

A pályázati munkatervnek megfelelően számos szenzoros neuropeptid és receptora, mint a szomatosztatin 4 receptor (sst₄), tachykinin NK1 receptor, a hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid (PACAP-38), valamint a tachykininek szerepét vizsgáltuk külföldi kollaborációinkon keresztül beszerzett génhányos egerek segítségével légúti gyulladásmodellekben. Három modellrendszerben végeztük kísérleteinket:

- **Endotoxinnal kiváltott neutrofil-dominált intersticiális gyulladás**, amely széles körben használt, jól definiált mechanizmus-modell. E modellben korábban az érzőideg-végződés, a TRPV1 ioncsatornák és a neuro-immun interakciók szerepét bizonyítottuk. Számos génhányos egértörzs integratív, komplex vizsgálatát, szintetikus sst₄ receptor agonisták hatástani elemzését és az sst₄ receptor expressziós analízisét végeztük. Eredményeinket több eredeti közleményben, összefoglalóban és könyvfejezetben publikáltuk.

- **Ovalbuminnal kiváltott krónikus allergiás asztma** modellben a szintetikus sst₄ receptor agonisták vizsgálatát végeztük, eredményeinket eredeti közleményben publikáltuk. Mivel e modell kizárólag SPF körülmények között tartott nőstény Balb/c egerekben működik, a C57Bl/6, illetve CD1 törzsekből létrehozott génhányos egereken ezt nem tudtuk kivitelezni. Bár az eredeti munkatervben nem szerepelt, annak érdekében, hogy eozinofil-dominanciájú allergiás légúti gyulladásban is vizsgálni tudjuk génhányos egereinkkel a számunkra érdekes neuropeptidok szerepét, három egyéb allergénnel előidézett légúti gyulladásmodellt is teszteltünk. *Ascaris sum*, házipor-atka és parlagfű antigénnel végzett kísérleteink eredményei bizonyították, hogy az *Ascaris* antigén (amelyet korábban egerben még nem alkalmaztak) 10 nap alatt jól reprodukálható, jelentős hiperreaktivitással járó gyulladást okoz. További kísérleteinkben ezt fogjuk alkalmazni.

- A **dohányfüsttel kiváltott krónikus bronchitisz** prediktív egérmodelljét a pályázat alatt állítottunk be, a kiváltáshoz szükséges füstexpozíciós készüléket 2008. végén vásároltuk. 2009-ben a modell kidolgozása történt, 1-4 hónapon keresztül analizáltuk a naponta kétszer alkalmazott teljes-test füstexpozíció légzésfunkciós hatásait. 2010-2012 között a génhányos egértörzseket is megvizsgáltuk. Eredményeinkből 2010. júliusában a World Pharma konferencián és 2012. májusában a British Pharmacological Society Focused Meeting on Neuropeptides konferencián meghívott előadásokat tartottam. Az absztraktok folyóiratokban megjelentek (*Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 107: p. 96, p. 267., 2010; Neuropeptides, in press 2012*). Mivel azonban e krónikus kísérletek nagyon időigényesek, egy kísérletsorozat a hörgő-mosófolyadék és a szövetminták analízisével együtt közel fél évet vesz igénybe, a két eredeti közlemény összeállítására és közlésre elküldésére csak most került sor.

A légúti gyulladás modellrendszereit, technikai problémáit, előnyeit és hátrányait egy idei könyvfejezetben foglaltuk össze. A pályázat ideje alatt összesen 35 eredeti közleményt publikáltunk, ebből 10 kapcsolódik közvetlenül a témához. Három könyvfejezet és két review született, témavezetésemmel hárman szereztek PhD minősítést, 2010. októberében megvédtem MTA doktori disszertációm, melynek egyik fő fejezete e projekthez köthető. A publikált eredményeinket csak röviden ismertetem, a közlésre elküldött adatokból néhány reprezentatív eredményt ábrákon is demonstrálok.

Eredményeink részletezve:

1.) Eredményeink az endotoxinnal (lipopoliszacharid: LPS) kiváltott tüdőgyulladás modellben:

a.) A kapszaicin-érzékeny afferenseken lokalizálódó TRPV1 receptor hiánya, valamint az sst₄ receptor hiánya fokozza a légúti gyulladást a szemikvantitatív szövettani értékelés, az akkumulálódott granulociták és makrofágok számával arányos mieloperoxidáz (MPO) aktivitás (spektrofotometria), a TNF-alfa és IL-1beta mennyiségének (ELISA), valamint a bronchoalveoláris mosófolyadékából (BALF) nyert gyulladással sejt és citokinek (flow citometria) meghatározása alapján. Ezekben az egércsoportokban fokozódott továbbá a légúti hiperreaktivitás (Buxco teljes test pletizmográffal a bronchokonstriktóval egyenesen arányos enhanced pause: Penh paramétert határoztuk meg éber egerekben). Korábbi eredményeink alapján és ezen adatok alapján a tüdő kapszaicin-érzékeny afferenseiből TRPV1 receptor aktivációval felszabaduló **szomatosztatin** gyulladást és hiperreaktivitást gátló hatása valószínűleg az **sst₄ receptorok** aktivációjával valósul meg (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106(31):13088-13093, 2009*).

b.) PACAP génhiányos egerekben fokozott légúti hiperreaktivitást és gyulladással paramétereket (MPO aktivitás, gyulladással citokinek, szövettani pontozás) tapasztaltunk (*Peptides 32:1439-46, 2011*). Ezeket az eredményeket alátámasztják izolált patkány tracheán nyert adataink, amelyek a PACAP-38, valamint hasonlóképpen a számos modellben antagonistaként számon tartott PACAP6-38 koncentráció-függő gátló hatását bizonyítják a gyulladással és fájdalomkeltő szenzoros neuropeptidok felszabadulására (*J. Mol. Neurosci. 36:270-278, 2008*). A PACAP-38 érzőideg-végződéseken kifejtett gátló hatása magyarázza a számos egyéb gyulladással modellben tapasztalt gyulladással csökkentő és antinociceptív hatást is (*J. Mol. Neurosci. 42:443-449, 2010; Pain 141:143-150, 2009*). Ezzel szemben a PACAP génhiányos egerekben csökkent nocifenzív reakciót és mechanikai hiperalgéziát tapasztaltunk számos fájdalom-modellben, azonban a termális hiperalgézia fokozódott. Eredményeink e neuropeptid centrális pro-nociceptív, azonban perifériás anti-nociceptív hatásait bizonyítják (*Neuropeptides 44:363-371, 2010; Neurobiol. Dis. 45:633-644, 2012*). A PACAP figyelemreméltó centrális pronociceptív szerepe, valamint perifériás analgetikus és gyulladással gátló hatásai alapján érdekes mediátor gyógyszerfejlesztési szempontból is, azonban a továbblépéshez a célpontok azonosítása és szintetikus agonisták/antagonisták széleskörű vizsgálata szükséges.

c.) A **P-anyagot** és **neurokinin A**-t kódoló preprotachykinin A (TAC1) génhiányos egerek segítségével bizonyítottuk, hogy a P-anyag fokozza az endotoxinnal kiváltott granulocita-akkumulációt és gyulladással citokintermelést, azonban a következményes légúti hiperreaktivitásban az NK2 tachykinin receptoroknak van meghatározó szerepe. Ezzel szemben az **NK1 receptor** hiánya nem befolyásolta a szövettani elváltozásokat, az mieloperoxidáz (MPO) aktivitást és a válaszkészség-fokozódást, azonban a gyulladással citokinek tüdőbeli koncentrációja kb. kétszeresére emelkedett. A kettős, TAC1+NK1 receptor génhiányos egerekben a TAC1 knockoutokhoz hasonló eredményeket kaptunk, amely arra utal, hogy a NKA játszik döntő szerepet a légúti gyulladással az NK2 receptorok aktivációján keresztül (*Neuropeptides 44:399-406; 2010*). **TAC4** gén-kódolt, elsősorban gyulladással és

immunsejtekben expresszáldó tachykinin, a **hemokinin 1**, ugyancsak fontos gyulladáskeltő mediátornak bizonyult, bár a légúti válaszkészség-fokozódásban nem játszik szerepet. TAC4 génhányos egerekben az endotoxin-indukálta tüdőbeli MPO aktivitás szignifikánsan csökkent és a jellegzetes hisztopatológiai paraméterek is jelentősen enyhébbnek bizonyultak. Mindemellett érdekes, hogy a bronchusokhoz/erekhez asszociáltan kifejezett, denz, tüszőszerű limfoid gyülemeket tapasztaltunk hemokinin 1 hiányában, amely e peptid normál immunválaszt és limfocita-funkciókat szabályozó szerepére utal (eredmények közlésre előkészítve; absztraktok: *Neuropeptides, in press 2012; J. Clin. Investigation, in press 2012*).

2.) Eredményeink allergiás asztma modellben:

a.) Mivel az **ovalbuminnal kiváltott krónikus allergiás asztma modell** kizárólag SPF körülmények között tartott nőstény Balb/c egerekben működik, a C57Bl/6, illetve CD1 alapon létrehozott génhányos egértörzseken technikailag nem tudtuk ezt kivitelezni, azonban a szintetikus sst₄ receptor agonisták vizsgálatát e modellben is elvégeztük. A heptapeptid TT-232 és a peptidomimetikum J-2156 hatékonyan gátolták mind az endotoxinnal kiváltott akut, mind az ovalbumin-indukálta krónikus légúti gyulladást és következményes hiperreaktivitást (*Eur. J. Pharmacol. 578:313-322, 2008*).

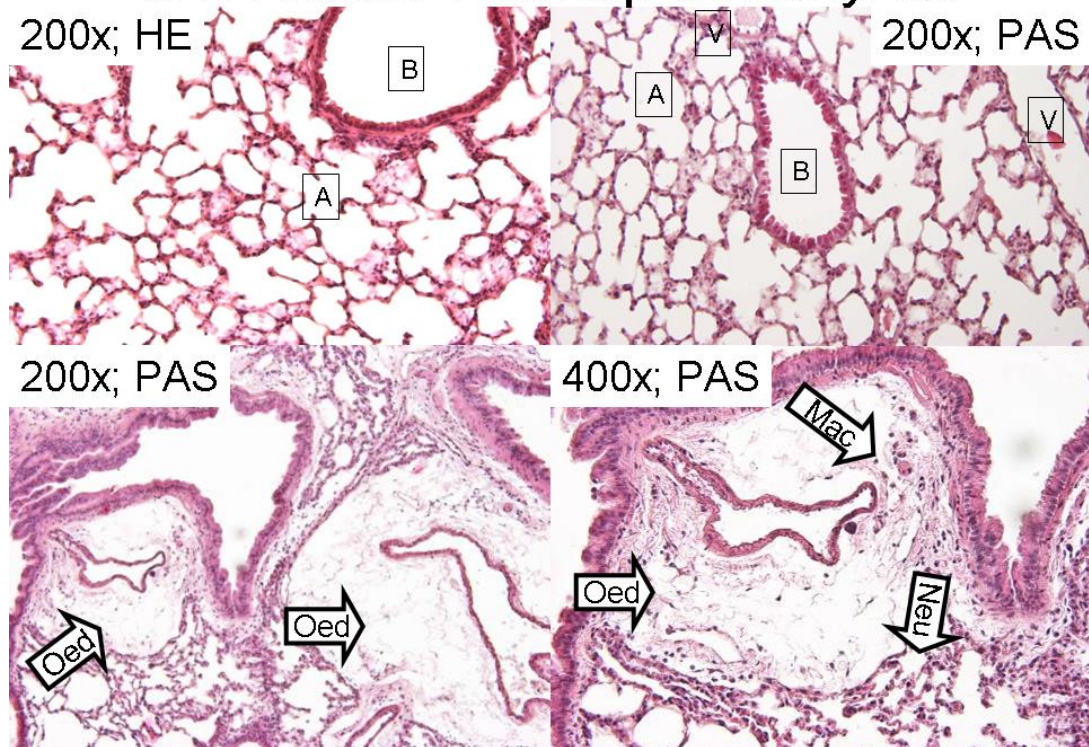
b.) Az *Ascaris*, háziporotka (house dust mite HDM) és a parlagnyálka allergénekkal kiváltott légúti gyulladás modellekben a bronchiális hiperreaktivitás mindhárom esetben kialakult, azonban jelentős eozinofiliát csak az *Ascaris* és a HDM eredményeztek, elsősorban nőstény egerekben. A 10 napos *Ascaris* modellt korábban csak juhokban, macskákban és kutyákban alkalmazták, elsőként mi dolgoztuk ki egérre. Az eredményeket közlésre előkészítettük.

3.) Eredményeink dohányfüsttel kiváltott krónikus bronchitisz modellben:

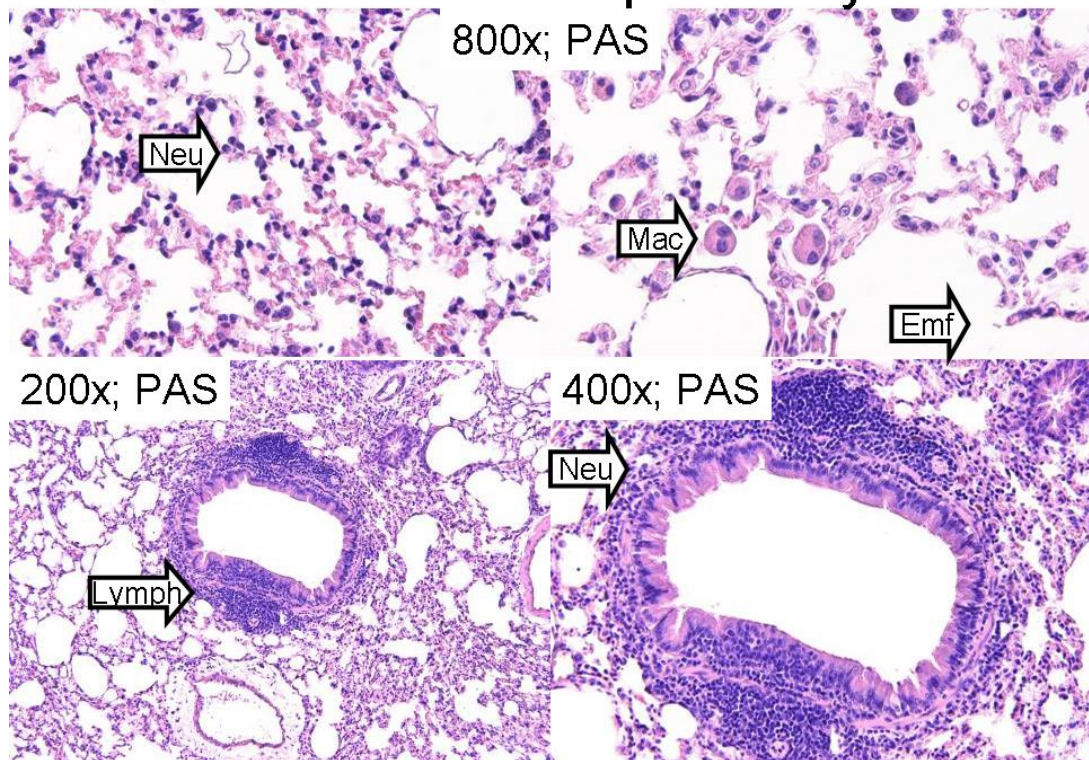
2008. novemberében az eredetileg beütemezett munkatervnek megfelelően megvásároltuk a Teague Enterprises kisállat-dohányoztató készüléket és az ebben alkalmazandó cigarettát (Kentucky Research Cigarettes). Az elmúlt három év során az irodalmi adatokból kiindulva beállítottuk **egerekben a dohányfüsttel kiváltott krónikus obstruktív légúti gyulladás (COPD) prediktív modelljét**. Az állatok 1, 2, 3, illetve 4 hónapig kapják a dohányfüst expozíciót napi 3-szor, alkalmanként 45 percen keresztül. CD1 és C57Bl/6 törzsekben, valamint hím és nőstény egerekben kialakult reakciók között nem találtunk szignifikáns különbségeket.

a.) Már 1 hónap alatt perivaszkuláris és peribronchiális ödéma, neutrofil- és makrofág-infiltráció, kezdődő epithelisejt-metaplázia és nyáktermelés-fokozódás figyelhető meg, ami 2, 3, illetve hónap expozíció után jelentősen súlyosbodik. A 2.-3. hónapra a limfociták beszűrődése, az erek és a bronchusok körüli hüvelyszerű felhalmozódása, többmagvú, aktivált makrofágok megjelenése, atelektáziás és emfizémás területek egyre nagyobb kiterjedése látható. A 4. hónapra az alveolusok szétszakadozása, egyre nagyobb atelektáziás területek, és limfocitagyülemek tapasztalhatók (e jellegzetes szövettani elváltozásokat az alábbiakban bemutatom).

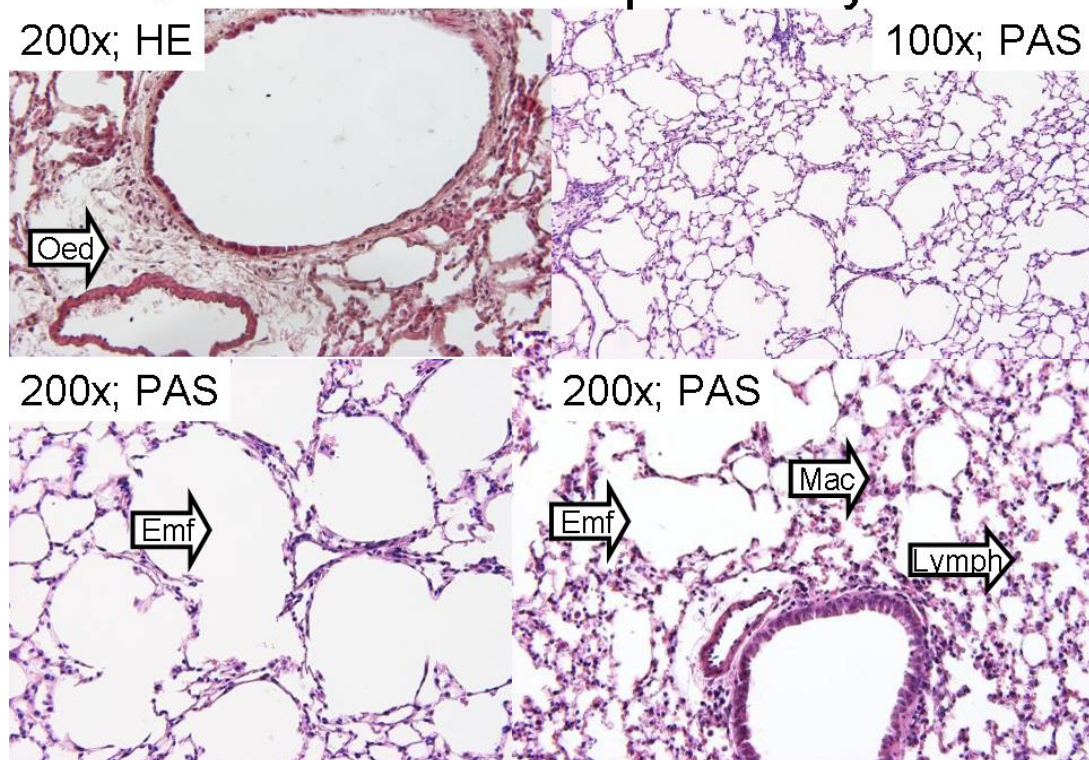
Szövettan: 1 hónap dohányzás



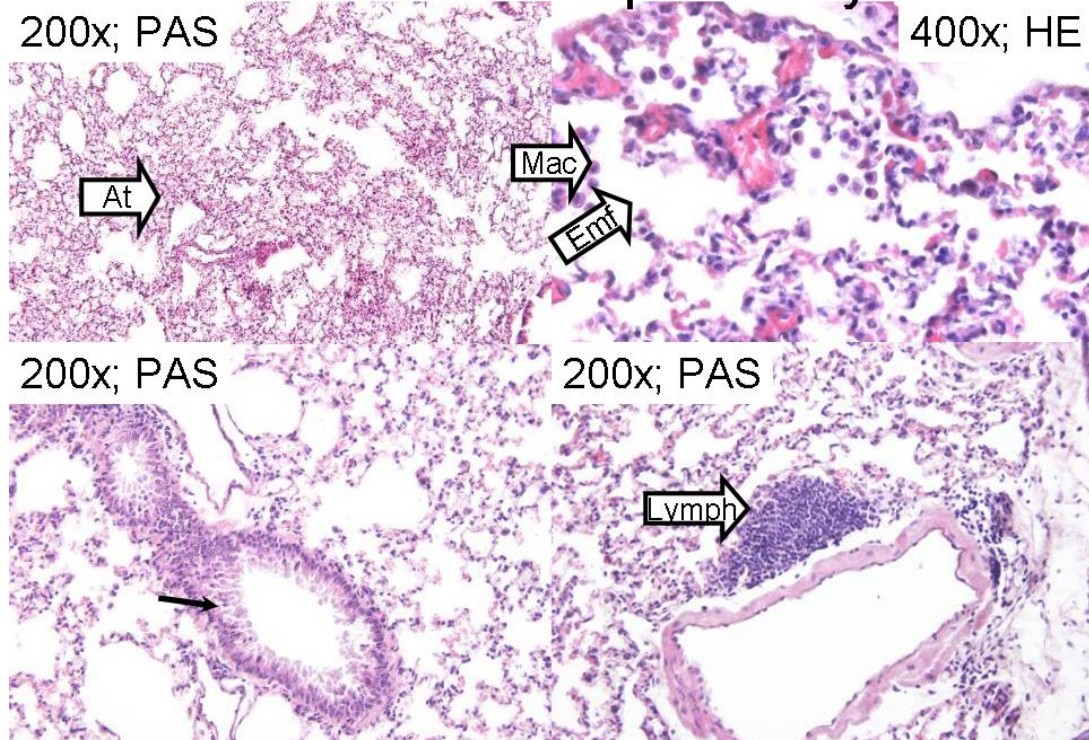
Szövettan: 2 hónap dohányzás



Szövettan: 3 hónap dohányzás

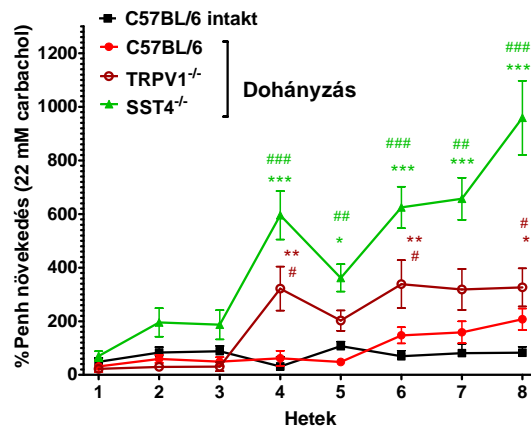


Szövettan: 4 hónap dohányzás



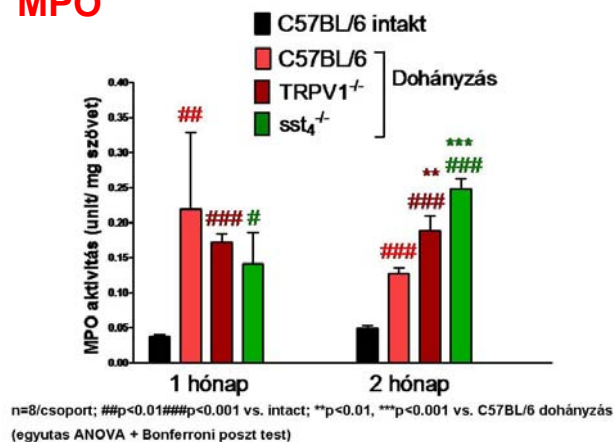
A gyulladás kialakulását a szövettani vizsgálatokon kívül a tüdőhomogenizátumban mért MPO aktivitás és citokin-koncentrációk, valamint a BALF citológiai/citokin analízise is igazolta. A légúti hiperreaktivitás azonban csak a 3. hónaptól alakul ki, ami összhangban áll a klinikai adatokkal: COPD-s betegekben relative kis százalékában és későn alakul ki bronchiális gyulladásos válaszkészség-fokozódás.

b.) Bár C57BL/6 vad típusú egerekben csak későn és csekély hiperreaktivitás alakul ki, TRPV1 és sst₄ génihiányos törzsekben (TRPV1^{-/-}, sst₄^{-/-}) már a 4. héttől szignifikáns válaszkészség-fokozódást tapasztaltunk. Ezzel szemben a SP és NKA, valamint az NK1 receptor hiányában nincs különbség a vad típushoz viszonyítva (1. ábra). A gyulladós reakció intenzitása (szöveti paraméterek, MPO, citokinek, BALF analízis) összhangban áll a válaszkészséggel, a TRPV1 és az sst₄ receptor aktivációja egyértelműen protektív, a tachykinineknek nincs döntő jelentősége e folyamatban. Az sst₄ és a TRPV1 receptor génihiányos egerek eredményeit az alábbi ábrákban mutatom be:

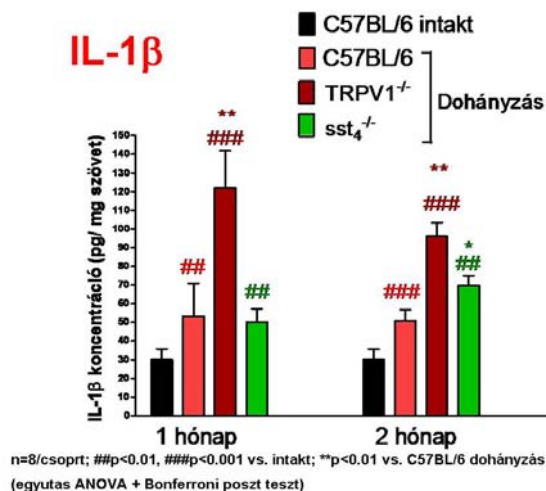


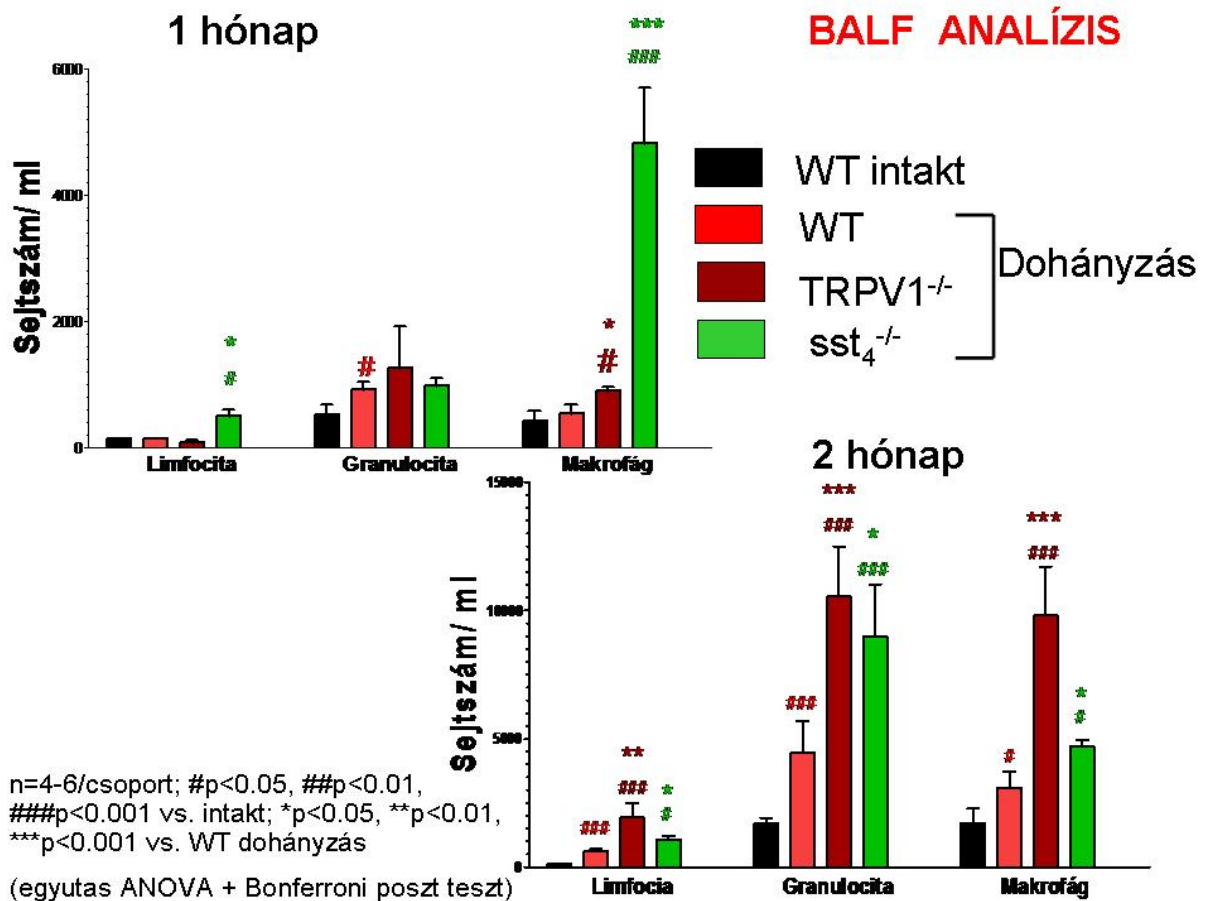
Légúti hiperreaktivitás. n=8/csoport; ###p<0.01####p<0.001 vs. intakt; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. C57BL/6 dohányzó (két-utas ANOVA + Bonferroni-féle poszt teszt)

MPO



IL-1β





c.) Dohányfüsttel kiváltott krónikus bronchitisz és endotoxinnal kiváltott szubakut pneumonitisz egérmódeljeiben, valamint dohányzáshoz kapcsolt krónikus bronchitiszben emberben Western blot és immunhisztokémia módszerekkel jelentős **sst₄ receptor** expresszió-fokozódást tapasztaltunk, elsősorban az intenzív makrofág-beáramlásnak köszönhetően (*J Histochem Cytochem.* 57:1127-37, 2009).

4. A pályázati munkatervben eredetileg nem szereplő, de azzal közvetlen összefüggésbe hozható kísérleti eredményeink:

a.) Bizonyítottuk, hogy szeptikus betegekben, valamint **tüdőműtétek** és ízületet érintő operációk **során a plazma szomatosztatin koncentrációja szignifikánsan emelkedik.** Eredményeink megerősítik azt a számos állatkísérletünk alapján alkotott koncepciót, hogy az aktivált érzőideg-végződésekből keringésbe jutó szomatosztatin szisztémás gyulladásgátló és analgetikus hatásokat közvetít (*Peptides* 31: 1208-12, 2010).

a.) A TRPV1 receptor géniányos egerek és a TRPV1 receptor antagonistá SB366791 segítségével bizonyítottuk a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végzések és a TRPV1 receptorok szerepét a kísérleti modellekben gyakran alkalmazott irritáns, a xilol, valamint a proteáz-aktivált receptor 2 (PAR2) gyulladás- és fájdalomkeltő hatásaiban (*Neurosci. Lett.* 451:204-207, 2009; *Eur. J. Pain* 14: 351-358, 2010). TRPV1 receptor géniányos egerekkel igazoltuk, hogy a TRPV1 ioncsatorna aktivációja a tüdőbe és az ízületben tapasztalt

gyulladás-keltő hatásához hasonlóan fokozza a dextranszulfáttal kiváltott bélgyulladás klinikai tüneteit, a szövettani károsodás súlyosságát, valamint a neutrofil-akkumulációt jelző mieloperoxidáz aktivitást (*J. Mol. Neurosci.* 42:80-88, 2010). A TAC1 gén-kódolt tachykininek e bélgyulladás modellben ugyancsak pro-inflammatorikus hatást közvetítenek (absztrakt: *Acta Physiol. Hung.* 97:139-140, 2010).

Elsőként mutattuk ki a plazmamembránok lipid raftjai és a TRPV1 receptor-aktiváció közötti összefüggést izolált patkány trigeminus ganglionsejteken és TRPV1 receptort stabilan expresszáló CHO sejteken. A különböző agonisták okozta TRPV1 aktivációban eltérő szerepe van a lipid raftoknak, és a hatás függ a receptorok mikrokörnyezetétől is. Eredményeink a TRPV1 különféle alloszterikus kötőhelyeinek létezését is igazolták (*Eur. J. Pharmacol.* 628:67-74, 2010).

b.) Tömegspektrometriás módszerrel elsőként mutattuk ki a PACAP-38 jelenlétét emberi plazmában és az anyatejben, valamint radioimmúnassay módszerrel megmértük e peptid koncentrációját. A plazmában egészséges önkéntes populációban a PACAP-38 koncentrációja kortól, nemtől, étkezéstől független (300-400 fmol/ml). Szoptatás alatt enyhe, de szignifikáns emelkedést mutat, az anyatejben azonban 15-30-szor magasabb koncentrációban mérhető (*Börzsei et al. Eur. J. Endocrinol.* 2009).

A pályázati periódusban 2 folyóiratban megjelent összefoglalót, és 3 könyvfejezetet írtunk:

Pintér E, **Helyes Zs**, Németh J, Szolcsányi J: Somatostatin as an Anti-Inflammatory Neuropeptide: From Physiological Basis to Drug Development, In: Neurogenic Inflammation in Health and Disease, pp. 121-134, Ed: *Jancsó G.*, Elsevier, 2009.

Helyes Zs, Pintér E, Szolcsányi J: Regulatory role of sensory neuropeptides in inflammation, In: Neuropeptides and peptide analogs, Vol. 7, pp. 111-141, Eds: *Kovács M. and Merchenthaler I.*, Research Signpost, Kerala, India, 2009.

Szolcsányi J, Pintér E, **Helyes Z**, Petho G.: Inhibition of the function of TRPV1-expressing nociceptive sensory neurons by somatostatin 4 receptor agonism: mechanism and therapeutic implications. *Curr. Top. Med. Chem.* 11(17): 2253-63. 2011.

Reglodi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gabriel R, Horvath G, Szakaly P, Sandor B, Lubics A, Laszlo E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, **Helyes Z**, Welke L, Lakatos A, Tamas A: PACAP is an Endogenous Protective Factor-Insights from PACAP-Deficient Mice. *J. Mol. Neurosci.* 48(3):482-92. 2012.

Helyes Zs and Hajna Zs: Airway inflammation and asthma models, *Methods in Pharmacology and Toxicology*, Eds: *Szallasi A and Biro T*, Springer/Humana Press, 2012.