

**SZOMATOSZTATIN ÉS PACAP HATÁSAINAK  
VIZSGÁLATA GYULLADÁS, FÁJDALOM ÉS  
TRIGEMINOVASZKULÁRIS AKTIVÁCIÓ MODELLJEIBEN**

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**



**Dr. Markovics Adrienn**

**Gyógyszertudományok Doktori Iskola  
Neurofarmakológia Program**

**Doktori iskola vezető: Dr. Barthó Loránd**

**Programvezető: Dr. Pintér Erika**

**Témavezető: Dr. Helyes Zsuzsanna**

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET**

2012

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
Általános bevezetés .....	5
<b>1. fejezet: A szomatosztatin sst<sub>4</sub> receptor szerepének vizsgálata akut és krónikus fájdalom-modellekben.....</b>	<b>11</b>
Irodalmi háttér, előzmények.....	11
Célkitűzések .....	20
Kísérleti modellek és vizsgálati módszerek .....	21
Eredmények.....	27
Megbeszélés, következtetések.....	32
<b>2. fejezet: A szomatosztatin és kortisztatin hatásainak összehasonlítása .....</b>	<b>34</b>
Irodalmi háttér, előzmények.....	34
Célkitűzések .....	36
Kísérleti modellek és vizsgálati módszerek .....	36
Eredmények.....	42
Megbeszélés, következtetések.....	49
<b>3. fejezet: A PACAP trigeminovaszkuláris aktivációban betöltött szerepe .....</b>	<b>53</b>
Irodalmi háttér, előzmények.....	53
Célkitűzések .....	58
Kísérleti modellek és vizsgálati módszerek .....	58
Eredmények.....	64
Megbeszélés, következtetések.....	72
<b>Összefoglalás .....</b>	<b>76</b>
<b>Irodalomjegyzék .....</b>	<b>77</b>
<b>Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>98</b>
<b>Publikációs lista .....</b>	<b>99</b>

## Rövidítések jegyzéke

**ANOVA:** analysis of variance/ variancia-analízis

**cAMP:** ciklikus adenzin-monofoszfát

**CBA:** cytometric bead array/ mikrogöngyhöz kötött, immunreakción alapuló analitikai eljárás

**CFA:** complete Freund's adjuvant/ komplett Freund adjuváns

**CGRP:** calcitonin gene-related peptide/ kalcitonin gén-rokon peptid

**CHO:** chinese hamster ovary/ kínai hörcsög petefészek

**CST:** kortisztatin

**DAB:** diamino-benzidin

**ELISA:** enzyme-linked immunosorbent assay/ enzimhez kötött immunoszorbens eljárás

**FWKT:** Phe-Trp-Lys-Thr aminosav régió

**GDP:** guanozin-difoszfát

**GH:** growth hormone/ növekedési hormon

**GHRH:** growth hormone releasing hormone/ növekedési hormon felszabadulást serkentő hormon

**GHS-R1a:** GH szekretagóg receptor 1a

**GTP:** guanozin-trifoszfát

**GTP $\gamma$ S:** <sup>35</sup>S jelölt guanozin-trifoszfát

**i.c.v.:** intracerebroventrikuláris

**IFN $\gamma$ :** interferon- $\gamma$

**IL:** interleukin

**IL-1Ra:** interleukin-1 receptor antagonist

**iNOS:** indukálható nitrogén-oxid szintáz

**i.p.:** intraperitoneális

**i.pl.:** intraplantáris

**i.v.:** intravénás

**LPS:** lipopoliszacharid

**n.:** nervus

**NKA:** neurokinin A

**NKB:** neurokinin B

**NK sejtek:** natural killer sejtek/ természetes ölüsejtek

**NMDA:** N-metil-D-aszpartát

**nNOS:** neurális nitrogén-oxid szintáz

**NO:** nitrogén-oxid

**NTG:** nitroglicerin

**PAC1:** PACAP specifikus receptora

**PACAP<sup>+/+</sup>:** PACAP génhiányos egerek vad típusú megfelelője

**PACAP<sup>-/-</sup>:** PACAP génhiányos/ PACAP knockout

**PACAP:** pituitary adenylate cyclase activating polypeptide/ hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid

**PCR:** polymerase chain reaction/ polimeráz lánreakció

**PFA:** paraformaldehid

**PMSF:** phenylmethylsulphonyl fluoride/ fenil-metil-szulfonil-fluorid

**PPE:** plazma protein extravazáció

**RA:** reumatoid artritisz

**RT-PCR:** reverse transcriptase PCR/ reverz transzkriptáz PCR

**SP:** substance P/ P-anyag

**SRIF:** somatotropine release inhibiting factor/ szomatotropin felszabadulást gátló faktor

**SST:** szomatosztatin

**sst<sub>4</sub><sup>+/+</sup>:** sst<sub>4</sub> receptor génhiányos egerek vad típusú megfelelője

**sst<sub>4</sub><sup>-/-</sup>:** sst<sub>4</sub> génhiányos/ sst<sub>4</sub> knockout

**TNC:** trigeminus nucleus caudalis/ nucleus caudalis nervi trigemini

**TNF $\alpha$ :** tumor nekrosis faktor  $\alpha$

**TRG:** trigeminus ganglion/ ganglion trigemini

**TRPA1:** Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1

**TRPV1:** Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1

**TSH:** thyreoid stimulating hormone/ pajzsmirigy stimuláló hormon

**VIP:** vasoaktív intesztinális polipeptid

**VPAC1/VPAC2:** a VIP és a PACAP közös receptorai

# Általános bevezetés

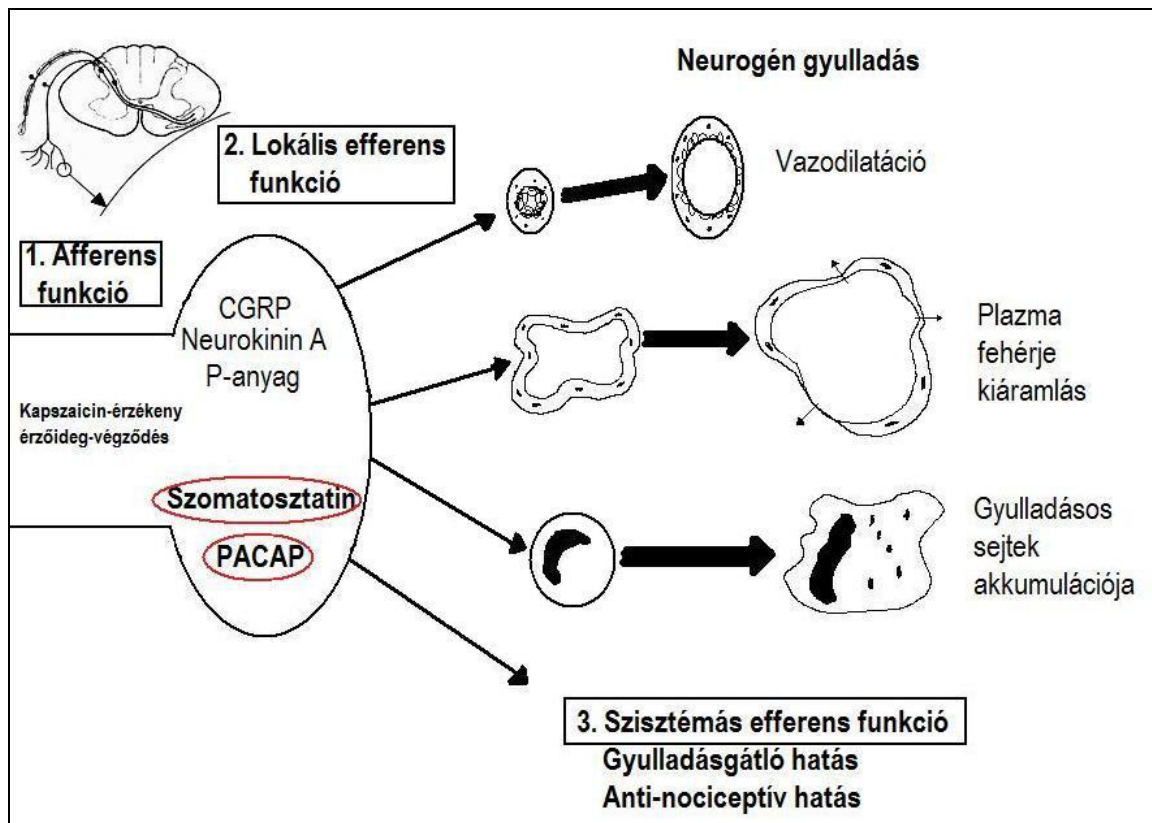
## A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés és hármas funkciójuk

A klasszikus idegszabályozási elmélet szerint az érzőidegek a szenzoros stimulusokat és a fájdalmat közvetítik a test különféle részeiről (bőr, ízületek, belső szervek) a központi idegrendszer felé. A perifériás idegrendszer másik csoportja a befutó ingerekkel kiváltott reflexek útján efferens, azaz mozgató vagy vegetatív működéseket lát el. A kapszaicin-érzékeny, azaz a kapszaicin specifikus Transiens Receptor Potenciál Vanillod 1 (TRPV1) receptorát expresszáló érző neuronok a vékony mielinhüvelyes (A $\delta$ -) és a mielinhüvely nélküli (C-) rostokkal rendelkező neuronok 50-70%-át teszik ki (Holzer 1991). Ezek perifériás végződésai azonban nemcsak a klasszikus afferens működéssel rendelkeznek, hanem egyben efferens funkciót is ellátnak. Közvetlenül, reflex nélkül, olyan neuropeptidok szabadulnak fel belőlük, amelyek a beidegzési területen *neurogén gyulladást* folyamatokat indítanak el. A kapszaicin-érzékeny érzőidegekből a gyulladáskeltő neuropeptideken kívül gátló hatású anyagok is felszabadulnak, a keringésbe kerülnek és a test távolabbi pontjain jelentősen csökkentik a neurogén gyulladást.

A kapszaicinre érzékeny érzőideg-végzések **hármas funkcióval** rendelkeznek: afferens, valamint lokális és szisztémás efferens működéseket közvetítenek (**1. ábra**). A **klasszikus afferens működés** során a kapszaicinnal vagy egyéb stimulánssal izgatott szenzoros idegvégzések a központi idegrendszer felé közvetítenek idegaktivitást, ennek következtében alakul ki a nocicepció, melynek szubjektív megélése a fájdalom. Emellett az aktivált perifériás idegvégződésből neurotranszmitterek szabadulnak fel, amelyek vazodilatációt és plazmafehérje kiáramlást okoznak. Ilyen mediátor a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), mely elsősorban értágulatot vált ki, illetve a tachikininnek, például a P-anyag (SP) vagy a neurokinin A (NKA), melyek a plazmafehérje-kiáramlásért felelősek és aktiválják a gyulladáshoz vezető sejteket. Ez adja a kapszaicin-érzékeny afferensek **lokális efferens funkcióját** (Szolcsányi 1984; Maggi és Meli 1988), aminek következtében kialakul a neurogén gyulladás (Szolcsányi 1988; Helyes és mtsai. 2003). Kutatócsoportunk korábban bizonyította, hogy ugyanezen aktivált szenzoros idegvégzések közül az előzőekben felsorolt gyulladáskeltő neuropeptideken kívül szomatosztatin (SST) is felszabadul, amely a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatásokkal rendelkezik. Ez az érzőideg-végzések harmadik, **szisztémás efferens funkciója** (Szolcsányi és mtsai. 1998a, b; Helyes

és mtsai. 2000, 2004), amit a szomatosztatin endokrin és parakrin hatásainak mintájára Szolcsányi professzor szenzokrin működésnek nevezett el (Szolcsányi és mtsai. 2004).

Dolgozatomban a felszabaduló gyulladásgátló hatású neuropeptidek közül a **szomatosztatin** vizsgálatára fókuszáltunk. Mivel a csoport korábbi eredményei alapján a kapszaicin-érzékeny idegvégződésekből felszabaduló hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (**PACAP**) a periférián egyértelműen fájdalom- és gyulladáscsökkentő, a központi idegrendszerben azonban aktiváló hatásokat közvetít, különösen fontosnak találtuk e peptid hatásainak vizsgálatát a migrénben szerepet játszó trigeminovaszkuláris aktivációban.



1. ábra: A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések hármas funkciója

### **A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből felszabaduló szenzoros neuropeptidek**

Az aktivált kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből felszabaduló **gyulladáskeltő hatású neuropeptidek** egyik csoportját a tachikininek alkotják. Ide sorolható a SP, valamint az NKA és NKB. Hatásaikat három G-proteinhez kapcsolt tachikinin receptoron keresztül fejtik ki, amelyeket NK1, NK2 és NK3 receptornak nevezünk. A SP legnagyobb affinitással az NK1 receptorokhoz kötődik, ezek aktivációjával érpermeabilitás-fokozódást és plazmafehérje-extravazációt vált ki, stimulálja a limfociták proliferációját, citokinek termelését, a hízósejtek aktivációját, a T-sejtek kemotaxisát, valamint a neutrofil granulociták akkumulációját (Grant 2002). Az NKA az NK2 receptorokhoz mutatja a legnagyobb affinitást, a SP-hez hasonlóan erőteljes plazmafehérje-kiáramlást idéz elő, továbbá simaizom-kontrakciót vált ki és stimulálja a gyulladást (neutrofil granulocitákat, limfocitákat, makrofágokat) (de Swert és Joos 2006). Hatásait elsősorban a periférián, valamint a központi idegrendszerben fejtik ki. Az NKB-t kötő NK3 receptor főként a központi idegrendszerben található, de jelen van a perifériás idegvégződéseken is (Frossard és Advenier 1991; Massi és mtsai. 2000), e mechanizmusoknak azonban kisebb jelentőséget tulajdonítanak a neurogén gyulladást előidéző folyamatokban. A 37 aminosavból álló CGRP biológiai hatásait a CGRP1 és CGRP2 receptorokon fejtik ki (van Rossum és mtsai. 1997). Erős vazodilatátor hatással rendelkezik, amely elsősorban a CGRP1 receptoron keresztül valósul meg. Érpermeabilitást fokozó hatását nem közvetlenül, hanem a SP hatásának potencírozásával fejtik ki (Cao és mtsai. 2000). Mindemellett a CGRP komplex immunmodulátor funkciókkal is rendelkezik.

**Fájdalom- és gyulladásgátló hatású neuropeptidek** a szomatosztatin és a PACAP, melyek részletes bemutatására az értekezés későbbi részében kerül sor. Ide tartoznak még az opioid peptidek is, melyek gátolják az immunsejtek proliferációját, a kemotaxisát, a szuperoxid- és citokintermelést, valamint a hízósejtek degranulációját (Bryant és mtsai. 1990). A gyulladást előidéző fájdalom hatékony endogén szabályozói az immunsejtekből felszabaduló opioid peptidek, amelyek a szenzoros végződéseken található  $\mu$  receptorokat aktiválják (Schafer és mtsai. 1996; Machelska és mtsai. 2002). Emellett  $\kappa$  receptor agonista endogén opioid peptidek, mint a dinorfin A és a hemorfin-7 perifériás gyulladásgátló hatásait is leírták (Sanderson és mtsai. 1998). Az endomorfinek 4 aminosavból álló endogén opioid peptidek. Különlegességük a többi opioid peptiddel összehasonlítva az eltérő kémiai szerkezetük és a  $\mu$  receptorok iránti nagyfokú szelektivitásuk (Zadina és mtsai. 1997; Prewloczki és Prewloczka 2001). Az irodalmi adatok többsége az endomorfinek analgetikus, elsősorban központi idegrendszeri

hatásaira fókuszál, néhány adat azonban gyulladáscsökkentő (Jessop 2006) és vazodilatátor hatásokról is beszámol (Horváth 2000).

### **Nocicepció, hiperalgéria, allodínia, fájdalom**

A Nemzetközi Fájdalom Társaság meghatározása szerint a fájdalom olyan pszichofiziológiai jelenség, szubjektív érzéskvalitás, amelynek két jól definiálható komponense különíthető el. Neurobiológiai eleme a **nocicepció** (a fájdalmas stimulus percepciója, szenzoros tapasztalat), ami állatkísérletesen is vizsgálható, míg az affektív komponens (a **fájdalom** emocionális megélése) megítélésére csak emberi vizsgálatok alkalmasak. A különféle állatkísérletes modellekben vizsgálható nocicepció mechanikai (érintés, nyomás), termális (hideg vagy meleg hőmérséklet) vagy kémiai (kapszaicin, formalin, ecetsav, stb.) ingerek hatására keletkezik, és a nocifenzív (fájdalomelhárító) reakciók küszöbértéke vagy latenciája mérhető. Az alapvetően nem fájdalmas stimulus hatására kialakuló érzékenység-fokozódást **allodíniának**, míg az enyhe fájdalmat kiváltó inger hatására fokozódó fájdalomérzetet **hiperalgériának** nevezzük (Merskey és Bogduk 1994).

### **Új fájdalom- és gyulladáscsökkentő-, valamint migrén elleni gyógyszerek kifejlesztésének szükségessége**

Új fájdalomcsillapító gyógyszerek fejlesztésének preklinikai fázisában a vegyületek hatásának, hatásosságának meghatározása nem könnyű feladat, mivel kizárólag a nocicepció vizsgálata lehetséges a nemzetközi irodalomban elfogadott állatmodellekben és vizsgálati módszerekkel. A több száz éve ismert és széles körben használatos klasszikus nem-szteroid gyulladáscsökkentők, nem-opioid fájdalomcsillapítók mind a ciklooxygenáz enzimet gátolják, így a prosztaglandin szintézist csökkentik, nem mérséklék azonban a neuropátiás fájdalmat és a gyulladás neurogén komponensét. Gyakran alkalmazzák őket az ízületek gyulladásos folyamataiban, reumatoid arthritisz (RA), oszteoarthritisz, spondilitisz ankilopoetika (Bechterev-kór), Reiter-szindróma kezelésében. Hatásuk elsősorban tüneti, mindemellett tartós alkalmazásuk során számos mellékhatás kialakulására kell számítanunk. Az enyhébb mellékhatások, mint hányinger, étvágytalanság, hasi fájdalom, hasmenés, a nem-szteroid gyulladáscsökkentőt szedő páciensek 10-60%-át érintik (Tseng és Wolfe 2000). Súlyos mellékhatásokat, mint a gyomorfekély, felső gasztrointesztinális vérzés, perforáció, az egy éve NSAID-dal kezelt páciensek 2-4%-ánál tapasztaltak (Silverstein és mtsai. 2000). További problémát jelent a megnyúlt vérzési idő, bronchospasmus, fülzúgás, szédülés, hiperszenzitív reakciók. A paracetamol túladagolása májkárosodást, tartós szedése vesekárosodást okozhat.



Az opioid származékok, amelyek áttörést jelentettek a tumoros fájdalom csillapításában, második/harmadik vonalbeli terápiás szerként használatosak krónikus gyulladásos, illetve neuropátiás fájdalom kezelésében. Légzésdepressziót kiváltó hatásuk miatt fokozott óvatosságot igényelnek. Krónikus alkalmazásuk mindenkori veszélye a tolerancia, valamint a pszichés és fizikális dependencia. Fájdalomcsillapítóként való használatuk gyermekek és idősek esetében még nagyobb körültekintést igényel. A szteroidok nagy dózisban gátolják ugyan a neurogén gyulladást, de súlyos mellékhatásaik miatt (gasztrointesztinális vérzések, fekély, cukorbetegség, elhízás, stb.) hosszabb távú alkalmazásuk nem javasolt.

Újabb kutatási irány a citokineket gátló gyógyszerek előállítása. Ilyenek a citokinek vagy receptoraik elleni specifikus monoklonális antitestek, a szolubilis citokin receptorok és a receptor antagonisták. Az infliximab TNF $\alpha$  (tumor nekrozis faktor  $\alpha$ ) elleni kiméra antitest, amely a TNF $\alpha$  -nak mind a transzmembrán, mind a szolubilis formáját megköti. Eredetileg Crohn-betegség kezelésére alkalmazták, az utóbbi időben terápiás alkalmazását kiterjesztették a reumatoid artritiszre is. A lehetséges mellékhatások között szerepel fejfájás, szédülés, hányinger, depresszió, bőrgyulladás, vérszegénység. Mivel az infliximab 25%-ban tartalmaz egérre jellemző szekvenciát, ellenanyag termelődése következhet be, ami csökkenti az infliximab hatását. Emellett fertőző betegségek gyakoribb előfordulása jelentkezhet a kezelés szövődményeként (Sakai és mtsai. 2012). Mivel az infliximab eliminációja 6 hónapig is eltarthat, a nem kívánt hatások a kezelés befejezése után is kialakulhatnak. Az etanercept szolubilis TNF receptor, mely a szérumban megköti a TNF $\alpha$ -t, ezáltal inaktíválva azt. Az adalimumab rekombináns humán TNF-ellenes monoklonális antitest, szintén alkalmazzák a RA terápiájában. Mellékhatása a többi TNF antagonistához hasonlóan a súlyos fertőzések, mint TBC fellángolása lehet. Viszonylag új szolubilis IL-1 receptor antagonistá az anakinra, hatékonyságának értékeléséhez további nagyszámú beteganyagon végzett vizsgálatokra van szükség.

A migrén terápiáját illetően bár a szerotonin 5-HT $_{1B/D}$  receptor agonista triptánok és a nem régiben kifejlesztett CGRP receptor antagonistá olcegepant és telcagepant hatékonynak bizonyultak az akut migrénes rohamok tüneteinek enyhítésében (Ho és mtsai. 2008, 2010), nem fejtenek ki erős és hosszantartó gátlást a trigeminális hiperexcitabilitást illetően (Petersen és mtsai. 2004; Villalón és mtsai. 2003). Profilaktikus kezelés elindítása alapos mérlegelést igényel. A lehetséges szerválasztást az együttesen jelen lévő betegségek, a tolerálhatóság és a beteg életvezetéséből adódó preferenciák határozzák meg. A migrén gyógyszeres terápiája és profilaxisa tehát nem kielégítő (Edvinsson és Linde 2010; Láinez 2009). A jelenleg forgalomban lévő szerek szív-érrendszeri és emésztőrendszeri mellékhatásai, valamint a

terápiarezisztens esetek jelentős száma miatt szükséges újabb gyógyszer-célpontok azonosítása (Chan és mtsai. 2011; Maassen VanDenBrink és mtsai. 1998).

Mindezek alapján fontos tehát új hatásmechanizmusú, elsősorban közvetlenül az érzőidegvégződések szintjén ható fájdalomcsillapítók, gyulladáscsökkentők kifejlesztése. Munkám során ennek érdekében számos állatkísérletes fájdalommodell beállításában vettem részt, és számos nocicepció- és gyulladásvizsgáló módszert elsajátítottam. Olyan alapvetően új, ígéretes célmolekulák azonosításában vettem részt, amelyek gyógyszerfejlesztési szempontból is érdekesek lehetnek, és új perspektívákat nyithatnak a gyulladáscsökkentő, fájdalomcsillapító és migrén ellenes farmakoterápiában.

# 1. fejezet: A szomatosztatin sst<sub>4</sub> receptor szerepének vizsgálata akut és krónikus fájdalommodellekben

*Az eredmények eredeti közlemény formájában történt publikációja:*

Helyes Z, Pintér E, Sándor K, Elekes K, Bánvölgyi A, Keszthelyi D, Szoke E, Tóth DM, Sándor Z, Kereskai L, Pozsgai G, Allen JP, Emson PC, **Markovics A**, Szolcsányi J. (2009) *Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(31):13088-93.*

## IRODALMI HÁTTÉR, ELŐZMÉNYEK

### **A ízületi gyulladás komplex patofiziológiai mechanizmusai, a neurogén gyulladásos komponens és a neuro-immun interakciók szerepe**

Az aktivált kapszaicin-érzékeny érző neuronok perifériás végződéseiből olyan neuropeptidok szabadulnak fel, amelyek erőteljes értágulatot, plazmafehérje-kiáramlást és gyulladásos sejtaktivációt okoznak a beidegzési területen, ezt a jelenséget összefoglalva *neurogén gyulladásnak* nevezzük (Szolcsányi 1988; Helyes és mtsai. 2003). A neurogén gyulladás jelentős szerepet játszik számos betegség, mint pl. az asztma, a pszoriázis, az ekcéma, a kontakt dermatitisz, a gyulladásos bél- és szembetegségek, valamint a szerteágazó következményeit tekintve napjaink egyik legsúlyosabb reumatológiai kórképének, a reumatoid artritisznek a patomechanizmusában (Maggi 1995; Szolcsányi 1996). Az ízületi tok és a szinovium gazdag szenzoros innervácót kap. Ezek az idegvégzések a feszülést és a fájdalmat közvetítik, valamint számos irodalmi adat igazolja, hogy a belőlük felszabaduló SP, NKA és CGRP magukon az idegvégzéseken, az ereken, a szinoviális sejteken valamint az ízületi gyulladásos sejteken fejtik ki biológiai hatásaikat, melyek révén jelentősen hozzájárulnak a gyulladásos reakció és a következményes fájdalom, hiperalgéria kialakulásához (Levine és mtsai. 1985; Ferrel és Lam 1996).

A reumatoid artritisz elsősorban a fiatal, középkorú nőket érinti, hazánkban mintegy 70-80 ezer pácienssel számolhatunk. Az RA egy autoimmun hátterű, krónikus progresszív sokízületi gyulladás, mely az ízületek destrukciója és deformitása révén a betegek fájdalmát, mozgáskorlátozottságát, rokkantságát és életminőségük jelentős romlását idézi elő (Harris 2005). Az autoantitestek jelenléte a páciensek szérumában (reumatoid faktor, citrullinált

protein ellenes antitest) évekkel korábban jelezheti a betegség később bekövetkező klinikai manifesztációját (Nielen és mtsai. 2004).

A betegség lefolyását három időbeli szakaszra bonthatjuk, ezek a folyamatok azonban egymás mellett, egymással kölcsönhatásban is zajlanak. A kezdeti szakaszban egy meglévő genetikai fogékonyság mellett exogén és endogén antigének kiváltó szerepét feltételezik. A centrális gyulladással szembe fordított szakasz során az antigénprezentáló sejtek és a CD4+ T helper limfociták kölcsönhatásából származó T helper sejt aktiválódás a kóros immunológiai történést elindítója (Poór 2006). A T helper sejtek aktiválódásával a celluláris (Th1) vonalon proinflammatorikus citokinek, köztük TNF $\alpha$  termelődnek, míg a humorális (Th2) vonalon keresztül B limfociták, plazmasejtek aktiválódnak, és a reumatoid artritiszre jellegzetes ellenanyagokat termelnek. Jelen ismereteink szerint a reumatoid artritisz Th1 túlsúlyú, TNF $\alpha$  és interleukin (IL)-1 dominanciájú kórkép. A késői, destruktív szakasz során krónikus szinoviális proliferáció, porc- és csontkárosodás figyelhető meg (Poór 2006). A kórkép terápiájában a korai, érlelyes bázisterápia (methotrexát, leflunomid) jelenti a legnagyobb esélyt a páciensek számára (Smolen és Steiner 2003). Ezen szerek hatástalansága esetén alkalmazhatunk biológiai szereket, melyek a betegség kialakulásában szerepet játszó egy-egy folyamatba célzottan avatkoznak be, elsősorban a gyulladással szembe fordított citokinek (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) hatását befolyásolva (O'Dell 2001). A jelenleg alapkísérletes fázisban lévő új eljárások közül a jövőben esetleg lehetőséget jelenthet a betegek számára a génterápia és az őssejtterápia. Napjainkban nincs forgalomban egyetlen olyan gyógyszer csoport sem, amely hatékonyan tudná gátolni a gyulladással szembe fordított betegségek neurogén komponensét. A gyulladással szembe fordított következtében kialakuló krónikus fájdalmat nagy dózisban gátolják ugyan a nem-szteroid gyulladáscsökkentők és az opioidok, azonban hosszantartó alkalmazásuk a számos súlyos mellékhatás miatt sok problémát okoz (Helyes és mtsai. 2003).

### **A neuropátiás fájdalom, mechanizmusai és kísérletes vizsgálata**

A neuropátiák fogalma alatt általában a környéki idegrendszer legkülönbözőbb eredetű károsodását, és az ebből következő funkcióvesztést, fájdalmat és egyéb panaszokat értjük. A neuropátiák egyes speciális formáikat (genetikailag determinált, autoimmun, ill. Bell-parézis) kivéve nem képeznek önálló entitást, hanem más szervi betegségek következményei. Leggyakoribb formája a diabéteszes polineuropátia, mely az 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő páciensek közel 50-60 %-át érinti (Boulton és mtsai. 2005), és jelentős életminőségbeli romlást eredményez.

A neuropátiák felosztásában megkülönböztetünk **mono-** ill. **polineuropátiákat** (azaz egy vagy több ideget érintő formákat). A mononeuropátia traumás vagy kompressziós eredetű, leggyakoribb formája a carpalis alagút szindróma mely a nők közel 6%-át érinti élete során. A polineuropátiák általában metabolikus vagy toxikus idegkárosodás következményei. Az immunmediált neuropátiák ritkábbak, a leggyakrabban előforduló Guillain-Barré-szindróma incidenciája sem haladja meg az 1-2/100 000 főt évente (McGrogan és mtsai. 2009).

A neuropátia hátterében három különböző patofiziológiai folyamat állhat. Ezek egyike az úgynevezett **Waller-féle degeneráció**, amikor az adott ideg neurális (axon, mielin) és egyéb elemei (epi, peri, és endoneurium) leggyakrabban durva mechanikai trauma következtében egyszerre károsodnak. A funkció visszatérésére ilyenkor kevés esély van, azonban ha mégis megtörténik, akkor abban egy másik ideg vagy gyök részéről létrejövő kollaterális ingerületátvitel („*ephaptic crosstalk*” ill. axonális „*sprouting*”) játszik szerepet. Ez utóbbi mechanizmus azonban a hibás összeköttetések révén a panaszok, dizesztéziák (kellemetlen érzészavarok) egyik fő forrása is. **Primer demielinizáció** esetében a lézió elsődlegesen a mielint érinti, az axonális struktúrák kezdetben épek, viszont a szaltatorikus ingerületvezetés megszűntével a vezetési sebesség lassulása, súlyos esetben vezetési blokk következik be. Legritkább és egyben legrosszabb prognózisú az úgynevezett **axonális neuropátia**, amikor priméren az axon károsodik.

A tüneti dominanciát figyelembe véve beszélhetünk szenzoros, motoros, autonóm, ill. kevert neuropátiákról. Messze a legnagyobb figyelmet kapják ezek közül a szenzoros tüneti túlsúlyú formák, mivel korunk népbetegségei a diabétesz, alkoholizmus, ill. malnutríció révén nagy tömegek életminőségét rontják.

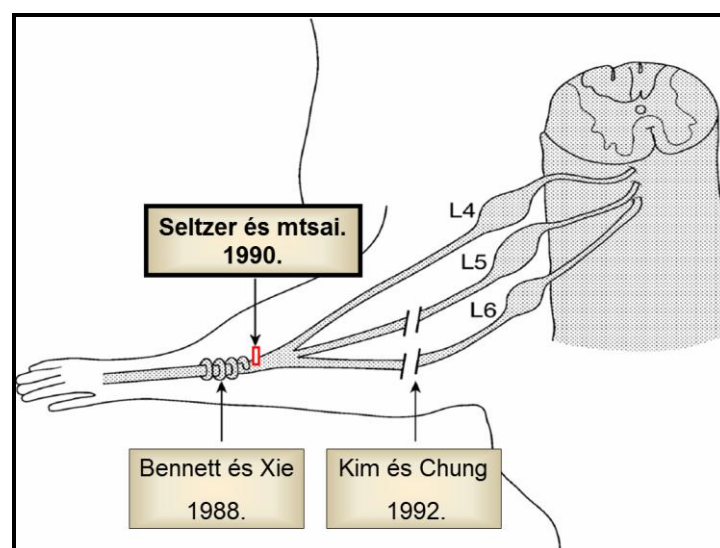
A neuropátiás fájdalomszindrómák legismertebb és leggyakoribb tünetei a különböző paresztéziák (zsibbadással járó fonákérzés) és dizesztéziák (a paresztéziánál kellemetlenebb, fájdalmas karakterű érzés), a spontán fájdalom, ill. a hiperalgézia és az allodínia. A **neuropátiás fájdalmat** minden egyéb szomatikus és viscerális nociceptív fájdalomtól elkülönítik a következő jellegzetességek:

1. Nincs védő hatása (a fájdalominger céltalan, elhárító viselkedéssel nem szüntethető meg)
2. A fájdalom az azt létrehozó alapbetegségtől függetlenül, hosszan fennáll
3. Fokozott érzékenység nem fájdalmas ingerekkel szemben (allodínia), illetve küszöbközeli ingerekkel szemben (hiperalgézia) (Chaplan és Sorkin 1997).

A perifériás neuropátiás fájdalom állatkísérletes vizsgálatára gyakran alkalmazott eljárás az ún. **Seltzer-műtét**, amely széles körben alkalmazott traumás mononeuropátia modell. Zeev

Seltzer 1990-es közleménye a *részleges szoros n. ischiadicus lekötésével* kiváltott neuropátiás fájdalommodellről fontos mérföldkövet jelentett (Seltzer és mtsai. 1990). A modell előnyei, hogy bár spontán fájdalommal jár, öncsonkító magatartás mégsem figyelhető meg, továbbá a végtag nem válik érzéketlenné, így kiváltott válaszok is vizsgálhatóak a von Frey és a Randall Selitto módszerekkel (a modell és a módszerek részletes leírása a „Kísérleti modellek és vizsgálati módszerek” részben található). Mivel a lekötött ideg kevert, ezért szenzoros, motoros és vegetatív rostok változó mértékben és arányban károsodnak, azonban a 7. napon, amikor mi is végezzük méréseinket, motoros koordinációs zavar nem figyelhető meg (nem publikált saját eredményeink). A modell további fontos előnyei, hogy technikailag egyszerű, gyors, kis műtéti traumával jár, jól ismételhető, megbízható, és a kialakuló mechanikai hiperalgészia/ allodínia jól vizsgálható.

A Seltzer-féle eljárás mellett manapság leggyakrabban alkalmazott modell az ún. *gerincközei gyöki ligatúra/idegátmetzés* (Kim és Chung 1992). A modell előnyei hasonlóak a korábban tárgyaltakhoz, egy jelentős különbség azonban, hogy egyedül ezzel az eljárással tudjuk pontosan szabályozni, hogy mennyi és milyen rostot károsítunk. Komoly hátránya viszont, hogy műtétechnikailag igen nehéz (eredetileg nem egérre, hanem patkányokra lett kidolgozva), illetve maga a műtét is nagy traumával jár, ami könnyen elfedheti a kialakuló neuropátia tüneteit. A Bennett-Xie módszer a n. ischiadicus teljes egészét érintő laza lekötést jelenti (Bennett és Xie 1988), amely azonban a lekötés szorosságától függően jelentős egyéni különbségeket eredményez. Az ismertetett modelleket a **2. ábra** foglalja össze.

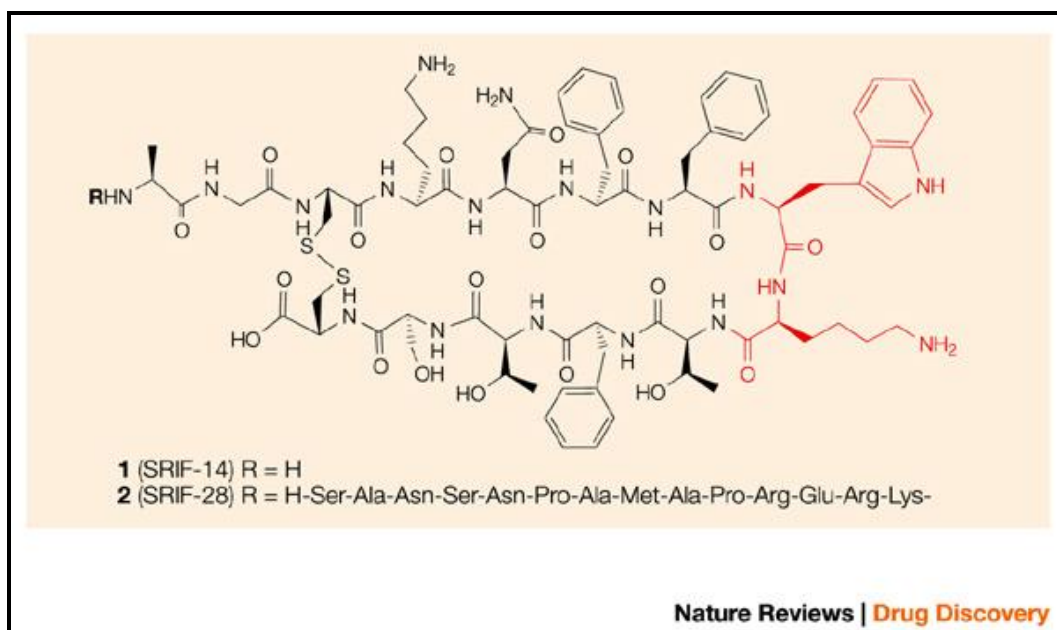


**2. ábra: A traumás mononeuropátia állatkísérletes modelljei**

(forrás: British Journal of Anaesthesia)

### A szomatosztatin és receptorai, szerepük a gyulladásban és a nocicepcióban

A **szomatosztatin**, vagy más néven szomatotropin (growth hormone, GH) felszabadulást gátló faktor (somatotropine release inhibitory factor: SRIF; SST) felfedezése Krulich és munkatársai nevéhez fűződik. 1968-ban egy olyan „faktor” létezését igazolták hipotalamusz extraktumban, amely gátolta a GH felszabadulását a hipofízis elülső lebenyéből (Krulich és mtsai. 1968). A szomatosztatin 14, illetve 28 aminosavból álló ciklikus peptid formában a szervezet számos helyén megtalálható (Brazeau 1986) (**3. ábra**).



3. ábra: A szomatosztatin-14 és szomatosztatin-28 szerkezete  
(forrás: Weckbecker és mtsai. 2003)

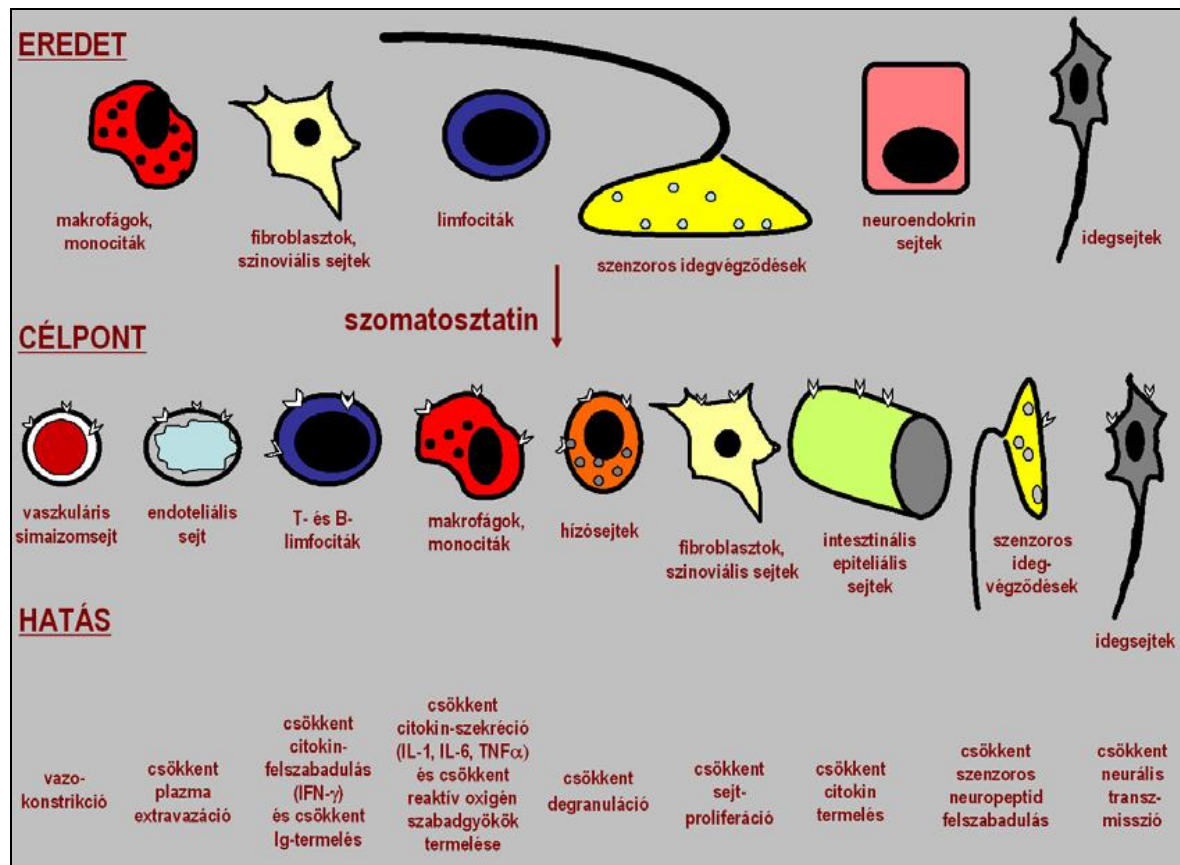
Jelen van a központi és a perifériás idegrendszerben (Parsons és mtsai. 1976; Reichlin 1983), a gasztrointesztinális traktus neuroendokrin sejtjeiben, a hasnyálmirigyben, a vesében, a mellékvesében, a pajzsmirigyben, gyulladásos sejtekben, ivarszervekben (Hofland és Lamberts 1996; Reubi és mtsai. 1999; ten Bokum és mtsai. 2000). Az ízületekben az aktivált szinoviális sejtek és az immunsejtek is szekretálnak szomatosztatint, amely autokrin vagy parakrin módon fejt ki hatását (Pintér és mtsai. 2006). A szomatosztatin gátló hatást gyakorol számos hormon (pl. GH, glukagon, inzulin, gasztrin, szekretin, kolecisztokinin, motilin, pankreatikus polipeptid, prolaktin, pajzsmirigy stimuláló hormon: TSH) szekréciójára, a gasztrointesztinális motilitásra és az emésztőnedvek termelésére. Gátolja a tumorsejtek proliferációját, valamint erős immunmodulátor hatással rendelkezik. Csökkenti a B-limfociták IgA, IgM és IgE szekrécióját, gátolja a T-limfociták IL-2, IL-4, IL-10 és interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) termelését, a neutrofil granulociták kemotaxisát, a makrofágok fagocita-, és a természetes

ölősejtek (NK sejtek) killer aktivitását (ten Bokum és mtsai. 2000; Krantic és mtsai. 2004). A szomatosztatinnak a központi idegrendszerben neuromodulátor szerepe van, gátolja más neurotranszmitterek (glutamát, szerotonin, acetyl-kolin) és neurohormonok (GHRH) felszabadulását. Befolyásolja a lokomotoros aktivitást és a kognitív funkciókat, jelentőségét számos pszichiátriai és neurológiai kórképben igazolták (Jiménez-Corral és mtsai. 2006; Wang és mtsai. 2011; Roca és mtsai. 1999).

A szomatosztatin az idegelemek közül elsősorban a kapszaicin-érzékeny, TRPV1 receptort expresszáló szenzoros neuronokban szintetizálódik és tárolódik. Állatkísérletes modellekben és különböző fájdalomkórképekben kimutatták, hogy a kívülről beadott szomatosztatin csökkenti a fájdalmat (Lembeck és mtsai. 1982; Chrubasik 1991; Karalis és mtsai. 1994; Fioravanti és mtsai. 1995). Mindezek mellett munkacsoportunk számos bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok aktivált perifériás végződéseiből felszabaduló és a keringésbe jutó szomatosztatin szisztémás gyulladáscsökkentő és antinociceptív hatásokat fejt ki (Szolcsányi és mtsai. 1998a, b; Thán és mtsai. 2000; Helyes és mtsai. 2000, 2001, 2004) **(4. ábra)**.

A SST szerkeázó hatásait saját receptorai közvetítik. Eddig öt  $G_i$ -proteinhez kapcsolt szomatosztatin receptort klónoztak egérben, patkányban, illetve emberben, amelyeket  $sst_1$ ,  $sst_2$ ,  $sst_3$ ,  $sst_4$  és  $sst_5$  névvel illették (Hoyer és mtsai. 1995; Patel 1999). Ez az öt sst receptor szintetikus szomatosztatin analóg-kötő képessége alapján két csoportra osztható. A SRIF1 csoportba tartoznak az  $sst_2$ ,  $sst_3$  és  $sst_5$  receptorok, amelyek nagy affinitással kötnek oktapeptid analógokat (pl. az oktreotidot), míg a SRIF2 csoportba sorolt  $sst_1$  és  $sst_4$  receptorok alacsony oktapeptid analóg-kötő képességgel rendelkeznek (Hoyer és mtsai. 1995; Pintér és mtsai. 2006). Számos irodalmi adat bizonyítja, hogy az endokrin hatást a SRIF1 csoportba tartozó receptorok közvetítik (Raynor és Reisine 1992). Munkacsoportunk eredményei azt mutatják, hogy a fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatás a másik csoporthoz, vagyis az  $sst_1$  és  $sst_4$  receptorokhoz köthető a periférián (Helyes és mtsai. 2001; Pintér és mtsai. 2002; Szolcsányi és mtsai. 2004; Pintér és mtsai. 2006). Bár e receptorok klónozása elősegítette a szomatosztatin fiziológiai/patofiziológiai szerepével kapcsolatos kutatásokat, különösen nagy előrelépést a receptor génhiányos egerek előállítását jelentett.





4. ábra: A szomatosztatin gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatásai háttérben álló mechanizmusok (forrás: Pintér és mtsai. 2006)

Munkacsoportunkban történtek az első *in vivo* vizsgálatok  $sst_4$  génhiányos ( $sst_4^{-/-}$ ) egerekkel, amelyek heterozigóta elődjait Dr. Piers Emson (Laboratory of Molecular Neuroscience, Babraham Institute, Cambridge, UK) laboratóriumában állították elő. Ezeket az állatokat a vele való kollaboráción keresztül kaptuk és tenyésztettük tovább az intézet állatházában.

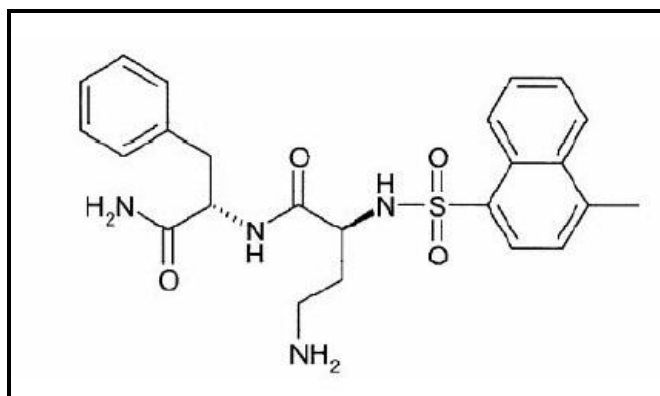
Bár a natív szomatosztatin terápiás alkalmazását rendkívül széles hatásspektruma és nagyon rövid (3 percnél kevesebb) plazma eliminációs féleletideje akadályozza (ten Bokum és mtsai. 2000), a stabil, szelektív  $sst_4/sst_1$  agonisták azonban új terápiás lehetőséget nyújthatnak a gyulladáscsökkentésben és a fájdalomcsillapításban. A szomatosztatin központi idegrendszeri mechanizmussal kialakuló gátló hatásait illetően számos adat áll rendelkezésre. Intratekális, epidurális, intracerebroventrikuláris alkalmazás után a natív SST és az oktreatid is hatékonyan gátolta a posztoperatív fájdalmat (Chrubasik és mtsai. 1984, 1985; Taura és mtsai. 1994), csontfájdalmat (Burgess és mtsai. 1996), a tumoros fájdalmat (Chrubasik és mtsai. 1984; Meynadier és mtsai. 1985), ízületi gyulladással járó fájdalmat (Matucci-Cerinic és Marabini 1998; Silveri és mtsai. 1994), a viscerális fájdalmat (Plourde és mtsai. 1993) és a migrént

(Kapicioglu és mtsai. 1997). Fontos azonban megemlíteni, hogy a nagy dózisu, központi idegrendszerbe történő ismételt SST-injekció toxikus hatást fejtett ki a mellső és hátsó szarvi neuronokra a gerincvelőben és fokális demielinizációt okozott (Gaumann és mtsai. 1989; Mollenholt és mtsai. 1988), amelyért elsősorban a vazokonstriktor hatást tették felelőssé (Freedman és mtsai. 1988). E probléma kiküszöbölése periférián ható sst agonistákkal lehetséges. Több évtizede leírták, hogy a szisztémásan, sőt a lokálisan alkalmazott SST is analgetikus hatásokkal rendelkezik (Lembeck és mtsai. 1982; Chrubasik 1991; Fioravanti és mtsai. 1995; Matucci-Cerinic és mtsai. 1995; Corsi és mtsai. 1997), ugyanis a patkányizületbe injektált sst agonisták képesek voltak csökkenteni a rotációra létrejövő afferens aktivitást (Heppelmann és Pawlak 1997). Az emberi izületbe adott szomatosztatin pedig gátolta a gyulladáscsökkentést (Matucci-Cerinic és Marabini 1998; Silveri és mtsai. 1994). Egy korábbi kísérletsorozatban munkacsoportunk azt találta, hogy altatott patkányokban a n. ischiadicus kapszaicin-érzékeny afferenseinek antidrómos elektromos ingerlésére az intraarteriális kapszaicinnal kiváltott nocifenzív (fájdalomelhárító) vegetatív reflexválaszok csökkennek. Hasonló gátlást tapasztaltunk szomatosztatin, illetve szintetikus SRIF2 (sst<sub>1</sub>/sst<sub>4</sub>) receptor agonisták i.v. injekciója után, a SRIF1-szelektív agonista oktapeptid oktrotid azonban hatástalan volt (Helyes és mtsai. 2000).

### **A szomatosztatin sst<sub>4</sub> receptoron ható szelektív agonisták**

Az endogén szomatosztatin terápiás alkalmazását akadályozza annak rendkívül sokrétű előfordulása a szervezetben, széles hatásspektruma, és nagyon rövid plazma féléletideje (ten Bokum és mtsai. 2000). Stabil, a szenzoros idegvégződés és számos gyulladáscsökkentő sejt sst<sub>4</sub> receptorain szelektíven ható szintetikus agonisták új terápiás lehetőséget nyújthatnak a gyulladáscsökkentésben és a fájdalomcsillapításban. Ezen agonisták nagy előnye, hogy nem rendelkeznek a szomatosztatin sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> és sst<sub>5</sub> receptorai által közvetített endokrin hatásokkal. Sst<sub>4</sub>/sst<sub>1</sub> receptor agonista molekula a ciklikus heptapeptid szerkezetű TT-232, amelynek széleskörű antinociceptív hatását számos korábbi kísérletünk igazolta (Helyes és mtsai. 2000; Pintér és mtsai. 2002; Helyes és mtsai. 2004, 2005). A TT-232 nem befolyásolta a növekedési hormon és a gasztrin szekrécióját, azonban potens antiproliferatív hatással rendelkezett, akut nocicepció és gyulladásmoellekben jelentős gátló hatást fejtett ki (Kéri és mtsai. 1996; Helyes és mtsai. 2000, 2001). A TT-232 széles dózistartományban (5 mg/kg-ig) atoxikusnak bizonyult, LD<sub>50</sub> érték nem volt meghatározható. Egerekben a legmagasabb, 120 mg/kg dózis több héten keresztül történő ismételt adása sem okozott elhullást, csupán az állatok 10%-ánál tapasztaltak enyhe, átmeneti testsúlycsökkenést.

Jelen kísérleteinket egy sst<sub>4</sub> receptorhoz szelektíven, nagy affinitással kötődő szomatosztatin agonistával, a J-2156 kódjelű vegyülettel végeztük (**5. ábra**), amit a Juvantia Pharma (Turku, Finnország) gyárában szintetizáltak. A J-2156 nem-peptid, szulfonamido-peptidomimetikum, pontos kémiai szerkezete (1'S, 2S)-4-amino-N-(1'-karbamoil-2'-feniletil)-2-(4''-metil-1''-naftalénszulfonamino)-butánamid.



5. ábra: A J-2156 molekula szerkezete

A J-2156 nanomólos affinitással kötődik az emberi sst<sub>4</sub> receptorhoz, ami a natív szomatosztatin kötődési affinitását jelentősen meghaladja, valamint közel 400-szoros szelektivitást mutat az sst<sub>4</sub>-hez az emberben megtalálható másik négy szomatosztatin receptorhoz viszonyítva (Engström és mtsai. 2005). A receptoraktivációt jelző ciklikus AMP-tesztben a natív szomatosztatin-14-hez vagy szomatosztatin-28-hoz hasonlóan teljes agonistaként működött. A GTP $\gamma$ S-kötődést jelző G-protein aktivációs funkcionális tesztben 2,5-szer erősebb válaszokat adott, mint a natív szomatosztatin. Ezen tulajdonságai alapján e molekulát a „szuperagonista” jelzővel illették (Engström és mtsai. 2005). További *in vitro* vizsgálatok igazolták, hogy a J-2156 ismételt alkalmazása sem okoz deszenzibilizációt, ami tovább növeli e molekula terápiás alkalmazásának lehetőségeit (Engström és mtsai. 2006). Alábbi kísérletsorozatunkban a J-2156 antinociceptív és gyulladásgátló hatásait vizsgáltuk akut és krónikus egérmodellekben.

## CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám egyik célja az volt, hogy megvizsgáljam a szomatosztatin sst<sub>4</sub> receptor szerepét akut és krónikus ízületi gyulladási folyamatokban, valamint neuropátiás mechanikai hiperalgégiában, génhiányos egerek és a szelektív sst<sub>4</sub> receptor agonista peptidomimetikum J-2156 segítségével. Kutatási programunk fontosságát és gyakorlati jelentőségét hangsúlyozza, hogy a gyulladási betegségek kezelésében a jelenleg elérhető hatóanyagok egyike sem képes a neurogén gyulladási komponens gátlására, illetve a számos súlyos mellékhatás miatt nem lehet ezeket hosszú ideig alkalmazni (pl. glükokortikoidok). Arra kerestük a választ, hogy az sst<sub>4</sub> receptor jelenthet-e új terápiás célpontot a gyulladási folyamatok és a fájdalom kezelésében.

A talp akut gyulladást carrageenannel váltottuk ki, a krónikus ízületi gyulladás modelljeként az irodalomban széles körben használt komplett Freund adjuváns (CFA) intraplantáris alkalmazását választottuk (Szabó és mtsai. 2005). A gyulladási folyamatok vizsgálatára duzzadásmérést végeztünk és meghatároztuk többféle citokin szöveti koncentrációját. Ilyen citokinek a krónikus artritisz kialakulásában és destrukciójában fontos szerepet betöltő TNF $\alpha$  és IL-1 $\beta$ , valamint a celluláris immunválaszra jellemző Th1-es IFN $\gamma$ , IL-2, valamint a Th2-es IL-4, IL-5. A nocicepciót a talp érintési érzékenységi küszöbének és a végtag spontán terhelésének meghatározásával értékeltük. A traumás mononeuropátia modellezésére a Seltzer-féle műtétet alkalmaztuk.

## **KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK**

### **Kísérleti állatok**

Kísérleteinkhez heterozigóta  $sst_4^{+/-}$  egereket tenyésztettünk intézetünk állatházában, melyeket Dr. Piers Emson (Laboratory of Molecular Neuroscience, Babraham Institute, Cambridge, UK) C57Bl/6 törzsből állított elő, 8 generáción keresztül visszakeresztzett, és munkacsoportunk rendelkezésére bocsátott. Az utódok genotípusát PCR-ral meghatároztuk, az első generációt követően homozigóta  $sst_4$  receptor génhiányos ( $sst_4^{-/-}$ , knockout, KO) és vad típusú ( $sst_4^{+/+}$ ) vonalakon külön történt a tenyésztés. Vizsgálatainkhoz az első három generációból származó, 20-25 g-os, hím  $sst_4^{-/-}$  és  $sst_4^{+/+}$  egereket használtunk. Az állatokat 24-25°C-on tartottuk, normál étellel és vízzel *ad libitum* ellátva. Mivel kísérleteinkhez nagyszámú egér szükséges, nem volt lehetőségünk minden modell esetén alomtestvéreket is megvizsgálni. Egyes kísérletsorozatokban azonban az összehasonlítás céljából  $sst_4^{+/+}$  és  $sst_4^{-/-}$  alomtestvéreket is teszteltünk.

Kísérleteink minden esetben megfeleltek az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998. számú kormányrendelet előírásainak, és igazodtak a fájdalom tanulmányozására létrehozott nemzetközi tanács javaslataihoz (Zimmermann 1983). A kísérleti eljárásokat a Pécsi Tudományegyetem állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: BA 02/2000-16-2006).

### **Kísérleti modellek:**

#### **- Carrageenannel kiváltott akut gyulladás**

Ebben a kísérleti elrendezésben  $sst_4^{+/+}$  és  $sst_4^{-/-}$  egereket és alomtársaikat hasonlítottuk össze. Az akut gyulladás széles körben használt, nemzetközileg elfogadott, carrageenannel kiváltott állatkísérletes modelljét alkalmaztuk (Buерkle és mtsai. 1999). A carrageenan egy tengeri hínárból származó poliszacharid. Az állatok egyik talpába 50  $\mu$ l 3%-os carrageenan-oldatot injektáltunk, amellyel kevert típusú, neurogén és nem-neurogén komponensekből álló gyulladási reakciót idéztünk elő lokálisan (Vinegar és mtsai. 1987; Gilligan és mtsai. 1994). A talp mechanonocéptív küszöbét eszteziométerrel, a lábduzzadást pletizmómméterrel mértük. A carrageenan-adás előtt 10 perccel az állatok egy másik csoportját 100  $\mu$ g/kg J-2156-tal kezeltük intraperitoneálisan (i.p.), míg kontrollként csak oldószert (fiz.sóoldat) alkalmaztunk. Ezt követően mechanonocéptív méréseket végeztünk 3, 6 és 22 órával, illetve

lábduzzadás mérését 6 órával a gyulladás kiváltása után. Az eredmények fejezetben a 6. órában nyert adatokat ábrázoltam.

#### **- Freund-adjuvánssal kiváltott krónikus ízületi gyulladás**

A krónikus ízületi gyulladást komplett Freund-adjuváns (CFA; 1 mg/ml hővel előlt *Mycobacterium tuberculosis* paraffinolajos szuszpenziója) faroktöbe, valamint intraplantárisan történő adásával (50-50 µl) váltottuk ki az egerekben. A szisztémás hatás fokozása érdekében a faroktöbe történő CFA-adást a következő napon megismételtük, ezt a napot tekintjük a kísérlet első napjának. A komplett adjuváns adásával a szervezet immunválasz-készsége stimulálható, a baktérium sejtfalában található muramil-dipeptid aktiválja a makrofágokat és a dendritikus sejteket, amely IL-12, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  fokozódó termeléséhez vezet. Ennek hatására poliklonális T limfociták aktiválódnak, elsősorban T helper1 (Th1, CD4+) irányba differenciálódnak és limfokineket termelnek. Az adjuváns alkalmazásának helyén a sajtos granulóma képződéséért a makrofágok fokozott mértékű antigén-feldolgozása felelős, a krónikus poliartritisz kialakulásában CD4+ T sejt klónok aktiválódása játszik szerepet (Joe és Wilder 1999; Billiau és Matthys 2001).

Funkcionális méréseinket CFA adás előtt és azt követően 21 napon keresztül végeztük. A mechanonociceptív küszöböt eszteziométerrel, a lábtérfogatot pletizmométerrel, a spontán súlyeloszlást incapacitance teszterrel mértük. A kísérlet végén, a 21. napon az állatok Napentobarbitallal (Nembutal, 100 mg/kg i.p.) történő túllaltatása után a tibio-tarzális ízületeket kimetszettük. Az így nyert preparátumokat a citokin-meghatározási módszerrel való feldolgozásig -80 °C-on tároltuk.

#### **-A n. ischiadicus részleges lekötésével kiváltott traumás mononeuropátia**

A n. ischiadicus egyoldali részleges lekötése (**2. ábra**) a végtag mechanonociceptív küszöbének csökkenését idézi elő (Seltzer és mtsai. 1990). Sst<sub>4</sub><sup>+/+</sup> és sst<sub>4</sub><sup>-/-</sup> egereket ketamin-xylozin keverékével elaltattunk (100 és 5 mg/kg i.p.), az egyik oldali n. ischiadicust a combon kipreparáltuk, majd az ideg 1/3-1/2-ed részét óvatosan elválasztottuk és 8-0-s atraumatikus szilikonos varróanyaggal szorosan lekööttük, végül a sebet zártuk. A műtétet követően az állatokat 7 napig hagytuk felépülni. A talp érintési érzékenységének mérését eszteziométerrel végeztük a műtét előtt, valamint a műtétet követő 7. és 12. napon. Miután az állatok mechanonociceptív küszöbét meghatároztuk, és a kialakult fájdalomküszöb-csökkenésről (mechanikai hiperalgészia) meggyőződünk, mindkét állatcsoportot 100 µg/kg sst<sub>4</sub> agonistával (J-2156) kezeltük i.p., majd 30 perc elteltével újabb mérést végeztünk.

## Vizsgálati módszerek:

### -A talp érintési érzékenységének mérése



6. ábra: Ugo Basile Dynamic Plantar Aesthesiometer

határoztuk meg, az erőhatás növekedési dinamikáját 2 g/s értékre állítottuk be. A fájdalomküszöb elérésekor, vagyis amikor az állat elrántja a lábát a tompa hegyű tőről, a számláló leáll, az erőhatást pedig a műszer kijelzőjéről grammokban leolvashatjuk. A mért adatokat a kezdeti kontroll értékekhez viszonyítottuk, a gyulladás hatására kialakuló küszöbcsökkenést (hiperalgécia) százalékban fejeztük ki.

A talp érintési érzékenységét dinamikus plantáris eszteziométerrel (Ugo Basile Dynamic Plantar Aesthesiometer 37400, Olaszország) vizsgáltuk (6. ábra). Ez valójában egy módosított, digitalizált von Frey készülék, ahol az állat szabadon mozog egy alul rácsos plexiketreben. Egy tükörrel ellátott stimulátoregység segítségével az állat talpának középső részét egy tompa hegyű tűvel fokozódó erőhatásnak tettük ki. A maximális erőhatást 10 grammban

### -A lábtérfogat mérése



7. ábra: Ugo Basile Plethysmometer

kialakult ödémát százalékban fejezzük ki.

A lábtérfogat mérésére alkalmas műszerünk a plethyszométer (Ugo Basile Plethysmometry 7140, Olaszország), ami a közlekedőedények elve alapján működik (7. ábra). Az állat hátsó lábát előre meghatározott jellegű ehhez a műszerhez tartozó folyadékkal teli hengerbe merítjük. Ehhez a hengerhez csatlakozik egy másik, folyadékkal teli henger, melyben lévő transzducer a láb bemelegítésekor bekövetkező folyadéktérfogat-kiszorítást érzékeli. A térfogatot  $\text{cm}^3$ -ben leolvashatjuk a digitális kijelzőről. A mérési adatokat végül a kezdeti értékekhez viszonyítjuk, a

### ***-A spontán súlyeloszlás meghatározása***



**8. ábra: Incapacitance Tester**

A hátsó végtagi súlyeloszlás méréséhez incapacitance tesztet (Linton Instruments, Egyesült Királyság) használtunk (8. ábra), mely a spontán fájdalom megítélésére alkalmas. Az állatokat a speciális plexiketreben úgy helyeztük el, hogy azok nyugalomban mellső lábaikat a plexi alapjával 45 fokos szöget bezáró elülső lapjára helyezték, így testsúlyukkal hátsó

végtagjaikra nehezedtek, melyeket a vizsgálat során egy-egy mérleggel ellátott lapon tartottak. Az egerek nyugalmi állapotában végzett vizsgálat alatt a hátsó végtagokra való ránehezedés szinte azonos mértékű, a spontán súlyeloszlás ekkor 50-50% körüli érték. A mért értékeket a digitális kijelzőről grammokban kifejezve olvastuk le. A spontán fájdalom hatására megváltozott súlyeloszlást a végtagok értékeinek egymáshoz való viszonyításával, százalékban fejeztük ki.

### ***-A gyulladáscitokinek meghatározása ELISA és Cytometric Bead Array (CBA) módszerekkel***

#### **1. Az ízületek homogenizálása**

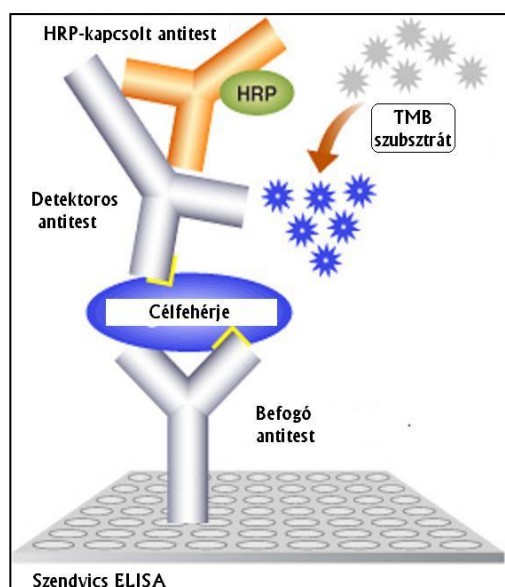
A  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolt minták tömegét fagyott állapotban megmértük, majd 1 ml homogenizáló pufferbe tettük, amely steril tápoldat (RPMI 1640) és proteáz inhibitor (PMSF) 100:1 arányú keveréke. Ebben a mintákat rövid ideig ollóval aprítottuk, majd késes homogenizátorral (Kika Labortechnik, Németország) az egyes mintákat 3 percig homogenizáltuk 20.500 fordulat/perc sebességgel. A munkafolyamat során a mintákat jégben tároltuk. Ezután centrifugán (Janetzky K24) a homogenizátumokat 10 percig 12.500 fordulat/perces sebességgel  $4^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk. Az így nyert szupernatánokat pipettával gondosan leszívtuk és a citokin-szintek meghatározásáig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.



## 2. Az IL-1 $\beta$ meghatározása szendvics ELISA módszerrel

Az interleukin-1 $\beta$  proinflammatorikus citokin, a gyulladás egyik legfontosabb markere (Dinarello 1994, 2000). Az immunválasz patológiás módosítása és az oszteoklasztok aktivációja révén hozzájárul az ízületi gyulladás kialakulásához és a folyamat progressiójához (Kagari és mtsai. 2002).

A szendvics ELISA módszer során a célfehérje detektálása három antitesttel történik (**9. ábra**). Az első, ismert mennyiségű befogó antitest az ELISA lemezre kötött. A célfehérjét tartalmazó mintát a lemezhez adva (a nem specifikus kötőhelyek blokkolása után) a célfehérje a befogó antitesthez kötődik. A detektáló, primer antitest a célmolekulával immunkomplexet képez, létrejön az ún. szendvics. Ezt követően adjuk a rendszerhez az enzim-konjugált antitestet, ami a detektáló antitesthez fog kötödni. Végül szubsztrátot adunk a rendszerhez, amit a jelölt antitesthez kapcsolt enzim színes végtermékké átalakít. A folyamatot megfelelő időben leállítva a kapott színintenzitást mérjük, ami egyenesen arányos a mintában található citokin mennyiségével. A homogenizátumok IL-1 $\beta$  koncentrációját mouse IL-1 $\beta$  OptEIA



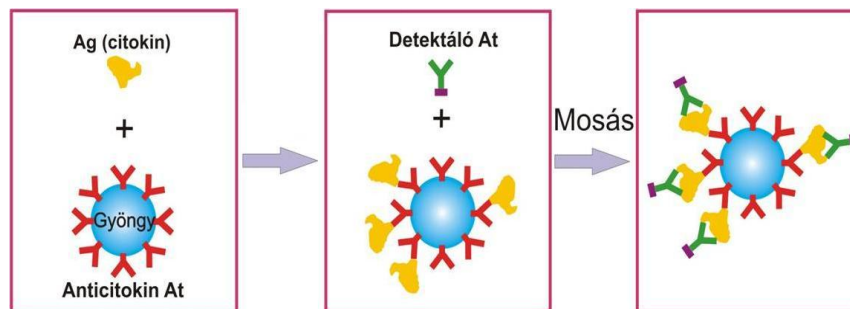
9. ábra: A szendvics ELISA elve

szettel (BD Biosciences, USA) határoztuk meg. Ehhez az ajánlott puffereket a leírásban megadott eljárás szerint elkészítettük. Az összeméréskor az assay protokollnak megfelelően jártunk el, minden esetben használtunk standard sort is. A folyamat végén 450 nm-en optikai denzitásértékeket, valamint 620 nm-en háttérjel aktivitást is mértünk Multiskan reader és a hozzá tartozó szoftver segítségével (Labsystems, Magyarország). A mért értékekből Excel táblázat segítségével, a standard sor alapján egyenest illetve számoltuk ki a citokin-koncentrációértékeket, pg citokin/g ízület mértékegységben megadva.

## 3. A TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IFN $\gamma$ meghatározása CBA módszerrel

A krónikus ízületi gyulladásban a celluláris immunválaszra jellemző Th1-es IFN $\gamma$ , IL-2, valamint a Th2-es IL-4, IL-5 molekulák koncentrációjának alakulását is érdemes megvizsgálni. A TNF $\alpha$  központi szerepet játszik a gyulladás kialakulásában, mivel serkenti más proinflammatorikus citokinek és kemokinek termelődését, a leukocita adhéziót, a migrációt, az angiogenezist, a porc- és csontdestrukciót (Kagari és mtsai. 2002).

A fenti citokinek vizsgálatához a Mouse Th1/Th2 cytokine CBA (Cytometric Bead Array, Becton Dickinson Biosciences, USA) kitet használtuk (**10. ábra**). A CBA assay hatféle mikrogyöngy keverékét tartalmazza. Az egyes típusú gyöngyök felszínéhez más-más citokinre érzékeny befogó antitest van kovalensen kötve. Az antigén, ami jelen esetben a mintában található citokin, a befogó antitesthez kötődik. A detektáló antitest fikoeritrinnel konjugált, a keresett antigénnel immunkomplexet képez. A citokinek koncentrációját a detektáló antitest gerjesztése által kiváltott fluoreszcencia intenzitása alapján flow citométerrel (Partec Cyflow Space) határoztuk meg. A módszer előnye a klasszikus ELISA módszerhez képest, hogy a szükséges minta mennyisége lényegesen kevesebb, valamint hogy a különböző mikrogyöngyök együttes alkalmazásának köszönhetően egyidejűleg több citokin meghatározására is alkalmas.



**10. ábra: A CBA módszer**

### Felhasznált anyagok

A carrageenan, a komplett Freund-adjuvánst, a proteáz-gátlót, valamint az ELISA szett kiegészítőit a Sigma-Aldrich Kft-től (Magyarország) szereztük be. A ketamint a Richter Gedeon Nyrt-től (Magyarország), a xylazint az Eurovet Kft-től (Hollandia), az RPMI médiumot a Gibco Cell Culture Systems-től (Németország), a nembutalt pedig a May and Bakertől (Egyesült Királyság) vásároltuk.

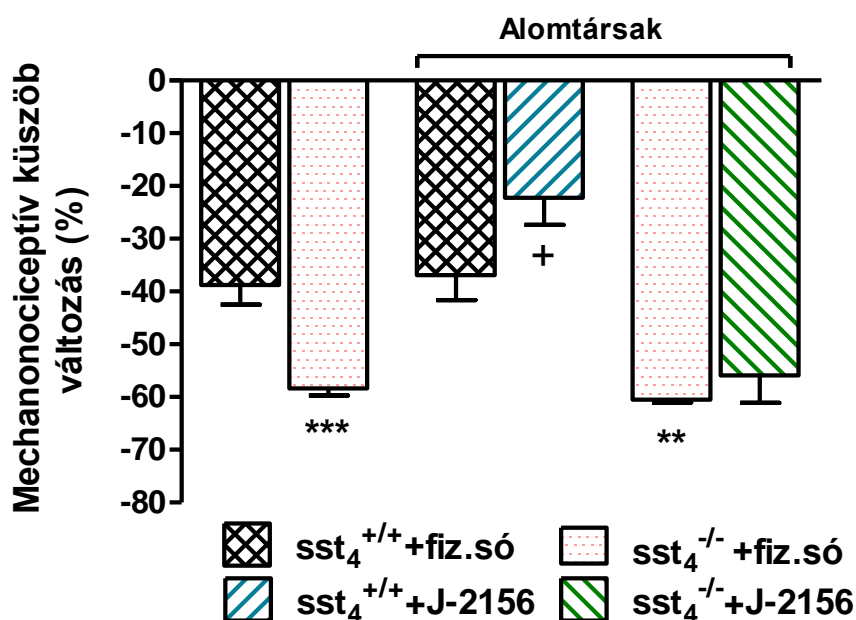
### Statisztikai analízis

A mechanikai hiperalgéria, a lábduzzadás valamint a spontán súlyeloszlás vizsgálata során kapott eredményeink értékelését egyutas ANOVA és módosított Bonferroni t-teszttel végeztük. A traumás mononeuropátia adatainak értékelése nem-parametrikus Mann-Witney U-teszttel történt. A citokin mérés eredményeinek feldolgozásához Student-féle t-próbát alkalmaztunk. A különböző csoportok közötti eredmények összehasonlításakor a  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  és  $***p < 0,001$  értékeket határoztuk meg szignifikánsnak.

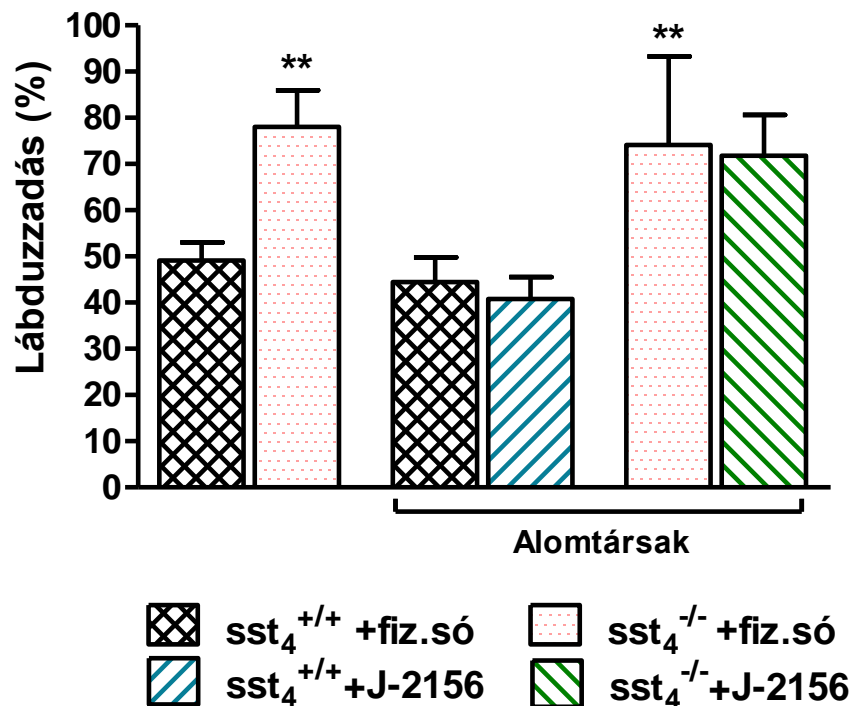
## EREDMÉNYEK

### Az $sst_4$ receptor szerepe carrageenannel kiváltott akut gyulladásban

Az  $sst_4^{+/+}$  és  $sst_4^{-/-}$  állatcsoport kontroll mechanonociceptív küszöbértékei ( $sst_4^{+/+}$ :  $8,3 \pm 0,16$  g;  $sst_4^{-/-}$ :  $8,0 \pm 0,14$  g) és lábtérfogatai ( $sst_4^{+/+}$ :  $0,67 \pm 0,02$  cm<sup>3</sup>;  $sst_4^{-/-}$ :  $0,68 \pm 0,02$  cm<sup>3</sup>) lényegesen nem különböztek egymástól. A carrageenan a kezelt végtag jelentős gyulladást okozta duzzadással, pírral és a mechanonociceptív küszöb csökkenésével. A gyulladás kiváltása után 6 órával a lábduzzadás és a nociceptív küszöb csökkenése is szignifikánsan nagyobbak voltak az  $sst_4$  génhíányos csoportban. A vad típusú és a heterozigóta állatokból keresztezéssel tenyésztett  $sst_4^{-/-}$  alomtestvérek eredményei nem különböztek lényegesen a külön vonalakként tenyésztett  $sst_4^{+/+}$  és  $sst_4^{-/-}$  állatcsoportok eredményeitől. A szelektív  $sst_4$  receptor agonista J-2156-tal történt előkezelés szignifikánsan csökkentette a mechanikai hiperalgéziát a vad állatcsoportban, de a génhíányos csoportban nem. A J-2156 egyik csoportban sem mérsékelte a lábduzzadást (11., 12. ábra).



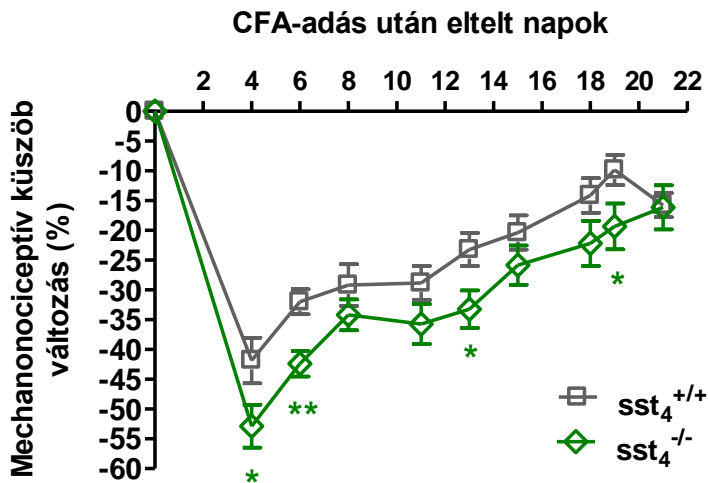
11. ábra: A mechanonociceptív küszöb csökkenése 6 órával az intraplantáris carrageenan injekció után  $sst_4^{+/+}$  és  $sst_4^{-/-}$  egerekben. Az alomtársakkal, valamint a szelektív  $sst_4$  receptor agonista J-2156-tal nyert eredmények is láthatók. A változást a kezdeti kontroll értékek %-ában fejeztük ki. (Az oszlopok az átlag  $\pm$  SEM értékeit jelzik,  $n=6-8$  független kísérlet során; \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$  vs.  $sst_4^{+/+}$  csoport; + $p<0,05$  vs. oldószerrel kezelt  $sst_4^{+/+}$  csoport. Egyutas ANOVA+Bonferroni módosított t-teszt.)



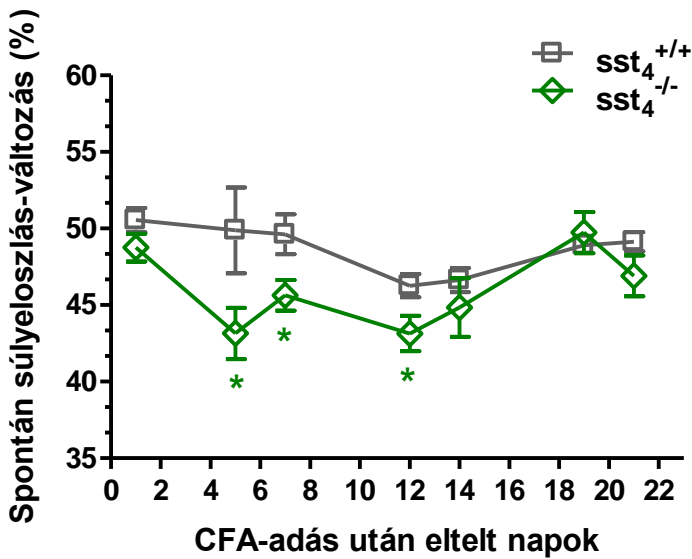
12. ábra: A lábtérfogat emelkedése 6 órával az intraplantáris carrageenan injekció után  $sst_4^{+/+}$  és  $sst_4^{-/-}$  egerekben. Az alomtársakkal, valamint a szelektív  $sst_4$  receptor agonista J-2156-tal nyert eredmények is láthatók. A változást a kezdeti kontroll értékek %-ában fejeztük ki. (Az oszlopok az átlag  $\pm$  SEM értékeit jelzik,  $n=6-8$  független kísérlet során; \*\* $p < 0,01$  vs.  $sst_4^{+/+}$  csoport; egyutas ANOVA+Bonferroni módosított t-teszt.)

### Az $sst_4$ receptor szerepe Freund-adjuvánnal kiváltott krónikus ízületi gyulladásban

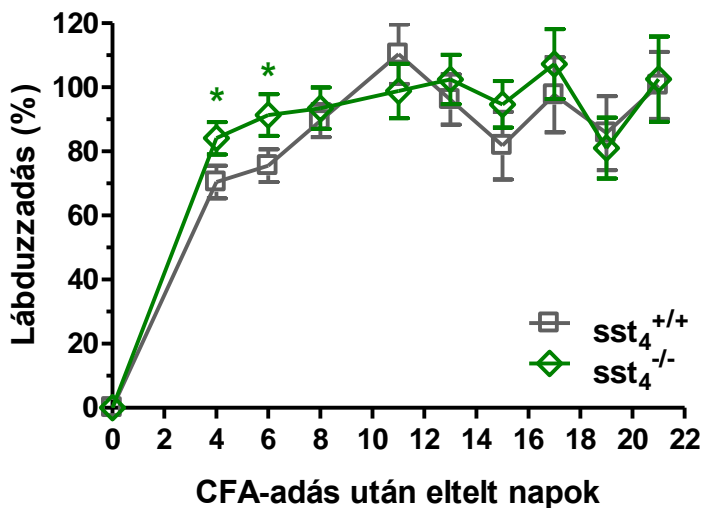
A CFA injekció 4 nap múlva kb. 40% mechanonociceptív küszöbcsökkenést eredményezett, amely a 21 napos kísérleti periódus alatt fokozatosan 15%-ra csökkent. A mechanikai hiperalgécia nagyobb volt a  $sst_4^{-/-}$  állatcsoportban, mint a vad típusúakban, bár szignifikáns különbséget a 21 napos periódus alatt 4 mérési pontban tapasztaltunk (13. ábra). A kísérlet első 12 napjában az  $sst_4$  génhiányos egerek szignifikánsan kisebb mértékben terhelték a kezelt lábukat, mint a vad típusú kontrolljaik (14. ábra). Szignifikáns eltérést a lábduzzadásban csak a 4. és 6. napon tapasztaltunk, a térfogatnövekedés a későbbiekben mindkét csoportban kb. 80-100% volt (15. ábra).



13. ábra: A mechanociceptív küszöb csökkenése a CFA-kezelést követő 21 napos periódusban,  $sst_4^{+/+}$  és  $sst_4^{-/-}$  egerekben. A változást a kezdeti kontroll értékek %-ában fejeztük ki. (A pontok az átlag±SEM értékeit ábrázolják, n=8-12/csoport; \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs.  $sst_4^{+/+}$  csoport. Egyutas ANOVA+ Bonferroni módosított t-teszt.)

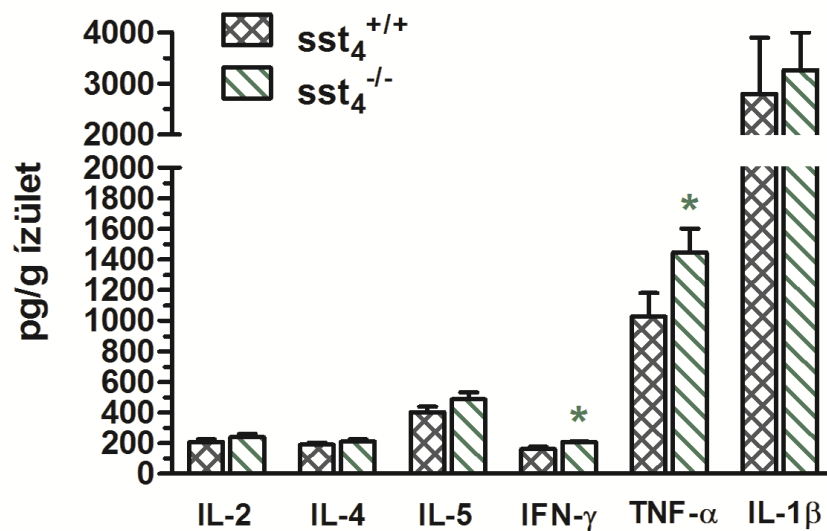


14. ábra: A spontán súlyeloszlás változása a CFA-kezelést követő 21 napos periódusban,  $sst_4^{+/+}$  és  $sst_4^{-/-}$  egerekben. A súlyeloszlás változását a végtagok értékeinek egymáshoz való viszonyításával, %-ban fejeztük ki. (A pontok az átlag±SEM értékeit ábrázolják, n=8-12/csoport; \*p<0,05 vs.  $sst_4^{+/+}$  csoport. Egyutas ANOVA+ Bonferroni módosított t-teszt.)



15. ábra: A lábtérfogat változása a CFA-kezelést követő 21 napos periódus alatt  $sst_4^{+/+}$  és  $sst_4^{-/-}$  egerekben. A változást a kezdeti kontroll értékek %-ában fejeztük ki. (A pontok az átlag±SEM értékeit ábrázolják, n=8-12/csoport; \*p<0,05 vs.  $sst_4^{+/+}$  csoport. Egyutas ANOVA+ Bonferroni módosított t-teszt.)

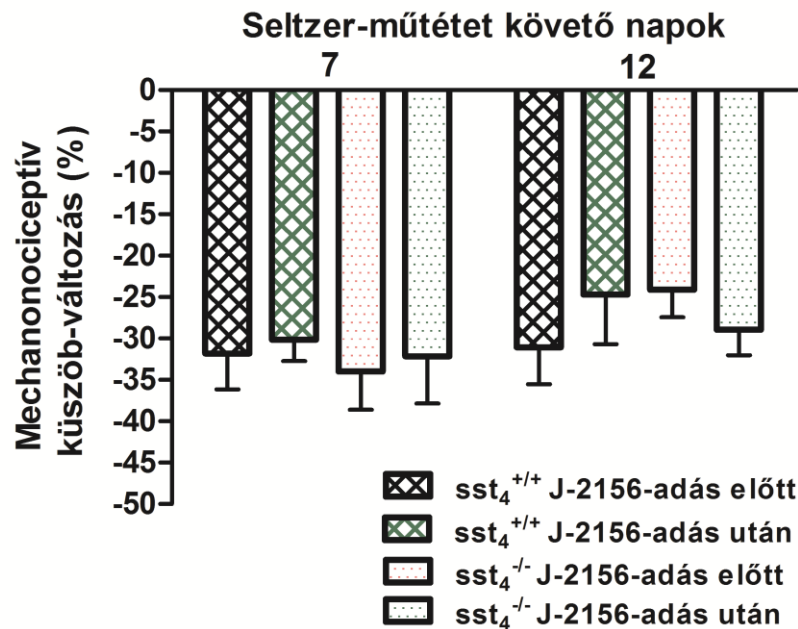
A kísérlet végén kimetszett és feldolgozott ízületi mintákból meghatároztuk az IL-2, IL-4, IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  és IL-1 $\beta$  jelenlétét és mennyiségét. A kapott értékeket az ábrázoláshoz pg citokin/g ízület mennyiségre számítottuk át. Az IL-2, -4 és -5 mennyisége elhanyagolhatónak mutatkozott mindkét állatcsoportban. Figyelemre méltó volt azonban az IFN $\gamma$  mennyiségének alakulása: bár összmennyiségét tekintve szintén igen keveset találtunk belőle (200 pg/g ízület alatt), a receptor génhiányos állatcsoportban még így is szignifikánsan nagyobb mennyiségben volt jelen. Jelentős mennyiséget csak TNF $\alpha$ -ból és IL-1 $\beta$ -ből mértünk. A TNF $\alpha$  koncentrációja a vad típusban kapott 1030 $\pm$ 150 pg/g-mal összehasonlítva szignifikánsan nagyobb, 1450 $\pm$ 150 pg/g volt az *sst*<sub>4</sub><sup>-/-</sup> egerek ízületében. Legnagyobb mennyiségben IL-1 $\beta$ -t találtunk a mintáinkban, azonban ebből a citokinekből mindkét csoportban közel azonos, 3000 $\pm$ 900 pg/g koncentrációkat mértünk (16. ábra).



16. ábra: A gyulladáscitokinek koncentrációja az ízületi homogenizátumokban 21 nappal a CFA-kezelést követően *sst*<sub>4</sub><sup>+/+</sup> és *sst*<sub>4</sub><sup>-/-</sup> egerekben. (Az oszlopok az átlag $\pm$ SEM értékeket ábrázolják; \* $p$ <0,05 vs. *sst*<sub>4</sub><sup>+/+</sup> csoport. Student-féle t-teszt.)

### Az $sst_4$ receptor szerepe traumás mononeuropátiában

A Seltzer-műtétet követő 7. napon kialakult a traumás mononeuropátia, amelynek következtében 31-34% mechanikai hiperalgémia jött létre mind a vad típusú, mind a receptor génhányos egerekben. Ez a hiperalgémia a 12. posztoperatív napra változatlanul fennmaradt a vad típusú egerekben, míg kis mértékben, 24%-ra módosult az  $sst_4^{-/-}$  csoportban. Ebben a modellben a J-2156 hatástalannak bizonyult mindkét állatcsoportban, mindkét mérési időpontban (17. ábra).



17. ábra: A mechanonociceptív küszöb csökkenése 7 és 12 nappal a Seltzer-műtétet követően,  $sst_4^{+/+}$  és  $sst_4^{-/-}$  egerekben, J-2156 adása előtt és után. A változást a kezdeti kontroll értékek %-ában fejeztük ki. (Az oszlopok az átlag $\pm$ SEM értékeit ábrázolják, n=8-12/csoport; Mann-Witney U-teszt.)

## **MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK**

Szomatosztatin sst<sub>4</sub> receptor génhányos egerekkel végzett kísérleteink eredményei elsőként szolgáltatottak közvetlen bizonyítékokat arra, hogy e receptor mind akut, mind krónikus gyulladási folyamatokban protektív szereppel rendelkezik. Mivel sst<sub>4</sub> szelektív antagonistáknak nem elérhető, ezekkel a génhányos állatokkal végzett kísérleteink alapvető fontosságúnak bizonyultak a szomatosztatin sst<sub>4</sub> receptor szerepének felderítésére élettani és kóreltani állapotokban egyaránt.

Szomatosztatin exogén alkalmazása, valamint szintetikus agonisták (a TT-232 és a J-2156) csökkentik a neurogén vazodilatációt, plazma protein extravazációt és a gyulladáskeltő neuropeptidek (SP és CGRP) felszabadulását az idegvégződésekből (Szolcsányi és mtsai. 1998; Helyes és mtsai 2001, 2006; Pintér és mtsai. 2002). Az SST jól ismert hatásai továbbá a proliferáció, infiltráció, kemotaxis, és fagocitózis gátlása valamint a gyulladási sejtekből felszabaduló reaktív oxigén gyökök és citokinek felszabadulásának jelentős mérséklése (van Hagen és mtsai. 1994; Pintér és mtsai. 2002; Muscettola és Grasso 1990; Niedermühlbichler és Wiedermann 1992). Sst<sub>4</sub> expresszió kimutatható a vaszkuláris endotél- és simaizomsejteken (Torrecillas és mtsai. 1999), aktivációjuk védő hatással rendelkezik patkány aorta endotheliumtól való megfosztását követően (Tigerstedt és mtsai. 2007). Sst<sub>4</sub> receptorok jelen vannak továbbá a perifériás vér monocitáin, limfocitáin, fibroblasztokon és endotél sejteken (ten Bokum és mtsai. 1999; Taniyama és mtsai. 2005).

Jelen kísérleteink során mindkét gyulladásmódban szignifikánsan nagyobb mértékű mechanikai hiperalgéziát, azaz fájdalomküszöb-csökkenést, valamint az akut módban szignifikánsan nagyobb lábduzzadást tapasztaltunk az sst<sub>4</sub><sup>-/-</sup> állatok csoportjában, elsősorban a gyulladási folyamatok korábbi stádiumaiban. A krónikus artritisz módban továbbá gyulladt végtag terhelés-csökkenése, és az ízületi homogenizátumban az IFN $\gamma$  és TNF $\alpha$  koncentrációja ugyancsak szignifikánsan nagyobb volt az sst<sub>4</sub> receptor hiánya esetén. A krónikus kísérlet első hetében az sst<sub>4</sub> receptor endogén aktivációjának szignifikáns analgetikus és duzzadásgátló szerep tulajdonítható, ami a későbbi fázisban már nem figyelhető meg. Ennek magyarázatául szolgálhat az az elképzelés, hogy az immunsejtekből felszabaduló egyéb mediátorok a szomatosztatin e gátló hatásait hosszabb idő alatt ellensúlyozzák. Az sst<sub>4</sub> receptor exogén aktivációjának jelentős gyulladásgátló és antinociceptív hatásait bizonyítja, hogy a nem peptid szerkezetű szelektív agonista J-2156 kezelés gátolta az akut gyulladási reakció során kialakuló mechanociceptív



küszöbcsökkenést. A gyulladásmodellekben tapasztalt eredményekkel ellentétben a traumás mononeuropátia okozta mechanikai hiperalgéziát sem az sst<sub>4</sub> receptor genetikai hiánya, sem a J-2156 kezeléssel történő exogén aktivációja nem befolyásolta szignifikánsan. Ez az eredmény abból a szempontból meglepő, hogy patkány ugyanilyen traumás mononeuropátia modelljében ez a vegyület anti-hiperalgetikus hatásúnak bizonyult (Sándor és mtsai. 2006). Ezen ellentmondás magyarázatául szolgálhatnak esetleges faji különbségek a patkány és az egér között a neuropátia kialakulási mechanizmusainak, az sst<sub>4</sub> receptor lokalizációjának/sűrűségének, valamint a J-2156 kinetikai paramétereinek vonatkozásában. A J-2156-tal végzett korábbi kísérletekben ez az agonista hatékonyan gátolt különböző gyulladásos folyamatokat is patkányban, egyrészt a neurogén komponensért felelős SP és CGRP szenzoros idegvégződésekből történő felszabadulásának csökkentésén, másrészt közvetlenül az ereken és az immunsejteken kifejtett gátló hatásokon keresztül. E peptidfelszabadulást gátló mechanizmust izolált tracheán korábban egyértelműen bizonyították (Helyes és mtsai. 2006). Mivel a J-2156 szelektíven csak az sst<sub>4</sub> receptoron fejti ki hatását, nem rendelkezik a natív szomatosztatinra jellemző széleskörű endokrin hatásokkal, mint a növekedési hormon, a glukagon, az inzulin felszabadulásának gátlása, ezek ugyanis főként az sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> és sst<sub>5</sub> receptor altípusokhoz (SRIF1 receptorcsalád) kapcsolhatók (Weckbecker és mtsai. 2003). Mindezek alapján a J-2156 előreláthatóan kedvező mellékhatás spektruma gyógyszerfejlesztés szempontjából is kiemelt jelentőséggel bír.

Bár az sst<sub>4</sub> receptor pontos lokalizációjára vonatkozóan kevés irodalmi adat áll rendelkezésre (Pintér és mtsai. 2006), ezen agonistával nyert funkcionális adatok alapján valószínű, hogy e gátló hatások magukon az érzőideg-végződéseken, valamint az érfali endotélsejteken és a gyulladásos sejteken lévő sst<sub>4</sub> receptor-aktiváción keresztül valósulnak meg. Ez utóbbira direkt *in vitro* bizonyítékot is szolgáltatottak a peritoneális makrofágok IL-1 $\beta$ -termelésének gátlásával (Elekes és mtsai. 2008).

Reményeink szerint a szomatosztatin sst<sub>4</sub> receptoron ható új hatásmechanizmusú szerek az eddig alkalmazottaknál sikeresebben befolyásolnák e betegségek progresszióját, kedvezőbb mellékhatásprofil mellett. Jelenleg elkezdtük a kollagén-ellenes antitesttel indukált reumatoid artritisz, a meniszejektómiával kiváltott oszteoartritisz, és az oxaliplatinnal indukált toxikus polineuropátia modellek beállítását, valamint az sst<sub>4</sub> receptorok szerepének és a J-2156 hatásainak ezekben az emberi patofiziológiai állapotokhoz még közelebb álló rendszerekben történő vizsgálatát.

## 2. fejezet: A szomatosztatin és kortisztatin hatásainak összehasonlítása gyulladás- és fájdalommodellekben

Az eredmények eredeti közlemény formájában történt publikációja:

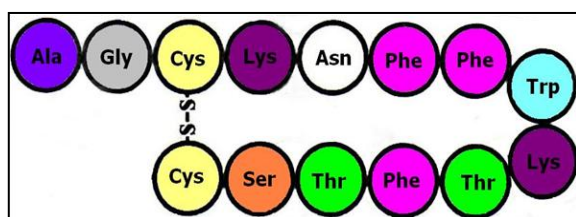
Markovics A, Szőke E, Sándor K, Börzsei R, Bagoly T, Kemény A, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. (2011) Comparison of the Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Effects of Cortistatin-14 and Somatostatin-14 in Distinct In Vitro and In Vivo Model Systems. *J Mol Neurosci.* 46(1):40-50.

### ELŐZMÉNYEK, IRODALMI HÁTTÉR

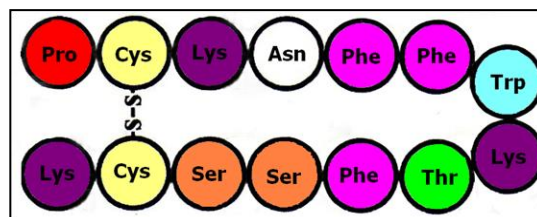
#### A kortisztatin és szerepe a nocicepcióban és gyulladásos folyamatokban

A kortisztatin (CST) szerkezetileg a szomatosztatinhoz nagyon közel álló neuropeptid, mely nevét túlnyomóan agykérgi expressziójáról és neuronális aktivitást gátló hatásáról kapta. A CST-nek is különböző biológiailag aktív formáit ismerjük: 14 (CST-14) és 17 (CST-17) aminosavat tartalmazó formái patkány, egér és emberi szövetekben is előfordulnak, 29 aminosavból felépülő formája (CST-29) pedig patkányban és emberben (Spier és de Lecea 2000; Ferone és mtsai. 2006) mutatható ki.

A szomatosztatin és a kortisztatin egyaránt prepropeptid formájában szintetizálódik, végleges formájuk ezt követően alakul ki. Génjeik egy közös ősgén duplikációja eredményeként jöttek létre (Tostivint és mtsai. 2006). A CST-14-nek 11 aminosava megegyezik az SST-14-ével (18., 19. ábra), többek között a két cisztein, melyek valószínűleg a peptid ciklikus szerkezetéért felelősek, valamint az FWKT régió (Phe, Trp, Lys, Thr), amely kulcsfontosságú az sst receptorokhoz való kötődésben (Spier és de Lecea, 2000).



18. ábra: A szomatosztatin-14 aminosav szerkezete



19. ábra: A kortisztatin-14 aminosav szerkezete

Kimutatták, hogy a CST képes mind az öt ismert sst receptorhoz való kötődésre (Criado és mtsai. 1999). Neuronális aktivitást gátló hatása megegyezik a szomatosztatinéval. Az i.c.v. beadott CST-14 a lokomotoros aktivitást csökkenti (Criado és mtsai. 1999), ugyanakkor a nagyobb dózisban (10 µg) alkalmazott CST görcsöket váltott ki, ami az SST-14 injekciót követően is megfigyelt jelenség. Valószínű tehát, hogy a CST in vivo is képes az sst receptorokon hatni (Lecea 2008). A CST azonban az SST-től eltérően lassú hullámú alvást indukál, amely elsősorban az acetilkolin kérgi excitátoros hatásának csökkentésével jön létre. A CST mRNS expressziója cirkadián ritmust követ, és alvásmegvonás esetén fokozódik, mely ugyancsak arra utal, hogy a CST alvást moduláló neuropeptid is (Spier és de Lecea 2000). Az endogén kortisztatin a szomatosztatinnal ellentétben stimulálja a prolaktin szekrécióját, CST génhiányos egerekben a keringésben lévő prolaktin szintje jelentősen csökkent (Córdoba-Chacón és mtsai. 2011). Friss kutatások a CST protektív szerepét mutatják a vaszkuláris kalcifikációval szemben patkányban, ami GHS-R1 receptoron keresztül valósulhat meg (Liu és mtsai. 2010). Perifériás hatásait tekintve a CST-14 az SST-14-hez hasonlóan rendkívül hatásos gyulladásgátló (Ferone és mtsai. 2006), gátolja a Th1 sejtek proliferációját és a gyulladáskeltő citokinek (IL-2 és IFN $\gamma$ ) felszabadulását, továbbá elősegíti a gyulladást gátló mediátorok (IL-10, IL-1Ra) termelését (Gonzalez-Rey és mtsai. 2006b; Rubio és mtsai. 2007; Delgado és Ganea 2008). A CST SST-től eltérő biológiai hatásai alapján egy CST-specifikus receptor létezését feltételezik (Spier és de Lecea 2000). Bár a CST gyulladáshoz vezető sejtes komponenseire kifejtett gátló hatása jól ismert (Ferone és mtsai. 2006), nagyon keveset tudunk az érzőidegekre, neurogén gyulladásra és hiperalgéziára gyakorolt hatásairól.

## CÉLKITŰZÉSEK

Munkám e fejezetének célkitűzése a CST és SST hatásainak szisztematikus összehasonlítása volt gyulladáshoz vezető folyamatok jól definiált *in vitro* és *in vivo* mechanizmus modell-rendszereiben. Az összehasonlítás szempontjai voltak: kompetitív receptor kötődési, és receptor aktivációs vizsgálatok, szenzoros neuropeptidok felszabadulására kifejtett hatás, stimulált peritoneális makrofágok IL-1 $\beta$  termelésének vizsgálata, neurogén gyulladás vizsgálata patkány lábháti bőrén, carrageenannel kiváltott mechanikai hiperalgéria, akut lábduzzadás és gyulladáshoz vezető citokinek termelésének vizsgálata, valamint enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgéria vizsgálata.

## KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

### **Kísérleti állatok**

Az *in vivo* kísérleteket hím CD1 egereken (25-30 g) és Wistar patkányokon (150-250 g) végeztük, az *in vitro* peptidfelszabadulási vizsgálatokhoz Wistar patkányok tracheáit használtuk. Az állatokat a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének Laboratóriumi Állatházában tartottuk és szaporítottuk 24-25 °C-on, normál étellel és vízzel *ad libitum* ellátva.

Minden kísérleti eljárás és vizsgálat megfelelt a Helsinkai Nyilatkozatban foglalt ajánlásoknak és eleget tett az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998 (XII. 31.) számú kormányrendelet előírásainak. A kísérleti eljárásokat a Pécsi Tudományegyetem állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: BA 02/2000-11-2006).

### **-Kompetitív receptor kötődési vizsgálatok**

Sst<sub>4</sub> és sst<sub>1</sub> receptorokat stabilan expresszáló CHO sejteket (CHO-sst<sub>4</sub>, CHO-sst<sub>1</sub>) állítottunk elő és vizsgáltunk kompetitív kötődési vizsgálatokban. A sejteket 24 lyukú tenyésztőlemezekben növesztettük egy éjszakán át. Másnap a konfluens sejttenyészetet (a tenyésztőedény alját egy rétegben benövő sejttenyészetet) kétszer átmostuk 10 mM HEPES-t, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-et, 5 mM MgCl<sub>2</sub>-t, 150 mM NaCl-t, 1 % borjú szérum albumint tartalmazó assay pufferrel. A sejteket 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk 1 ml assay pufferben, amely 1 mg/ml bacitracint és 10 nM [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>11</sup>]SST-14-et (általunk történő jelölés 125-ös I izotóppal) tartalmazott. A sejteket ezzel egyidőben emelkedő koncentrációjú (10<sup>-9</sup>- 10<sup>-5</sup> M)

CST-14-el inkubáltuk. A 30 perc letelte után a sejteket kétszer mostuk jéghideg assay pufferrel, majd lizáltuk 1 ml oldatban, mely 8M ureát és 3M ecetsavat tartalmazott. A lizátumot tartalmazó oldat radioaktivitását  $\alpha$  számlálóval mértük (Engström és mtsai. 2005).

#### ***-Receptor aktiváció vizsgálata: [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötődési teszt***

A CHO-sst<sub>4</sub> és CHO-sst<sub>1</sub> sejteket homogenizáltuk, és membránfrakciókat készítettünk Tris-EGTA pufferben (50 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, pH 7.4). A membrán frakciókat (10  $\mu$ g fehérje/minta) 30 °C-on inkubáltuk 60 percig, ugyanabban a Tris-EGTA pufferben. A puffer [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-t (0,05 nM) és emelkedő koncentrációjú SST-14-et és CST-14-et (10<sup>-9</sup>- 10<sup>-5,5</sup> M) tartalmazott. A végtérfogot 500  $\mu$ l volt, a GDP koncentrációja 30  $\mu$ M volt. A reakciót a minták Whatman GF/B filteren való átszűrésével állítottuk meg. A filtereket 48 lyukú Slot Blot szűrőbe fogtuk, ezen keresztül a mintákat háromszor mostuk jéghideg 50 mM Tris-HCl pufferrel (pH 7.4). A filterpapír megszáradása után (60 perc, 37 °C) a membránfrakciókat tartalmazó filterdarabkákat kivágtuk, szcintillációs folyadékba helyeztük, ezek radioaktivitását Packard Tri-Carb 2800 TR szcintillációs számlálóval mértük (Packard, USA). A nem-specifikus kötődést 10  $\mu$ M jelöletlen GTP $\gamma$ S jelenlétében, a teljes kötődést a tesztanyag hiányában határoztuk meg. A specifikus kötődés meghatározásához a teljes kötődésből kivontuk a nem-specifikus kötődést. Az SST-14 és CST-14 által indukált G-protein aktivációt az agonista hiányában megfigyelt specifikus [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötődés százalékában adtuk meg (Bojnik és mtsai. 2009).

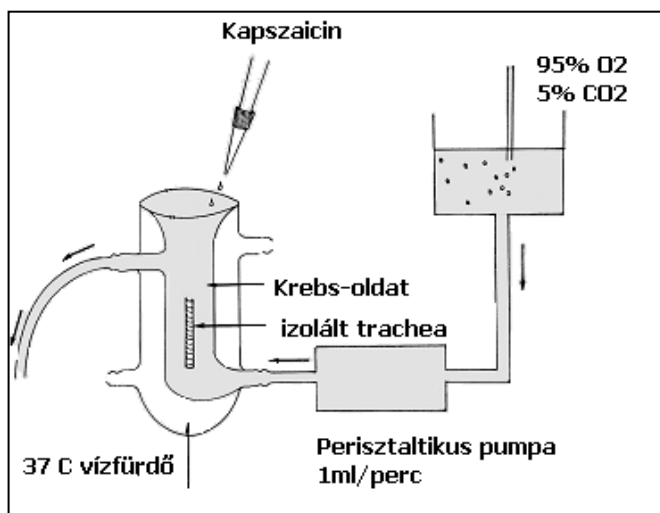
#### ***-Stimulált peritoneális makrofágok interleukin-1 $\beta$ szintézisének vizsgálata***

Hím CD1 egereket Salmonella typhimurium endotoxinnal (lipopoliszacharid, LPS, 300  $\mu$ g/ml, 300  $\mu$ l) kezeltünk intraperitoneálisan. Az LPS IL-1 $\beta$ -felszabadulást okoz a Toll-like receptor aktivációjával (Ulich és mtsai. 1990). 4 órával később az állatokat éter anesztézia alatt kivérettük, majd a hasüreget átmostuk 2,5 ml jéghideg sejttenyésztő médiummal (RPMI 1640 10% fetal calf serummal kiegészítve). Ezáltal a peritoneum üregéből összegyűjtöttük a gyulladós sejteket, melyek főleg makrofágok ebben az időpontban. Ezután a peritonális mosófolyadék-mintákból 100-100  $\mu$ l-t pipettáztunk 800  $\mu$ l sejttenyésztő médiumra 24 lyukú lemezen. A makrofágok stimulálására további 1  $\mu$ l 1  $\mu$ g/ml LPS oldatot adtunk minden lyukhoz. A kontroll kísérletek esetében 100  $\mu$ l fiziológiás sóoldatot, más esetekben 100  $\mu$ l SST-14-et vagy CST-14-et adtunk az 1, 10 és 100  $\mu$ g/ml-es oldatokból a

lyukakba, hogy a vizsgálni kívánt vegyületek 0,1; 1 és 10 µg/ml-es végső koncentrációját elérjük. Az *in vivo* LPS stimuláció széles körben használt nagyobb mennyiségű pre-aktivált peritoneális makrofág begyűjtésére, az *in vitro* LPS inkubáció célja a további stimulálás és citokin termeltesítés (Kang és mtsai. 2002). Az így előkészített sejtenyészítő lemezeket 8 órán át inkubáltuk, 37 C°-on, 5% CO<sub>2</sub> koncentráció mellett. Ezt követően minden lyuk tartalmát leszívtuk, centrifugáltuk 10 percig, 10.000 fordulat/perc fordulatszámom, majd a sejteket flow cytometer (CyFlow Space, Partec) segítségével azonosítottuk. Az IL-1β koncentrációját szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg (BD Biosciences, USA).

**-Kapszaicinnel kiváltott szenzoros neuropeptid felszabadulás vizsgálata izolált patkány trachea érzőideg végződéseiből**

Hím patkányok mély (thiopental, 40 mg/kg i.p.) anesztézia alatti kivéreztetését követően a trachea teljes egészében eltávolításra került. A trachea azért jó modellszerv szenzoros neuropeptid-felszabadulás vizsgálatára, mert nagyon gazdag kapszaicin-érzékeny innervációval rendelkezik és a végződések közel vannak a felszínhez, így könnyen stimulálhatók. A szerveket a zsírtól és a kötőszövettől megtisztítottuk. Két patkányból



**20. ábra: A trachea perfúziós rendszer vázlatos rajza**

származó légsövet ugyanazon szervfürdőbe helyeztünk az elegendő mennyiségű peptid felszabadulásának elérése érdekében, majd a tracheákat 60 percig (kiegyenlítődési periódus) perfundáltuk (1 ml/min) 7.2 pH-jú, oxigenizált Krebs oldattal 37 °C-on (**20. ábra**). Az áramlás megszakítása után az oldatot 3-szor cseréltük 8 percenként, hogy stimuláció előtti, stimulált és stimuláció utáni frakciókat nyerjünk. A második 8 perces periódusban kapszaicin

stimulációt ( $10^{-6}$  M) alkalmaztunk a neurotranszmitter felszabadulás kiváltására. A CGRP koncentrációkat a szervfürdők 200 µl volumenű mintáiból határoztuk meg a laborunk által kifejlesztett és leírt radioimmunoassay módszerrel (Németh és mtsai. 1996, 1998; Helyes és mtsai. 1997). Minden frakció kezdetén SST-14-et, CST-14-et vagy fiziológiás sóoldatot adtunk az inkubációs médiumhoz. A hozzáadott vegyületek koncentrációja 10-2000 nM volt a

különböző kísérletekben, ugyanazon trachea esetében csak egy koncentrációt alkalmaztunk a neuropeptid depléció elkerülése érdekében.

#### ***-Mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladás vizsgálata patkány lábháti bőrén***

Altatott patkányok (thiopental, 40 mg/kg i.p.) mindkét oldali n. saphenusát és n. ischiadicusát átvágtuk 30 perccel a kísérletet megelőzően, hogy megakadályozzuk a mustárolaj nociceptív hatásából adódó reflexválaszokat. Az akut neurogén gyulladást a lábháti bőr 1%-os mustárolajjal (paraffinolajban oldva) való bekenésével váltottuk ki. A plazmafehérje-kiáramlás mértékét az Evans kék akkumuláció módszerével határoztuk meg (**21. ábra**). Tíz perccel a mustárolajjal történő kenés előtt intravénásan 50 mg/kg Evans kék festéket adtunk,



**21. ábra: Evans-kék akkumulációja patkány lábháti bőrén**

amely erősen kötődik albuminhoz és a plazma extravazáció helyén akkumulálódik a gyulladt szövetekben. Húsz perccel a gyulladás kiváltása után az állatokat elvégeztettük és a kimetszett bőrterületek festéktartalmát formamidban extraháltuk 72 órán keresztül, szobahőmérsékleten. Az oldat optikai denzitását, amely a gyulladás intenzitásával egyenesen arányos, spektrofotométerrel határoztuk meg 620 nm-en. Az akkumulálódott

Evans kék mennyiségét  $\mu\text{g/g}$  nedves szövetre vonatkoztattuk (Helyes és mtsai. 1997, 2006). 20 perccel a gyulladás kiváltásának kezdete előtt SST-14-et, CST-14-et ( $10 \mu\text{g/kg}$ ,  $0,1 \text{ ml}/100 \text{ g}$  a  $10 \mu\text{g/ml}$ -es oldatból) vagy a kontroll csoport esetében fizioiógias sóoldatot adtunk a hasüregbe. Ezt a dózist a korábban ugyanebben a modellben SST-vel és szintetikus  $\text{sst}_4$  agonistákkal nyert adatok alapján választottuk (Helyes és mtsai. 2001, 2006).

#### ***-Carrageenannel kiváltott mechanikai hiperalgéria és akut lábduzzadás mérése egérben, valamint gyulladósos citokinek mérése a talpbőr homogenizátumokból***

Hím CD1 egerek hátsó talpába  $50 \mu\text{l}$  3%-os carrageenan oldatot injektáltunk ketamin–xylazin ( $100 \text{ mg/kg}$  és  $5 \text{ mg/kg}$  i.p.) anesztézia alatt. 15 perccel a gyulladás kiváltását megelőzően valamint minden mérés előtt is, SST-14, CST-14 ( $100 \mu\text{g/kg}$  i.p.,  $0,1 \text{ ml}/10 \text{ g}$  a  $10 \mu\text{g/ml}$ -es oldatból) vagy a kontroll csoportban oldószer (fiz.sóoldat) beadása történt. A mechanonociceptív küszöb mérését 1, 2, 4, 6 és 23 órával a carrageenan adás után, a

lábduzzadás mérését 6 órával a gyulladás kiváltása után végeztük. Az alkalmazott dózist az ebben a modellben nyert korábbi eredményeink alapján választottuk.

A talp mechanonociceptív küszöbének meghatározását az 1. részben bemutatott Ugo Basile dinamikus plantáris eszteziométerrel végeztük. A lábak térfogatát a már szintén korábban bemutatott Ugo Basile pletizmométerrel mértük a gyulladás kiváltása előtt és 6 órával később. 24 órával a gyulladás kiváltását követően ketamin-xylazin altatás alatt cervikális diszlokációt végeztünk, majd a talpbőrt kimetszettük és tömegét megmértük. A mintákat ezután folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a későbbi feldolgozásig. A feldolgozás során a mintákat 1 ml-nyi 990  $\mu\text{l}$  RPMI 1640-t és 10  $\mu\text{l}$  PMSF proteáz gátlót tartalmazó pufferben 2 percen keresztül homogenizáltuk 21.000 fordulatszámon, Micra D-9 homogenizátorral (Art-moderne Labortechnik, Németország). Ezt követően a mintákat lecentrifugáltuk (10 perc, 5 C, 12.500 rpm) majd a felülúszókat összegyűjtöttük és  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a gyulladáscitokin koncentrációk meghatározásáig. Az IL-1 $\beta$  és TNF $\alpha$  koncentrációját szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg (BD Biosciences, USA és R&D Systems, USA), a minták optikai denzitását 450 nm-en spektrofotométerrel mértük. A citokinek koncentrációját pg/g nedves szövetre vonatkoztattuk.

### ***-Enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgéria vizsgálata patkányban***

Hím patkányok (150-250 g) hátsó végtagjának fájdalmas hőküszöbét laboratóriumunk és az Experimetria Kft. (Budapest, Magyarország) által kidolgozott és validált emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mértük (Bölcskei és mtsai. 2007) (**22. ábra**). A készülék alkalmas a fájdalmas hőküszöb meghatározására, ami az a legalacsonyabb hőmérséklet, melynél az állat visszarántja a vízfürdőbe merített lábát. A vízfürdő hőmérséklete  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ról indul és fokozatosan  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ig emelkedik  $0,4\text{ }^{\circ}\text{C/s}$  sebességgel. Az állatokat lazán, de stabilan tartjuk, egyik hátsó lábukat a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőbe merítjük, majd elindítjuk a hőmérsékletemelést.



**22. ábra: Emelkedő hőmérsékletű vízfürdő**

A termociceptív küszöb elérésénél, amikor az állat kihúzza a lábát, a hőmérséklet emelkedését egy pedál segítségével azonnal leállítjuk és a megfelelő vízhőmérsékletet a digitális kijelzőről leolvassuk. Az enyhe hőtrauma kiváltásához a



kontrollméréseket követően az állatok egyik hátsó lábát éterbódításban 51°C-os állandó hőmérsékletű vízfürdőbe mártottuk 20 másodpercre, majd ismételt méréseket végeztünk. Az első mérés 20 perccel a hőtrauma után történt, ezzel igazoltuk a termális hiperalgémia kialakulását. Ezt követően SST-14-et, CST-14-et vagy a kontroll csoport esetében fiziológiás sóoldatot alkalmaztunk az egyik állatcsoportnál i.p.(100 µg/kg, 0,1 ml/100g a 100 µg/ml-es oldatból), a másikon intraplantárisan (i.pl.; 100 µl, 250 µg/ml-es oldatból). Ezután a hőküszöbököt 80 percen keresztül ismételten mértük 20 percenként. Az anyagok dózisa és koncentrációi korábbi akut gyulladásmodellekben nyert eredményeink alapján kerültek meghatározásra és alkalmazásra.

### **Felhasznált anyagok**

A CST-14, SST-14, GDP, GTPγS, LPS, RPMI 1640, PMSF, kapszaicin, mustárolaj, carrageenan és a sejt kultúrához használt anyagok beszerzése a Sigma-Aldrich Kft.-től történt (Magyarország). A I<sup>125</sup> izotóp és a [<sup>35</sup>S]GTPγS az Izotóp Intézetből származott (Budapest). A Tris-EGTA gyártója a Reanal (Magyarország). A Whatman GF/B filtereket a Whatman Kft.-től vásároltuk (Egyesült Királyság). Slot Blot szűrőt a Cleaver Scientific-től, borjúszérumot (fetal calf serum) a Gibco-tól (Németország) vásároltunk. A ketamin forrása a Richter-Gedeon Nyrt. (Magyarország), a xylaziné az Eurovet Animal Health (Hollandia). A formamid a Szkarabeusz Kft-től (Magyarország), a thiopental a Sandoz-tól (Ausztria) származik.

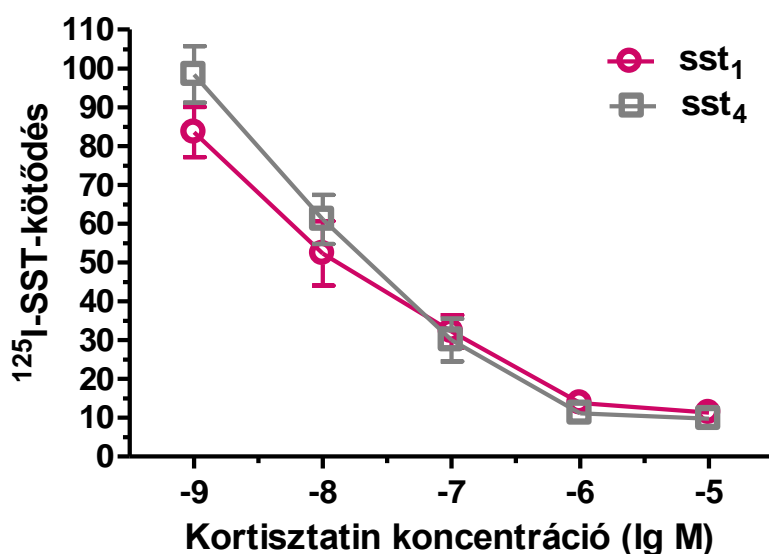
### **Statisztikai analízis**

A statisztikai értékelést egyutas és kétutas ANOVA+Bonferroni módosított t-tesztel végeztük az SST-14/CST-14 hatásainak mind a kontroll, fiziológiás sóoldattal kezelt csoporthoz, mind egymáshoz viszonyított kimutatásánál. Minden esetben a p<0,05 értéket tekintettük szignifikáns eltérésnek.

## EREDMÉNYEK

### A kortisztatin $ss_{t1}$ és $ss_{t4}$ receptorokhoz való kötődési képessége

A CST-14  $ss_{t4}$  és  $ss_{t1}$  receptorokhoz való kötődési képességét a [ $^{125}$ I-Tyr $^{11}$ ]SST-14 leszorítási tesztben vizsgáltuk. A növekvő koncentrációban ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) alkalmazott CST-14 leszorította a 10 nM radioaktívan jelölt SST-14-et mind a CHO- $ss_{t4}$ , mind a CHO- $ss_{t1}$  sejtekről, koncentrációfüggő módon. A maximális gátlást a  $10^{-6}$  M CST eredményezte (98,4%) az  $ss_{t4}$  sejtek esetében, és ugyanez a koncentráció a CHO- $ss_{t1}$  sejteknél (83,6%). Az IC $_{50}$  érték 12 és 18 nM volt mindkét sejtípus esetén, a CST-14 és SST-14 hasonló affinitását jelezve e receptorokhoz (23. ábra).

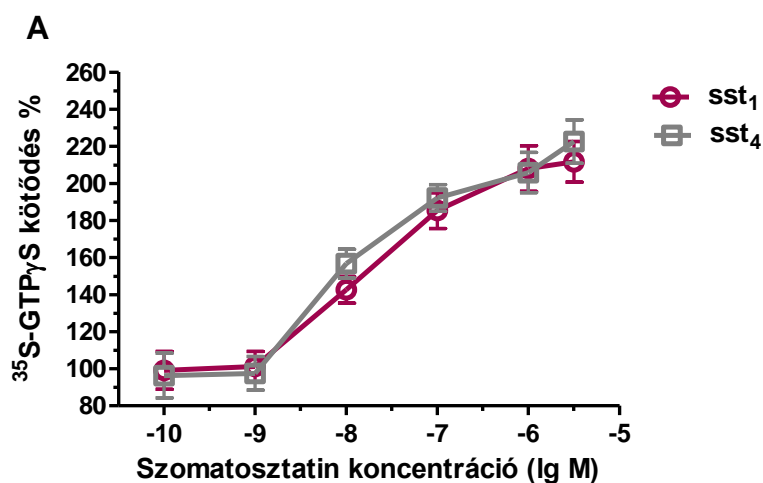


23. ábra:  $^{125}$ I-SST kötődés CST-14 jelenlétében az  $ss_{t1}$  és  $ss_{t4}$  receptorokon. A pontok az átlag $\pm$ SEM értékeit ábrázolják, n=3 független kísérlet esetén. (Egyutas ANOVA+Bonferroni módosított t-teszt.)

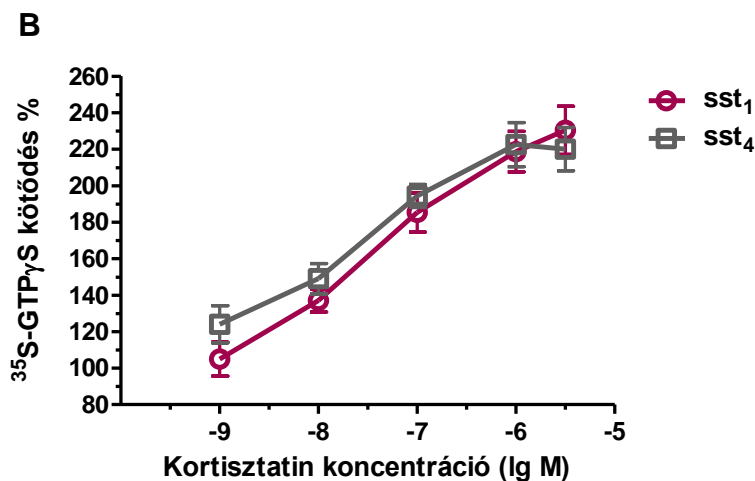
### A kortisztatin és szomatosztatin által kiváltott G-protein aktiváció

Az SST-14 és CST-14 által kiváltott  $ss_{t1}$  és  $ss_{t4}$  receptorokhoz kapcsolódó G-protein aktivációt a ligand-stimulált [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S kötődési tesztel vizsgáltuk, mely megfelel az agonistával kiváltott GDP-GTP kicserélődésnek a G-proteinek  $\alpha$  alegységén. Mindkét peptid emelkedő koncentrációja a [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S kötődés fokozódását eredményezte, koncentrációfüggő módon. EC $_{50}$  értéként azt a ligandkoncentrációt határoztuk meg, mely a maximális válasz 50%-át produkálja. Az SST-14 esetében ez az érték 10 nM volt a CHO- $ss_{t4}$  sejteken és 13 nM a CHO- $ss_{t1}$  sejteken. A CST-14 EC $_{50}$  értékei 33 nM és 28 nM voltak a

CHO-*sst*<sub>4</sub> és CHO-*sst*<sub>1</sub> sejteken. A maximális aktiváció értéke a [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S kötődés fokozódásának a bazális aktivitáson túli százaléka. SST-14 kezelésnél a maximális aktiváció 218% és 204% voltak a CHO-*sst*<sub>4</sub> és CHO-*sst*<sub>1</sub> sejteken. A CST-14 megfelelő értékei 223 és 218% voltak, a két peptid hasonló hatékonyságát jelezve (24. ábra A, B).



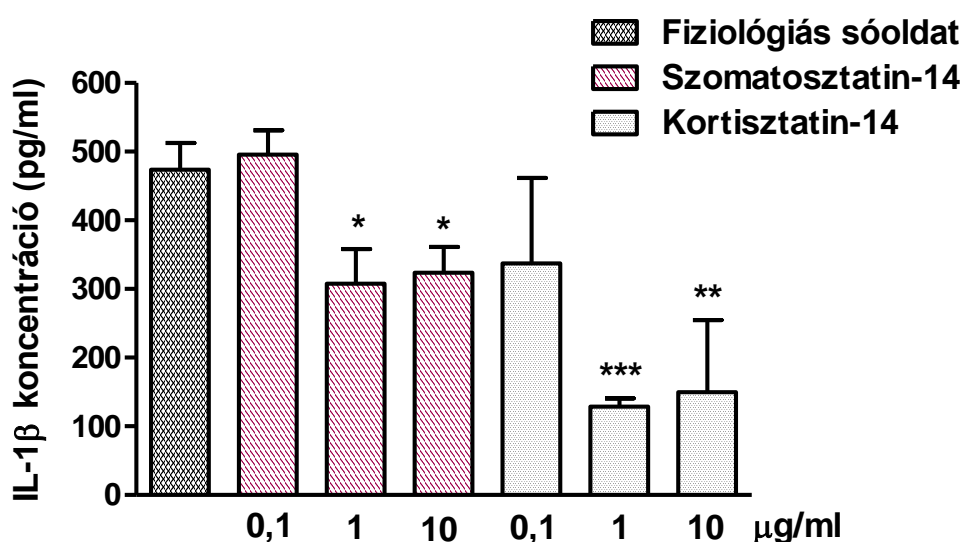
**24.A ábra: SST-14 hatása az *sst*<sub>1</sub> és *sst*<sub>4</sub> receptorokhoz kapcsolt G-protein aktivációra.** A mérési pontok az átlag±SEM értékeit ábrázolják, n=3 független kísérlet során. (Egyutas ANOVA+Bonferroni módosított t-teszt.)



**24.B ábra: CST-14 hatása az *sst*<sub>1</sub> és *sst*<sub>4</sub> receptorokhoz kapcsolt G-protein aktivációra.** A mérési pontok az átlag±SEM értékeit ábrázolják, n=3 független kísérlet során. (Egyutas ANOVA+Bonferroni módosított t-teszt.)

### A szomatosztatin és kortisztatin hatása stimulált peritoneális makrofágok interleukin-1 $\beta$ szintézisére

Az IL-1 $\beta$  koncentrációja a peritoneális makrofág tenyészetben  $473,76 \pm 38,81$  pg/ml volt a kontroll csoportban, 100  $\mu$ l fiziológias sóoldatot alkalmazva. 0,1  $\mu$ g/ml SST-14 vagy ugyanennyi CST-14 jelenléte nem befolyásolta e gyulladáscsökkentő citokin mennyiségét. Ugyanakkor a peptidek magasabb koncentrációja (1 és 10  $\mu$ g/ml) szignifikánsan csökkentette az IL-1 $\beta$  termelést: az SST-14 kb. 33-35% csökkenést, a CST-14 jelentősebb, kb. 70-75%-os citokintermelődés-csökkenést idézett elő. Koncentráció-válasz összefüggést nem figyeltünk meg ebben a dózistartományban (25. ábra).

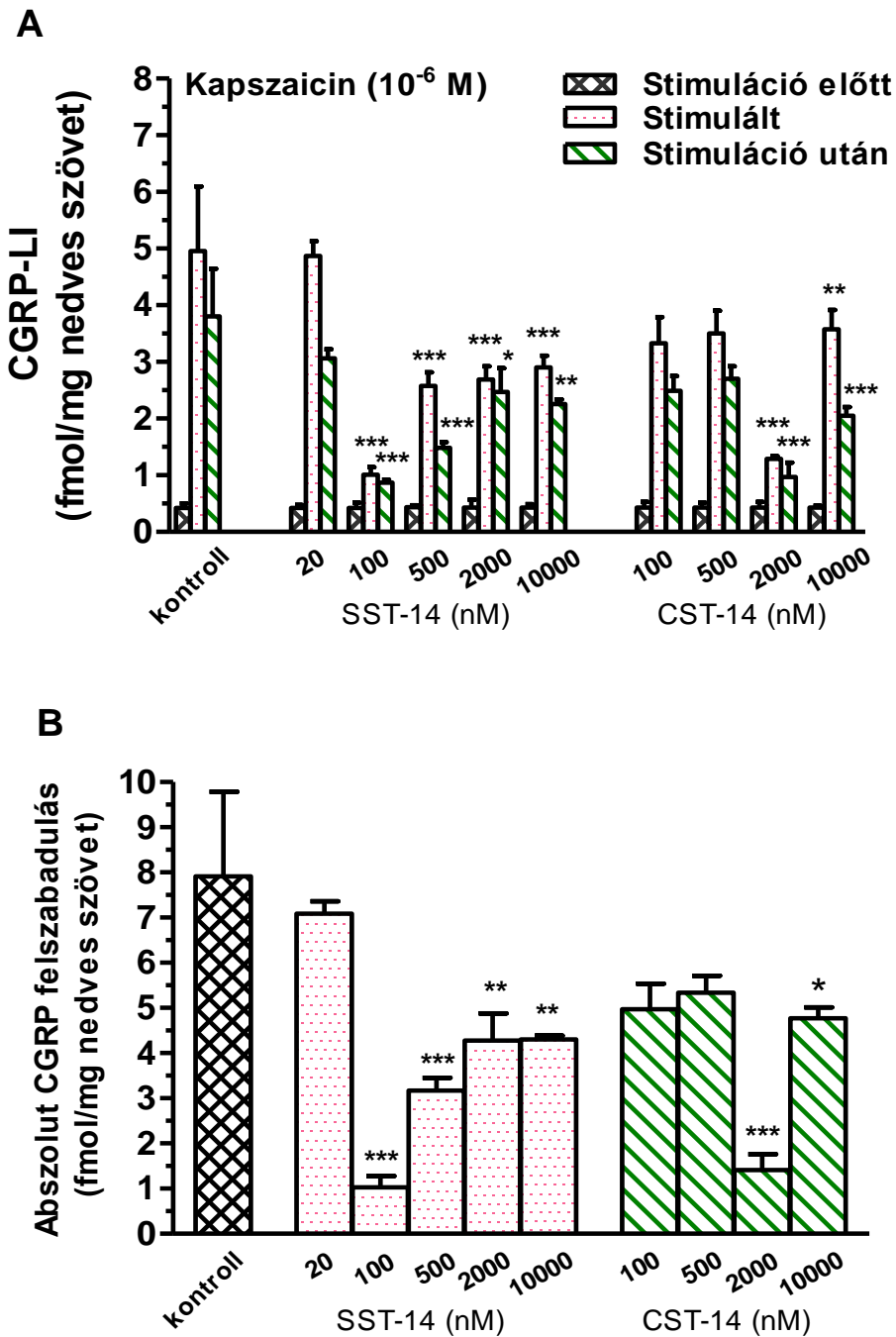


25. ábra: A szomatosztatin-14 és a kortisztatin-14 hatása stimulált peritoneális makrofágok IL-1 $\beta$  szintézisére. Az egyes oszlopok az  $\text{átlag} \pm \text{SEM}$  értékeit ábrázolják,  $n=6-24$  független kísérlet során. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. kontroll, fiz.sóoldattal kezelt csoport; egyutas ANOVA+ Bonferroni módosított t-teszt.)

### A szomatosztatin és kortisztatin hatása izolált patkány trachea érzőideg-végződéseiből kapszaicinnal kiváltott szenzoros neuropeptid-felszabadulásra

A nedves szövettömegre vonatkoztatott CGRP felszabadulás  $0,43 \pm 0,08$  fmol/mg-ról  $4,96 \pm 1,14$  fmol/mg-ra emelkedett a  $10^{-6}$  M kapszaicin stimuláció hatására. Az SST-14 és a CST-14 is szignifikáns mértékben gátolta a stimuláció-kiváltott CGRP felszabadulást. A koncentráció növelésével a hatás egyik esetben sem fokozódott, sőt, a legnagyobb gátlást a legkisebb SST koncentráció eredményezte. A  $2 \mu$ M CST-14 és 100 nM SST-14 gátló hatása hasonló mértékű volt, 85 és 87%. Maximális gátló hatásnak ezeket tekinthetjük, magasabb

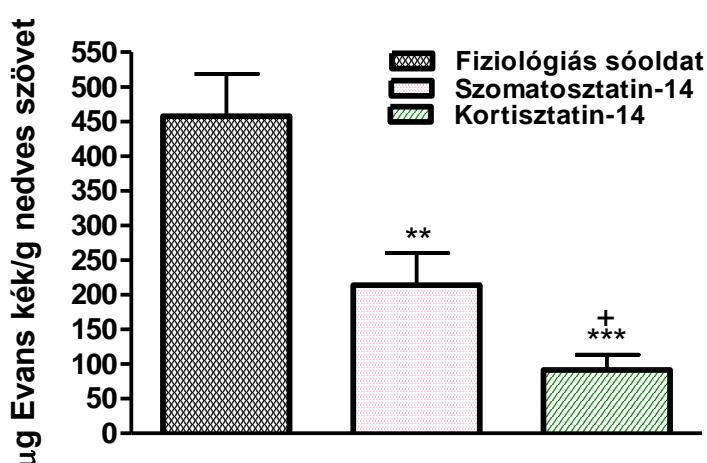
koncentrációkban mindkét peptid kisebb hatással rendelkezett. Egyik peptid sem befolyásolta a bazális, stimuláció nélküli CGRP felszabadulást (26. ábra).



26. ábra: A szomatosztatin-14 és kortisztatin-14 hatása a kapszaicinnel kiváltott CGRP felszabadulásra. *A*: a peptidfelszabadulás értékei szeparáltan mérve a három 8-perces frakcióban. *B*: Az abszolút peptidfelszabadulás a szenzoros rostok kémiai stimulációját követően. Kontrollként Krebs oldatot használtunk SST-14 vagy CST-14 nélkül. Az oszlopok az  $\text{átlag} \pm \text{SEM}$  értékeit ábrázolják,  $n=5$  független kísérlet során. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. kontroll; kétutas ANOVA+Bonferroni módosított t-teszt.)

### A szomatosztatin és kortisztatin hatása a mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladásra patkány lábháti bőrében

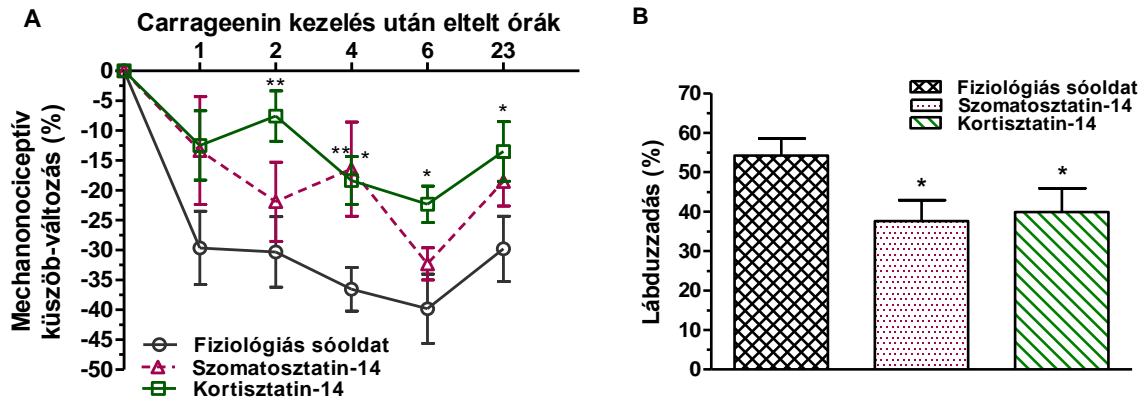
Mind az SST-14, mind a CST-14 szignifikánsan csökkentette a mustárolajjal kiváltott plazmafehérje-kiáramlást 20 perccel a gyulladást okozó stimulus helyi alkalmazását követően (27. ábra). A mustárolaj ebben az 1%-os koncentrációban szelektíven aktiválja a TRPA1 ioncsatornákat a szenzoros idegvégződéseken (Jordt és mtsai. 2004), így ez az akut válasz tisztán neurogén folyamatnak tekinthető (Inoue és mtsai. 1997; Bánvölgyi és mtsai. 2004). Az SST-14 kb. 60%-os, a CST-14 jelentősen nagyobb mértékű, majdnem 80% gátló hatást fejtett ki.



27. ábra: A szomatosztatin-14 és kortisztatin-14 hatása a mustárolajjal kiváltott neurogén gyulladásra patkány lábháti bőrében. Az Evans kék akkumulációja i.p. SST-14 vagy CST-14 előkezelést követően a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva. Az oszlopok az  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  értékeit ábrázolják,  $n=6-8$  patkány/csoport esetén. (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. kontroll, † $p < 0,05$  vs. SST-14. Egyutas ANOVA+Bonferroni módosított t-teszt.)

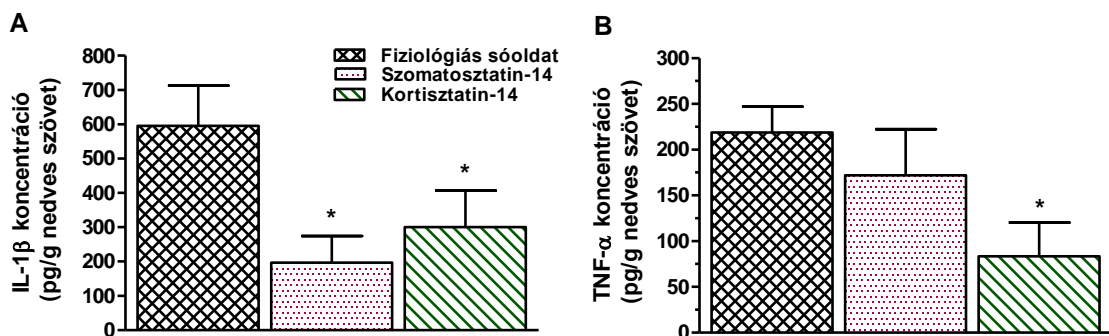
### A szomatosztatin és kortisztatin hatása a carrageenannel kiváltott mechanikai hiperalgéziára, akut lábduzzadásra, valamint gyulladást okozó citokin-termelésre egérben

A 3% carrageenan intraplantáris injekciójának hatására jelentős mechanikai hiperalgésia és lábduzzadás alakult ki a kontroll, fiziológiás sóoldattal kezelt egércsoportban (kb. 40% maximális hiperalgésia és 55% duzzadás a 6 órási időpontban). 100 µg/kg i.p. SST-14 kezelés esetén gátló tendenciát figyeltünk meg, de a gátlás csak a 4 órási mérési pontban bizonyult szignifikánsnak. CST-14 kezelést követően a hiperalgésia 2-23 óráig minden mérési pontban szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll csoport esetén. A lábduzzadást hasonló mértékben, kb. 30-35%-kal csökkentette mindkét peptid a 6 órási időpontban (28. ábra).



28. ábra: A szomatosztatin-14 és kortisztatin-14 hatása a carrageenannel kiváltott mechanonociceptív küszöb-változásra és lábduzzadásra. **A:** A mechanonociceptív küszöb csökkenése az i.pl. carrageenan injekció utáni 24 órás periódusban. **B:** A lábterfogat változása 6 órával a gyulladás kiváltása után. Kontrollként fiziológiás sóoldatot használtunk. Az eltéréseket a kezdeti kontroll értékek %-ában fejeztük ki. Az egyes mérési pontok és oszlopok az átlag±SEM értékeit ábrázolják, n=8-10 egér/csoport esetén. (\*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. kontroll. Egyutas ANOVA+Bonferroni módosított t-teszt)

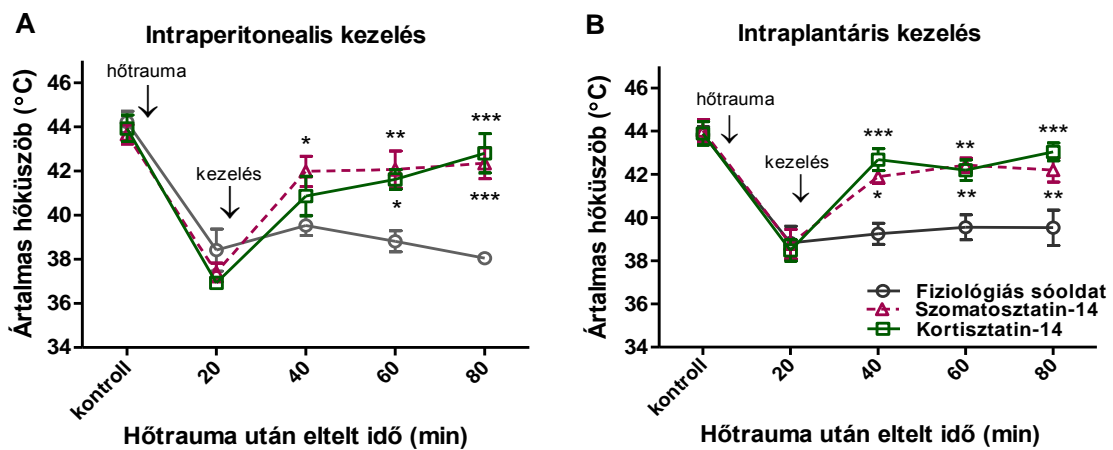
A carrageenan kezelés jelentős mértékű IL-1 $\beta$  és TNF $\alpha$  felszabadulást okozott a fiziológiás sóoldattal kezelt csoport talpbőrében. 100  $\mu$ g/kg i.p. SST-14 és CST-14 szignifikánsan csökkentette az IL-1 $\beta$  szintézist, de a TNF $\alpha$  szintézist csak a CST-14 mérsékelte szignifikáns módon (29. ábra).



29. ábra: A szomatosztatin-14 és kortisztatin-14 hatása a carrageenannel kiváltott gyulladásos citokin produkcióra. Az IL-1 $\beta$  (A) és TNF $\alpha$  (B) koncentrációja az egér talpbőr homogenizátumokban 24 órával az i.pl. carrageenan injekció után. Kontrollként fiziológiás sóoldatot használtunk. Az oszlopok az átlag±SEM értékeit ábrázolják, n=8-10 egér/csoport esetén. (\*p<0,05 vs. kontroll. Egyutas ANOVA+Bonferroni módosított t-teszt.)

## A szomatosztatin és kortisztatin hatása az enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgéziára patkányban

A hőtrauma utáni ébredést követően egy állatnál sem figyeltünk meg spontán nocifenzív viselkedést. 20 perccel a hőtraumát követően a termonociceptív küszöb 5-6 °C-os esését tapasztaltuk, ez a hő hiperalgézia fennmaradt a kísérleti periódus 80 perce folyamán. A fiziológias sóoldattal kezelt csoporthoz képest az i.p. és i.pl. SST-14 és CST-14 hasonló mértékben és szignifikánsan csökkentette a termális hiperalgéziát végig a vizsgálati periódus alatt (**30. ábra**), bár az i.p. CST-14 gátló hatása nem volt statisztikailag szignifikáns a legkorábbi, 40 perces mérési időpontban.



**30. ábra:** A szomatosztatin-14 és kortisztatin-14 hatása az enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgéziára patkányban. Az enyhe hőtrauma okozta termális hiperalgézia gátlása **A:** intraperitoneális, **B:** intraplantáris SST-14 vagy CST-14 adása esetén. Kontrollként fiziológias sóoldatot használtunk ugyanazon adásmóddal, ugyanolyan volumenben. Az egyes mérési pontok az  $\text{átlag} \pm \text{SEM}$  értékeit ábrázolják,  $n=5-6$  patkány/csoport esetén. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. kontroll. Egyutas ANOVA (repeated measures)+Bonferroni módosított t-teszt.)



## **MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK**

Összehasonlító kísérleteink alapján arra következtetünk, hogy a SST és CST hasonló kötődési profillal és agonista tulajdonsággal rendelkezik az sst<sub>1</sub> és sst<sub>4</sub> szomatosztatin receptorokon. Csoportunk korábbi eredményei alapján e receptorok közvetítik az SST gyulladásgátló és antinociceptív hatásait. Eredményeink újdonságtartalma abban rejlik, hogy *in vitro* és *in vivo* bizonyítékokat szolgáltatnak arra, hogy ezek a peptidek jelentősen gátolják a szenzoros neuropeptid CGRP felszabadulását a perifériás szenzoros idegvégződésekből, a következményes akut plazma protein extravazációt, valamint a hő- és mechanikai hiperalgéziát. A Capuano és munkatársai által 2011-ben közölt eredmények, miszerint a CST és SST gátolta a kémiai kiváltott CGRP felszabadulást patkány trigeminus idegsejttenyészetben (Capuano és mtsai. 2011), alátámasztják a perifériás idegvégzések szintjén tapasztalt eredményeinket. Az érdekes jelenség, hogy nagyobb koncentrációkban a CST és az SST CGRP felszabadulást gátló hatása csökken, illetve megszűnik, peptidek esetében nem ritka. 5-HT, opioid és kannabinoid receptorokon ható nem-peptid struktúrájú vegyületek esetében is hasonló fordított, vagy harang alakú koncentráció-hatás összefüggés tapasztalható. Ennek magyarázatául a nagyobb koncentrációk esetén fellépő receptor-deszenzibilizáció, illetve internalizáció szolgálhat (Helyes és mtsai. 2001). A CST és SST neurogén gyulladásra és hiperalgéziára kifejtett hasonló hatásai mellett a CST-14 szignifikánsan nagyobb gátló hatással rendelkezik a gyulladás sejtes komponenseire, ahogy azt a peritoneális makrofágok endotoxin-stimulált IL-1 $\beta$  termelésénél és az egér talpbőr carrageenan-kiváltott TNF $\alpha$  szintézisének látjuk. A szintetikus, szelektív sst<sub>4</sub> receptor agonista J-2156-tal nyert korábbi, peritoneális makrofágok IL-1 $\beta$  termelésére vonatkozó eredményeink (Elekes és mtsai. 2008) összhangban vannak jelen adatainkkal, a legnagyobb, kb. 70-75% gátló hatást mindkét esetben a 1  $\mu$ g/ml-es koncentrációval értük el. A carrageenannal kiváltott lábduzzadást és mechanikai hiperalgéziát, melyek neurogén és nem neurogén komponensekkel egyaránt rendelkeznek (Vinegar és mtsai. 1987; Gilligan és mtsai. 1994), mindkét peptid hasonló mértékben gátolta.

A CST-14 szerkezetileg nagyon közel áll a SST-14-hez (11 aminosav megegyezik a 14-ből), és mind az öt klónozott sst receptorhoz hasonló affinitással képes kötődni, mint a SST-14 (Siehler és mtsai. 1998; Criado és mtsai. 1999; Engström és mtsai. 2005). Ezt sst<sub>1</sub> és sst<sub>4</sub> receptorokon saját kötődési eredményeink is alátámasztják. G-protein aktivációs tesztben ugyancsak a SST-hez hasonló potens agonistaként viselkedett. Engström és kollégái hasonló

eredményeket közöltek a CST-17-tel, a J-2156-tal, az SST-14-gyel és az SST-28-cal kapcsolatban CHO sejt membránpreparátumokon (Engström és mtsai. 2005). Az agonista hatékonyság sorrendje a következő volt: J-2156>SST-28≥SST-14=CST-17 (Engström és mtsai. 2006). Bár a CST és SST hasonló hatékonyságát és hatáserősségét írták le az sst receptorokon, aktivációjuk *in vivo* jelentősége még nem tisztázott (Siehler és mtsai. 2008).

Bár az SST hatáserőssége nagyobb volt a perifériás idegvégződésekből történő CGRP felszabadulására, mint a CST-é (az SST 100 nM koncentrációja hatékony, míg a CST igazán 2000 nM koncentrációban hat), a hatékonysága (maximális hatás) megközelítőleg ugyanolyannak bizonyult. Ez nem zárja ki azonban annak a lehetőségét, hogy mindkét peptid ugyanazon a receptoron hat, mindössze eltérő receptor aktiváló képességük (intrinzik hatékonyságuk) lehet.

A CST és SST mRNS expressziójának hasonlósága mellett számos különbség is megfigyelhető: a CST mRNS főleg az agykéregben és a hippocampusban (Lecea és mtsai. 1997; Spier és de Lecea 2000) expresszálódik, de kifejeződik a gasztrointesztinális epitél sejtekben, a vesében, és az immunrendszerben (Dalm és mtsai. 2003a, b). Az SST és receptorai megtalálhatók a szenzoros neuronokban, gyulladásgátló és immunsejtekben, exokrin és endokrin mirigyekben (Patel 1999; Schindler és mtsai. 1996). Számos emberi immunsejt termel kortisztatint, de szomatosztatint nem. A CST szintje a sejt differenciáltságával és aktivációs állapotával korrelál, amely arra utal, hogy a CST kulcsfontosságú szabályozó funkciót tölthet be az immunrendszerben (Dalm és mtsai. 2003c).

A CST a lokomotoros aktivitást csökkenti, de az SST-vel ellentétben lassú hullámú alvást indukál. Ez alapján saját CST receptor létezését vagy más struktúrákon, mint pl. a Mas1 onkogénnel összefüggő MrgX2 (Mas-rokon gén) orphan receptoron való hatásait feltételezik (Dong és mtsai. 2001; Robas és mtsai. 2003). Ez utóbbi receptorok nocicepcióban betöltött szerepére utal, hogy a hátsó gyöki ganglionok kis szenzoros neuronjaiban expresszálódnak. Kvantitatív PCR vizsgálatok a CST MrgX2 receptorokénál sokkal szélesebb expresszióját igazolták. A SST-től eltérően a CST-nek nagy az affinitása a ghrelin receptor (GHS-R1a) iránt, melynek szerepét a gyulladásgátló hatás hátterében is feltételezik (Gonzalez-Rey és mtsai. 2007). A CST-14 és az SST-14 fiziológiai hatásai között megfigyelt eltérések hátterében receptor internalizációs különbségek is állhatnak (Spier és de Lecea 2000), mint például a  $\mu$  receptorokon is ható morfin és methadon esetében. Kimutatták, hogy a kortisztatin mRNS expressziója szomatosztatinnal hiányos állatokban nem emelkedett, ami feltételezi, hogy a CST nem csupán egy szerkezeti módosulata az SST-nak (Ramírez és mtsai. 2002).

Munkacsoportunk számos bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a SST gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatását az sst<sub>1</sub> és sst<sub>4</sub> receptorok közvetítik, különös tekintettel a neurogén gyulladással kapcsolatos folyamatokra és ennek háttérében álló szenzoros neuropeptid-felszabadulás gátlására. Az sst<sub>2</sub>/sst<sub>3</sub>/sst<sub>5</sub> receptor agonista oktreotid nem gátolta ezeket a folyamatokat (Helyes és mtsai. 2001, 2006; Pintér és mtsai. 2006). Mivel eredményeink alapján a CST hasonló mértékben csökkentette az akut neurogén gyulladást és hiperalgéziát, mint az SST, valószínűleg a szenzoros idegvégződéseken lévő sst<sub>1</sub> és sst<sub>4</sub> receptorok aktivációja játszik ebben szerepet (Pintér és mtsai. 2006). Az immunsejtek funkciójának gátlását az sst<sub>2</sub> receptor aktivációja is közvetítheti (Dalm és mtsai. 2003a). Carlton és munkatársai a fájdalomcsillapító hatás háttérében az sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> és sst<sub>5</sub> receptorok részvételét is lehetségesnek tartják (Carlton és mtsai. 2001a, b). Mivel a termális hiperalgésia e típusában döntő szerepet játszik a perifériás idegvégzések gyors szenzitizációja, ennek a gátlása valószínűleg független a gyulladásgátló hatásoktól. Lokális alkalmazás esetén ezek az anyagok csak a perifériás idegvégzésekben képesek hatni, de szisztémás adás esetén is ez a fő hatáshelyük, aminek az a magyarázata, hogy ezek a viszonylag nagy peptidek valószínűleg nem képesek olyan koncentrációban átjutni a vér-agy gáton, hogy biológiai hatást fejthessenek ki a központi idegrendszerben (Banks és mtsai. 1990). A perifériás hatások mellett a CST a centrális fájdalom feldolgozás folyamatában is szerepet játszhat, ugyanis cerebroventrikuláris alkalmazása emelte a hőstimulációra megjelenő nocifenzív magatartás latenciáját (Mendéz-Diáz és mtsai. 2004).

A CST gyulladással és immunsejteken kifejtett hatásaira számos irodalmi adat áll rendelkezésre, azonban rendkívül kevés adat szól a neurogén mechanizmusokban betöltött szerepéről. A CST mérsékli a szepszis-kiváltotta halálózást, egyrészt az aktivált makrofágok gyulladással mediátorainak termelését gátolva, másrészt csökkentve a neutrofilek és monociták beáramlását a gyulladt szövetekbe (Gonzalez-Rey és mtsai. 2006a). A CST kollagén-indukált artritiszben kifejtett gyulladásgátló hatásának fő mechanizmusa a rezidens és beáramló makrofágok aktivitásának csökkentése. Ebben a modellben a CST szignifikánsan nagyobb gátló hatást fejtett ki, mint a SST, ami alátámasztja, hogy a CST a SST-től eltérő receptorokat és jelátviteli utakat aktiválhat (Gonzalez-Rey és mtsai. 2007).

A CST gátolja a fagocitózist és a szabadgyök képződést, valamint a gyulladással citokinek és kemokinek termelését (TNF $\alpha$ , IL-12, IL-6, IL-1 $\beta$ ), de elősegíti az antiinflammatorikus IL-10 szintézisét (Gonzalez-Rey és mtsai. 2006b). Eredményeink párhuzamba állíthatók Gonzalez-Rey és kollégái adataival, miszerint a CST gátolja a TNF $\alpha$  és IL-6, valamint az endotoxin-aktivált egér peritoneális makrofágok nitrogén-monoxid termelését (Gonzalez-Rey és mtsai. 2006a). A CST nagyobb gátló hatást fejtett ki a gyulladással mediátorok termelésére,

mint az SST, vagy a szintetikus sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub>, sst<sub>5</sub> receptor agonista oktreotid. Bár a nem szelektív SST receptor antagonisták cikloszomatostatin kivédte az SST hatásait, csak részben gátolta a CST hatását, feltételezve, hogy a CST más receptorokon keresztül is kifejtheti gyulladásszerű funkciókat csökkentő hatásait (Gonzalez-Rey és mtsai. 2006a; Gonzalez-Rey és Delgado 2008). A kortisztatin egészséges önkénteseknek adva semmilyen jelentős mellékhatást vagy toxicitást nem okozott (Broglia és mtsai. 2002).

Eredményeink alapján arra következtettünk, hogy a CST képes csökkenteni az akut neurogén gyulladást, a termális és mechanikai hiperalgéziát. Ebben valószínűleg fontos szerepet játszik a proinflammatorikus szenzoros neuropeptid felszabadulásának gátlása a perifériás idegvégződésekből, és valószínűleg hasonlóképpen a centrálisakból is. Mivel ezek a hatások nagyon hasonlóak a SST hatásaihoz, a szomatostatin receptorok aktivációja feltételezhető a folyamatban. Ezzel szemben a CST a SST-nál jelentősen nagyobb gátló hatást fejt ki a gyulladásszerű citokinek termelésére, amely a gyulladásszerű folyamatok fontos komponense, és valószínűleg a sst receptoroktól eltérő mechanizmussal valósul meg.

### 3. fejezet: A PACAP trigeminovaskuláris aktivációban betöltött szerepe

*Az eredmények eredeti közlemény formájában történt publikációja:*

**Markovics A, Kormos V, Gaszner B, Lashgarara A, Szoke E, Sandor K, Szabadfi K, Tuka B, Tajti J, Szolcsanyi J, Pinter E, Hashimoto H, Kun J, Reglodi D, Helyes Z. (2012) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol Dis.* 45(1):633-44.**

#### ELŐZMÉNYEK, IRODALMI HÁTTER

##### **A PACAP és szerepe a nocicepcióban**

A **PACAP** vagy teljes nevén hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide) izolálása eredetileg birka hipotalamuszból történt (Miyata és mtsai. 1989). A szekretin-glukagon-vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP) család tagja, ugyanis háromdimenziós vizsgálatok kimutatták, hogy alapvető szerkezeti rokonságot mutat a család többi tagjával (Segre és Goldring 1993; Wray és mtsai. 1993). A legszorosabb, 68%-os egyezést a VIP szerkezetével mutat, adenilát-cikláz aktiváló hatása azonban legalább 1000-szer erősebb a VIP-énél (Gottschall és mtsai. 1990; Sherwood és mtsai. 2000). Két biológiailag aktív formája létezik: az emlős szervezetekben 90%-ban előforduló 38 aminosavból álló PACAP-38, és a 27 aminosavból álló PACAP-27. Patkányban a legnagyobb koncentrációban a hipotalamuszban és a herében fordul elő (Arimura és mtsai. 1991), de az endokrin mirigyekben (Vigh és mtsai. 1993; Mikkelsen és mtsai. 1995), az ivarszervekben (Shioda és mtsai. 1996), a gasztrointesztinális traktusban (Hannibal és mtsai. 1998), a légzőrendszerben (Moller és mtsai. 1993) és a bőrben (Odum és mtsai. 1998) is expresszálódik. Szenzoros neuropeptidként tartják számon, mivel megtalálható a gerincvelő hátsó szarvában (Dickinson és Fleetwood-Walker 1999; Dickinson és mtsai. 1999), a hátsó gyöki ganglionokban (Moller és mtsai. 1993; Dun és mtsai. 1996; Parsons és mtsai. 2000), a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok perifériás végződéseiben (Zhang és mtsai. 1996; Fahrenkrug és Hannibal 1998), pl. az ízületi tokot ellátó afferensekben (Uddmann és mtsai. 1998), de a központi idegrendszer számos területén is (Mulder és mtsai. 1994). Immunhisztokémiával PACAP pozitív sejteket mutattak ki az emberi agytörzs ún. „migrén-generátor” régiójának sejttestjeiben és idegrostjaiban (Tajti és mtsai. 2001), továbbá a nucleus caudalis trigeminiben és a nyaki gerincvelő C1-C2-es szegmentumaiban (Uddman és mtsai.

2002). A dura mater perivaszkulárisan található és a neuronokkal szoros asszociációban lévő hízósejtjei szintén tartalmaznak PACAP-ot. Aktiválódásuk bekövetkezhet trigeminális idegaktiválódást, cervikális vagy sphenopalatin ganglion stimulációt követően (Edvinsson és mtsai. 1976; Levy 2009; Levy és mtsai. 2007; Ottosson és Edvinsson 1997; Rozniecki és mtsai. 1999; Theoharides és mtsai. 2005; Zhang és mtsai. 2007).

A PACAP rendkívül sokféle hatást fejt ki: szabályozza a neurotranszmitterek felszabadulását (May és mtsai. 2000), értágulatot, illetve bronchodilatációt okoz, fokozza a bélmotilitást, növeli egyes hormonok koncentrációját a vérben (Hamelink és mtsai. 2002), szabályozza a sejtproliferációt és gátolja az apoptózist (Vaudry és mtsai. 2002). Ezek a hatások speciális receptorokon keresztül valósulnak meg. Két kötőhelytípust mutattak ki PACAP- és VIP-kötő képességük alapján. Az I-es típusú kötőhelyhez a PACAP mindkét formája nagy affinitással kötődik, a VIP viszont csak alig (Gottschall és mtsai. 1990; Lam és mtsai. 1990; Suda és mtsai. 1992). A II-es típusú kötőhelyhez a PACAP és a VIP is hasonló affinitással kötődik, ezen belül viszont két altípust is elkülönítenek a szekretinhez való affinitás alapján (Tatsuno és mtsai. 1990; Vaudry és mtsai. 2000). A receptorokat később a kötőhelyek szerkezete alapján klónozták, és PAC1, valamint VPAC1/VPAC2 receptoroknak nevezték el (Harmar és mtsai. 1998). Mindhárom receptor neuronokon, simaizom sejteken és számos gyulladásosejten megtalálható, stimulációjuk Gs/q-proteinhez kapcsolt mechanizmusokat indít el, ezen keresztül aktiválódik az adenilát-cikláz, illetve a foszfolipáz C rendszer (Dickinson és Fleetwood-Walker 1999; Vaudry és mtsai. 2000; Zhou és mtsai. 2002; Somogyvári-Vígh és Reglődi 2004).

Mivel a PACAP-38 jelenlétét a fájdalomközvetítő pályarendszer több szintjén, pl. a gerincvelő hátsó szarvában (Dickinson és Fleetwood-Walker 1999; Dickinson és mtsai. 1999), a hátsó gyöki ganglionokban (Moller és mtsai. 1993; Mulder és mtsai. 1994) és a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok perifériás végződéseiben (Zhang és mtsai. 1996; Fahrenkrug és Hannibal 1998; Uddmann és mtsai. 1998) is bizonyították, feltételezhető volt, hogy a PACAP részt vesz a nociceptív folyamatokban. Ezt az elképzelést azonban rendkívül kevés funkcionális adat támasztotta alá, az összes erre irányuló *in vivo* kísérletben kizárólag a PACAP központi idegrendszeri hatásait vizsgálták és meglehetősen ellentmondásos eredményekre jutottak (Shimizu és mtsai. 2004). Az intratekálisan adott PACAP gátolta a nociceptív reflexműködést és a gyulladás következtében kialakuló nocicepciót (Yamamoto és Tatsuno 1995; Zhang és mtsai. 1996; Onou és mtsai. 2007). Intracerebroventrikulárisan adva a PACAP a formalin teszt korai, az érzőideg-végzések közvetlen aktivációjából adódó fázisában analgetikus hatásúnak, míg a késői, akut gyulladásosejten pronociceptívnek

bizonyult (Shimizu és mtsai. 2004). Másrésről azonban a központi idegrendszerbe adott PACAP dózisfüggő módon csökkentette a hőküszöböt a talpban, és szerepet játszott a nociceptív stimulus hátsó szarvba történő közvetítésében, elsősorban N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorokon keresztül (Ohsawa és mtsai. 2002). Macskákban az intracerebrális PACAP mikroinjekció közepes mértékű agyi vérátáramlás-fokozódást okoz (Uddman és mtsai. 1993). PACAP hiányos egerekben sem termális, sem mechanikai hiperalgészia nem jött létre carragenannel kiváltott gyulladás, illetve gerincvelői idegátmetzés után (Mabuchi és mtsai. 2004). A PACAP-38 nociceptív folyamatokban betöltött szerepének megítélése tehát korántsem egyértelmű. Perifériás alkalmazás esetén zsigeri és szomatikus gyulladás során antinociceptív, hiperalgésziát és allodiniát gátló hatásokat fejt ki (Sándor és mtsai. 2009). A PACAP ezen hatásai nem magyarázhatók a sejten belüli cAMP vagy  $Ca^{2+}$  koncentrációt emelő hatásaival, így egy jelenleg ismeretlen gátló hatást közvetítő receptor vagy splice variáns létezését feltételezzük a perifériás idegvégződésen (Németh és mtsai. 2006, Sándor és mtsai. 2009). A periférián kifejtett gátló hatásokkal ellentétben csoportunk számos egér fájdalom modellben a PACAP erős centrális pronociceptív szerepéről számolt be (Sándor és mtsai. 2010). Bár a PACAP jelenléte kimutatható az emberi és állati agy trigeminális rendszerrel összefüggő számos régiójában (Tajti és mtsai. 2001; Uddman és mtsai. 2002; Christiansen és mtsai. 2003), lehetséges szerepe a trigeminovaskuláris aktivációban csak mostanában merült fel a PACAP és PAC1 receptorok patkány és humán intrakraniális ereinek simaizombeli lokalizációja alapján (Boni és mtsai. 2009; Chan és mtsai. 2011). Nemrég felfedezés, hogy migrénesekben a PACAP infúzió aura nélküli migrénszerű fejfájást okoz (Schytz és mtsai. 2009). Ezen klinikai megfigyelések alapján feltételezik, hogy a PACAP fontos mediátor lehet a trigeminovaskuláris aktivációban, ami a migrén fontos patofiziológiai tényezője (Schytz 2010; Schytz és mtsai. 2010a, b).

### **A trigeminovaskuláris aktiváció és szerepe migrénben**

A migrén a populáció 7,5-18 %-át érintő betegség, a priméren neurovaskuláris fejfájások csoportjába tartozik. E betegségek fő tulajdonsága, hogy a fájdalom szoros összefüggésben van az intrakraniális érrendszer változásaival. Ezek a változások neurális hátterűek (Goadsby és mtsai. 2002), ezért beszélhetünk neurovaskuláris történésekről. Kísérletesen a kraniális fájdalom vazodilatációt vált ki (May és mtsai. 1998), ez a reflex macskákban (Goadsby és Duckworth 1987), majmokban (Goadsby és mtsai. 1986) és emberben (May és mtsai. 2001) is létezik. A reflex úgy valósul meg, hogy a trigeminus ideg első ágának aktivációja véráramlás-fokozódást eredményez az első ág által beidegzett területeken, az arcon (Lambert és mtsai.

1984) és az agyban (Goadsby és mtsai. 1996) egyaránt. A primer neurovaszkuláris fejfájás kóros volta az eredendően protektív reflex túlzott mértékű aktivációjában rejlik, amit a fájdalom percepciója vált ki. A dura matert, a nagy cerebrális ereket, a pia ereit és a nagy vénás szinuszokat mielinhüvely nélküli rostok kötege veszi körül, melyek a ganglion trigemini ophtalmicus ágából (Liu-Chen és mtsai. 1984) és a felső cervikális hátsó gyökökből (Arbab és mtsai. 1986) erednek. Az agyi ereket beidegző trigeminus rostok a ganglion trigeminiből erednek, melyek SP-t és CGRP-t tartalmaznak (Uddman és mtsai. 1985). A trigeminus ganglion stimulációja esetén mindkét peptid felszabadul (Goadsby és mtsai. 1988). A koponya ereinek stimulációja - mint a sinus sagittalis superioré - fájdalmat vált ki emberben (Feindel és mtsai. 1960).

Moskowitz és kollégái szerint a migrénes fájdalom a steril neurogén gyulladás egyik formája lehet (Moskowitz 1990). Patkány trigeminus ganglion elektromos stimulációja során plazma protein extravazáció figyelhető meg (Markowitz és mtsai. 1987). Az elfogadott, hogy a hízósejt degranuláció, a trombocita aggregáció, és steril gyulladás kialakulása fájdalmat okozhatnak (Dimitriadou és mtsai. 1991, 1992), nem tisztázott azonban, hogy ezek a változások önmagukban elegendőek vagy további triggeret igényelnek. A neurogén plazmafehérje-kiáramlás gátlása nem egyértelműen prediktív az antimigrén hatásra emberben, ahogy azt P-anyag- és neurokinin-1 antagonistákkal (Diener és mtsai. 2003), specifikus plazma protein extravazáció blokkolókkal (Roon és mtsai. 1997) és endothelin antagonistákkal (May és mtsai. 1996) végzett klinikai vizsgálatok mutatják. Bármilyen szerepet is játszik a dura mater steril gyulladása a migrén patomechanizmusában, az bizonyos, hogy a trigeminális szenzitizáció valamely formája részt vesz a folyamatban. Ezt alátámasztja az is, hogy Burstein és kollégái allodíniát figyeltek meg a migrénes rohamok alatt, és néha a rohamok után is (Burstein és mtsai. 2000a, 2000b). A szenzitizáció lehet perifériás, gyulladással mediátorok lokális felszabadulásának következtében, mely valószínűleg a trigeminális nociceptorok kóros aktivációját eredményezi. Még valószínűbb migrén során a szenzitizáció centrális formája, amely lehet klasszikus érzékenység-fokozódás a trigeminus mag területén, vagy a leszálló fájdalommoduláló pályák diszfunkciója (Knight és mtsai. 2002). A migrén patomechanizmusában neuropeptideknek is fontos szerepet tulajdonítanak. A trigeminus ganglion elektromos stimulációja macskában és emberben egyaránt az extracerebrális vérátáramlás megnövekedéséhez és CGRP valamint SP lokális felszabadulásához vezet (Goadsby és mtsai. 1988). Humán adat is létezik, miszerint a CGRP szintje emelkedett a migrén fejfájásos fázisában (Goadsby és mtsai. 1990), alátámasztva a teóriát, miszerint a trigeminovaszkuláris rendszer aktivációja kulcsfontosságú ezen



állapotokban (Juhász és mtsai. 2003). A CGRP mellett a PACAP is kimutatható az emberi és állati agy trigeminális rendszerrel összefüggő számos régiójában (Tajti és mtsai. 2001; Uddman és mtsai. 2002; Christiansen és mtsai. 2003). Friss irodalmi adatok utalnak arra, hogy migrénesekben a PACAP infúzió aura nélküli migrénszerű fejfájást okoz (Schytz és mtsai. 2009). Ezen klinikai megfigyelések alapján feltételezik, hogy a PACAP fontos szerepet tölt be a trigeminovaszkuláris aktivációban.

## **CÉLKITŰZÉSEK**

Mivel e legújabb klinikai vizsgálati adatok egyértelműen a PACAP szerepére utaltak migrénben, valamint munkacsoportunk számos állatkísérletes fájdalommodellben igazolta e peptid jelentőségét, kísérleteink célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk a PACAP szerepét a migrén mechanizmusait modellező trigeminovaskuláris aktivációban génhányos egerek segítségével. Bár az emberi betegségnek teljes egészében megfelelő állatmodell nem létezik, az általunk vizsgált kísérletes megközelítés számos tekintetben párhuzamba állítható a migrén patofiziológiai folyamataival. Munkánk során a lehető legkomplexebb megközelítés érdekében magatartási, vaszkuláris képalkotó és hisztopatológiai technikákat alkalmaztunk: vizsgáltuk a nitroglicerinnel kiváltott fénykerülő magatartást, a meningeális vérátáramlás változását, a neuronális aktiváció mértékét jelző c-Fos expressziót a trigeminus ganglionban és a nucleus caudalisban, valamint a PAC1 receptor expresszióját e területeken.

## **KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK**

### **Kísérleti állatok**

Kísérleteinket hím, 25-30 g súlyú PACAP génhányos (PACAP<sup>-/-</sup>) egereken és vad típusú (PACAP<sup>+/+</sup>) kontroll megfelelőiken végeztük. A génhányos egereket az Osakai Egyetemen állította elő Prof. Akemichi Baba és munkatársai, a heterozigóta tenyészpárokat tőlük kaptuk Dr. Reglödi Dóra kollaborációján keresztül. Az első generáció genotipizálása után az állatokat vad típusú és génhányos homozigóta vonalakon a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének Laboratóriumi Állatházában tartottuk és tenyésztettük 24-25 °C-on, normál étellemmel és vízzel *ad libitum* ellátva. Kísérleteinkben az első három generáció utódait használtuk a genetikai variációk minimalizálása érdekében. A PACAP gén hiányát RT-PCR módszerrel igazoltuk (Hashimoto és mtsai. 2001). A PACAP gén hiányát olyan, a migrénnel összefüggésbe hozható struktúrákban is kimutattuk, mint a ganglion trigemini (TRG) és nucleus caudalis trigemini (TNC). Minden kísérleti eljárás és vizsgálat megfelelt a Helsinki Nyilatkozatban foglalt ajánlásoknak és eleget tett az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998(XII. 31.) számú kormányrendelet előírásainak. A kísérleti eljárásokat a Pécsi Tudományegyetem állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: BA 02/2000-11-2006).

### **Kísérleti modell:**

#### ***-A trigeminovaskuláris rendszer kémiai aktivációja***

A trigeminovaskuláris rendszer aktiválására a nitroglicerinnel (NTG) kiváltott kémiai aktiváció modelljét választottuk széleskörű irodalma, jó reprodukálhatósága és humán vonatkozásai miatt (Bergerot és mtsai. 2006; Buzzi és Tasorelli 2010; Lambert és mtsai. 2000; Olesen 2010; Tassorelli és mtsai. 1997). A nitroglicerinnel nitrogén-oxid (NO) donor, mely a trigeminovaskuláris rendszer direkt stimulációját, perifériás és centrális szenzitizációját váltja ki az erek, a TRG és a TNC szintjén (Lambert és mtsai. 2000; Neeb és Reuter 2007; Olesen 2010; Párdutz és mtsai. 2000). Kísérleteinkben az aktivációt 10 mg/kg NTG i.p. injekciójával váltottuk ki (Nitrolingual aerosol, Pohl-Boskamp/Merck).

### **Vizsgálati módszerek:**

#### ***-A fénykerülő magatartás vizsgálata***

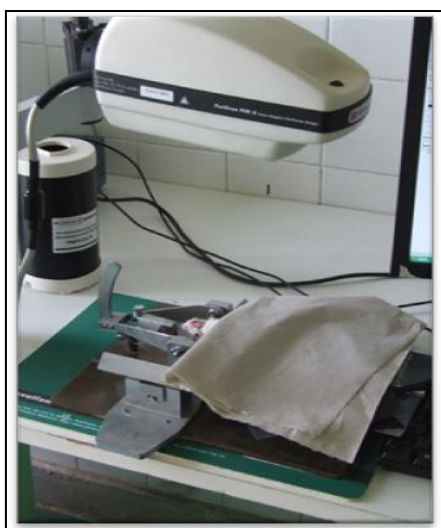


**31. ábra:** A sötét-világos doboz Recober és mtsai. nyomán módosított változata (A fényforrás az ábrán nem látható)

A fény-averzív magatartást, mint a migrénszerű fejfájás egyik tünetét (fotofóbia) az NTG adás utáni korai (0-30 perc) és késői periódusban (90-120 perc) vizsgáltuk, a nitroglicerinnel által kiváltott akut vazodilatáció és ezt követő trigeminovaskuláris szenzitizáció detektálására. Sötét-világos dobozként a Recober és mtsai. által használt doboz (Recober és mtsai. 2010) módosított változatát készítettük el (60 cm hossz, 60 cm szélesség, 45 cm magasság) (31. ábra). A doboz két egyenlő részre osztott, a fehér rész fedél nélküli és 1000 luxszal megvilágított (thermalneutral fibre optic source (Fiber-lite)), a sötét rész teljesen zárt. A két részt egy nyílás köti össze (7×7 cm). Minden vizsgálatot megelőzően az állatok egy órán át akklimatizálódtak a vizsgálati helyiségben, megvilágított környezetben. A kísérletet mindig azonos napszakban, azonos körülmények között végeztük. Az egereket egyenként a dobozba helyezve azok természetes felfedező készletüknek köszönhetően ki-be mozognak a világos és sötét rész között. 30 perc eltelté után a sötét részt részesítik előnyben, és mozgásuk jelentősen csökken, ezért ezt követően visszahelyeztük őket a ketrecükbe, majd 90 perccel az NTG kezelést követően ismét vissza a sötét-világos dobozba. A fényben töltött időt másodpercben kifejezve, 5 perces periódusokban értékeltük.

### ***-A meningeális mikrocirkuláció vizsgálata laser Doppler scanning módszerrel***

A meningeális mikrocirkuláció változását laser Doppler vérátáramlás-scanner (Periscan PIM-II, Perimed, Svédország) segítségével (32. ábra), uretánnal altatott egerekben vizsgáltuk a perioszteumtól megfosztott, zárt koponyán keresztül. Az uretán hosszan tartó, stabil anesztéziát biztosított a 4 órás megfigyelési idő során, továbbá gátolta az autonóm reflexeket, melyek a mikrocirkulációt befolyásolhatják. A készülék működése során a szövetek felszínéről visszatérő szórt fényt egy detektor regisztrálja. A Doppler-elv alapján a mozgó vörösvértestekkel találkozó fényrészecskék hullámhossz/frekvencia-változáson mennek keresztül (Doppler-shift), míg a mozdulatlan struktúrákkal érintkező részecskék változatlan formában verődnek vissza. A visszaverődött fény nagyságának és frekvenciájának megoszlása



**32. ábra: Perimed PIM II Laser Doppler Scanner**

a vörösvértestek számával és sebességével arányos, ugyanakkor nem függ mozgásuk irányától. A kontroll felvételek után 10 mg/kg NTG-t injektáltunk intraperitoneálisan. Az NTG által kiváltott korai és késői vaszkuláris reakciók, valamint a centrális és perifériás szenzitizáció felderítésére a vérátáramlás változását 4 órán keresztül követtük. PACAP-38 exogén bevitele esetén a megfigyelési periódus 30 percig tartott. A mikrocirkuláció-változás értékelésére a koponya egy körülhatárolt régiójának átlagos mikrocirkulációs értékeit a kontroll felvételek átlagértékeivel hasonlítottuk össze a megfigyelési idő függvényében. A szisztémás vérnyomás

értékeit az arteria carotis communisba vezetett kanül segítségével regisztráltuk és a Buxco Biosystem XA szoftver segítségével értékeltük (Buxco Electronics, UK).

### ***-A korai neuronális aktiváció vizsgálata c-Fos immunhisztokémiával***

A c-fos egy proto-onkogén, mely elfogadott és széles körben alkalmazott markere az extracelluláris stimulusra bekövetkezett neuronális aktivációnak (Morgan és Curran 1991; Tassorelli és Joseph 1995). A gén terméke, a c-Fos protein immunhisztokémiai technikával azonosítható és felhasználható, mint az ártalmas stimulusra bekövetkező neuron aktiváció jelzője (Bullitt 1990). Mély uretán altatásban lévő PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egereket használtunk immunhisztokémiára, 2 és 4 órával az NTG beadást követően. Az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk 20 ml 0,1 M foszfátpuffer (PBS pH 7.6) majd 150 ml jéghideg 4%-os paraformaldehid (PFA) oldat felhasználásával. A nyaki gerincvelő felső szakasza és a

trigeminális ganglionok kipreparálása után utófixálás következett 24 órán át (PFA 4%). A gerincvelői trigeminus mag tanulmányozásához a nyúltvelőt a gerincvelő felső szakaszával beágyasztuk. Annak érdekében, hogy a megfelelő területeket biztosan tartalmazzák a metszetek, a metszés az obexnél kezdődött. Állatonként három sorozat, 20 µm vastagságú coronális metszetet készítettünk (Lancer Vibratome, Ted Pella Inc., USA). A metszeteket fagyás elleni oldatba (30% glicerol, 20% etilén-glikol, 0,1 M foszfát-puffer) való helyezés után -20 °C-on tároltuk a további felhasználásig. Diaminobenzidin (DAB) immunhisztokémia céljából a metszeteket mosást, Triton-X kezelést és blokkolást követően egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten poliklonális, c-Fos elleni antiszérummal (sc-52, 1:500) inkubáltuk (Gaszner és mtsai. 2007, 2009). Ezt követően a metszeteket biotinilált borjú anti-nyúl IgG-vel kezeltük (1:200, Vectastain Elite ABC Kit). Avidin-biotin komplexszel (Vectastain Elite ABC Kit) való inkubáció után az előhívás 0,05% diaminobenzidin és hidrogén-peroxid segítségével történt. A reakció megállítása Tris pufferrel történt.

A trigeminus ganglionokat 6% formalinban utófixáltuk, majd dehidráltuk 50 v/v%, 70 v/v%, 90 v/v%, és 100 v/v% etanol oldatok felhasználásával. Az immunhisztokémia paraffinba ágyazott metszeteken történt. Három sorozat, 4 µm vastag hosszanti metszetet készítettünk. A c-Fos immunhisztokémiára a metszetek első sorozatát használtuk a fent leírt protokoll szerint. A metszetekről digitális képek készültek. Az optimális kontraszt elérése érdekében a digitális képeket Photoshop 7.0.1. segítségével korrigáltuk. A TNC és a TRG c-Fos pozitivitásának meghatározásához állatonként öt metszeten megszámoltuk a c-Fos pozitív sejtmagokat és ezeket átlagoltuk. A mennyiségi értékelés kettős-vak protokoll szerint történt, és a metszetek kiválasztása véletlenszerű volt.

#### ***-A PACAP-38 exogén bevitele***

PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerek egy-egy csoportjának PACAP-38-at injektáltunk intraperitoneálisan (300 µg/kg, 0,1 ml/10 g a 30 µg/ml-es oldatból) a fénykerülő magatartás, a meningeális vérátáramlás-változás és a 4 órával későbbi c-Fos expresszió vizsgálatára. Két másik csoportban a PACAP-38-at intracerebroventrikulárisan adtuk (i.c.v., 30 pmol 2µl fiziológias sóoldatban Hamilton fecskendővel), mély uretán anesztézia alatt. A c-Fos expresszió változását 4 órával a kezelés után vizsgáltuk. Az i.c.v. alkalmazás koordinátái - 0,55 mm poszterior, 1 mm laterál, és 2 mm mélység voltak a Bregma ponttól számítva (Paxinos és Franklin 2003). Minden esetben fiziológias sóoldattal kezelt állatok szolgáltak kontrollként.

### ***-A PAC1 receptor expressziójának vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel***

A PAC1 receptor expresszióját megvizsgáltuk a trigeminus ganglionban és a nucleus caudalis trigeminiben. A fent részletezett módon c-Fos immunhisztokémiára előkészített ganglion és nucleus metszetekből állatonként öt darabot deparaffináltunk, majd permeabilizáltunk 0,1 % Triton X-100 felhasználásával. A nem specifikus kötéseket normál kecske szérummal történő inkubáció (1 óra) során blokkoltuk. A metszeteket ezt követően primer antitesttel kezeltük (nyúlban termelt anti-PAC1 receptor, 1:100 hígítás) egy éjszakán át inkubálva, szobahőmérsékleten (Brabet és mtsai. 1996). Ezt számos PBS-sel történő mosás, majd a másodlagos antitesttel (Alexa Fluor „568”, 1:1000) történő 2 órás inkubáció követte sötét környezetben (Ausubel és mtsai. 1992). Mosást követően a metszeteket Fluoromont-G felhasználásával lefedtük. Csoportonként tíz metszetet értékeltünk. A primer antiszérum nélküli negatív kontroll metszeteken specifikus sejtfestődés nem volt megfigyelhető. A digitális képek elkészítése után (Nikon Eclipse 80i mikroszkóp CCD kamerával) az optimális kontrasztot Photoshop 7.0.1 (Adobe, San Jose, CA, USA) segítségével értük el. A vörös fluoreszcens képeket szürke skála képekké alakítottuk.

Az immunreakció intenzitását metszetenként 10 perikarionban az ImageJ szoftver segítségével értékeltük (1.44 verzió, NIH, Bethesda, MD, USA). A denzitometriai analízis során a PAC1 receptor expressziót minden metszet esetében a szöveti és metszeti háttérdenzitás függvényében korrigáltuk. A mennyiségi értékelés itt is kettős-vak protokoll szerint történt, és a metszetek kiválasztása véletlenszerű volt.

### **Felhasznált anyagok**

Az NTG származási helye a Pohl-Boskamp GmbH (Németország), a PACAP-38, a normál kecske szérum, és az anti-PAC1 receptor antitest a Sigma-Aldrich Kft (Magyarország) terméke. Uretánt, glicerolt és etilén-glikolt a Spektrum 3D-től (Magyarország) vásároltunk. A Hamilton fecskendő gyártója a Hamilton Company (Svájc). A PFA gyártója a Molar Chemicals (Magyarország), a xylén és etanol a Merck-től (Egyesült Királyság) származik. A DAB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és Triton X-100 előállítója a Sigma Chemical (Hollandia). Az sc-52 antitest a Santa Cruz Biotechnology-től (USA) származik. Vectastain Elite ABC Kit: Vector Laboratories (USA). Az Alexa Fluor „586” és a Fluoromont-G előállítója a Southern Biotech (Magyarország), a DePeX medium gyártója a Merck (Egyesült Királyság).

### **Statisztikai analízis**

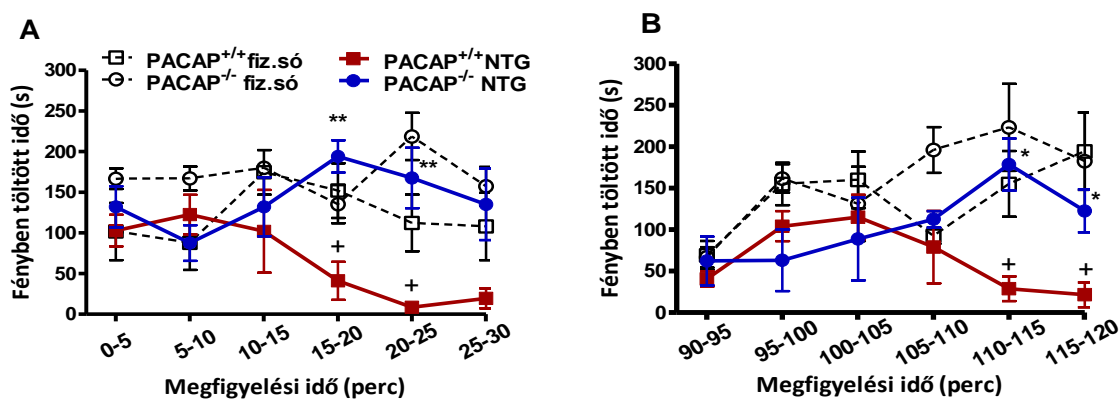
A viselkedési és a laser Doppler perfúziós adatok értékeléséhez repeated measures egyutas és kétutas ANOVA+Bonferroni módosított t-tesztet használtunk. A c-Fos immunhisztokémia és a PAC1 receptor expresszió értékelése kétutas ANOVA+Fisher poszttesztel történt. Minden esetben a  $p < 0,05$  értékeket vettük szignifikáns eltérésnek.

## EREDMÉNYEK

### A nitroglicerinnel kiváltott fénykerülő magatartás PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerekben

A sötét-világos dobozban eltöltött első 30 perc során mindkét csoport fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll állatai ki-be mozogtak a doboz világos és sötét részei között. Az NTG-vel kezelt vad típusú egerek a 20. perctől kezdve szignifikánsan kevesebb időt töltöttek a világos részben a fénykerülő magatartás kialakulásának megfelelően. Ezzel ellentétben a nitroglicerinnel kezelt knockout állatok nem mutattak fény-averziót (33. ábra).

A vizsgálat második, késői fázisában (90-120 perc) a vad típusú, NTG-vel kezelt állatok jelentősen kevesebb időt töltöttek a doboz fényes részében, különösen a vizsgálati periódus végső szakaszában. Ez párhuzamba állítható a trigeminovaskuláris rendszer nitroglicerinnel kiváltott centrális szenzitizációjával (Párdutz és mtsai. 2000; Lambert és mtsai. 2000; Neeb és Reuter 2007; Olesen 2010). A korai fázishoz hasonlóan, a PACAP génhíányos csoport nem mutatott fénykerülő magatartást (33. ábra).



33. ábra: Nitroglicerinnel kiváltott fény-averzív magatartás PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerekben az injekció utáni korai (A: 0-30.perc) és késői (B: 90-120. perc) periódusnak megfelelően. Az egyes mérési pontok az átlag±SEM értékeit ábrázolják, n=6-8/csoport esetén. (\*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. PACAP<sup>+/+</sup> NTG; +p<0,05 vs. PACAP<sup>+/+</sup> fiz.só. Kétutas ANOVA+Bonferroni módosított t-teszt.)

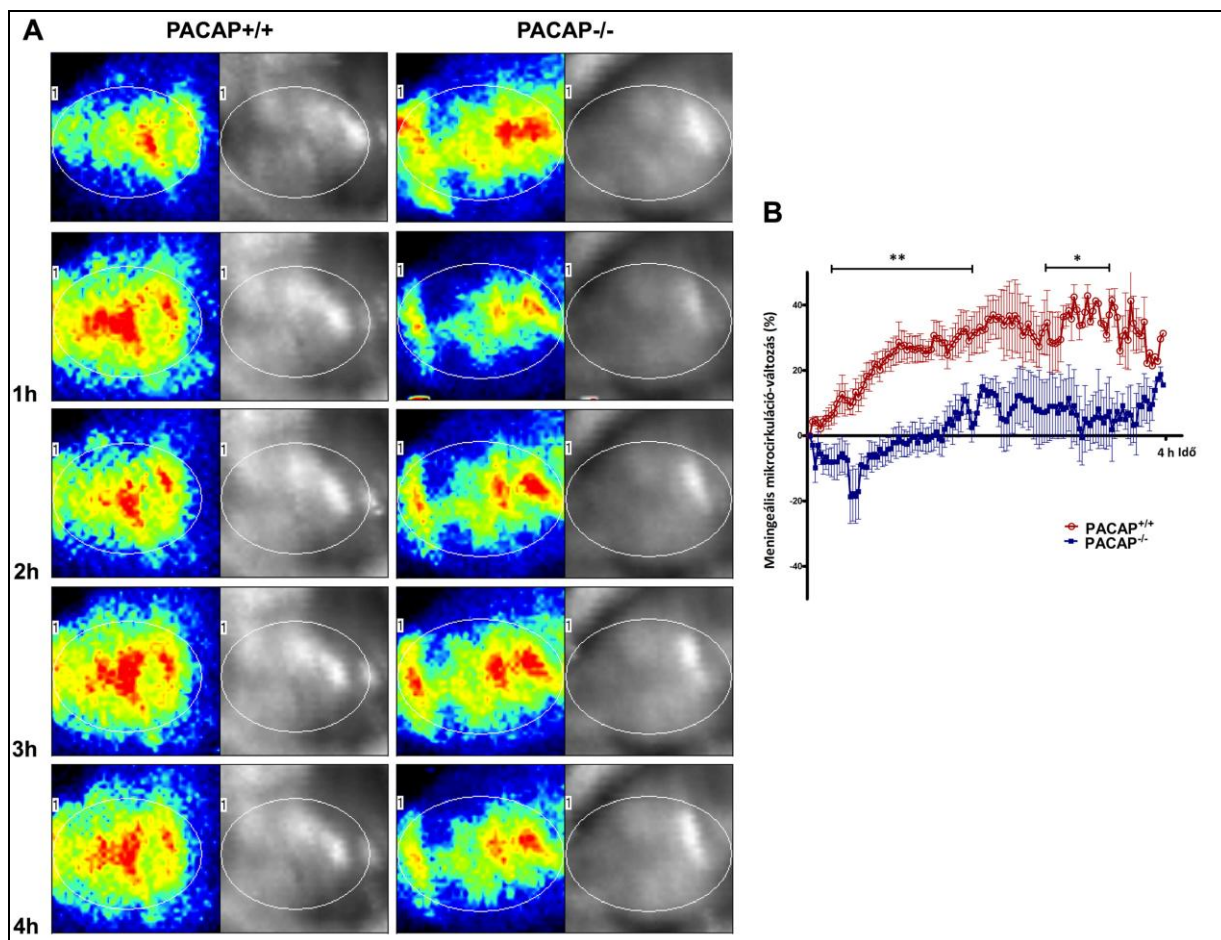
### A nitroglicerinnel kiváltotta agyfelszíni vazodilatáció PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerekben

Laser Doppler scanning vizsgálataink során 2 órával az NTG beadását követően a meningeális vérátáramlás jelentős mértékű emelkedését tapasztaltuk PACAP<sup>+/+</sup> egerekben. A vérátáramlás 35-40%-os maximális fokozódása viszonylag stabilan fennállt a megfigyelési idő alatt, csökkenést csak az utolsó 15 percben figyeltünk meg. Ezzel szemben a PACAP<sup>-/-</sup> állatcsoport esetében nem tapasztaltunk vérátáramlás-fokozódást az intraperitoneálisan



injektált NTG hatására az első 2 órában, és a későbbi hiperémiás hatás is jelentősen kisebb volt, mint a vad típusú, PACAP<sup>+/+</sup> állatcsoport esetén (34. ábra).

A szisztémás vérnyomás középértéke mindkét csoportban 30-35%-kal csökkent a 10 mg/kg nitroglicerinnel történő kezelés hatására, utána anesztézia alkalmazása mellett.

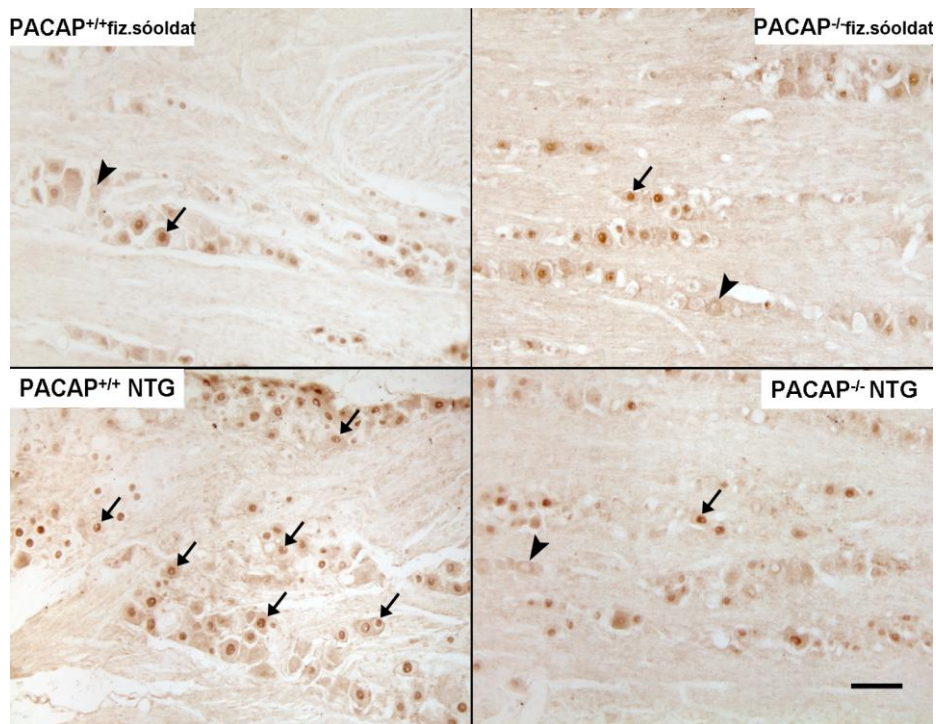


34. ábra: Nitroglicerinnel kiváltott meningeális mikrocirkuláció-változás PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerekben. A: reprezentatív laser Doppler képek 1,2,3 és 4 órával az NTG kezelés után. Kék szín jelzi az alacsony perfúziójú területeket, zöld és sárga jelöli a magasabb perfúziót, míg a piros a legmagasabb mikrocirkulációjú területeket jelöli. B: A meningeális mikrocirkuláció-változás értékei a megfigyelési idő függvényében. Az egyes mérési pontok az átlag±SEM értékeket jelzik, a kezdeti referencia képekhez képest, n=9-13/csoport esetén. (\*p<0,05, \*\*p<0,01 vs.PACAP<sup>-/-</sup>. Egyutas ANOVA+Bonferroni módosított t-teszt.)

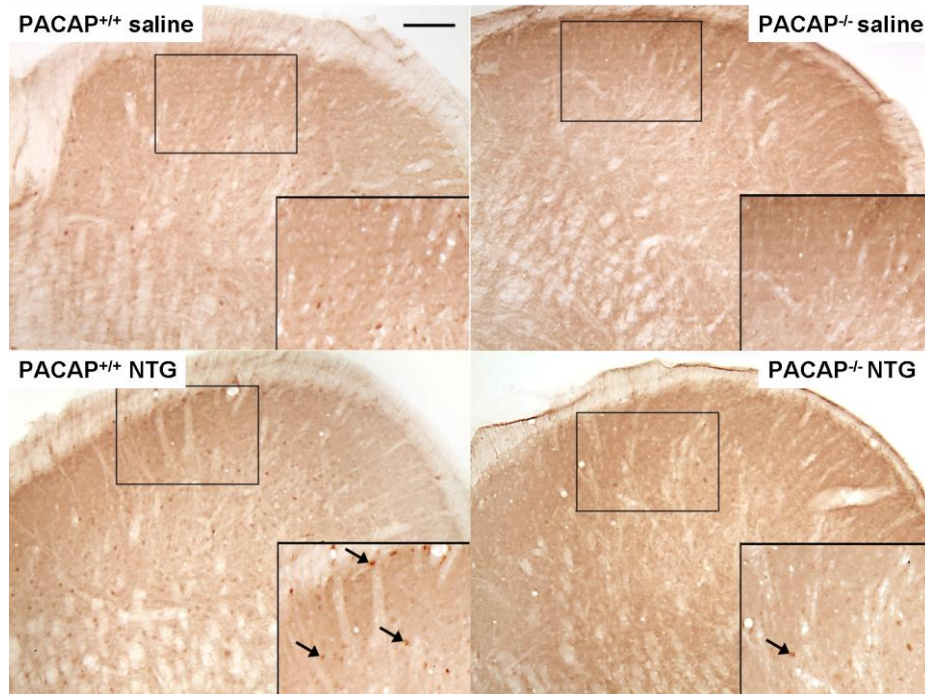
### A nitroglicerinnel kiváltotta c-Fos expresszió változása NTG-kezelt PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerek trigeminus ganglionjaiban és trigeminus nucleus caudalisában

A PACAP<sup>+/+</sup> egértörzs fiziológiás sóoldattal kezelt kontrollcsoportjában az NTG injekciót követően 2 órával 9,05±2,125, 4 órával 25±7,034 c-Fos pozitív neuront találtunk a TNC-ben. Ugyanezen időpontokban 39,36±2,916 és 29,76±5,467 c-Fos pozitív sejtmag volt megfigyelhető a TRG-ben. A fiziológiás sóval kezelt PACAP<sup>-/-</sup> egerekben 2 órával az NTG-

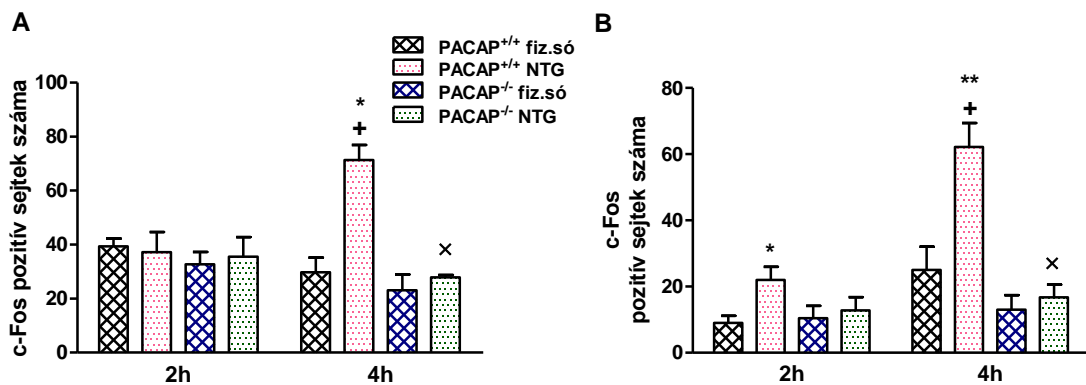
adást követően  $10,45 \pm 3,745$  és 4 órával az NTG-adást követően pedig  $13,05 \pm 4,353$  pozitív neuront mutattunk ki a TNC-ben,  $32,67 \pm 4,588$  és  $23,13 \pm 5,787$  volt megfigyelhető a TRG-ben. Nitroglicerinnel adást követően 2 órával egyik csoport esetében sem figyeltünk meg c-Fos expresszió változást a TRG-ben a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva (PACAP<sup>+/+</sup>:  $37,2 \pm 7,506$ ;  $p=0,875$ ; PACAP<sup>-/-</sup>:  $35,51 \pm 7,282$ ;  $p=0,704$ ). A vad típusú, PACAP<sup>+/+</sup> egércsoportban 4 órával a kémiai stimulációt követően kb. kétszeres c-Fos expresszió emelkedést találtunk a TRG-ben ( $71,35 \pm 5,586$ ;  $p < 0,001$ ), míg a génhányos egércsoportnál nem tapasztaltunk változást ( $27,91 \pm 0,845$ ;  $p=0,545$ ). A vad típusú egértörzs esetén a TNC-ben több mint kétszeresére emelkedett a c-Fos pozitivitás ( $22,05 \pm 3,887$ ) a kontrollcsoporthoz képest ( $9,05 \pm 2,125$ ), már az NTG-alkalmazását követően 2 órával ( $p=0,068$ ). Ugyanakkor e sejtszámok 4 órával a kezelést követően közel háromszoros emelkedést mutattak ( $62,15 \pm 7,287$ ;  $p < 0,001$ ). Ezzel ellentétben a c-Fos expresszió mindegyik időpontban változatlan maradt a génhányos egércsoportban (35., 36., 37. ábra).



**35. ábra:** A c-Fos expressziót bemutató immunhisztokémiai képek PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerek trigeminus ganglionjaiban, 4 órával a fiziológiás sóoldattal vagy NTG-vel történt kezelést követően. (200× nagyítás, mértékvonal: 100 μm) A neuronális aktivációt a ganglionsejtek perikarionján belüli barna magok jelzik (nyilak). Néhány nucleáris c-Fos immunreaktivitással nem rendelkező sejtet nyílhegygel megjelöltünk.



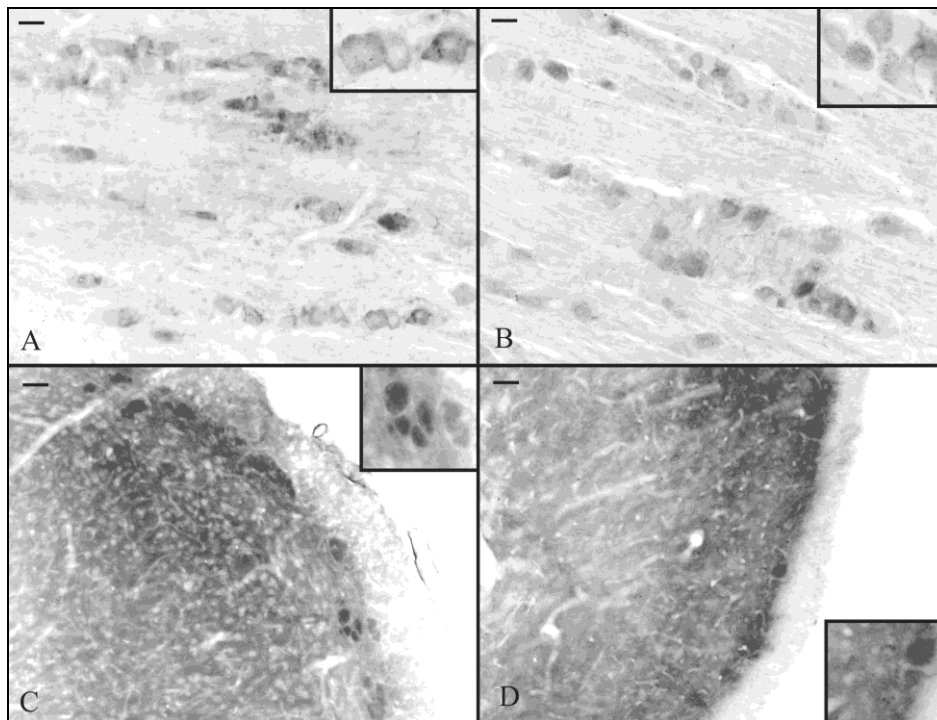
36. ábra: A c-Fos expressziót bemutató immunhisztokémiai képek PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerek agytörzsi trigeminus magjaiban, 4 órával a fiziológiás sóoldattal vagy NTG-vel történt kezelést követően. (200× nagyítás, mértékvonal: 100 μm) A neuronális aktivációt a barna magok jelzik (nyilak).



37. ábra: A c-Fos immunhisztokémia kvantitatív értékelése A: a trigeminus ganglionban B: a nucleus caudalis trigeminiben PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerekben, 2 és 4 órával a kezelés után. Az egyes oszlopok az átlag±SEM értékeit jelzik (a látóterenkénti c-Fos pozitív neuronok számát), n=5-8/csoport esetén. (\*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. PACAP<sup>+/+</sup> fiz.sóoldat; <sup>+</sup>p<0,001 vs. PACAP<sup>+/+</sup> NTG 2 óra; <sup>x</sup>p<0,001 vs. PACAP<sup>+/+</sup> NTG 4 óra. Kétutas ANOVA+Fisher teszt.)

### A PAC1 receptor expressziója PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerek trigeminális ganglionjaiban és trigeminális nucleus caudalisában

Az immunfluoreszcens reakció alapján mindkét csoport trigeminális ganglionjaiban és nucleus caudalisában a PAC1 receptor hasonló mértékben expresszálódik. A kétutas ANOVA-val történt mennyiségi analízis nem mutatott szignifikáns különbséget a TRG-ben sem a genotípust ( $F=0,538$ ,  $p=0,48$ ), sem az NTG kezelést ( $F=0,411$ ,  $p=0,53$ ) vagy ezek interakcióját tekintve ( $F=1,37$ ,  $p=0,26$ ). Ehhez hasonlóan a TNC-ben sem a genotípust ( $F=0,02$ ,  $p=0,99$ ), sem a kezelést ( $F=0,21$ ,  $p=0,66$ ), sem ezek interakciója ( $F=0,23$ ,  $p=0,65$ ) nem befolyásolta szignifikáns mértékben a receptor kifejeződését. Ebből arra következtetünk, hogy a genotípus vagy az NTG stimuláció nem befolyásolja a PAC1 receptor expresszióját ezeken a területeken (38., 39. ábra).



38. ábra: A PAC1 receptor immunhisztokémiai lokalizációja A,B: a trigeminus ganglionban, C,D: a nucleus caudalis trigeminiben, PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerekben. (Mértékvonal: 20 $\mu$ m valamennyi kép esetén.)

## A. TRG

SSD (arbitrary units)	PACAP <sup>+/+</sup>		PACAP <sup>-/-</sup>	
	fiz.sóoldat	NTG	fiz.sóoldat	NTG
Átlag	9.37	7.36	7.27	7.86
SEM	1.73	1.35	0.25	0.18

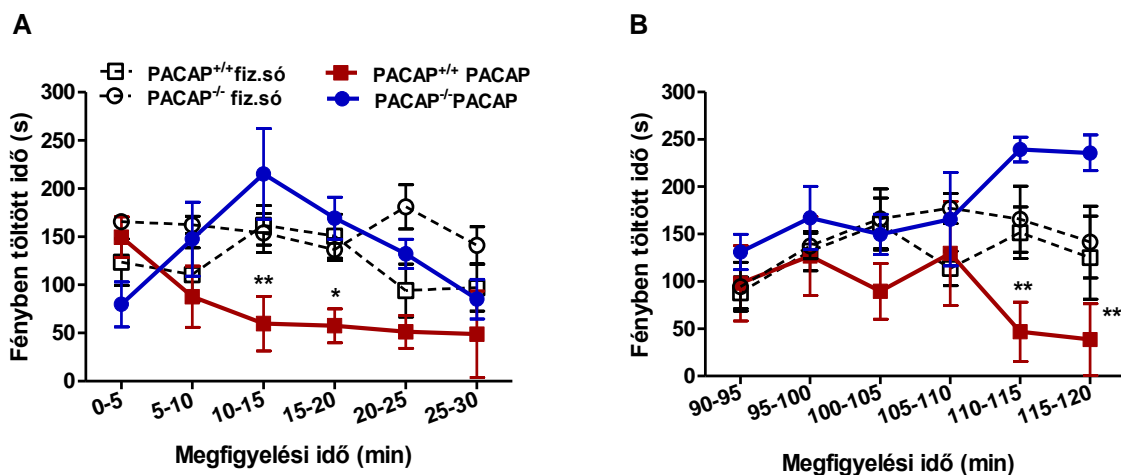
## B. TNC

SSD (arbitrary units)	PACAP <sup>+/+</sup>		PACAP <sup>-/-</sup>	
	fiz.sóoldat	NTG	fiz.sóoldat	NTG
Átlag	29.04	25.20	27.02	27.09
SEM	1.38	4.54	2.65	6.08

39. ábra: A PAC1 receptor expresszió kvantitatív értékelése. A PAC1 receptor immundenzitás specifikus szignáldenzitás (SSD) értékei A: a trigeminus ganglionban, B: a nucleus caudalis trigeminiben.

## A PACAP-38 által kiváltott fénykerülő magatartás PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerekben

A 300 µg/kg PACAP-38 intraperitonelis injekciója jelentős fény-averzív magatartást váltott ki a vad típusú, PACAP<sup>+/+</sup> egerekben mind a 2 órás megfigyelési idő korai, illetve késői fázisában. E fotofóbia megjelenése és mintázata nagyon hasonló volt az NTG-kezelés által kiváltott hatáshoz. A génhányos, PACAP<sup>-/-</sup> egércsoportban nem tapasztaltunk fénykerülő magatartást PACAP-38 hatására (40. ábra).

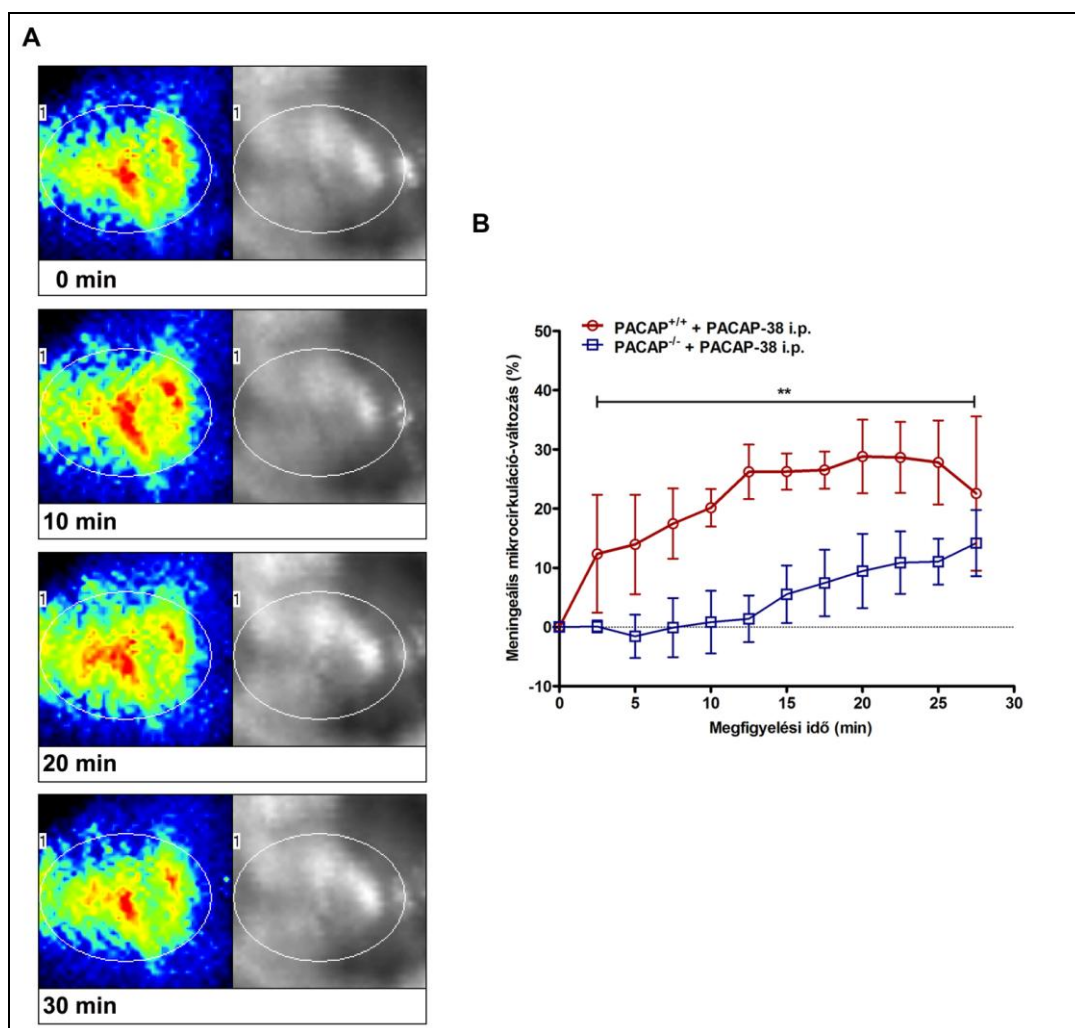


40. ábra: PACAP-38 által kiváltott fény-averzív magatartás PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerekben az injekció utáni korai (A: 0-30. perc) és késői (B: 90-120. perc) periódusban. Az egyes mérési pontok az átlag±SEM értékeit ábrázolják, n=4-8/csoport esetén. (\*p<0,05, \*\*p<0,01 vs.PACAP-38 kezelt PACAP<sup>-/-</sup>. Kétutas ANOVA+Bonferroni t-teszt.)

### A PACAP-38 által kiváltott meningeális vazodilatáció PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerekben

A vad típusú egércsoportban 300 µg/kg i.p. PACAP-38 hatására 20%-os agyfelszíni mikrocirkuláció-fokozódás alakult ki. A hatás 10 percen belül jelentkezett, 30%-os maximumát 20 percnél érte el, majd 25 perc után csökkenni kezdett. Ugyanez a kezelés a génihiányos egércsoportban nem váltott ki mikrocirkuláció-változást az első 15 percben, és a második 15 perces periódusban is csak 10%-os emelkedést eredményezett. Ez szignifikánsan kisebb mértékű válasz volt a PACAP<sup>+/+</sup> egércsoportban megfigyelthez képest (41. ábra).

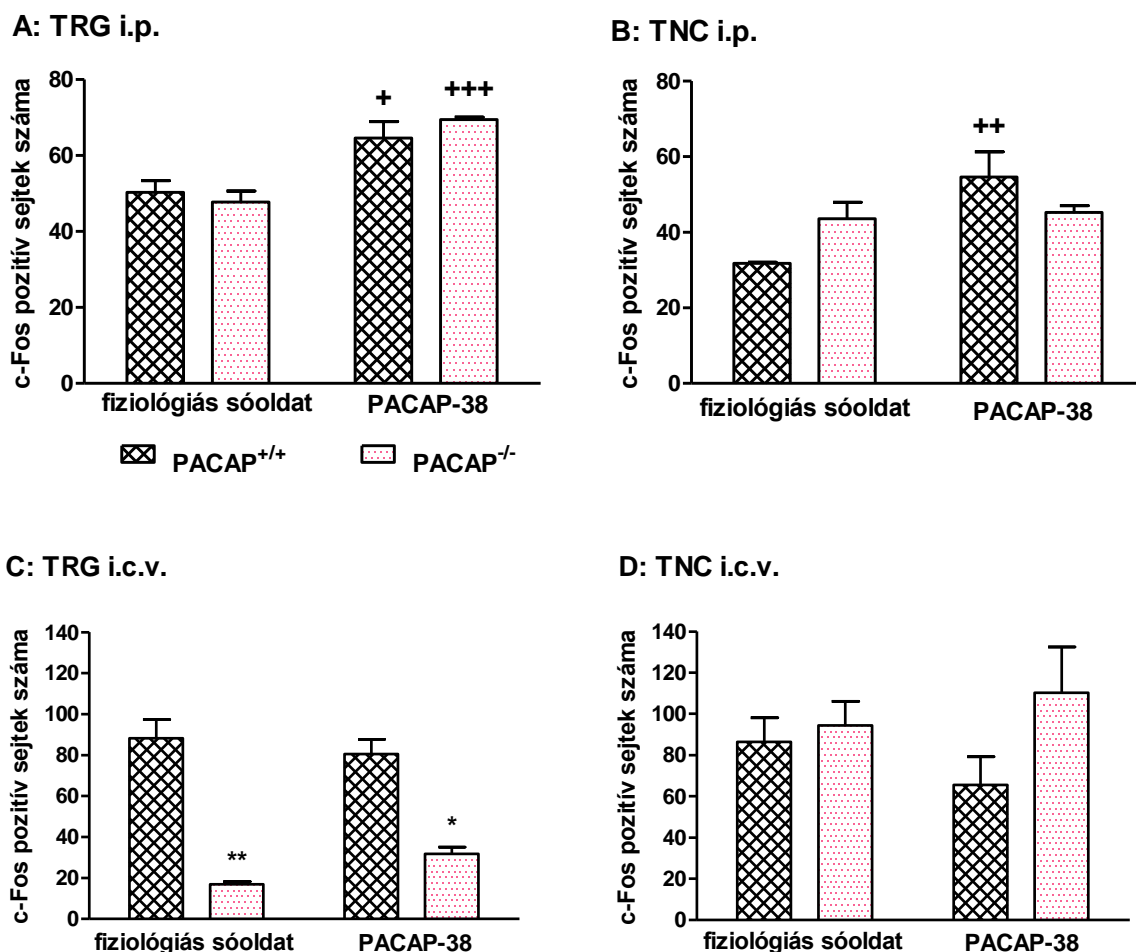
A szisztémás vérnyomás 80,6±0,4 Hgmm-ről 62,8±0,1 Hgmm-re csökkent 10 percen belül és megközelítőleg változatlan maradt a 30 perces mérés alatt. A két csoport között szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető.



41. ábra: PACAP-38 által kiváltott mikrocirkuláció-változás PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerekben. A: reprezentatív laser Doppler képek 10, 20 és 30 perccel az i.p. PACAP kezelés után. Kék szín jelzi az alacsony perfúziójú területeket, zöld és sárga jelöli a magasabb perfúziót, míg a piros a legmagasabb mikrocirkulációjú területeket jeöli. B: A meningeális mikrocirkuláció-változás értékei a megfigyelési idő függvényében. Az egyes mérési pontok az átlag±SEM értékeit jelzik, a kezdeti referencia képekhez képest, n=5-6/csoport esetén. (\*\*p<0,01 vs.PACAP-kezelt PACAP<sup>-/-</sup>. Egyutas ANOVA+Bonferroni módosított t-teszt.)

## A PACAP-38 által kiváltott c-Fos expresszió PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerek trigeminális ganglionjaiban és trigeminális nucleus caudalisában

Az i.p. PACAP-38 injekció szignifikánsan növelte a neuronális aktivációt jelző c-Fos expressziót 4 órával a beadás után mindkét csoport trigeminus ganglionjaiban, de csak a PACAP<sup>+/+</sup> csoport nucleus caudalisában. Ezzel összehasonlítva az agykamrába injektált (i.c.v.) PACAP-38 nem növelte a c-Fos pozitív neuronok számát sem a vad típusú, sem a génhányos csoport vizsgált régióiban (42. ábra). Érdekes módon a PACAP<sup>+/+</sup> egerekben mindkét területen jelentősen emelkedett a c-Fos expresszió i.c.v. adást követően az i.p. injekcióhoz viszonyítva, nemcsak a PACAP, hanem a fiziológias só adása után is. Szignifikánsan kisebb mértékű c-Fos immunpozitivitást tapasztaltunk azonban a PACAP hiányos egerek trigeminus ganglionjában, mind fiziológias sóoldat, mind PACAP-38 i.c.v. adása után.



42. ábra: A c-Fos immunhisztokémia kvantitatív értékelése A,C: a trigeminus ganglionban, B,D: a nucleus caudalis trigeminiben, PACAP<sup>+/+</sup> és PACAP<sup>-/-</sup> egerekben, 4 órával az i.p. vagy i.c.v. PACAP-38/fiz.sóoldat kezelés után. Az egyes oszlopok a látóterenkénti c-Fos pozitív neuronok számát jelzik, n=4-5/csoport esetén. (\*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. PACAP<sup>+/+</sup>; +p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,001 vs.a megfelelő fiz.sóoldattal kezelt csoport. Kétutas ANOVA+Fisher teszt.)

## **MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK**

Magatartási, funkcionális és morfológiai vizsgálatokkal PACAP génhiányos egerekben nyert eredményeink bizonyítják a PACAP fontos, aktiváló szerepét a trigeminovaszkuláris rendszerben. Ezt az aktiváló szerepet egyrészt közvetlenül a meningeális ereken, másrészt a TRG és a TNC szintjén fejt ki. A PACAP lehetséges szerepét a trigeminovaszkuláris rendszerben már korábban is feltételezték az emberi agytörzs ún. „migrén generátor” régiójában való lokalizációja alapján (Tajti és mtsai. 2001), a TNC-ben és a nyaki gerincvelő C1-C2-es szegmentumában való jelenléte (Uddman és mtsai. 2002), valamint a dura mater hízósejtjeiben történő előfordulása miatt (Theoharides és mtsai. 2005). Ezen immunolokalizációs eredmények jelentőségét tovább erősítette a PACAP és PAC1 receptor kifejeződése az arteria meningea media simaizomzatában (Boni és mtsai. 2009; Chan és mtsai. 2011), valamint azok a klinikai adatok, amelyek migrénes páciensekben a PACAP infúziós adagolása következtében kialakuló erős fejfájásról számoltak be (Schytz és mtsai. 2009).

A trigeminovaszkuláris rendszer nitroglicerinnel történő kémiai aktivációja egy széles körben alkalmazott, jól reprodukálható modell (Bergerot és mtsai. 2006; Olesen és mtsai. 1994, 1995). Jelentőségét emberben is leírták (Olesen 2010), bár a migrén prevenciójával és akut kezelésével kapcsolatban az indukálható és neurális nitrogén-monoxid-szintáz (iNOS és nNOS) gátlásának terápiás jelentőségét még nem sikerült randomizált, kontrollált klinikai vizsgálatokban bizonyítani (Goadsby 2010). A nitroglicerinnel NO leadása révén a trigeminovaszkuláris rendszer stimulációjához vezet az erek és a szenzoros idegvégződések, valamint a TRG és a TNC szintjén, amely perifériás és centrális szenzitizációt hoz létre (Olesen 2010; Tassorelli és mtsai. 1999; van der Kuy 2003).

A fény-averzió a páciensek többségénél jelentős tünete a migrén rohamoknak (Choi és mtsai. 2009). E tünet állatkísérletes vizsgálatára szolgált a világos-sötét doboz, mely alapvetően a szorongás-vizsgálat eszköze. Recober és munkatársai a dobozt módosítva a fénykerülő magatartást vizsgálták nestin/hRAMP1 transzgenikus egerekben, melyek megnövekedett szenzitivitással rendelkeznek a CGRP iránt (Recober és mtsai. 2010). Kísérleteinkben az általuk módosított dobozt elkészítve azt tapasztaltuk, hogy az NTG jelentős mértékű fénykerülő magatartást váltott ki a vad típusú egerekben, míg ez szignifikánsan kisebb volt a génhiányos, PACAP<sup>-/-</sup> állatcsoportban.



Az i.p. NTG vad típusú egerekben jelentős mértékű meningeális vazodilatációt eredményezett 4 órán keresztül. Ezzel szemben a PACAP génhiányos csoportban e kezelés a kísérlet első 2 órájában nem váltott ki mikrocirkuláció-fokozódást, a későbbi fázisban pedig szignifikánsan kisebb emelkedést okozott. A PACAP<sup>+/+</sup> egértörzsben a c-Fos pozitív sejtek száma korábban és nagyobb mértékben emelkedett a TNC-ben, mint a TRG-ben, alátámasztva a teóriát, miszerint a centrális szenzitizáció elengedhetetlen kezdeti folyamata az NTG-indukált trigeminovaskuláris aktivációnak (Párdutz és mtsai. 2000; Tassorelli és mtsai. 1999). Négy órával az NTG injekciót követően a vad típusú egércsoportban a c-Fos immunpozitivitás jelentős emelkedését figyeltük meg a TRG-ben is. A génhiányos csoportban a c-Fos expresszió egyik időpontban sem változott, alátámasztva a centrális és perifériás szenzitizáció hiányát. Mindezek alapján a PACAP kulcsfontosságú mediátornak bizonyult a migrénnel összefüggő neuron aktivációs folyamatokban. A migrén pathomechanizmusában a megnövekedett meningeális vazodilatáció és neurogén gyulladás mellett (Messlinger 2009; Moskowitz és mtsai. 1993) fontos tényező a trigeminális neuronok hyper-excitabilitása egyrészt a TRG, másrészt a TNC szintjén, amely kóros szenzoros információfeldolgozást eredményez (Schürks és Diener 2008). A PACAP trigeminovaskuláris rendszert aktiváló mechanizmusa jól magyarázható a PAC1 és VPAC receptorokon keresztül megvalósuló, Gs és Gq protein-asszociált jelátviteli folyamatokkal. Az emelkedett intracelluláris cAMP szint vazodilatációt, a cAMP és Ca<sup>2+</sup> szint emelkedése idegi stimulációt és hízósejt degranulációt eredményez (Laburthe és mtsai. 2007; Spengler és mtsai. 1993; Vaudry és mtsai. 2009). A PACAP és a CGRP trigeminovaskuláris rendszerben való részleges kolokalizációja miatt (Edvinsson és mtsai. 2001) elképzelhető, hogy excitátoros hatásuk egymáshoz kapcsolódik. A lehetséges interakciók felderítéséhez szelektíven ható, centrális antagonistákra lenne szükség. A PAC1 receptor expressziója hasonló mértékű a TRG-ben és a TNC-ben a vad típusú és a PACAP génhiányos egerekben, amely bizonyítja, hogy a peptid hiánya nem befolyásolja specifikus receptorának jelenlétét és mennyiségét ezeken a migrénnel összefüggő agyterületeken. Ezek az adatok összhangban állnak más szövetekből nyert eredményekkel (Girard és mtsai. 2006). Ezen felül, a funkcionális tesztekben és c-Fos expresszióban talált különbségek ellenére a PAC1 receptor expressziója nem változott egyik csoportban sem az NTG stimulációt követő 4 órában. Bár a VPAC receptorok szerepe nem zárható ki a PACAP trigeminovaskuláris hatásaiban, kísérleteinkben a PAC1 receptor szerepére összpontosítottunk. Ennek oka, hogy a PAC1 a PACAP specifikus receptora, ami iránt a PACAP nagyobb affinitással rendelkezik, mint a VPAC receptorok iránt, valamint jelentősen kisebb nociceptív válaszokat regisztráltak a PAC1 receptorral nem rendelkező egerekben

(Jongsma és mtsai. 2001). Emellett a PACAP migrénszerű fejfájást okozott emberben (Schytz és mtsai. 2009), míg a VIP nem. Mindezek alapján a PAC1 receptort tartják potenciális új célpontnak a migrénellenes terápiában (Schytz és mtsai. 2010a).

A szisztémás vérnyomás hasonló mértékű, kb. 30-35 %-os csökkenését tapasztaltuk mindkét uretánnal altatott egértörzsben az NTG-kezelés következtében, ezért a vérnyomás változása nem magyarázza az eltérő mikrocirkulációs válaszokat. Továbbá az i.p. alkalmazott PACAP mérsékelt hipotenzív hatása ellenére meningeális értágító hatása egyértelmű.

A PACAP-38 vér-agy gáton való átjutása nagyon csekély, kevesebb, mint 0,1 % (Banks és mtsai. 1993). Ebből következik, hogy i.p. alkalmazás után megfigyelt hatásai a meningeális erekből és a szenzoros idegvégződésekből származnak, amely a migrénnel összefüggő agyterületek másodlagos aktivációját eredményezi. Az i.p. PACAP injekció az NTG-hez hasonlóan fénykerülő magatartást és meningeális értágulatot váltott ki a vad típusú egértörzsben, azonban ezek hiányoztak vagy jelentősen kisebb mértékűek voltak a génhányos egerek esetén. További változás volt a PACAP hatására a c-Fos expresszázó TRG sejtek megemelkedett száma mindkét állatcsoportban, de a TNC-ben csak a vad törzsben jött létre fokozott neuronaktiváció 4 órával később. Az exogén peptid a PACAPerg trigeminális szenzoros neuronok perifériás végződéseit stimulja a meningeális területen, amely a sejttestek hasonló aktivációját okozza mindkét csoport TRG-jében, azonban endogén PACAP hiányában a TNC nem tud aktiválódni. Az elsődleges trigeminális érzőidegek centrális végződéseiből felszabaduló PACAP elengedhetetlennek tűnik a centrális szenzitizáció mechanizmusában. Szemben az i.p. PACAP-38 hatására tapasztalt változásokkal, az i.c.v. alkalmazott PACAP nem emelte a c-Fos pozitív neuronok számát egyik csoport egyik régiójában sem. Ezért olyan kinetikai okok lehetnek felelősek, mint a gyors elimináció a gerincvelői folyadékban vagy nem megfelelő penetrációs képesség. Érdekes tapasztalatok ugyanakkor, hogy a) a vad típus mindkét régiójában jelentősen emelkedett a c-Fos expresszió az i.p. injekcióhoz képest mind a fiziológiás só, mind PACAP adása után, b) a génhányos egértörzs jelentősen csökkent c-Fos immunpozitivitása a TRG-ben mindkét injekciót követően. Az első megfigyelés magyarázatául maga a műtéti beavatkozás szolgálhat (a koponya fúrása és a kanül beültetése a mély altatás ellenére is fájdalmas stimulus), a második megfigyelést korábbi eredményeink is alátámasztják, mint a csökkent nocicepció és c-Fos expresszió a PACAP génhányos egerek fájdalom-asszociált agyi régióiban számos fájdalommodellben (Sándor és mtsai. 2010). Jelen eredményeink összhangban állnak azokkal a korábbi adatokkal, hogy PACAP génhányos egerekben jelentősen csökkent nocifenzív magatartást tapasztaltunk akut szomatikus és zsigeri kemonocicepció tesztekben, gyulladáso

nocicepció és hiperalgécia modellekben, valamint a krónikus traumatikus mononeuropátia modelljében (Sándor és mtsai. 2009, 2010). Ezt jelentős mértékben csökkent c-Fos expresszió kísérte a szomatoszenzoros kéreg és a periaqueductalis szürkeállomány területén, amely a korai idegi aktiváció érzékeny és általános markere és alátámasztja, hogy a PACAP fontos excitátoros szerepet játszik a fájdalommal kapcsolatos folyamatokban (Sándor és mtsai. 2010). A hátsó szarvi neuronok elektrofiziológiai aktivitását (Dickinson és mtsai. 1997), valamint nyúlvelő átvágás után patkányok flexor reflexeit (Xu és Wiesenfeld-Hallinn 1996) szintén nagymértékben fokozta a PACAP. A PACAP-génhiányos egerek több eltérő morfológiai tulajdonsággal rendelkeznek az agy fejlődésében, ú.m. eltérő kisagyi növekedés (Allais és mtsai. 2007), és kóros axonális arborizáció (Yamada és mtsai. 2010). Ezeken felül számos magatartásbeli eltérést megfigyeltek a PACAP génnel nem rendelkező egértörzsekben (Hashimoto és mtsai. 2006): kisebb mértékű szorongás és ugráló magatartás (Hashimoto és mtsai. 2001), csökkent depresszív viselkedés (Hashimoto és mtsai. 2006, 2009; Gaszner és mtsai. 2012), valamint eltérő morfin-indukált jutalmazó mechanizmusok (Marquez és mtsai. 2009). A vese fénystimulációval kiváltott szimpatikus idegi aktivitás-emelkedése, a plazma kortikoszteron szintje, valamint a c-Fos expresszió a nucleus suprachiasmaticusban szintén ugyancsak szignifikánsan csökkentek a PACAP génhiányos állatokban (Hatanaka és mtsai. 2008).

A szerotonin 5-HT<sub>1B/D</sub> receptor agonista triptánok, valamint a közelmúltban kifejlesztett CGRP receptor antagonistá olcegepant és telcagepant hatékonynak bizonyultak az akut migrénes rohamok tüneteinek enyhítésében (Ho és mtsai. 2008, 2010). Jelentős érösszehúzó hatással rendelkeznek a meningeális ereken, de nem fejtenek ki erős és hosszantartó gátlást a trigeminális hiperexcitabilitást illetően (Petersen és mtsai. 2004; Villalon és mtsai. 2003). Ezért a migrén gyógyszeres terápiája korántsem megoldott, a profilaxis tekintetében különösen (Edvinsson és Linde 2010; Láinez 2009). A jelenleg forgalomban lévő szerek szív-érrendszeri és emésztőrendszeri mellékhatásai, valamint a terápiarezisztens esetek jelentős száma újabb gyógyszer-célpontok azonosítását teszik szükségessé (Chan és mtsai. 2011; Maassen VanDenBrink és mtsai. 1998). Jelen munkánk szolgáltatja az első állatkísérletes bizonyítékot arra, hogy a PACAP jelentős szerepet játszik a trigeminovaskuláris aktivációban. Az e hatásokat közvetítő receptorának azonosítása, a jelátviteli mechanizmusok részletes felderítése gyógyszerfejlesztési szempontból is rendkívül érdekes perspektívákat jelent. A vér-agy gáton jól penetráló kis molekulájú, receptortípusra szelektív antagonisták szintézise és preklinikai tesztelése fontos feladat a közeljövőben.

# ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatócsoportunk a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből felszabaduló neuropeptidek hatásainak komplex vizsgálatát végzi, PhD értekezésem ezen belül a szomatosztatin és a PACAP gyulladáshoz és nociceptív folyamatokban betöltött szerepének analizálására fókuszált. A disszertációban bemutatott legfontosabb megállapítások a következők:

1) A szomatosztatin  $sst_4$  receptora fontos szerepet játszik az akut és krónikus ízületi gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokban. Az  $sst_4$  receptor hiánya esetén az akut és a krónikus modellben is szignifikánsan nagyobb mértékű mechanikai hiperalgéziát (fájdalomküszöb-csökkenést), valamint az akut modellben szignifikánsan nagyobb lábduzzadást tapasztaltunk, elsősorban a gyulladáshoz kapcsolódó folyamatok korábbi stádiumaiban. A krónikus arthritisz modellben továbbá a gyulladt végtag terhelés-csökkenése és az ízületi homogenizátumban az  $IFN\gamma$  és  $TNF\alpha$  koncentrációja ugyancsak szignifikánsan nagyobb volt az  $sst_4$  receptor hiánya esetén. A szelektív agonista peptidomimetikum J-2156 hatékonyan gátolta az akut gyulladáshoz kapcsolódó mechanikai hiperalgéziát. Mindezek alapján az  $sst_4$  receptor érdekes új gyulladáscsökkentő és analgetikum célpont lehet.

2) A szomatosztatin és a kortisztatin hasonló kötődési profillal és agonista tulajdonsággal rendelkezik az  $sst_1$  és  $sst_4$  szomatosztatin receptorokon. Ezek a peptidek jelentősen gátolják a szenzoros neuropeptid CGRP felszabadulását a perifériás szenzoros idegvégződésekből, a következményes akut plazma protein extravazációt, valamint a hő- és mechanikai hiperalgéziát. A CST és SST neurogén gyulladáshoz és hiperalgéziához kifejtett hasonló hatásai mellett a CST szignifikánsan nagyobb gátló hatással rendelkezik a gyulladáshoz kapcsolódó citokintermelésre.

3) A PACAP jelentős szerepet játszik a trigeminovaskuláris aktivációban. A PACAP hiánya egerekben szignifikánsan kisebb mértékű nitroglicerinnel kiváltott fotofóbiát, kisebb mértékű meningeális mikrocirkuláció-fokozódást, és alacsonyabb c-Fos expressziót eredményezett a TRG-ben és a TNC-ben. Az elsődleges trigeminális érzőidegek centrális végződéseiből felszabaduló PACAP kulcsfontosságú mediátor a centrális szenzitizáció mechanizmusában. Célmolekulájának azonosítása új perspektívákat nyithat a migrénelles farmakoterápiában.

## Irodalomjegyzék

**Allais A, Burel D, Isaac ER, Gray SL, Basille M, Ravni A, Sherwood NM, Vaudry H, Gonzalez BJ.** (2007) Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Eur J Neurosci*; 25:2604-2618.

**Arbab MA, Wiklund L, Svendgaard NA.** (1986) Origin and distribution of cerebral vascular innervation from superior cervical, trigeminal and spinal ganglia investigated with retrograde and anterograde WGA-HRP tracing in the rat. *Neurosci.* 19(3):695-708.

**Arimura A, Somogyvári-Vígh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C.** (1991) Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: Highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinol* 129: 2787–2789.

**Ausubel RM, et al.** (1992) *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd Edition, Eds., John Wiley and Sons.; pp. 14-24–14-30.

**Banks WA, Kastin AJ, Komaki G, Arimura A.** (1993) Passage of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-27 and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide1-38 across the bloodbrain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 267:690-6.

**Banks WA, Schally AV, Barrera CM, Fasold MB, Durham DA, Csernus V, Groot K, Kastin A.** (1990) Permeability of the murine blood–brain barrier to some octapeptide analogs of somatostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6762–6766.

**Bánvölgyi Á, Pozsgai G, Brain SD, Helyes Zs, Szolcsányi J, Ghosh M, Meleg B, Pintér E.** (2004) Mustard oil induces a transient receptor potential vanilloid 1 receptor-independent neurogenic inflammation and a nonneurogenic cellular inflammatory component in mice. *Neurosci* 125: 449-459.

**Bennett GJ, Xie YK.** (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33(1):87-107.

**Bergerot A, Holland PR, Akerman S, Bartsch T, Ahn AH, MaassenVanDenBrink A, Reuter U, Tassorelli C, Schoenen J, Mitsikostas DD, van den Maagdenberg AM, Goadsby PJ.** (2006) Animal models of migraine: looking at the component parts of a complex disorder. *Eur J Neurosci* 24:1517-34.

**Billiau A, Matthys P.** (2001) Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 70: 849-860.

**Bojnik E., Magyar A., Tóth G., Bajusz S., Borsodi A., Benyhe S.** (2009) Binding studies of novel, non-mammalian enkephalins, structures predicted from frog and lungfish brain cDNA sequences. *Neurosci* 158(2), 867-74.

**Boni LJ, Ploug KB, Olesen J, Jansen-Olesen I, Gupta S.** (2009) The in vivo effect of VIP, PACAP-38 and PACAP-27 and mRNA expression of their receptors in rat middle meningeal artery. *Cephalalgia* 29(8):837-47.

**Bölskei K, Horváth D, Szolcsányi J, Pethő G. (2007)** Heat injury-induced drop of the noxious heat threshold measured with an increasing-temperature water bath: a novel rat thermal hyperalgesia model. *Eur J Pharmacol.* 564:80-87.

**Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D. (2005)** American Diabetes Association. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 28(4):956-62.

**Brabet P, Diriong S, Journot L, Bockaert J, Taviaux S. (1996)** Localization of the human pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide receptor (PACAP1-R) gene to 7p15-p14 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 38(1):100-2.

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

**Broglio F, Koetsveld Pv P, Benso A, Gottero C, Prodam F, Papotti M, Muccioli G, Gauna C, Hofland L, Deghenghi R, Arvat E, Van Der Lely AJ, Ghigo E. (2002)** Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(10):4829-32.

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

**Buerkle H, Schapsmeier M, Bantel C, Marcus MAE, Wusten R, van Aken H. (1999)** Thermal and mechanical antinociceptive action of spinal vs peripherally administered clonidine in the rat inflamed knee joint model. *Br. J. Anaesth.* 83: 436-41.

**Bullitt E. (1990)** Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 296(4):517-30.

**Burgess JR, Shepherd JJ, Murton FJ, Parameswaran V, Greenaway TM. (1996)** Effective control of bone pain by octreotide in a patient with metastatic gastrinoma. *Med. J. Aust.* 164: 725-727.

**Burstein R, Cutrer MF, Yarnitsky D. (2000a)** The development of cutaneous allodynia during a migraine attack clinical evidence for the sequential recruitment of spinal and supraspinal nociceptive neurons in migraine. *Brain.* 123 ( Pt 8):1703-9.

**Burstein R, Yarnitsky D, Goor-Aryeh I, Ransil BJ, Bajwa ZH. (2000b)** An association between migraine and cutaneous allodynia. *Ann Neurol.* 47(5):614-24.

**Buzzi MG, Tassorelli C. (2010)** Experimental models of migraine. *Handb Clin Neurol* 97:109-23.

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

- Capuano A, Currò D, Navarra P, Tringali G.** (2011) Cortistatin modulates calcitonin gene-related peptide release from neuronal tissues of rat. Comparison with somatostatin. *Peptides* 32(1):138-43.
- Carlton SM, Du J, Davidson E, Zhou S, Coggeshall RE.** (2001b) Somatostatin receptors on peripheral primary afferent terminals: inhibition of sensitized nociceptors. *Pain* 90(3):233-44.
- Carlton SM, Du J, Zhou S, Coggeshall RE.** (2001a) Tonic control of peripheral cutaneous nociceptors by somatostatin receptors. *J Neurosci.* 21(11):4042-49.
- Chan KY, Vermeersch S, de Hoon J, Villalón CM, Maassenvandenbrink A.** (2011) Potential mechanisms of prospective antimigraine drugs: A focus on vascular (side) effects. *Pharmacol Ther* 129(3):332-51.
- Chaplan SR, Sorkin LS.** (1997) Agonizing over pain terminology. *Pain Forum* 6:81-87.
- Choi JY, Oh K, Kim BJ, Chung CS, Koh SB, Park KW.** (2009) Usefulness of a photophobia questionnaire in patients with migraine. *Cephalalgia* 29(9):953-9.
- Christiansen T, Bruun A, Knight YE, Goadsby PJ, Edvinsson L.** (2003) Immunoreactivity of NOS, CGRP, PACAP, SP and VIP in the trigeminal nucleus caudalis and in the cervical spinal cord C1 and C2 of the cat. *J Headache Pain* 4:156-163.
- Chrubasik J, Meynadier J, Blond S, Scherpereel P, Ackerman E, Weinstock M, Bonath K, Cramer H, Wunsch E.** (1984) Somatostatin, a potent analgesic. *Lancet* 2: 1208-1209.
- Chrubasik J, Meynadier J, Scherpereel P, Wunsch E.** (1985) The effect of epidural somatostatin on postoperative pain. *Anesth. Analg.* 64: 1085-1088.
- Chrubasik J.** (1991) Somatostatin and chronic pain management. In: *Contemporary issues in chronic pain management* (ed: Parris WCV), pp. 87-96.
- Córdoba-Chacón J, Gahete MD, Pozo-Salas AI, Martínez-Fuentes AJ, de Lecea L, Gracia-Navarro F, Kineman RD, Castaño JP, Luque RM.** (2011) Cortistatin is not a somatostatin analogue but stimulates prolactin release and inhibits GH and ACTH in a gender-dependent fashion: potential role of ghrelin. *Endocrinology* 152(12):4800-12.
- Corsi MM, Ticozzi C, Netti C, Fulgenzi A, Tiengo M, Gaja G, Guidobono F, Ferrero ME.** (1997) The effect of somatostatin on experimental inflammation in rats. *Anesth. Analg.* 85: 1112-1115.
- Criado JR, Li H, Jiang X, Spina M, Huitrón-Reséndiz S, Liapakis G, Calbet M, Siehler S, Henriksen SJ, Koob G, Hoyer D, Sutcliffe JG, Goodman M, de Lecea L.** (1999) Structural and compositional determinants of cortistatin activity. *J Neurosci Res.* 56(6):611-9.
- Dalm VA, Hofland LJ, Ferone D, Croxson R, Lamberts SW, van Hagen PM.** (2003c) The role of somatostatin and somatostatin analogs in the pathophysiology of the human immune system. *J Endocrinol Invest.* 26(8 Suppl):94-102.

**Dalm VA**, van Hagen PM, van Koetsveld PM, Achilefu S, Houtsmuller AB, Pols DH, van der Lely AJ, Lamberts SW, Hofland LJ. (2003a) Expression of somatostatin, cortistatin, and somatostatin receptors in human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285(2):E344-53.

**Dalm VA**, van Hagen PM, van Koetsveld PM, Langerak AW, van der Lely AJ, Lamberts SW, Hofland LJ. (2003b) Cortistatin rather than somatostatin as a potential endogenous ligand for somatostatin receptors in the human immune system. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(1):270-6.

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

**Delgado M**, Ganea D. (2008) Anti-inflammatory neuropeptides: a new class of endogenous immunoregulatory agents. *Brain Behav Immun.* 22(8):1146-51.

**Dickinson T**, Fleetwood-Walker SM. (1999) VIP and PACAP: very important in pain? *Trends Pharmacol. Sci.* 20:324-329.

**Dickinson T**, Fleetwood-Walker SM, Mitchell R, Lutz EM. (1997) Evidence for roles of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptors in modulating the responses of rat dorsal horn neurons to sensory inputs. *Neuropeptides* 31:175-185.

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

**Diener HC**; RPR100893 Study Group. (2003) RPR100893, a substance-P antagonist, is not effective in the treatment of migraine attacks. *Cephalalgia.* 23(3):183-5.

**Dimitriadou V**, Buzzi MG, Moskowitz MA, Theoharides TC. (1991) Trigeminal sensory fiber stimulation induces morphological changes reflecting secretion in rat dura mater mast cells. *Neurosci.* 44(1):97-112.

**Dimitriadou V**, Buzzi MG, Theoharides TC, Moskowitz MA. (1992) Ultrastructural evidence for neurogenically mediated changes in blood vessels of the rat dura mater and tongue following antidromic trigeminal stimulation. *Neurosci.* 48(1):187-203.

**Dinarello CA.** (1994) The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *The FASEB J* 8:1314-1325.

**Dinarello CA.** (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* 118: 503-508.

**Dong X**, Han S, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. (2001) A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell.* 106(5):619-32.

**Dun EC**, Huang RL, Dun SL, Dun NJ. (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide immunoreactivity in human spinal cord and dorsal root ganglia. *Brain Res.* 721: 233-237.



**Edvinsson** L, and Linde M. (2010) New drugs in migraine treatment and prophylaxis: telcagepant and topiramate. *Lancet* 376(9741):645-55.

**Edvinsson** L, Elsås T, Suzuki N, Shimizu T, Lee TJ. (2001) Origin and Co-localization of nitric oxide synthase, CGRP, PACAP, and VIP in the cerebral circulation of the rat. *Microsc Res Tech* 53(3):221-8.

**Edvinsson** L, Owman C, Sjöberg NO. (1976) Autonomic nerves, mast cells, and amine receptors in human brain vessels. A histochemical and pharmacological study. *Brain Res* 115:377- 393.

**Elekes** K, Helyes Z, Kereskai L, Sandor K, Pinter E, Pozsgai G, Tekus V, Banvolgyi A, Nemeth J, Szuts T, Keri G, Szolcsanyi J. (2008) Inhibitory effects of synthetic somatostatin receptor subtype 4 agonists on acute and chronic airway inflammation and hyperreactivity in the mouse. *Eur J Pharmacol* 578(2–3):313–322.

**Engström** M, Savola JM, Würster S. (2006) Differential efficacies of somatostatin receptor agonists for G-protein activation and desensitization of somatostatin receptor subtype 4-mediated responses. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 1262-1268.

**Engström** M, Tomperi J, El Darwish K, Ahman M, Savola JM, Würster S. (2005) Superagonism at the human somatostatin receptor subtype 4. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 332-338.

**Fahrenkrug** J, and Hannibal J. (1998) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide immunoreactivity in capsaicin-sensitive nerve fibres supplying the rat urinary tract. *Neurosci* 83:1261-1272.

**Feindel** W, Penfield W, McNaughton F. (1960) The tentorial nerves and localization of intracranial pain in man. *Neurology* 10:555-63.

**Ferone** D, Boschetti M, Resmini E, Giusti M, Albanese V, Goglia U, Albertelli M, Vera L, Bianchi F, Minuto F. (2006) Neuroendocrine-immune interactions: the role of cortistatin/somatostatin system. *Ann N Y Acad Sci.*1069:129-44.

**Ferrel** WM, Lam FY. (1996) Sensory neuropeptides in arthritis. *In: Neurogen inflammation.* CRC Press, USA pp. 33-49.

**Fioravanti** A, Govoni M, La Montagna G, Perpignano G, Tirri G, Trotta F, Bogliolo A, Ciocci A, Mauceri MT, 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.

**Freedman** J, Post C, Kahrström J, Ohlen A, Mollenholt P, Owman C, Alari L, Hökfelt T. (1988) Vasoconstrictor effects in spinal cord of the substance P antagonist [D-Arg, D-Trp<sup>7,9</sup> Leu<sup>11</sup>]-substance P (Spantide) and somatostatin and interaction with thyrotropin releasing hormone. *Neurosci* 27: 267-278.

**Frossard** N, Advenier C. (1991) Tachykinin receptors and the airways. *Life Sci.* 49: 1941-1953.

**Gaszner B, Jensen KO, Farkas J, Reglodi D, Csernus V, Roubos EW, Kozicz T. (2009)** Effects of maternal separation on dynamics of urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor in the rat non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus. *Int J Dev Neurosci* 27(5):439-51.

**Gaszner B, Korosi A, Palkovits M, Roubos EW, Kozicz T. (2007)** Neuropeptide Y activates urocortin 1 neurons in the nonpreganglionic Edinger-Westphal nucleus. *J Comp Neurol* 500(4):708-19.

**Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglodi D, Helyes Z. (2012)** The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 202:283-99.

**Gaumann DM, Yaksh TL, Post C, Wilcox GL, Rodriguez M. (1989)** Intrathecal somatostatin in cat and mouse studies on pain, motor behavior, and histopathology. *Anesth. Analg.* 68: 623-632.

**Gilligan JP, Lovato SJ, Erion MD, Jeng AZ. (1994)** Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. *Inflammation* 18:285–292.

**Girard BA, Lelievre V, Braas KM, Razinia T, Vizzard MA, Ioffe Y, El Meskini R, Ronnett GV, Waschek JA, May V. (2006)** Noncompensation in peptide/receptor gene expression and distinct behavioral phenotypes in VIP- and PACAP-deficient mice. *J Neurochem* 99:499-513.

**Goadsby PJ, Duckworth JW. (1987)** Effect of stimulation of trigeminal ganglion on regional cerebral blood flow in cats. *Am J Physiol.* 253(2 Pt 2):R270-4.

**Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. (1988)** Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system. *Ann Neurol.* 23(2):193-6.

**Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. (1990)** Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol.* 28(2):183-7.

**Goadsby PJ, Hoskin KL, Knight YE és mtsai. (1996)** Sagittal sinus stimulation selectively increases cerebral blood flow compared to extracerebral blood flow in the anaesthetised cat. *Cephalalgia* 16:366.

**Goadsby PJ, Lambert GA, Lance JW. (1986)** Stimulation of the trigeminal ganglion increases flow in the extracerebral but not the cerebral circulation of the monkey. *Brain Res.* 381(1):63-7.

**Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD. (2002)** Migraine--current understanding and treatment. *N Engl J Med.* 346(4):257-70.

**Goadsby PJ. (2010)** Headache. *Neurotherapeutics* 7:149-52.

**Gonzalez-Rey E**, Chorny A, Del Moral RG, Varela N, Delgado M. (2007) Therapeutic effect of cortistatin on experimental arthritis by downregulating inflammatory and Th1 responses. *Ann Rheum Dis.* 66(5):582-8.

**Gonzalez-Rey E**, Chorny A, Robledo G, Delgado M. (2006a) Cortistatin, a new antiinflammatory peptide with therapeutic effect on lethal endotoxemia. *J Exp Med.* 203(3):563-71.

**Gonzalez-Rey E**, Delgado M. (2008) Emergence of cortistatin as a new immunomodulatory factor with therapeutic potential in immune disorders. *Mol Cell Endocrinol.* 286(1-2):135-40.

**Gonzalez-Rey E**, Varela N, Sheibanie AF, Chorny A, Ganea D, Delgado M. (2006b) Cortistatin, an antiinflammatory peptide with therapeutic action in inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(11):4228-33.

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

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

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

**Hannibal J**, Ekblad E, Mulder H, Sundler F, Fahrenkrug J. (1998) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the gastrointestinal tract of the rat: distribution and effects of capsaicin or denervation. *Cell Tissue Res.* 291: 65–79.

**Harmar AJ**, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA, Waschek JA. (1998) International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol. Rev.* 50: 265–270.

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

**Hashimoto H**, Hashimoto R, Shintani N, Tanaka K, Yamamoto A, Hatanaka M, Guo X, Morita Y, Tanida M, Nagai K, Takeda M, Baba A. (2009) Depression-like behavior in the forced swimming test in PACAP-deficient mice: amelioration by the atypical antipsychotic risperidone. *J Neurochem* 110:595-602.

**Hashimoto H**, Shintani H, Baba A. (2006) New insights into the central PACAP-ergic system from the phenotypes of PACAP- and PACAP receptor-knockout mice. *Ann NY Acad Sci.* 1070:75-89.

**Hashimoto** H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A. (2001) Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13355-13360.

**Hatanaka** M, Tanida M, Shintani N, Isojima Y, Kawaguchi C, Hashimoto H, Kakuda M, Haba R, Nagai K, Baba A. (2008) Lack of light-induced elevation of renal sympathetic nerve activity and plasma corticosterone levels in PACAP-deficient mice. *Neurosci Lett*. 444:153-6.

**Helyes** Z, Nemeth J, Pinter E, Szolcsanyi J. (1997) Inhibition by nociceptin of neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals. *Br J Pharmacol* 121: 613–615.

**Helyes** Zs, Pintér E, Németh J, Kéri Gy, Thán M, Oroszi G, Horváth A, Szolcsányi J. (2001) Anti-inflammatory effect of synthetic somatostatin analogues in the rat. *Br J Pharmacol* 134: 1572-1579.

**Helyes** Zs, Pintér E, Németh J, Sándor K, Elekes K, Szabó Á, Pozsgai G, Keszthelyi D, Kereskai L, Engström M, Würster S, Szolcsányi J. (2006) Effects of the somatostatin receptor subtype 4 selective agonist J-2156 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rodents. *Br J Pharmacol* 149: 405-415.

**Helyes** Zs, Pintér E, Németh J, Szolcsányi J. (2003) Pharmacological targets for the inhibition of neurogenic inflammation. *Curr Med Chem* 2: 191-218.

**Helyes** Zs, Pintér E, Szolcsányi J. (2005) TT-232. *Drugs Future* 30: 1-9.

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

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

**Heppelmann** B, Pawlak M. (1997) Inhibitory effect of somatostatin on the mechanosensitivity of articular afferents in normal and inflamed knee joints of the rat. *Pain* 73: 377-82.

**Ho** TW, Edvinsson L, Goadsby PJ. (2010) CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. *Nat Rev Neurol*. 6(10):573-82.

**Ho** TW, Ferrari MD, Dodick DW, Galet V, Kost J, Fan X, Leibensperger H, Froman S, Assaid C, Lines C, Koppen H, Winner PK. (2008) Efficacy and tolerability of MK-0974 (telcagepant), a new oral antagonist of calcitonin gene-related peptide receptor, compared with zolmitriptan for acute migraine: a randomised, placebo-controlled, parallel-treatment trial. *Lancet* 372(9656):2115-23.

- Hofland** LJ, Lamberts SW. (1996) Somatostatin receptors and disease: role of receptor subtypes. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab* 10: 163-176.
- Holzer** P. (1991) Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.* 43: 143-201.
- Horváth** G. (2000) Endomorphin-1 and endomorphin-2: pharmacology of the selective endogenous mu-opioid receptor agonists. *Pharmacol. Ther.* 88: 437-463.
- Hoyer** D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE. (1995) Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 16: 86-88.
- Inoue** H, Asaka T, Nagata N, Koshihara Y. (1997) Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 333: 231-240.
- Jessop** DS. (2006) Endomorphins as agents for the treatment of chronic inflammatory disease. *BioDrugs* 20:161-166.
- Jiménez-Corral** C, Morán-Sánchez JC, Alonso-Navarro H. (2006) Neuropeptides in Alzheimer's disease. *Rev Neurol.* 42(6):354-9.
- Joe** B, Wilder RL. (1999) Animal models of rheumatoid arthritis. *Mol Med Today* 5: 367-369.
- Jongsma** H, Pettersson LM, Zhang Y, Reimer MK, Kanje M, Waldenström A, Sundler F, Danielsen N. (2001) Markedly reduced chronic nociceptive response in mice lacking the PAC1 receptor. *Neuroreport* 12:2215-2219.
- Jordt** SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D. (2004) Mustard oil and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427:260-265.
- Juhász** G, Zsombok T, Módos EA, Olajos S, Jakab B, Nemeth J, Szolcsányi J, Vitrai J, Bagdy G. (2003) NO-induced migraine attack: strong increase in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and negative correlation with platelet serotonin release. *Pain* 106(3):461-70.
- Kagari** T, Doi H, Shimozato T. (2002) The importance of IL-1 beta and TNF-alpha, and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *J Immunol* 169: 1459-1466.
- Kang** JS, Jeon YJ, Kim HM, Han SH, Yang K-H. (2002) Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* 302:138-144.
- Kapicioglu** S, Gökce E, Kapicioglu Z, Ovali E. (1997) Treatment of migraine attacks with a long-acting somatostatin analogue (octreotide SMS 201-995). *Cephalalgia* 17: 27-30.
- Karalis** K, Mastorakos G, Chrousos GP, Tolis G. (1994) Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo. *J Clin Invest* 93: 2000-2006.

**Kéri Gy, Érchegyi J, Horváth A, Mező 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 antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 12513-12518.

**Kim SH, Chung JM. (1992)** An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain.* 50(3):355-363.

**Knight YE, Bartsch T, Kaube H, Goadsby PJ. (2002)** P/Q-type calcium-channel blockade in the periaqueductal gray facilitates trigeminal nociception: a functional genetic link for migraine? *J Neurosci.* 22(5):RC213.

**Krantic S, Goddard I, Saveanu A, Giannetti N, Fombonne J, Cardoso A, Jaquet P, Enjalbert A. (2004)** Novel modalities of somatostatin actions. *Eur. J. Endocrinol.* 151: 643-655.

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

**Laburthe M, Couvineau A, Tan V. (2007)** Class II G-protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 28:1631-1639.

**Láinez MJ. (2009)** The effect of migraine prophylaxis on migraine-related resource use and productivity. *CNS Drugs* 23(9):727-38.

**Lam HC, Takahashi K, Ghatei MA, Kanze SM, Polak JM, Bloom SR. (1990)** Binding sites of a novel neuropeptide pituitary-adenylate-cyclase-activating polypeptide in the rat brain and lung. *Eur. J. Biochem.* 193: 725–729.

**Lambert GA, Bogduk N, Goadsby PJ, Duckworth JW, Lance JW. (1984)** Decreased carotid arterial resistance in cats in response to trigeminal stimulation. *J Neurosurg.* 61(2):307-15.

**Lambert GA, Donaldson C, Boers PM, Zagami AS. (2000)** Activation of trigeminovascular neurons by glyceryl trinitrate. *Brain Res* 887(1):203-10.

**Lecea L., del Rio JA, Criado JR, Alcántara S, Morales M, Danielson PE, Henriksen SJ, Soriano E, Sutcliffe JG. (1997)** Cortistatin is expressed in a distinct subset of cortical interneurons. *J Neurosci.* 17(15):5868-80.

**Lecea L. (2008)** Cortistatin--functions in the central nervous system. *Mol Cell Endocrinol.* 286(1-2):88-95.

**Lembeck F, Donnerer J, Barthó L. (1982)** Inhibition of neurogenic vasodilation and plasma extravasation by substance P antagonists, somatostatin and [D-Met<sup>2</sup>, Pro<sup>5</sup>] enkephalinamide. *Eur J Pharmacol* 85: 171-176.

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

**Levy D, Burstein R, Kainz V, Jakubowski M, Strassman AM.** (2007) Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache. *Pain* 130:166-176.

**Levy D.** (2009) Migraine pain, meningeal inflammation, and mast cells. *Curr Pain Headache Rep* 13:237-240.

**Liu Y, Zhou YB, Zhang GG, Cai Y, Duan XH, Teng X, Song JQ, Shi Y, Tang CS, Yin XH, Qi YF.** (2010) Cortistatin attenuates vascular calcification in rats. *Regul Pept* 159(1-3):35-43.

**Liu-Chen LY, Gillespie SA, Norregaard TV, Moskowitz MA.** (1984) Co-localization of retrogradely transported wheat germ agglutinin and the putative neurotransmitter substance P within trigeminal ganglion cells projecting to cat middle cerebral artery. *J Comp Neurol.* 225(2):187-92.

**Maassen VanDenBrink A, Reekers M, Bax WA, et al.** (1998) Coronary side-effect potential of current and prospective antimigraine drugs. *Circulation* 98(1):25-30.

**Mabuchi T, Shintani N, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, Hashimoto H, Muratani T, Minami T, Baba A, Ito S.** (2004) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is required for the development of spinal sensitization and induction of neuropathic pain. *J. Neurosci.* 24: 7283-7291.

**Machelska H, Mousa SA, Brack A, Schopohl JK, Rittner HL, Schafer M, Stein C.** (2002) Opioid control of inflammatory pain regulated by intracellular adhesion molecule-1. *J. Neurosci.* 22: 5588-5596.

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

**Maggi CA, Meli A.** (1988) The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol.* 19: 1-43.

**Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA.** (1987) Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *J Neurosci.* 7(12):4129-36.

**Marquez P, Bebawy D, Lelievre V, Coûté AC, Evans CJ, Waschek JA, Lutfy K.** (2009) The role of endogenous PACAP in motor stimulation and conditioned place preference induced by morphine in mice. *Psychopharmacology* 204:457-463.

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

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

**Matucci-Cerinic M, Marabini S.** (1998) Somatostatin treatment for pain in rheumatoid arthritis: a double blind versus placebo study in knee involvement. *Med. Sci. Res.* 16: 233-34.

- May A, Büchel C, Turner R, Goadsby PJ.** (2001) Magnetic resonance angiography in facial and other pain: neurovascular mechanisms of trigeminal sensation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 21(10):1171-6.
- May A, Gijsman HJ, Wallnöfer A, Jones R, Diener HC, Ferrari MD.** (1996) Endothelin antagonist bosentan blocks neurogenic inflammation, but is not effective in aborting migraine attacks. *Pain* 67(2-3):375-8.
- May A, Kaube H, Büchel C, Eichten C, Rijntjes M, Jüptner M, Weiller C, Diener HC.** (1998) Experimental cranial pain elicited by capsaicin: a PET study. *Pain* 74(1):61-6.
- May V, Beaudet MM, Parsons RL, Braas KM.** (2000) PACAP modulates rat sympathetic neuron depolarization through IP3. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 921: 186-194.
- McGrogan A, Madle GC, Seaman HE, de Vries CS.** (2009) The epidemiology of Guillain-Barré syndrome worldwide. A systematic literature review. *Neuroepidemiology* 32(2):150-63.
- Méndez-Díaz M, Guevara-Martínez M, Alquicira CR, Guzmán Vásquez K, Prospéro-García O.** (2004) Cortistatin, a modulatory peptide of sleep and memory, induces analgesia in rats. *Neurosci Lett* 354(3):242-4.
- Merskey & Bogduk (Eds.)** (1994) *Classification of Chronic Pain.* Seattle: IASP Task Force on Taxonomy
- Messlinger K.** (2009) Migraine: where and how does the pain originate? *Exp Brain Res* 196(1):179-93.
- Meynadier J, Chrubasik J, Dubar M, Wunsch E.** (1985) Intrathecal somatostatin in terminally ill patients. A report of two cases. *Pain* 23: 9-12.
- Mikkelsen JD, Hannibal J, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Olcese J, McArdle C.** (1995) Pituitary adenylate cyclaseactivating peptide-38 (PACAP-38), PACAP-27, and PACAP related peptide (PRP) in the rat median eminence and pituitary. *J. Neuroendocrin.* 7: 47–55.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N, Arimura A.** (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164:567-574.
- Mollenholt P, Post C, Rawal N, Freedman J, Hökfelt T, Paulsson I.** (1988) Antinociceptive and 'neurotoxic' actions of somatostatin in rat spinal cord after intrathecal administration. *Pain* 32: 95-105.
- Moller K, Zhang YZ, Hakanson R, Luts A, Sjölund B, Uddman R, Sundler F.** (1993) Pituitary adenylate cyclaseactivating peptide is a sensory neuropeptide: Immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neurosci* 57: 725–732.
- Morgan JJ, Curran T.** (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14:421-51.



**Moskowitz** MA, Nozaki K, Kraig RP. (1993) Neocortical spreading depression provokes the expression of c-fos protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms. *J Neurosci* 13(3):1167-77.

**Moskowitz** MA. (1990) Basic mechanisms in vascular headache. *Neurol Clin.* 8(4):801-15.

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

**Muscettola** M, Grasso G. (1990) Somatostatin and vasoactive intestinal peptide reduce interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunobiology* 180(4-5):419-30.

**Neeb** L, Reuter U. (2007) Nitric oxide in migraine. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6:258-64.

**Németh** J, Gorcs T, Helyes Z, Oroszi G, Kocsy T, Pinter E, Szolcsanyi J. (1998) Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research. *Neurobiology (Budapest)* 6: 473–475.

**Németh** J, Helyes Z, Gorcs T, Gardi J, Pinter E, Szolcsanyi J. (1996) Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone. *Acta Physiol Hung* 84: 313–315.

**Németh** J, Reglodi D, Pozsgai G, Szabó A, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. (2006) Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neurosci* 143:223-230.

**Niedermühlbichler** M, Wiedermann CJ. (1992) Suppression of superoxide release from human monocytes by somatostatin-related peptides. *Regul Pept.* 41(1):39-47.

**Nielen** MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BA. (2004) Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* 50(2):380-6.

**O'Dell** James R. (2001) How Is It Best to Treat Early Rheumatoid Arthritis Patients? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 1: 125-37.

**Odum** L, Petersen LJ, Skov PS, Ebskov LB. (1998) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is localized in human dermal neurons and causes histamine release from skin mast cells. *Inflamm Res* 47(12):488-92.

**Ohsawa** M, Brailoiu GC, Shiraki M, Dun NJ, Paul K, Tseng LF. (2002) Modulation of nociceptive transmission by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the spinal cord of the mouse. *Pain* 100:27-34.

**Olesen** J, Thomsen L, Lassen LH, Olesen IJ. (1995) The nitric oxide hypothesis of migraine and other vascular headaches. *Cephalalgia* 15(2):94-100.

**Olesen J**, Thomsen LL, Iversen H. (1994) Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. *Trends Pharmacol Sci* 15(5):149-53.

**Olesen J**. (2010) Nitric oxide-related drug targets in headache. *Neurotherapeutics* 7(2):183-90.

**Onou T**, Shimizu T, Sakamoto H, Higashi M, Kanmura Y, Miyata A. (2007) Involvement of opioidergic system in supraspinal PACAP analgesia and the tolerance. *J. Mol. Neurosci.* 33: 339.

**Ottosson A**, Edvinsson L. (1997) Release of histamine from dural mast cells by substance P and calcitonin gene-related peptide. *Cephalalgia* 17:166-174.

**Pardutz A**, Krizbai I, Multon S, Vecsei L, Schoenen J. (2000) Systemic nitroglycerin increases nNOS levels in rat trigeminal nucleus caudalis. *Neuroreport* 11(14):3071-5.

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

**Parsons RL**, Rossignol TM, Calupca MA, Hardwick JC, Brass KM. (2000) PACAP peptides modulate guinea pig cardiac neuron membrane excitability and neuropeptide expression. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 921: 202-210.

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

**Paxinos G**, Franklin K. (2003) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 3rd edition. San Diego, Elsevier Academic Press.

**Petersen KA**, Birk S, Doods H, Edvinsson L, Olesen J. (2004) Inhibitory effect of BIBN4096BS on cephalic vasodilatation induced by CGRP or transcranial electrical stimulation in the rat. *Br J Pharmacol* 143(6):697-704.

**Pinter E**, Helyes Z, Nemeth J, Porszasz R, Petho G, Than M, Kéri G, Horváth A, Jakab B, Szolcsányi J. (2002) Pharmacological characterisation of the somatostatin analogue TT-232: effects on neurogenic and non-neurogenic inflammation and neuropathic hyperalgesia. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 366: 142–150.

**Pinter E**, Helyes Z, Szolcsányi J. (2006) Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol. Ther.* 112(2):440-56.

**Plourde V**, Lembo T, Shui Z, Parker J, Mertz H, Taché Y, Sytnik B, Mayer E. (1993) Effects of the somatostatin analogue octreotide on rectal afferent nerves in humans. *Am. J. Physiol.* 265: G742-751.

**Poór Gy**. (2006) Szöveti destrukció, korai diagnosztika és célzott terápia reumatoid artritiszben. *Magyar Tudomány* 167: 1178-1184.

**Przewlocki R**, Przewlocka B. (2001) Opioids in chronic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 429: 79-91.

**Ramírez JL**, Mouchantaf R, Kumar U, Otero Corchon V, Rubinstein M, Low MJ, Patel YC. (2002) Brain somatostatin receptors are up-regulated in somatostatin-deficient mice. *Mol Endocrinol.* 16(8):1951-63.

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

**Recober A**, Kaiser EA, Kuburas A, Russo AF. (2010) Induction of multiple photophobic behaviors in a transgenic mouse sensitized to CGRP. *Neuropharmacology* 58:156-65.

**Reichlin S.** (1983) Somatostatin. *N Engl J Med* 309: 1495-1501.

**Reubi JC**, Laissue JA, Waser B, Steffen DL, Hipkin W, Schonbrunn A. (1999) Immunohistochemical detection of somatostatin sst2a receptors in the lymphatic, smooth muscular, and peripheral nervous systems of the human gastrointestinal tract: facts and artifacts. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 2942-2950.

**Robas N**, Mead E, Fidock M. (2003) MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J Biol Chem.* 278(45):44400-4.

**Roca CA**, Su TP, Elpern S, McFarland H, Rubinow DR. (1999) Cerebrospinal fluid somatostatin, mood, and cognition in multiple sclerosis. *Biol Psychiatry.* 46(4):551-6.

**Roon K**, Diener HC, Ellis P és mtsai. (1997) CP-122,288 blocks neurogenic inflammation, but is not effective in aborting migraine attacks: results of two controlled clinical studies. *Cephalalgia* 17:245.

**Rozniecki JJ**, Dimiriadou V, Lambracht-Hall M, Pang X, Theoharides TC. (1999) Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell neuron interactions in vitro and in vivo. *Brain Res* 849:1-15.

**Rubio A**, Avila J, de Lecea L. (2007) Cortistatin as a therapeutic target in inflammation. *Expert Opin Ther Targets* 11(1):1-9.

**Sakai R**, Komano Y, Tanaka M, Nanki T, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Nakajima A, Atsumi T, Koike T, Ihata A, Ishigatubo Y, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Tohma S, Tamura N, Fujii T, Sugihara T, Kawakami A, Hagino N, Ueki Y, Hashiramoto A, Nagasaka K, Miyasaka N, Harigai M; for the REAL Study Group. (2012) Time-dependent increased risk for serious infection from continuous use of TNF antagonists during three years in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Care Res (Hoboken).* *Megjelenés alatt.*

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

**Sándor K**, Elekes K, Szabó Á, Pintér E, Engström M, Würster S, Szolcsányi J, Helyes Zs. (2006) Analgesic effects of the somatostatin sst4 receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models. *Eur J Pharmacol* 539(1-2): 71-75.

**Sándor K**, Bolcskei K, McDougall J, Schuelert N, Reglodi D, Elekes K, Petho G, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. (2009) Divergent peripheral effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-38 on nociception in rats and mice. *Pain* 141:143-150.

**Sándor K**, Kormos V, Botz B, Imreh A, Bölcskei K, Gaszner B, Markovics A, Szolcsányi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D, Helyes Z. (2010) Impaired nocifensive behaviors and mechanical hyperalgesia, but enhanced thermal allodynia in pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide deficient mice. *Neuropeptides* 44(5):363-71.

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

**Schindler M**, Humphrey PP, Emson PC. (1996) Somatostatin receptors in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 50(1):9-47.

**Schürks M**, and Diener HC. (2008) Migraine, allodynia, and implications for treatment. *Eur J Neurol* 15(12):1279-85.

**Schytz HW**, Birk S, Wienecke T, Kruuse C, Olesen J, Ashina M. (2009) PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura. *Brain* 132:16-25.

**Schytz HW**, Olesen J, Ashina M. (2010a) The PACAP receptor: a novel target for migraine treatment. *Neurotherapeutics* 7(2):191-6.

**Schytz HW**, Schoonman GG, Ashina M. (2010b) What have we learnt from triggering migraine? *Curr Opin Neurol* 23(3):259-65.

**Schytz HW**. (2010) Investigation of carbachol and PACAP38 in a human model of migraine. *Dan Med Bull* 57(12):B4223.

**Segre GV**, Goldring SR. (1993) Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide, glucagon-like peptide 1, growth hormone releasing hormone, and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family. *Trends Endocrinol. Metab.* 4: 309–314.

**Seltzer Z**, Dubner R, Shir Y. (1990) A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43, 205–218.

**Sherwood NM**, Krueckl SL, McRory JE. (2000) The origin and function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr. Rev.* 21: 619-670.

**Shimizu T**, Katahira M, Sugawara H, Inoue K, Miyata A. (2004) Diverse effects of intrathecal pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on nociceptive transmission in mice spinal cord. *Regul. Pept.* 123:117-122.

**Shioda S**, Nakai Y, Nakajo S, Nakaya K, Arimura A. (1996) Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its type I receptors in the rat ovary: Immunohistochemistry and in situ hybridization. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 805: 677–683.

**Siehler S**, Nunn C, Hannon J, Feuerbach D, Hoyer D. (2008) Pharmacological profile of somatostatin and cortistatin receptors. *Mol. Cell Endocrinol.* 286(1-2), 26-34.

**Siehler S**, Seuwen K, Hoyer D. (1998) [125I]Tyr10-cortistatin14 labels all five somatostatin receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 357(5):483-9.

**Silveri F**, Morosini P, Brecciaroli D, Cervini C. (1994) Intra-articular injection of somatostatin in knee osteoarthritis: clinical results and IGF-1 serum levels. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* 14: 79-85.

**Silverstein FE**, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Makuch R, Eisen G, Agrawal NM, Stenson WF, Burr AM, Zhao WW, Kent JD, Lefkowitz JB, Verburg KM, Geis GS. (2000) Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA.* 284(10):1247-55.

**Smolen JS**, Steiner G. (2003) Therapeutic Strategies for Rheumatoid Arthritis. *Nat Rev. Drug Discov* 2: 483-488.

**Somogyvari-Vigh A**, and Reglodi D. (2004) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr Pharm Des* 10:2861-2889.

**Spengler D**, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L. (1993) Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365:170-175.

**Spier AD**, de Lecea L. (2000) Cortistatin: a member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions. *Brain Res Brain Res Rev.* 33(2-3):228-41.

**Suda K**, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR. (1992) Investigation of the interaction of VIP binding sites with VIP and PACAP in human brain. *Neurosci. Lett.* 137: 19–23.

**Szabó Á**, Helyes Zs, Sándor K, Bite A, Pintér E, Németh J, Bánvölgyi Á, Bölcskei K, Elekes K, Szolcsányi J. (2005) Role of TRPV1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther* 314(1): 111-119.

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

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

**Szolcsányi J**, Pinter E, Helyes Z, Oroszi G, Nemeth J. (1998b) Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br J Pharmacol* 125: 916–922.

**Szolcsányi J**, Pintér E, Helyes Zs. (2004) Sensocrine function of capsaicin-sensitive nociceptors mediated by somatostatin regulates against inflammation and hyperalgesia. *In: Hyperalgesia: molecular mechanisms and clinical implications* 113-128. Editors: Handwerker HO, Brune K. IASP Press, Seattle.

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

**Szolcsányi J.** (1996) Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. *Prog Brain Res* 113: 343-359.

**Tajti J,** Uddman R, Edvinsson L. (2001) Neuropeptide localization in the "migraine generator" region of the human brainstem. *Cephalalgia* 21(2):96-101.

**Taniyama Y,** Suzuki T, Mikami Y, Moriya T, Satomi S, Sasano H. (2005) Systemic distribution of somatostatin receptor subtypes in human: an immunohistochemical study. *Endocr J.* 52(5):605-11.

**Tassorelli C,** and Joseph SA. (1995) Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Res* 682(1-2):167-81.

**Tassorelli C,** Joseph SA, Buzzi MG, Nappi G. (1999) The effects on the central nervous system of nitroglycerin--putative mechanisms and mediators. *Prog Neurobiol* 57(6):607-24.

**Tassorelli C,** Joseph SA, Nappi G. (1997) Neurochemical mechanisms of nitroglycerin-induced neuronal activation in rat brain: a pharmacological investigation. *Neuropharmacology* 36(10):1417-24.

**Tatsuno I,** Gottschall PE, Köves K, Arimura A. (1990) Demonstration of specific binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in rat astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168:1027-1033.

**Taura P,** Planella V, Balust J, Beltran J, Anglada T, Carrero E, Burgués S. (1994) Epidural somatostatin as an analgesic in upper abdominal surgery: a double-blind study. *Pain* 59: 135-140.

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

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

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

**Theoharides TC,** Donelan J, Kandere-Grzybowska K, Konstantinidou A. (2005) The role of mast cells in migraine pathophysiology. *Brain Res Rev* 49(1):65-76.

**Tigerstedt NM,** Aavik E, Aavik S, Savolainen-Peltonen H, Hayry P. (2007) Vasculoprotective effects of somatostatin receptor subtypes. *Mol Cell Endocrinol.* 279(1-2):34-8.

- Torrecillas** G, Medina J, Díez-Marqués ML, Rodríguez-Puyol D, Rodríguez-Puyol M. (1999) Mechanisms involved in the somatostatin-induced contraction of vascular smooth muscle cells. *Peptides* 20(8):929-35.
- Tostivint** H, Joly L, Lihrmann I, Parmentier C, Lebon A, Morisson M, Calas A, Ekker M, Vaudry H. (2006) Comparative genomics provides evidence for close evolutionary relationships between the urotensin II and somatostatin gene families. *PNAS* 103, 2237–2242.
- Tseng** CC, Wolfe MM. (2000) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Med Clin North Am.* 84(5):1329-44.
- Uddman** R, Edvinsson L, Ekman R, Kingman T, McCulloch J. (1985) Innervation of the feline cerebral vasculature by nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide: trigeminal origin and co-existence with substance P. *Neurosci Lett.* 62(1):131-6.
- Uddman** R, Goadsby PJ, Jansen I, Edvinsson L. (1993) PACAP, a VIP-like peptide: immunohistochemical localization and effect upon cat pial arteries and cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab.* 13(2):291-7.
- Uddman** R, Grunditz T, Kato J, Sundler F. (1998) Distribution and origin of nerve fibers in the rat temporomandibular joint capsule. *Anat. Embryol.* 197: 273-282.
- Uddman** R, Tajti J, Hou M, Sundler F, Edvinsson L. (2002) Neuropeptide expression in the human trigeminal nucleus caudalis and in the cervical spinal cord C1 and C2. *Cephalalgia* 22(2):112-6.
- Ulich** TR, Guo KZ, Irwin B, Remick DG, Davatellis GN. (1990) Endotoxin-induced cytokine gene expression in vivo. II. Regulation of tumor necrosis factor and interleukin-1 alpha/beta expression and suppression. *Am. J. Pathol.* 137: 1173-1185.
- van der Kuy** PH, and Lohman JJ. (2003) The role of nitric oxide in vascular headache. *Pharm World Sci* 25(4):146-51.
- van Hagen** PM, Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Reubi JC, Anker-Lugtenburg PJ, Löwenberg B, Lamberts SW. (1994) Somatostatin and the immune and haematopoietic system; a review. *Eur J Clin Invest.* 24(2):91-9.
- van Rossum** D, Hanisch U, Quirion R. (1997) Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21: 649-678.
- Vaudry** D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, **Vaudry** H. (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 61:283-357.
- Vaudry** D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52: 269-324.

- Vaudry D**, Pamantung TF, Basille M, Rouselle C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC, Gonzalez BJ. (2002) PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 15:1451-1460.
- Vécsei L**, Widerlöv E. (1988) Brain and CSF somatostatin concentrations in patients with psychiatric or neurological illness. An overview. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 78:657-667.
- Vígh S**, Arimura A, Gottschall PE, Kitada C, Somogyvári-Vígh A, Childs GV. (1993) Cytochemical characterization of anterior pituitary target cells for the neuropeptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), using biotinylated ligands. *Peptides* 14: 59–65.
- Villalón CM**, Centurión D, Valdivia LF, de Vries P, Saxena PR. (2003) Migraine: pathophysiology, pharmacology, treatment and future trends. *Curr Vasc Pharmacol* 1(1):71-84.
- Vinegar R**, Truax JF, Selph JL, Johnston PR, Venable AL, McKenzie KK. (1987) Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed Proc* 46:118–126.
- Wang AY**, Lohmann KM, Yang CK, Zimmerman EI, Pantazopoulos H, Herring N, Berretta S, Heckers S, Konradi C. (2011) Bipolar disorder type 1 and schizophrenia are accompanied by decreased density of parvalbumin- and somatostatin-positive interneurons in the parahippocampal region. *Acta Neuropathol.* 122(5):615-26.
- Weckbecker G**, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns C. (2003) Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov* 2: 999-1017.
- Wray V**, Kokoschke C, Nokihara K, Naruse S. (1993) Solution structure of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 32: 5832–5841.
- Xu XJ**, and Wiesenfeld-Hallin Z. (1996) Intrathecal pituitary adenylate cyclase activating polypeptide facilitates the spinal nociceptive flexor reflex in the rat. *Neuroscience* 72:801-804.
- Yamada K**, Matsuzaki S, Hattori T, Kuwahara R, Taniguchi M, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kumamoto N, Yamada K, Yoshikawa T, Katayama T, Tohyama M. (2010) Increased stathmin1 expression in the dentate gyrus of mice causes abnormal axonal arborizations. *PLoS One* 5:e8596.
- Yamamoto T**, Tatsuno I. (1995) Antinociceptive effect of intrathecally administered pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the rat formalin test. *Neurosci. Lett.* 184: 32-35.
- Zadina JE**, Hackler L, Lin-Jun G, Kastin AJ. (1997) A potent and selective endogenous agonist for the  $\mu$ -opiate receptor. *Nature* 386: 499-502.



**Zhang** XC, Strassman AM, Burstein R, Levy D. (2007) Sensitization and activation of intracranial meningeal nociceptors by mast cell mediators. *J Pharmacol Exp Ther* 322:806-812.

**Zhang** Y, Malmberg AB, Sjolund B, Yaksh TL. (1996) The effect of pituitary adenylylating peptide (PACAP) on the nociceptive formalin test. *Neurosci. Lett.* 207:187-190.

**Zhou** CJ, Shioda S, Yada T, Inagaki N, Pleasure SJ, Kikuyama S. (2002) PACAP and its receptors exert pleiotropic effects in the nervous system by activating multiple signaling pathways. *Curr Protein Pept Sci* 3:423-439.

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

# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönöm témavezetőmnek, Dr. Helyes Zsuzsannának, hogy bevezetett a kutatómunka világába, mindenben támogatott, és példát mutatott szakmai tudásával, szorgalmával és fáradhatatlanságával.

Köszönöm a Neurofarmakológia Program vezetőjének, Dr. Pintér Erika Professor Asszonynak, hogy szakmai tanácsaival hozzájárult kutatómunkám eredményességéhez.

Köszönöm Dr. Szolcsányi János Professor Úrnak, hogy csatlakozhattam munkacsoportjához, és szakmai kérdéseimmel bármikor hozzá fordulhattam.

Köszönöm Dr. Barthó Loránd Professor Úrnak, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet és a Gyógyszertudományok Doktori Iskola vezetőjének, hogy PhD-hallgatóként az intézetben dolgozhattam.

Nem lehetek elég hálás Dr. Sándor Katalinnak, aki diákkörösének fogadott, időt és energiát nem kímélve szakmai és emberi tanácsaival munkám első percétől kezdve mindvégig támogatott.

Köszönöm a kísérletek elvégzésében nyújtott nélkülözhetetlen és fáradhatatlan segítséget, valamint példamutatást Dr. Szőke Évának, Dr. Kemény Ágnesnek, Dr. Elekes Krisztiánnak és Dr. Bölcskei Katának.

Köszönet illeti Perkecz Anikót kiváló minőségű szövettani munkáiért, Góglné Kati nénit, Ömböliné Dórit és Bagoly Terézt a kísérletek elvégzéséhez nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért.

Köszönöm PhD-s társaimnak türelmüket és hasznos tanácsaikat.

Köszönet illeti Dr. Gaszner Balázst, Dr. Gasznerné Kormos Viktóriát és Dr. Szabadfi Krisztinát precíz és magas színvonalú immunhisztokémiai munkáikért.

Köszönet Dr. Reglődi Dóranak, Dr. Tajti Jánosnak és Tuka Bernadettnek a sok hasznos tanácsért és iránymutatásért a kísérletek elvégzésében.

Továbbá köszönöm a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden dolgozójának a munkám elvégzéséhez nyújtott segítséget.

Nem utolsósorban köszönöm Családomnak, hogy biztos támaszt jelentettek a hosszú évek során, és köszönöm Páromnak, hogy szeretetével és türelmével mindig mellettem állt.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

### Az értekezés alapjául szolgáló publikációk:

Helyes Z, Pintér E, Sándor K, Elekes K, Bánvölgyi A, Keszthelyi D, Szoke E, Tóth DM, Sándor Z, Kereskai L, Pozsgai G, Allen JP, Emson PC, **Markovics A**, Szolcsányi J. (2009) Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(31):13088-93. (IF: 9,432)

**Markovics A**, Szőke E, Sándor K, Börzsei R, Bagoly T, Kemény A, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. (2011) Comparison of the Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Effects of Cortistatin-14 and Somatostatin-14 in Distinct In Vitro and In Vivo Model Systems. *J Mol Neurosci*. 46(1):40-50. (IF: 2,922)

**Markovics A**, Kormos V, Gaszner B, Lashgarara A, Szoke E, Sandor K, Szabadi K, Tuka B, Tajti J, Szolcsanyi J, Pinter E, Hashimoto H, Kun J, Reglodi D, Helyes Z. (2012) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol Dis*. 45(1):633-44. (IF: 5,121)

### Egyéb publikációk:

Sándor K, Kormos V, Botz B, Imreh A, Bölskei K, Gaszner B, **Markovics A**, Szolcsányi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D, Helyes Z. (2010) Impaired nociceptive behaviours and mechanical hyperalgesia, but enhanced thermal allodynia in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice. *Neuropeptides*. 44(5):363-71. (IF: 2,036)

Tuka B, Helyes Z, **Markovics A**, Bagoly T, Németh J, Márk L, Brubel R, Reglodi D, Párdutz A, Szolcsányi J, Vécsei L, Tajti J. (2012) Peripheral and central alterations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-like immunoreactivity in the rat in response to activation of the trigeminovascular system. *Peptides*. [Epub ahead of print] (IF: 2,654)

### Az értekezés alapját képező prezentációk:

**Markovics Adrienn**; A szomatosztatin sst<sub>4</sub> receptor gyulladásgátló és fájdalomcsillapító szerepe akut és krónikus gyulladásmoделlekben, egérben; *Biológus Doktoranduszok Konferenciája*, Pécs, 2009 (előadás)

**Markovics Adrienn**; Anti-inflammatory and analgesic roles of the somatostatin receptor subtype 4 (sst<sub>4</sub>) in acute and chronic inflammation models; *Sanofi-Aventis PhD-nap*, Budapest, 2009 (poszter)

Helyes Z, Sandor K, Elekes K, Banvolgyi A, **Markovics A**, Pinter E, Kereskai L, Szolcsanyi J; Role of somatostatin receptor subtype 4 (sst(4)) in acute and chronic inflammatory processes. *Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológus Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése Debrecen, 2008*  
Absztrakt: *Acta Physiologica Hungarica* 96:(1)pp. 82-83.(2009) (IF:0,75)

**Adrienn Markovics**, Katalin Sándor, Éva Szőke, Viktória Kormos, Balázs Gaszner, Dóra Reglődi, Akemichi Baba, János Tajti, László Vécsei, Bernadett Tuka, Árpád Párdutz, Annamária Fejes, Zsuzsanna Bohár, János Szolcsányi, Zsuzsanna Helyes; Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the nitroglycerin-induced migraine model of the mouse. *IBRO International Workshop*, Pécs, 2010 (poszter)  
Absztrakt: *Frontiers in Neuroscience* (IF: 3,215)

**Markovics Adrienn**, Szőke Éva, Sándor Katalin, Tuka Bernadett, Kormos Viktória, Tajti János, Szolcsányi János, Gaszner Balázs, Reglődi Dóra, Helyes Zsuzsanna; A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerepe a trigeminovaszkuláris rendszerben. *A Magyar Élettani Társaság és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság II. közös tudományos konferenciája*, Szeged, 2010 (poszter)  
Absztrakt: *Acta Physiologica Hungarica*

**Markovics A**, Sandor K, Kemeny A, Borzsei R, Bagoly T, Pinter E, Szolcsanyi J, Helyes Z; Cortistatin and somatostatin comparing their effects on inflammation in vitro and in vivo. *7<sup>th</sup> Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference*, Pécs, 2010 (poszter)  
Absztrakt: *Neuropeptides*44:(6)pp. 542-543.(IF: 1,917)

**Markovics A**, Lashgarara A, Szoke E, Sandor K, Tuka B, Kormos V, Tajti J, Szolcsanyi J, Gaszner B, Reglodi D, Hashimoto H, Helyes Z; Role of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *7<sup>th</sup> Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference*, Pécs, 2010 (poszter)  
Absztrakt: *Neuropeptides*44:(6)p. 543.(IF: 1,917)

**Markovics A.**, Szőke É., Sándor K., Elekes K., Lashgarara A., Tuka B., Kormos V., Tajti J., Szolcsányi J., Hashimoto H., Gaszner B., Helyes Zs.; Role of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide in the nitroglycerol-induced migraine-model of the mouse. *The 16<sup>th</sup> World Congress of Pharmacology*, Koppenhága, Dánia, 2010 (poszter)  
Absztrakt: *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2010; (IF: 2,308)

Tuka B, Helyes Z, **Markovics A**, Szoke E, Bagoly T, Reglodi D, Kormos V, Hashimoto H, Tajti J, Párdutz A, Bohar Z, Fejes A, Szolcsanyi J, Vecsei L; The role of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the trigeminovascular system. *14<sup>th</sup> Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS)*, Geneva, Switzerland 2010 (poszter)  
Absztrakt: *European Journal of Neurology* 17:p. 240. (2010)

**Markovics Adrienn**; The role of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Sanofi-Aventis PhD- nap*, Budapest, 2010 (előadás)

**Markovics A**, Lashgarara A, Szoke E, Sandor K, Tuka B, Kormos V, Tajti J, Szolcsanyi J, Gaszner B, Reglodi D, Hashimoto H, Helyes Zs; Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide plays an important role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *A Magyar Idegtudományi Társaság XIII. Konferenciája*, Budapest, 2011 (poszter)  
Absztrakt: *Frontiers in Neuroscience*

Tuka Bernadett, Helyes Zsuzsanna, **Markovics Adrienn**, Bagoly Teréz, Szolcsányi János, Tajti János, Vécsei László. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid immunoreaktivitásának (PACAP-IR) változása trigeminális aktiváció állatmodelljeiben. *A Magyar Fejfájás Társaság XVIII. Kongresszusa*, Siófok, 2011 (előadás)  
Absztrakt: CEPHALALGIA HUNGARICA 21: p.18. (2011)

Tuka B, Helyes Z, **Markovics A**, Bagoly T, Szolcsányi J, Tajti J, Vecsei L; Alterations of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-like immunoreactivity (PACAP-LI) in rat plasma and trigeminovascular system in response to activation. *15th Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS)* Budapest, 2011 (poszter)  
Absztrakt: EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY 18: 2, 66–343. (2011)

Helyes Zs, **Markovics A**, Sándor K, Kormos V, Gaszner B, Szőke É, Botz B, Imreh A, Pintér E, Szolcsányi J, Hashimoto H, Reglödi D; A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerepének vizsgálata egér fájdalom-modellekben. *FAMÉ*, Pécs, 2011 (előadás)  
Absztrakt: Acta Physiologica (IF: 2,81)

### **Egyéb prezentációk:**

Elekes K, Sándor K, Szőke É, Tóth DM, Molnár FT, Szolcsányi J, **Markovics A**, Jakab L, Mester M, Szitter I, Helyes Zs; Effects of marijuana smoke on the mouse lung. *IBRO International Workshop*, Pécs, 2010 (poszter)  
Absztrakt: Frontiers in Neuroscience (IF: 3,215)

Szitter István, Pintér Erika, **Markovics Adrienn**, Perkecz Anikó, John Quinn, Szolcsányi János, Helyes Zsuzsanna; Tachikininnek szerepének vizsgálata génhányos egerekkel dextrán-szulfáttal kiváltott bélgyulladás modellben. *A Magyar Élettani Társaság és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság II. közös tudományos konferenciája*, Szeged, 2010 (poszter)  
Absztrakt: Acta Physiologica Hungarica

Helyes Zsuzsanna, Elekes Krisztián, Kemény Ágnes, Sándor Katalin, Perkecz Anikó, Kereskai László, Mester Miklós Gyula, Szakács Balázs, Jakab László, **Markovics Adrienn**, Szőke Éva, Pintér Erika, Szolcsányi János, Molnár F Tamás; Marihuana- és dohányfüst-indukálta krónikus légúti gyulladás vizsgálata prediktív egérmodellben. *A Magyar Élettani Társaság és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság II. közös tudományos konferenciája*, Szeged, 2010 (előadás)  
Absztrakt: Acta Physiologica Hungarica

Nagy P, **Markovics A**, Perkecz A, Sandor K, Pinter E, Szolcsányi J, Helyes Z; Role of capsaicin-sensitive sensory nerves and TRPV1 receptors in iodoacetate-induced osteoarthritis in mice. *7<sup>th</sup> Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference*, Pécs, 2010 (poszter)  
Absztrakt: Neuropeptides 44:(6) pp. 534-535. (IF: 1,917)

Szitter I, Pinter E, Perkecz A, **Markovics A**, Elekes K, Szolcsanyi J, Quinn J, Helyes Z; The role of the tachykinin system in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *7<sup>th</sup> Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference*, Pécs, 2010 (poszter)

Absztrakt: *Neuropeptides* 44:(6) pp. 536-537. (IF: 1,917)

Krisztian Elekes, K Sandor, E Szoke, DM Toth, **A Markovics**, I Szitter, L Jakab, B Szakacs, L Kereskai, J Szolcsanyi, T Molnar, Z Helyes; Peripheral effects of the marijuana smoke in the lung of mice. *The 16<sup>th</sup> World Congress of Pharmacology*, Koppenhága, Dánia, 2010 (poszter) Absztrakt: *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2010; (IF: 2,308)

Zs Helyes, K Elekes, K Sandor, A Kemeny, **A Markovics**, E Szoke, E Pinter, M Mester, L Kereskai, JP Quinn, PC Emson, J Szolcsanyi; Role of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor and sensory neuropeptides in airway inflammation and hyperresponsiveness. *16<sup>th</sup> World Congress of Pharmacology*, Koppenhága, Dánia, 2010 (előadás) Absztrakt: *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2010; (IF: 2,308)

**A Markovics**, E Borbely, P Nagy, K Sandor, I Toth, L Kereskai, A Berger, C Paige, E Pinter, A Zimmer, J Szolcsanyi, JP Quinn, Zs Helyes; Role of tachykinins in mouse models of chronic inflammatory and degenerative joint diseases. *The Joint Meeting of Summer Neuropeptide Conference and The European Neuropeptide Club*, Boston, USA, 2011 (poszter) Absztrakt: *Frontiers in Neuropeptides* (IF: 3,909)

**A Markovics**, E Borbely, P Nagy, K Sandor, I Toth, L Kereskai, A Berger, C Paige, E Pinter, A Zimmer, J Szolcsanyi, JP Quinn, Zs Helyes; Role of tachykinins in mouse models of chronic inflammatory and degenerative joint diseases. *FAMÉ*, Pécs, 2011 (poszter) Absztrakt: *Acta Physiologica* (IF: 2,81)

Borbély É, Sándor K, **Markovics A**, Pintér E, Szolcsányi J, Quinn JP, McDougall JJ, Helyes Zs; Kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés, TRPV1 receptorok és tachykininek szerepének vizsgálata hízósejt-triptáz indukált akut ízületi gyulladásmodellben. *FAMÉ*, Pécs, 2011 (poszter)

Absztrakt: *Acta Physiologica* (IF: 2,81)