÁNOS

EGYETEMI TANÁR

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

DR. HELYES ZSUZSANNA

TÉMAVEZETŐ: DR. SZOLCSÁNYI JÁNOS

FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET

PÉCSI ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM, PÉCS

1998.

ELŐZMÉNYEK

A kapszaicin egyrost vizsgálatok alapján az érzőreceptorok meghatározott csoportját, a bőrben a C-polimodális nociceptorokat, a meleg és forró receptorokat, valamint a kemonociceptorokat izgatja és deszenzibilizálja. Lokális vagy szisztémás nagy dózisu 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 ma már általánosan használatos és a kapszaicin VR-1 receptor klónozása révén biokémiai kritérium alapján is bizonyítást nyert. A kapszaicinnal vagy egyéb stimulánssal izgatott szenzoros idegvégződés 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*). Szenzoros idegrostok antidiromos izgatásával arteriolás vazodilatáció, érpermeabilitás fokozódás, protein kiáramlás, majd később a sejtes elemek (hízósejtek, leukociták) aktivációja jön létre mind a bőrben, mind a vizszerális nyálkahártya és kötőszöveti területeken, amelyet neurogén gyulladásnak nevezünk. Patkány bőrét beidegző afferens rostok legalább 30 %-a képes neurogén gyulladást létrehozni.

A gerincvelői hátsó gyökerek antidiromos izgatásával kiváltott u.n. antidiromos vazodilatáció jelensége több, mint száz év óta ismert. Bayliss (1901), majd Bruce (1910) és Lewis (1927) axon reflex teóriája alapján a vaszkuláris válasz kiváltásában a szenzoros receptoroktól elkülönült, effektor funkcióra specializálódott axonkollaterális végződést tették felelőssé. Ezzel szemben újabb kísérleti eredmények a szenzoros axonterminális ugyanazon régiójának kettős (afferens és efferens) működését támasztják alá (Szolcsányi 1984, 1996). A kapszaicin-típusú irritánsok plazma extravazációt okozó hatását tetrodotoxin (TTX), illetve helyi érzéstelenítők nem gátolják, tehát axonvezetés nem szükséges a jelenséghez. *In vitro* kapszaicinnal (1-10 nM) kiváltott SP és CGRP felszabadulás is létrejön TTX jelenlétében vagy az N-típusú feszültségfüggő Ca^{2+} csatorna ω -conotoxin GVIA-val történő blokkolása után (Maggi 1995). Ennél alacsonyabb koncentrációknál azonban egyes adatok szerint (Lundberg 1996) TTX és ω -conotoxin jelenlétében a kapszaicin nem vált ki neuropeptid-felszabadulást, ami küszöbingerek alkalmazása esetén a klasszikus axon reflex teóriát látszik támogatni. Az ellentmondó adatok miatt szükséges volt megvizsgálni a feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatorna blokkoló hatását a nanomol koncentrációjú kapszaicinnal létrehozott SP-, CGRP- és szomatostatinfelszabadulás *in vitro* (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

gyökerek antidiromos ingerlésével kiváltott neurogén gyulladás gátolja egy később létrehozott gyulladás kialakulását a szervezet távolabbi pontján (Pintér és Szolcsányi 1988, 1996). A szenzoros idegvégzödések ilyen módon történő izgatása kizárja az efferens rostok aktivációját és a célszerv szövetein létrejövő direkt kémiai hatást. Az én feladatom az volt, hogy a szenzoros idegvégzödéseknek 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 peptidok 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 szomatostatin és stabil, szintetikus analógjai (IV. fejezet), valamint egy újonnan felfedezett ópioid peptid, a nociceptin, (V. fejezet) gyulladásgátló hatásának vizsgálatát végeztem. A SP, a CGRP és a szomatostatin 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 alapjául szolgáló kutatási eredményeim didaktikailag 5 fő fejezetbe sorolhatók:

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

(Előzetes adatok: előadáskivonat - Szolcsányi, J., Németh, J., Oroszi, G., Helyes, Zs., Pintér, E., *Br. J. Pharmacol.* 124, p. 8P, 1998. és a teljes kísérletsorozat eredményei: közlésre előkészített kézirat)

BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A kapszaicin-érzékeny afferens neuronok perifériás végzödései kettős „szenzoros-efferens” funkcióval rendelkeznek. Ezen idegvégzödések kémiai vagy elektromos ingerlése szenzoros neuropeptidok (tachykininek, CGRP, szomatostatin) felszabadulását eredményezi, amelyek mediátor szerepe testszerte kimutatható (szív, erek, légutak, gasztrointesztinális és genitourinális traktus, bőr, szem, ízületek, dura mater, nyirokszervek). A kémiai ingeranyagok közül a kapszaicin és analógja, a resiniferatoxin (RTX), előbb felszabadítja, majd depletálja ezeket a peptidokat. Irodalmi adatok azt bizonyítják, hogy e peptidfelszabadulás Ca^{2+} függő, de TTX és ω -conotoxin rezisztens, amely arra utal, hogy axonális vezetés, illetve N-típusú Ca^{2+} csatornák részvétele nélkül jön

létre. Ezen *in vitro* vizsgálatokat eddig szinte kivétel nélkül 10^{-6} - 10^{-5} M kapszaicin oldattal végezték, amely koncentrációtartományban a szer már neurotoxikus rostdegenerációt is kiválthat, így a modulációs hatások hiánya még nem tekinthető bizonyítéknak. Ezt a lehetőséget látszott támogatni az a megfigyelés, hogy tengerimalac perfundált tüdő preparátumon a TTX nem gátolta a 10^{-8} - 10^{-7} M kapszaicinnal kiváltott CGRP-felszabadulást (Lundberg 1996). 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* 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.

MÓDSZEREK

Kísérleteinkben nőtény Wistar patkányokat pentobarbital (Nembutal, 40 mg/kg i.p.) altatásban elvéreztettünk. Tracheáikat kimetszettük és szervfürdőnként (1.8 ml) 2-2 szövet 37 °C-os oxigenizált (95 % O_2 és 5 % CO_2) Krebs oldattal 60 percen át perfundáltuk (1 ml/perc). Az átáramlás leállítását után a kamrákban lévő oldatot 8 percenként 3-szor lecsereélve frakciókat gyűjtöttünk (ingerlés előtti - ingerlés utáni).

A peptid felszabadulását kiváltó elektromos téringerlést 40 V, 0.1 ms, 2 Hz paraméterekkel a második periódus 5. percétől 50 másodpercen keresztül végeztük. 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 légszűrődarabok nedves súlyát lemértük. A frakciók SP, CGRP és szomatosztatin koncentrációit intézetünkben kifejlesztett specifikus RIA módszerek segítségével határoztuk meg, melyek érzékenysége a szomatosztatin és a CGRP esetében 1 fmol/cső, a SP-nél 2 fmol/cső. A peptid mennyiségét fmol/mg egységben, nedves szövetsúlyra vonatkoztatva fejeztük ki. A második és a harmadik frakcióbeli mennyiségekből kivontuk az első frakcióbelit 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 téringerlés 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 téringerléssel kiváltott peptidfelszabaduláshoz axonális vezetés szükséges.

2. A kapszaicin (10^{-8} M) fokozta a peptid 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 küszöb koncentrációjú kapszaicin 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. Mivel a nagy dózisú 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 alkalmazásával válna lehetővé.

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

(Pintér, E., Szolcsányi, J., Helyes, Zs., *Neurobiology* 4, pp. 233-235, 1996. és Szolcsányi, J., Pintér, E., Helyes, Zs., Oroszi, G., Németh J., *Br. J. Pharmacol.* 124, közlésre elfogadva, 1998.)

BEVEZETÉS

Intézetünkben dr. Pintér Erika figyelte meg néhány éve azt az érdekes jelenséget, hogy a gerincvelői hátsó gyökök antidrómos 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 gyulladós reakció* kifejlődését a konjunktívában, illetve az ellenoldali lábőrben (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 antidrómosan 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. Az ópoid peptidok és a galanin, amelyeket ugyancsak kimutattak ezen idegvégzésekben, szintén képesek gátolni a gyulladós 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 neveltek. Altatáshoz 40 mg/kg i.p. pentobarbital-t (Nembutal) használtunk.

Ortodrómos ingerléssel kiváltott neurogén gyulladás vizsgálata:

Mindkét 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 be-cseppentésével 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 gyulladás kiváltása 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.

Nem neurogén gyulladás kiváltása és mérése:

Ezeket a kísérleteket 5 nappal a n. ischiadicus és a n. saphenus átvágása után végeztük a hátsó végtagokon. A lábduzzadást 100 µl 5 %-os dextrans oldat szubplantáris adásával váltottuk ki, amely a hízósejtekből szabadít fel gyulladáskeltő anyagokat (hisztamin, bradikinin, leukotriének, prosztaglandinok, vérlemezke aktiváló faktor). A lábak térfogatát Ugo-Basile típusú pletizmómméterrel mértük a s.c. dextrans injekció előtt (kontroll), majd 10, 20, 30 perccel utána. Az ödéma nagyságát a kontroll érték %-ában fejeztük ki.

Adrenalektómia:

A mellékvesekéregsteroidok szerepének vizsgálatára laterális abdominális metszésből a mellékveséket 30 perccel a mustárolaj-kenést megelőzően eltávolítottuk, majd a sebet zártuk. A kontroll, ál-operált állatokban szintén elvégeztük a bemetésztést, 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 Trasylolt tartalmazó, jégben lehűtött üvegcsővekbe előkezeletlen, valamint 280 mg/kg s.c. cysteaminnal 4 órával az ingerlés előtt előkezelt állatokból. A cysteamin szulfhidril vegyület, amely szelektíven immunológiailag és funkcionálisan inaktívra teszi a szomatosztatint, 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 mustárolajat. A 4 °C-on történő centrifugálást követően a peptidet abszolút alkohol 3-szoros volume-

nével extraháltuk a plazmából. A precipitáció és a második centrifugálás után a mintákat nitrogén alatt beszárítottuk, majd a RIA mérések előtt pufferben oldottuk vissza.

Statisztikai 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 (*primér 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 gátlódott, nem különbözött szignifikánsan az első csoportban tapasztalt primér reakciótól. Amennyiben a mustárolajjal egyidőben 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 kapszaicin cseppentés feltehetően az irritáció kicsiny területe miatt önmagában nem csökkentette szignifikánsan az ellenoldali szemben a festékiáramlást.)
 3. Ha a primér neurogén gyulladást az akutan 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 dextrán szubplantáris injekciójával kiváltott ödémát is. A gátlás 58.3 %, 47.4 % és 48.2 % volt 10, 20 és 30 perccel a dextrán injekciót követően a kontroll csoporthoz viszonyítva, ahol paraffinolajat használtunk mustárolaj helyett.

Ez arra utal, hogy a mustárolajjal kiváltott neurogén gyulladás gátolja a nem neurogén, tisztán kémiai gyulladást is. A feltételezett gátló neuromediátorok tehát biztosan van közvetlen vaszkuláris illetve immunsejtekre (pl. hiszócsejtekre) 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 dextránnal kiváltott nem-neurogén plazma extravazáció és szöveti ödéma nem gátolta az ellenoldali, akutan denervált végtagon a 10 perccel később mustárolajjal létrehozott festék akkumulációt. A szekunder reakció intenzitása hasonló volt a kontroll csoportéhoz, ahol a dextrán helyett fiziológiás NaCl oldatot alkalmaztunk. Mustárolaj krónikus denerváció után nem hozott létre szignifikáns gyulladást 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 mustárolajat akutan denervált lábba kentük és az adrenalektómia nem gátolta a létrejött gyulladásgátló hatást, a jelenségben a szimpatikus rostok reflex aktivációja és a mellékveséből felszabaduló glükokortikoidok - 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 végződéseiből felszabaduló mediátorok teherők 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, a szomatosztatin és a galanin 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-indukált neurogén gyulladásgátló hatását kivédte, ha a szekunder reakció is neurogén volt és a gátlást 23.4 %-kal csökkentette a dextránnal kiváltott nem neurogén második gyulladás esetén.
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.

Mivel irodalmi adatok alapján a szomatosztatin 1-es receptor altípusa (R1) és a µ-ópioid receptor aminósav szekvenciája 40 %-ban hasonló, továbbá *in vitro* receptorkötődési vizsgálat eredményei is arra utalnak, hogy a szomatosztatin és

analogjai a naloxonnál erősebb ópioid receptor affinitást mutatnak. A naloxon gátló hatása tehát egyaránt szolgálhat bizonyítékul az opioid peptidok 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 megszünt, 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 akutan 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 a 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 ópioid peptidok 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

(Szolcsányi, J., Helyes, Zs., Oroszi, G., Németh, J., Pintér, E., *Br. J. Pharmacol.* 123, pp. 936-942, 1998.)

A vizsgálat sorozat célja a hátsó gyökér ingerlésnél technikailag egyszerűbb és gyorsabb kísérleti elrendezés kidolgozása volt, amelyben lehetővé válik a szenzoros rostok antidrómos 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 szomatosztatin mediátor szerepére vonatkozóan is.

MÓDSZEREK

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

A n. ischiadicus izgatása:

A n. ischiadicust a csípő tájékon átvágtuk és a műtéti terület felett kialakított mendencét testmeleg paraffinolajjal töltöttük fel. A perifériás idegcsonkot 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 a neuromuszkuláris transzmisszió gátlására pipecuronium bromidot (200 mg/kg i.v.) használtunk. Az egyik v. jugulárisba kanült vezetünk, 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 váltottuk ki, a kísérlet előtt 30 perccel átvágtuk a n. ischiadicust és a n. saphenust, hogy a nociceptív reflexek hatását elkerüljük.

A légső és a nyelőső nyálkahártyájában, valamint a mediasztinális kötőszövetben a plazma extravazációt a n. vagus perifériás csonkjának 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 lábhati bőrt, illetve a n. vagus által beidegzett disztális 2/3-nyi nyelősőszakaszt, a nagyerek körüli mediasztinális kötőszövetet és a légsővet távolítottuk el. A térdízületi gyulladás vizsgálatára az intenzív kékülést mutató ízületi tokot, kereszt- és oldalszalagokat és a duzzadt szinovialis kötőszövetet metszettük 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 kanülon 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 stimulációja 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 carrageeninnel 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 carrageeninnel 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.

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 légcsőben 32.8 %-kal, a mediasztinális kötőszövetben 37.6 %-kal gátolta a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A gyulladásgátló hatás tehát nem csak exteroceptív (bőr), hanem interoceptív területeken (izület, vizsцерális 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. Szomatosztatin injekciónak (10 µg/kg i.v.) ugyan csak nem volt hatása az antidrómos vazodilatációra.

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

6. Nem jött létre a n. ischiadicus antidrómos izgatásával kiváltott gátló hatás az ellenoldali talpbőrben 5 perccel később azonos módon előidézett neurogén gyulladásra, ha a patkányokat poliklonális szomatosztatin antiszérummal (0.5 ml/patkány i.v. 1 órával korábban) vagy szomatosztatin depléciót okozó cysteaminnal (280 mg/kg s.c. 4 órával a kísérlet előtt) kezeltünk elő.

7. Szomatosztatin antiszérum előkezelés után a n. ischiadicus szenzoros rostjainak antidrómos izgatása a n. vagus ingerlésével kiváltott plazma extravazációt sem gátolta.

8. A plazma szomatosztatin 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 szomatosztatin plazmaszintje még mindig 142 %-kal magasabb volt. Cysteamin előkezelés megakadályozta a stimuláció hatására bekövetkező szomatosztatin szint emelkedést.

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

Alap kutatási eredményeink gyakorlati hasznosíthatósága:

Az értekezésben ismertetett új alap kutatási eredményeknek terápiás konzekvenciája lehet, hiszen a neurogén gyulladásnak több gyakori betegség (elsősorban légúti és ízületi gyulladással járó folyamatok) patomechanizmusában kitüntetett szerepet tulajdonítanak. Jelenleg nem rendelkezünk 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 azonosítása egy új típusú, hatékony gyulladáscsökkentő szer kifejlesztéséhez adhat kiindulási alapot. Ilyen irányú további kutatásainkat a következő két fejezet ismerteti:

IV/1. SZINTETIKUS SZOMATOSZTATIN ANALÓGOK GYULLADÁS-GÁTLÓ ÉS ANTINOCICEPTÍV HATÁSA

(Helyes, Zs., Pintér, E., Szolcsányi, J., Horváth, J., *Neurobiology* 4, pp.115-117, 1996.; szabadalmi beadvány, 1998. és a teljes kísérletsorozat 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. Ezen hatások 5 receptor altípuson keresztül valósulnak meg, amelyek a G-proteinhez kapcsolódó receptorcsalád tagjai. A natív szomatosztatin terápiás alkalmazhatóságát jelentősen gátolja széles hatásspektruma és rövid (3 perces) felezési ideje. Szelektíven ható analógok jelentősen megkönnyítenék az egyes körképek 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 és a nocicepciót. Az előzőekben vázolt kísérleti eredményeink alapján a peptid felszabadul és 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 kísérletsorozatunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a szomatosztatin, az octreotide (Sandostatin), 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 (1)

Neurogén gyulladást 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 lsd. az előző fejezetekben). Ezzel egyidőben az előkezelt állatok szomatosztatint vagy szintetikus szomatosztatin 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 pletizmométerrel mértük a dextrán által kiváltott lábduzzadást, amelyet a kiindulási volumenhez viszonyított %-os növekedés formájában adtunk meg.

Kemonociceptív reflexek vizsgálata:

Uretán narkózisban (1 g/kg i.p.) kontroll patkányokban kemonociceptív ingerek hatására (az intakt hátsó végtagok 1 %-os mustárolajjal történő ecsetelése illetve 100 µg/ml-es kapszaicoidat szembe cseppentése) jelentős szisztémás vérnyomásemelkedés (presszor válasz), szívfrekvencianövekedés és légzésfokozódás jött létre. 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 szomatosztatin szintetikus analógjait 1 csepp ecetsav hozzáadásával fiziológiás NaCl-ban oldottuk, az octreotide ampullás kiszerezésben állt rendelkezésünkre. Statisztikai értékeléshez Mann-Whitney tesztet használtunk.

EREDMÉNYEK (1)

1. A szomatosztatin 24.85 %-kal gátolta a mustárolajjal indukált neurogén plazma kiáramlást és 30.96 %-kal a dextránnal kiváltott nem neurogén ödémát (dextrán 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 gyulladásos reakcióban a dextrán 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 (Sandostatin), amelyet gyógyszerként sikerrel alkalmaznak hormonszekréciók gátlására és endokrin tumorok kezelésére, nem befolyásolta sem a neurogén, sem a nem neurogén gyulladást.
4. Az antinociceptív hatás vizsgálatok *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 percnkénti légzésszám 61-gyel (mustárolaj) illetve 48-cal (kapszaicin) növekedett. Ezen efferens reflexválaszokat a natív szomatosztatin, 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 legerősebbnek és az octreotide antinociceptív hatást sem mutatott. A TT-232 előkezelés a mustárolaj hatására történő vérnyomásemelkedést 5 (mustárolaj) illetve 13 (kapszaicin) Hgmm-re, a szívfrekvenciafokozódást 14-re (mustárolaj) illetve 23-ra (kapszaicin), a légzésszámnövekedést 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 szomatosztatin és analógiainak 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. Az általunk vizsgált hatások tehát valószínűleg az irodalmi adatok alapján külön csoportba sorolható R1 és/vagy az R4 receptor(ko)n keresztül valósulnak meg, és a különböző szubsztitúciókkal előállított analógok ezekhez a szomatosztatinnál nagyobb affinitást mutatnak. A tumorgátló hatás is feltehetőleg ezen receptorokhoz kapcsolható, hiszen a kísérleteinkben leghatékonyabbnak bizonyult heptapeptid TT- 232 a tumorsejt proliferációt is a legerősebben gátolta. 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:

IV/2. A TT-232 SZOMATOSZTATIN ANALÓGGAL KIVÁLTOTT GYULLADÁSGÁTLÓ HATÁS ELEMZÉSE

CÉLKITŰZÉSEK (2)

Az eddigi eredmények alapján jelen kísérleteinkben a következőket vizsgáltuk:

1. A TT-232 különböző dózisainak (i.p. és i.v.) gátló hatása mustárolajjal kiváltott neurogén, valamint krónikus denerváció után dextranszal illetve bradykininnel indukált nem neurogén gyulladási 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 téringlerléssel illetve kapszaicinnel kiváltott SP, CGRP és szomatosztatinfelszabadulásra.

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 pletizmómméterrel 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* felszabadulását elektromos téringlerléssel (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 fiziológiás 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) μ g/kg, ID_{50} (i.v.) = 4.32 (2.41-8.84) μ g/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 μ g/kg i.v.) gátló hatása a neurogén gyulladásra 2 órán át tartott.
3. A TT-232 (1, 2.5, 5 μ g/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) μ g/kg. A dextran ödémát 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 μ g/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 elektromos téringlerlés 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) csökken-

tette. A bazális, stimuláció nélküli peptidfelszabadulást a TT-232 nem befolyásolta.

KÖVETKEZTETÉSEK (2)

A TT-232, egy stabil, ciklikus, szintetikus heptapeptid szomatosztatin 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), de jelenleg egyetlen olyan gyógyszer sincs, amely a neurogén gyulladáshoz vezető 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 (*rhinitis, bronchitis, asthma bronchiale*), az ízület gyulladások (elsősorban a *rheumatoid arthritis*), a *migrén*, az *allergiás conjunctivitis*, az *urticaria* és a *psoriasis*. A szteroidok csak olyan nagy dóziban képesek gátolni a neurogén gyulladást, melyben a számos mellékhatás veszélye miatt nem lehet gyakorlati alkalmazással számolni. Bár a natív szomatosztatin gátolja a kísérletesen kiváltott neurogén gyulladást, széles hatásspektuma és rövid felezési ideje miatt terápiásan nem jöhet számításba. A TT-232 ezzel szemben sokkal hatékonyabb molekula és *in vivo* körülmények között lebomlása lassabb, ezáltal hatása tartósabb. Szelektívebb is, mert endokrin hatásokról 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 erekben és/vagy a gyulladáshoz vezető sejteken - elsősorban hízósejteken - is gátlást okoz.

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

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

(Helyes, Zs., Németh, J., Pintér, E., Szolcsányi, J., *Br. J. Pharmacol.* 121, pp. 613-615, 1997. és Németh, J., Helyes, Zs., Oroszi, G., Than, M., Pintér, E., Szolcsányi, J., *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 és a neurogén gyulladást. Valószínűleg a mediátorfelszabadulás gátlásán alapul gerincvelői szinten az analgetikus hatásuk is.

Az utóbbi években két munkacsoport egymástól függetlenül felfedezett egy új, biokémiai az ópioidok közé sorolható 17 aminosavból álló neuropeptidet. Egyikük (Meunier és mtsai. 1995) **nociceptin** névvel illette, mert intracerebrovaszkulárisan beadva - a morfinnal és az enkefalinokkal ellentétben - egér tail-flick tesztben 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 ópioid 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 gátolja 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 kísérletsorozatunkban a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Gátolja-e a szisztémásan (i.p.) adott nociceptin az ortodróm és antidróm neurogén, valamint a nem neurogén gyulladáshoz vezető reakciókat *in vivo*?
2. Befolyásolja-e a nociceptin a mast cell degranulating peptide (MCDP), az 5-hydroxytryptamin (5-HT) illetve a hisztamin által kiváltott 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 (szomatosztatin) 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 csomójának 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 kísérletsorozatban 50 µl-nyi térfogatban 0.25 µg bradykinint, a másikkban MCDP-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 kimetszett 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 átáramlás leállítását után a szervfűrdőben lévő oldatot 3-szor 5 (elektromos téringelés esetén) illetve 8 (kémiai stimulációnál) percnként lecseréltük (ingerlés előtti - ingerelt - ingerlés utáni frakciók).

A peptidok felszabadulását kiváltó *elektromos téringelés* a második 5 perces periódus elején történt 50 másodpercig 40 V, 0.1 ms, 2 Hz paraméterekkel 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 légsődarabokból 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 neuropeptidok 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 peptidok 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 gyulladási 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 fejt ki. Ezt az elképzelést megerősítik az izolált légsővel kapott *in vitro* adataink, amelyekkel elsőként bizonyítottuk biokémiai mérésekkel, hogy a nociceptin gátolja a szenzoros neuropeptidok felszabadulását az idegvégződésekből. 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. Ezen felül a nociceptin csökkenti a gyulladásgátló hatású szomatosztatin felszabadulását is, amelyet kapszaicinnal 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. 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 hízósejtmembránban lévő kation csatornákon keresztül valósul meg. A hízósejtek degranulációja, exocitózisa 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. A MCDP egy 22 aminosavból álló, erősen kationos peptid, amely a hízósejteket a Ca^{2+} csatornák megnyitására és a K^+ csatornák blokkolásán keresztül aktiválja. Irodalmi adatok utalnak arra, hogy a nociceptin fokozza a K^+ áramot patkány központi idegrendszerében és a morfinnal ellentétben gátolja neuronokban az alacsony feszültségű T-típusú Ca^{2+} csatornák működését. A nociceptin valószínűleg ezeken a csatornákon hatva gátolja mind a hízósejtek degranulációját, mind az idegvégződések-ből történő neurotranszmitter-felszabadulást.

Ezen újonnan felfedezett ópioid peptiddel kapcsolatos eredményeinknek gyakorlati jelentősége is lehet. Szintetikus nociceptin analógok, vagyis ORL_1 receptor agonisták előállítására új farmakológiai profilú, a hízósejteken és a nociceptív idegvégződésekben egyaránt gátló hatással rendelkező gyulladásgátló szer kifejlesztésére nyújthat lehetőséget.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

I. EREDETI KÖZLEMÉNYEK:

A./ Külföldi folyóiratok:

1. Pintér, E., Helyes, Zs., Pethő, 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., Érchegeyi 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**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. Szolcsányi, J., Németh, G., Oroszi, G., **Helyes, Zs.**, Pintér, E.: 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. Oroszi, G., Németh, J., Pintér, E., Kocsy, T., **Helyes, Zs.**, Szolcsányi, J.: Mechanism of calcitonin gene-related peptide (CGRP) release from sensory nerve terminals in isolated trachea of the rat
The Third International Symposium on Calcitonin 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 háttére
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 érzőidegvégződés 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 neuropeptidok 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 antidrómos 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.: Antidrómos 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 idegvégzésekben
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.