

A nociceptin-nocistatin rendszer
szabályozó szerepe és szabályozottsága:
kapcsolat a biogénamin rendszerrel

Doktori értekezés

Dr. Tekes Kornélia

Budapest

2012

TARTALOMJEGYZÉK

1. AZ ÉRTEKEZÉSBEN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE..	8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1. A NOP receptor.....	11
2.1.1. A NOP receptor szintetikus peptid és nem-peptid ligandjai.....	16
2.2. A NOP receptor endogén agonistája: a nociceptin	18
2.2.1. A nociceptin metabolizmusa	21
2.3. A prepronociceptin egyéb biológiai aktivitású szekvenciái: a nocistatin, a NCII és a NCIII.	22
2.3.1. A nocistatin.....	22
2.3.2. A NCII és NCIII.....	23
2.4. A nociceptinerg rendszer és a biogénamin neurotranszmisszió kapcsolata	23
2.4.1. A nociceptin és a hisztamin.....	23
2.4.2. A nociceptin és a szerotonin	24
2.4.3. A nociceptin és a dopamin	26
2.4.4. A nociceptin és a noradrenalin	27
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	30
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	31

4.1. Állatmodellek	31
4.1.1. <i>Krónikus diabetes, mint neuropathiás fájdalom-modell</i>	31
4.1.2. <i>Exogén nociceptin hatásának vizsgálata a hisztamin és a szerotonin anyagcserére</i>	32
4.2. Betegcsoportok	32
4.2.1. <i>Különböző etiológiájú krónikus májbetegségben szenvedők</i>	32
4.2.1.1. Wilson-kóros betegek	33
4.2.1.2. Primer biliáris cirrhosisban szenvedők.....	34
4.2.1.3. Hepatocelluláris carcinomában szenvedők	34
4.2.2. <i>Elsődleges fejfájásban szenvedők.....</i>	34
4.2.2.1. Migrénes betegek	35
4.2.2.2. Cluster-fejfájásos betegek.....	35
4.2.3. <i>Kardio-vaszkuláris kórképekben szenvedő betegek</i>	37
4.2.3.1. Akut ischémiás stroke-betegek.....	37
4.2.3.2. Krónikus stabil angina pectoris és perifériás artéria-betegek.....	39
4.3. Bioanalitikai módszerek.....	40
4.3.1. <i>Nociceptin mennyiségi meghatározása humán plazma, ill. patkány plazma, liquor, agy, máj és uterus szövetben, a módszer validálása.....</i>	40
4.3.1.1. A módszer validálása	41

4.3.2.	<i>Nocistatin mennyiségi meghatározása patkány plazma, liquor, agy, máj és uterus szövetben, a módszer validálása</i>	41
4.3.2.1.	A módszer validálása	41
4.3.3.	<i>Dopamin és metabolitjai (DOPAC, HVA), szerotonin és metabolitjai (5HIAA, 5HTOL) meghatározása optimalizált HPLC-EC módszerrel.....</i>	42
4.3.3.1.	Mintaelőkészítés	42
4.3.3.2.	A kromatográfiás rendszer	42
4.3.4.	<i>Hisztamin meghatározása mikroradioenzimátikus módszerrel</i>	45
4.3.4.1.	Hisztamin-N-Metiltranszferáz enzim (HNMT) preparálása tengerimalac agyszövetből.....	45
4.3.4.2.	A hisztamin szöveti szintjének meghatározása	45
4.4.	Bispiridinium aldoximok (K27 és K203) meghatározása optimalizált HPLC-UV és HPLC-EC módszerrel patkányag, liquor, szem és szérumb mintákban.....	46
4.4.1.	<i>A K27 plazma-felezési idejének meghatározásához és a kromatográfiás csúcs azonosságának igazolására HPLC-MS módszert alkalmaztunk.....</i>	46
4.4.1.1.	Az állatok kezelése	47
4.4.1.2.	Mintaelőkészítés	47
4.4.2.	<i>A K27 meghatározása optimalizált HPLC-EC módszerrel patkányag, liquor és szérumb mintákban.....</i>	47

4.4.3.	<i>A K203 plazma-felezési idejének, vér-agy-gát átjárhatóságának és a szemben kialakuló koncentrációja időfüggésének meghatározása HPLC-UV és HPLC–EC módszerrel</i>	48
4.4.3.1.	<i>Az állatok kezelése</i>	48
4.5.	Statisztikai analízisek.....	48
5.	EREDMÉNYEK	50
5.1.	Különböző etiológiájú krónikus májbetegségben szenvedők plazma nociceptin szintje	50
5.1.1.	<i>Wilson-kóros betegek</i>	50
5.1.2.	<i>Primer biliáris cirrhosisban szenvedők.....</i>	51
5.1.3.	<i>Hepatocelluláris carcinomában szenvedők</i>	53
5.2.	Elsődleges fejfájásban szenvedők	54
5.2.1.	<i>Migrénes betegek</i>	54
5.2.2.	<i>Cluster-fejfájásos betegek.....</i>	55
5.3.	Kardio-vaszkuláris kórképekben szenvedő betegek...57	
5.3.1.	<i>Akut ischémiás stroke-betegek.....</i>	57
5.3.2.	<i>Krónikus stabil angina pectoris és perifériás artéria-betegek.....</i>	59
5.4.	A nociceptin és nocistatin pathophysiológiai szerepének vizsgálata állatkísérletekben.....	61
5.4.1.	<i>A nociceptin, a nocistatin és a krónikus diabetes, mint neuropathiás fájdalom-modell.....</i>	61

5.5.	Exogén nociceptin hatása a központi idegrendszeri hisztamin és szerotonin szintre	64
5.6.	Nociceptin-nel, nocistatin-nal és β -endorfin-nal előídezett hormonális imprinting hatása a noradrenalin, a dopamin és a szerotonin anyagcserére	67
5.7.	Bispiridinium aldoximok (K27 és K203) hatása a központi idegrendszeri biogénaminok és metabolitjaik (szerotonin, dopamin, noradrenalin, 5HIAA és HVA) patkány agy, liquor és szérum koncentrációira.....	73
6.	AZ EREMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	79
6.1.	Plazma nociceptin szint különböző kórképekben	79
6.1.1.	<i>Különböző etiológiájú krónikus májbetegségben szenvedők</i>	<i>79</i>
6.1.1.1.	Wilson-kóros betegek	79
6.1.1.2.	Primer biliáris cirrhosisban szenvedők.....	81
6.1.1.3.	Hepatocelluláris carcinomában szenvedők	82
6.1.2.	<i>Elsődleges fejfájásban szenvedők.....</i>	<i>83</i>
6.1.2.1.	Migrénes betegek	83
6.1.2.2.	Cluster-fejfájásos betegek.....	84
6.1.3.	<i>Kardio-vaszkuláris kórképekben szenvedő betegek</i>	<i>85</i>
6.1.3.1.	Akut ischémiás stroke-betegek.....	85
6.1.3.2.	Krónikus stabil angina pectoris és perifériás artéria-betegek.....	86

6.2. A nociceptin és nocistatin pathophysiológiai szerepének vizsgálata állatkísérletekben.....	86
6.2.1. <i>A nociceptin, a nocistatin és a krónikus diabetes, mint neuropathiás fájdalom-modell.....</i>	<i>86</i>
6.2.2. <i>Exogén nociceptin hatása a központi idegrendszeri hisztamin és szerotonin szintre</i>	<i>88</i>
6.2.3. <i>Nociceptinnel, nocistatinnal és β-endorfinnal előidézett hormonális imprinting hatása a dopamin és a szerotonin anyagcserére</i>	<i>90</i>
6.2.4. <i>Újszülöttkori nociceptin imprinting</i>	<i>91</i>
6.2.5. <i>Újszülöttkori nocistatin imprinting</i>	<i>92</i>
6.2.6. <i>Újszülöttkori β-endorfin imprinting.....</i>	<i>93</i>
6.3. Biszpiridinium aldoximok (K27 és K203) hatása a központi idegrendszeri biogénaminok és metabolitjaik (szerotonin, dopamin, noradrenalin, 5HIAA és HVA) patkány agy, liquor és szérum koncentrációira.....	94
7. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI:	96
8. IRODALOMJEGYZÉK	98
9. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	122
9.1. <i>Klinikai anyagon végzett vizsgálatok</i>	<i>122</i>
9.2. <i>Állatkísérletes munkákból készült közlemények.....</i>	<i>123</i>

10. A DOKTORI ÉRTEKEZÉSBEN NEM SZEREPLŐ, AZ ORVOSTUDOMÁNY KANDIDÁTUSA FOKOZAT MEGSZERZÉSE UTÁN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE (LEZÁRVA 2012. JÚLIUS 15.)	128
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	138

1. AZ ÉRTEKEZÉSBEN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5HIAA	5-hidroxi-indolecetsav
5HT	5-hidroxi-triptamin, szerotonin
ACh	acetilkolin
AChÉ	acetilkolin-észteráz
APN	aminopeptidáz N
C	carotis területi keringészavar
cAMP	ciklikus-adenozin-monofoszfát
CGRP	calcitonin-gene related peptide, calcitonin-génhez kapcsolt fehérje
CHO	kínai aranyhörcsög petefészek sejtvonala
CRF	corticotropin-releasing factor
CSF	cerebrospinális folyadék, liquor
DA	dopamin
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
EP	endopeptidáz
GABA	γ -amino-vajsav
H₁-receptor	hisztamin ₁ receptor
H₂-receptor	hisztamin ₂ receptor
H₃-receptor	hisztamin ₃ receptor

dc_520_12

HA	hisztamin
HNMT	hisztamin-N-metil-transzferáz
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal axis, hypothalamo-hypophysealis tengely
HPLC	high performance liquid chromatography, nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
HVA	homovanillinsav
ICH	International Conference on Harmonization
i.c.v.	intrecerebroventrikuláris
i.d.	intredermális
i.pl.	intraplantáris
i.t.	intratekális
IUPHAR	International Union of Basic and Clinical Pharmacology
i.v.	intravénás
K27	1-(4-hidroximino-metil-piridinium)-3-(4-karbamoilpiridinium) propán dibromid
K203	(E)-1-(4-carbamoylpyridinium)-4-(hydroxyiminomethyl-pyridinium)-but-2-ene dibromide
KIR	központi idegrendszer
L	lacunaris területi keringészavar
LOQ	limit of quantitation, mennyiségi meghatározás alsó határa
mRNS	messenger ribonukleinsav
NA	noradrenalin

dc_520_12

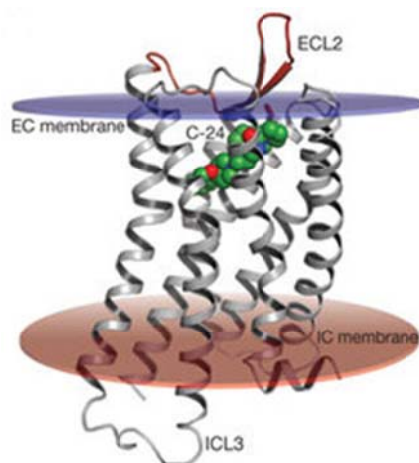
NC	nociceptin, orphanin FQ, OFQ
NCII	nociceptin II
NCIII	nociceptin III
NK	neurokinin
NOP	nociceptin/orphanin FQ receptor
NOS	Nitric oxide synthase, nitrogén oxid szintáz
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating peptide, agyalapi mirigy adenil cikláz aktiváló polipeptid
PAG	periaqueductalis szürkeállomány
PCA	perklórsav
ppNC	prepronociceptin (nociceptin prekursor)
RIA	radioimmunnoassay
SP	substance P, P anyag
TFA	trifluoro-ecetsav
TIA	transziens ischémiás attack

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A nociceptinerg rendszer felfedezése az 1994-1995-ben közölt vizsgálatokra nyúlik vissza, melyekben a δ -opioid receptor klónozása során, a homológia vizsgálatok egy olyan új, opioid-szerű receptor létét igazolták (Mollereau et al. 1994, Chen et al. 1994), melyhez az ismert opioid receptor ligandok nem kötődtek. Ez az „árva”, „orphan” receptor akkor vált különösen érdekessé farmakológiai/élettani szempontból, amikor két munkacsoport is, egymástól függetlenül és gyakorlatilag egyidőben nociceptin (Meunier et al. 1995) ill. orphanin FQ (Reinscheid et al. 1995) néven izolálta a receptor endogén agonistáját. Maga a receptor kezdetben „opioid- receptor like 1”, (ORL1), néven vált ismertté, de az IUPHAR receptor-nevezéktani besorolása szerint 2000 óta NOP receptor a neve.

2.1. A NOP receptor

Még 1997-ben kimutatásra került, hogy emberben a NOP receptor génje a 20. kromoszóma q13.2-13.3 régiójában található. A NOP a klasszikus opioid receptorokhoz hasonlóan hét transzmembrán egységgel rendelkezik és a legújabb közleményben (Thompson et al. 2012) kristályszerkezete is megállapítást nyert. (1. ábra)



1. ábra

A NOP receptor szerkezete

(EC-extracelluláris membránfelszín, IC-intracelluláris membránfelszín, ECL2-a 2. extracelluláris hurok, ICL3 - a 3. intracelluláris hurok, C-24 - a dokkoláshoz használt NOP-ligand) (Thompson et al. 2012)

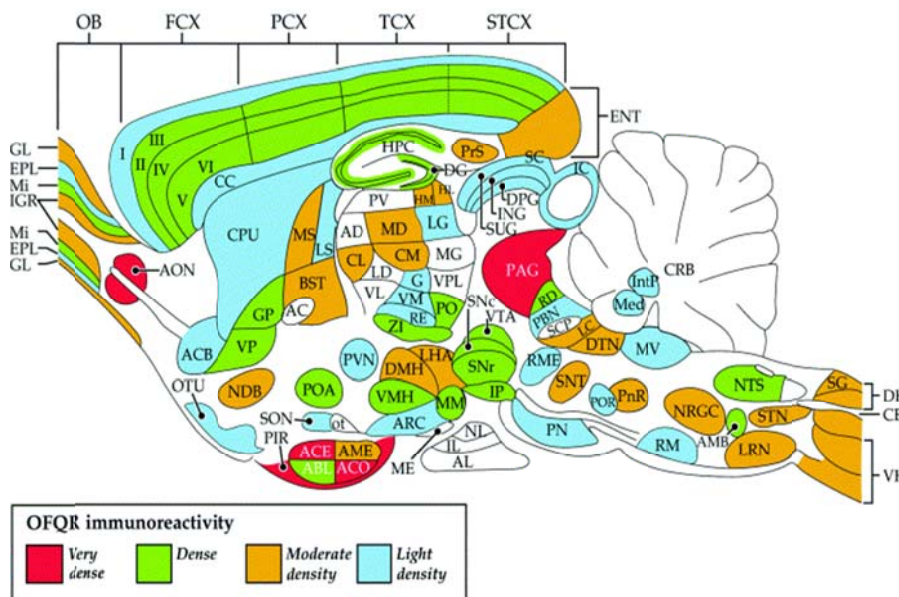
Jellegzetessége, hogy naloxonnal nem antagonizálható és a klasszikus μ -, κ - és δ -opioid-receptorok agonistáit gyakorlatilag nem köti, hatását a sejt belseje felé Gi/G₀ fehérje közvetíti. Aktivációja gátolja a cAMP felhalmozódást (Reinscheid et al. 1995) fokozza a foszfolipáz C aktivitást és a mitogén-aktiválta protein kinázt (New and Wong 2002, Buzas et al. 2002), gátolja a feszültségfüggő Ca²⁺-csatornák aktivációját (Connor et al. 1996), és fokozza a sejtbe irányuló K⁺ áramot (Nicol et al. 1996).

Elsősorban a ¹²⁵I-[Tyr¹⁴]NC receptorkötési vizsgálatok alapján felmerült a NOP receptor két különböző konformációs állapotának, ill. két NOP receptor létezésének lehetősége is (Mogil and Pasternak 2001).

A NOP receptorok döntő többsége posztzinaptikusan található, de több szövetben is preszinaptikus NOP receptor jelenléte nyert igazolást. (Yamazaki et al. 2001, Tallent et al. 2001, Hou et al. 2003, Pennock et al. 2012)

A NOP receptor a központi idegrendszerben és a perifériás szövetekben egyaránt jellegzetes eloszlást mutat.

Patkányagy NOP-receptor eloszlását (Darland et al. 1998) foglalta össze. (2. ábra)



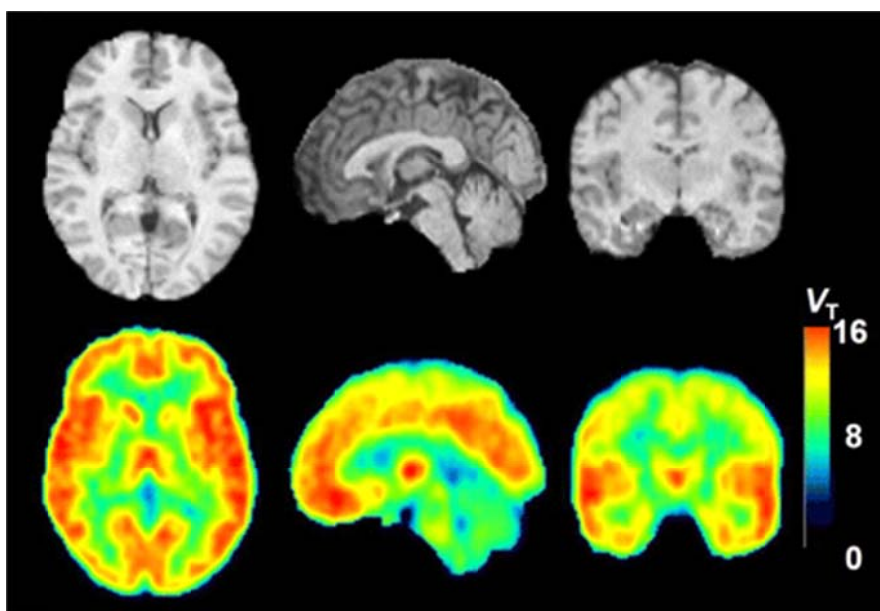
2. ábra

A NOP receptor előfordulása patkány központi idegrendszerében (Darland et al. 1998)

(I-VI-kérgi rétegek; ABL-basolateral amygdaloid nucleus; AC-anterior commissure; ACB-nucleus accumbens; ACE-central amygdaloid nucleus; ACO-cortical amygdaloid nucleus; AD-anterodorsal thalamus; AL-anterior lobe, pituitary; AMB-nucleus ambiguus; AME-medial amygdaloid nucleus; AON-anterior olfactory nucleus; ARC-arcuate nucleus, hypothalamus; BST-bed nucleus, stria terminalis; CC-corpor callosum; CE-central canal; CL-centrolateral thalamus; CM-centromedial thalamus; CPU-caudate putamen; CRB-cerebellum; DG-dentate gyrus; DH-dorsal horn, spinal cord; DMH-dorsomedial hypothalamus; DPG-deep gray layer, superior colliculus; DTN-dorsal tegmental area; ENT-entorhinal cortex; EPL-external plexiform layer, olfactory bulb; FCX-frontal cortex; G-nucleus gelatinosus, thalamus; GL-glomerular layer, olfactory bulb; GP-globus pallidus; HL-lateral habenula; HM-medial habenula; HPC-hippocampus; IC-inferior colliculus; IGR- intermediate granular layer, olfactory bulb; IL-intermediate lobe, pituitary; ING-intermediate gray layer, superior colliculus; IntP-interposed cerebellar nucleus; IP-interpeduncular nucleus; LC-locus coeruleus; LD-laterodorsal thalamus; LG-lateral geniculate thalamus; LHA-lateral hypothalamic area; LRN-lateral reticular nucleus; LS-lateral septum; MD-mediodorsal thalamus; ME-median eminence; Med-medial cerebellar nucleus; MG-medial geniculate thalamus; Mi-mitral cell layer, olfactory bulb; MM-medial mammillary nucleus; MS-medial septum; MV-medial vestibular nucleus; NDB-nucleus diagonal band; NL-neural lobe, pituitary; NRGC-nucleus reticularis gigantocellularis; NTS-nucleus tractus solitarius; OB-olfactory bulb; ot-optic tract; OTU-olfactory tubercle; PAG-periaqueductal gray; PBN-parabrachial nucleus; PCX-parietal cortex; PIR-piriform cortex; PN-pons; PnR-pontine reticular; PO-posterior nucleus thalami; POA-preoptic area; POR-periolivary region; PrS-presubiculum; PV-paraventricular thalamus; PVN-paraventricular hypothalamus; RD-dorsal raphe; RE-reuniens thalami; RM-raphé magnus; RME-median raphe; SC-superior colliculus; SCP-superior cerebellar

peduncle; SG-substantia gelatinosa; SNc-substantia nigra, pars compacta; SNr-substantia nigra, pars reticulata; SNT- sensory trigeminal nucleus; SON-supraoptic nucleus; STCX-striate cortex; STN-spinal trigeminal nucleus; SUG-superficial gray layer, superior colliculus; TCX-temporal cortex; VH-ventral horn, spinal cord; VL-ventrolateral thalamus; VM-ventromedial thalamus; VMH-ventromedial hypothalamus; VP-ventral pallidus; VPL-ventroposterolateral thalamus; VTA-ventral tegmental area; ZI-zona incerta.)

Az emberi agy NOP-receptor eloszlását (Lohith et al. 2012) legújabb adatai alapján a 3. ábra mutatja.



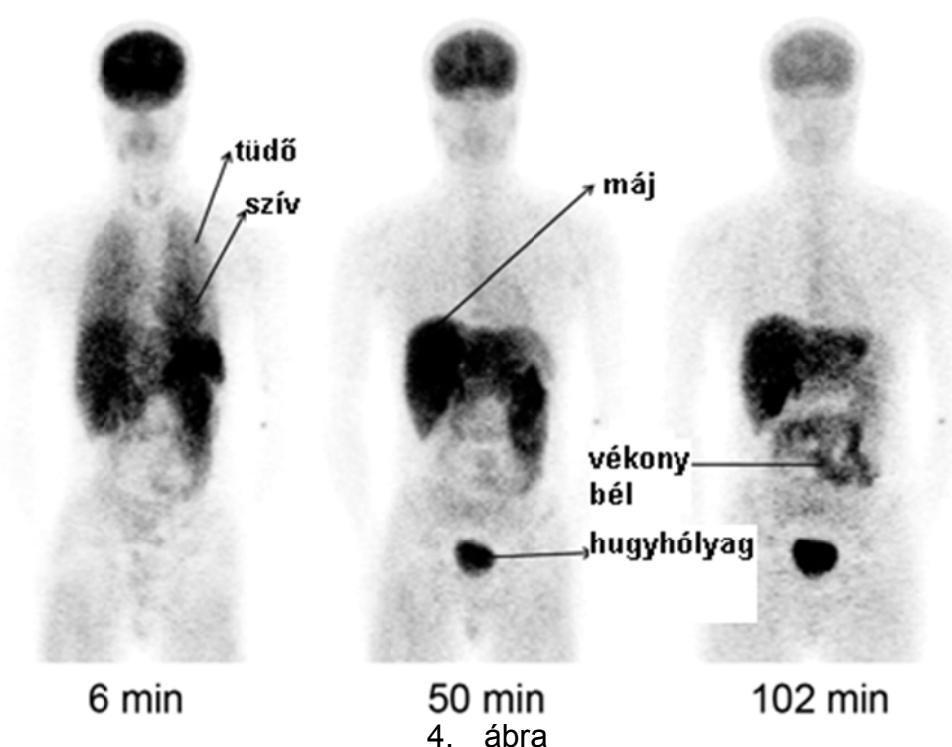
3. ábra

Egészséges emberi agy NOP receptor eloszlása PET vizsgálatok alapján ^{11}C -NOP-1A (NOP receptor antagonista) alkalmazásával (Lohith et al. 2012)

A NOP receptor a perifériás idegrendszerben és különböző szövetekben is kimutatást nyert, így patkány vesében (Hadrup et al. 2007) gyomorban (Grandi et al. 2007), vékony-, és vastagbélben, májban, ovariumban, herében (Wei et al. 1999), az epidermisben (Andoh et al. 2004), a lépben, vaszkuláris endothélsejtekben, valamint a lymphocytákban (Nothacker et al. 1996, Arjomand et al. 2002).

Az emberi perifériás szövetekben a NOP receptor sűrűséget PET módszerrel vizsgálva a ^{11}C -NOP-1A beadása után eltelt idő függvényében a 4. ábra mutatja.

A NOP receptor aktiválása rendkívül széleskörű hatásokat eredményez; i.c.v. adva hiperalgéziát, a gerincvelőben és a periférián fájdalomcsillapító hatást közvetít, módosítja a stressz kiváltotta viselkedési mintázatot, bradycardizál, csökkenti a vérnyomást, vazodilatációt eredményez, fokozza a diurézist, csökkenti a nátrium-kiválasztást, növeli a húgyhólyag kapacitását, gátolja a vizeleti reflexet, gátolja a morfin-, a cocain- és az alkohol-kiváltotta jutalmazó („rewarding”) hatást, immundepresszív, gátolja a bronchus-kontrakciót, gátolja a gyomor- béltraktus motilitását, fokozza a táplálékfelvételt, gátolja a tanulást és a memóriát valamint az erektilis funkciót (Lambert 2008, Mustazza and Bastanzio 2011).



Egészséges ember NOP receptor eloszlása az idő függvényében PET vizsgálatok alapján ^{11}C -NOP-1A (NOP receptor antagonist) alkalmazásával (Lohith et al. 2012)

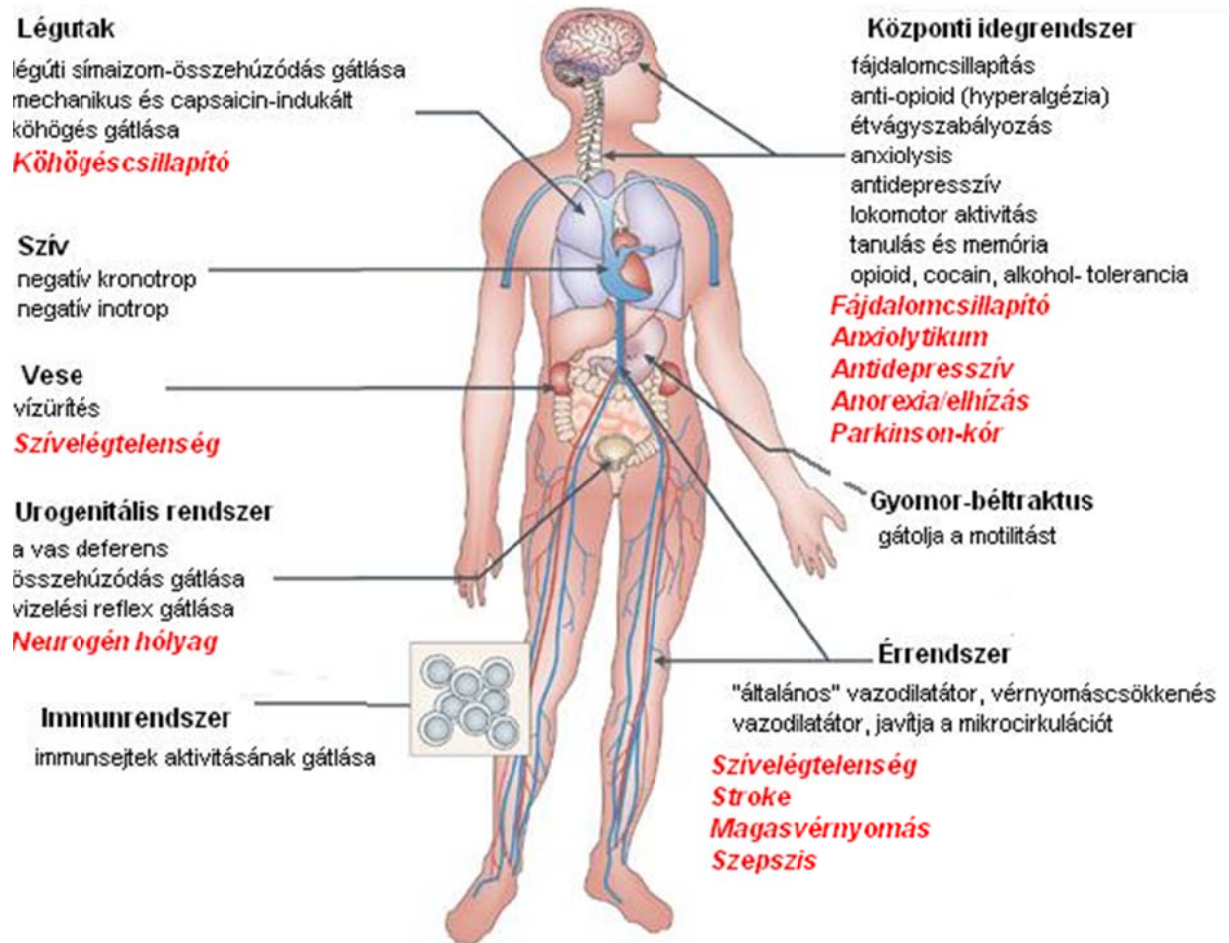
A NOP receptoron megvalósuló rendkívül sokoldalú hatások alapján a NOP receptor agonistáinak, ill. antagonistáinak potenciális gyógyszerként az alábbi terápiás felhasználásai körvonalazódnak (5. ábra)

2.1.1. A NOP receptor szintetikus peptid és nem-peptid ligandjai

A NOP receptor szintetikus ligandjai közül több mint 600 ismert. A peptid szerkezetű agonista és antagonistá ligandokat elsősorban a receptor szerkezetének, kötőhelyeinek kutatásában alkalmazzák (Mustazza and Bastanzio 2011, Zaveri 2003, Chiou et al. 2007). Magyarországon is jelentős NOP receptor szelektív ligand-kutatás folyik (Bojnik et al. 2009, Gunduz et al. 2006).

A nem-peptid ligandok sokasága kémiai szerkezetük szerint a morfinán-vázás, a 4-arylpiperidin, a 3-arylnortropán, a 4-heterociklussal szubsztituált piperidinek, a 2-heterociklussal szubsztituált kinolizidinek, a spiropiperidinek, a spironotropánok, a 4-aminokinolinek, a kinazolinek, a 6-piperazinil-benzimidazolo, a 2-(1,2,4-oxadiazolil)- indolok, a pyrrolopiridinek csoportjaiba sorolhatók (Mustazza and Bastanzio 2011).

Klinikai vizsgálatban az antagonistá JTC-801 fájdalomcsillapítóként, az antagonistá SB-612111 antiparkinson-szerként, a parciális agonista ZP-120 akut szívelégtelenségben diuretikumként, az antagonistá TRK-820 viszketéscsillapítóként szerepel.



5. ábra

A NOP receptor agonisták és antagonisták potenciális terápiai felhasználása
 (Lambert 2008)

2.2. A NOP receptor endogén agonistája: a nociceptin

A NOP receptor felismerése után azonnal hatalmas erővel indult meg az új receptor és endogén agonistájának (nociceptin, NC, orphaninFQ) kutatása, így az első, 1997-ben megjelent összefoglaló közlemény (Meunier 1997) már több mint 200 publikáció alapján született. Jelenleg csak a PubMed adatbázis szerint több mint 1530 közlemény foglalkozik a nociceptinerg rendszerrel.

A 17 aminosavból álló nociceptin a klasszikus opioid peptidektől abban mutat alapvető különbséget, hogy az N-terminális első négy aminosavja közül (a message domain) az első aminosav nem tiramin, hanem fenilalanin, ami a receptor-kötődés és az élettani hatások szempontjából meghatározó jelentőségű (6. ábra).

A nociceptin a 176 aminosavból álló prepronociceptinből (ppNC, ppOFQ) proteolitikus enzim hatására hasad ki, mely ppNC génje emberben a 8. kromoszóma 8p21 régiójában található (Mollereau et al. 1996) és más biológiailag aktív szekvenciákat (nocistatin, NCII és NCIII) is tartalmaz (7. ábra).

Orphanin FQ	-	F	G	G	F	T	G	A	R	K	S	A	R	K	L	A	N	Q
Dynorphin A	-	Y	G	G	F	L	R	R	I	R	P	K	L	K	W	D	N	Q
α -Endorphin	-	Y	G	G	F	M	T	S	E	K	S	Q	T	P	L	V	T	
Dynorphin B	-	Y	G	G	F	L	R	R	Q	F	K	V	V	T				
Leu-enkephalin	-	Y	G	G	F	L												
Endomorphin 1	-	Y	P	W	F													
Endomorphin 2	-	Y	P	F	F													

6. ábra

A nociceptin/orphaninFQ és a klasszikus opioid peptidek aminosav-szekvenciája
(Darland 1998)

szignál peptid

MKVLLCDLLLSLFSSVFSSCQRDCLTCQEKLHPALDSFDLEV
CILECEEKVFPSPWLTPCTKVMARSSWQLPAAPEHVAALYQ

Nocistatin

PRASEMQHLLRRMPRVRSLFQEEPEPGMEEAGEMEQLKRLKR

Nociceptin

NCII

NCIII

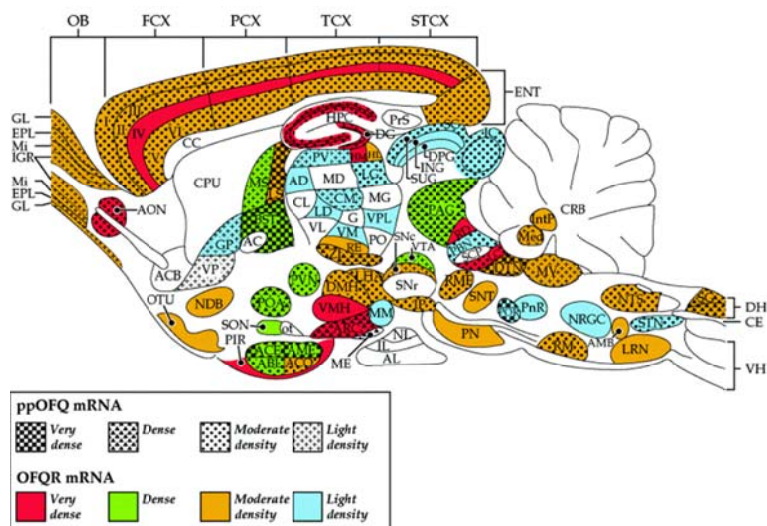
FGGFTGARKSARKLANQKRFSEFMRQYLVLSMQSSQRRRTLHQNGNV 176 AA

7. ábra

A prepronociceptin (ppNC) szerkezete és a biológiai aktivitással rendelkező szekvenciái (Salvadori et al. 1999)

(G-glicin, A-alanin, V-valin, L-leucin, I-izoleucin, P-prolin, F-fenilalanin, Y-tirozin, W-triptofán, S-szerin, T-treonin, C-cisztein, M-metionin, N-aszpargin, Q-glutamin, D-aszpartát, E-glutamát, K-lizin, R-arginin, H-hisztidin).

Az ivarérett patkány agyában a ppNC mRNS és NC mRNS eloszlását a 8. ábra mutatja. In situ hibridizációs módszerrel vizsgálva kimutatást nyert, hogy mind a ppNC mind a NC a gesztációs periódus korai szakaszától megjelenik az agyban és különösen kifejezett a fájdalom-érzéssel, ill. a stressz-reakciókkal kapcsolatos agyterületeken (Neal et al. 2001).



8. ábra

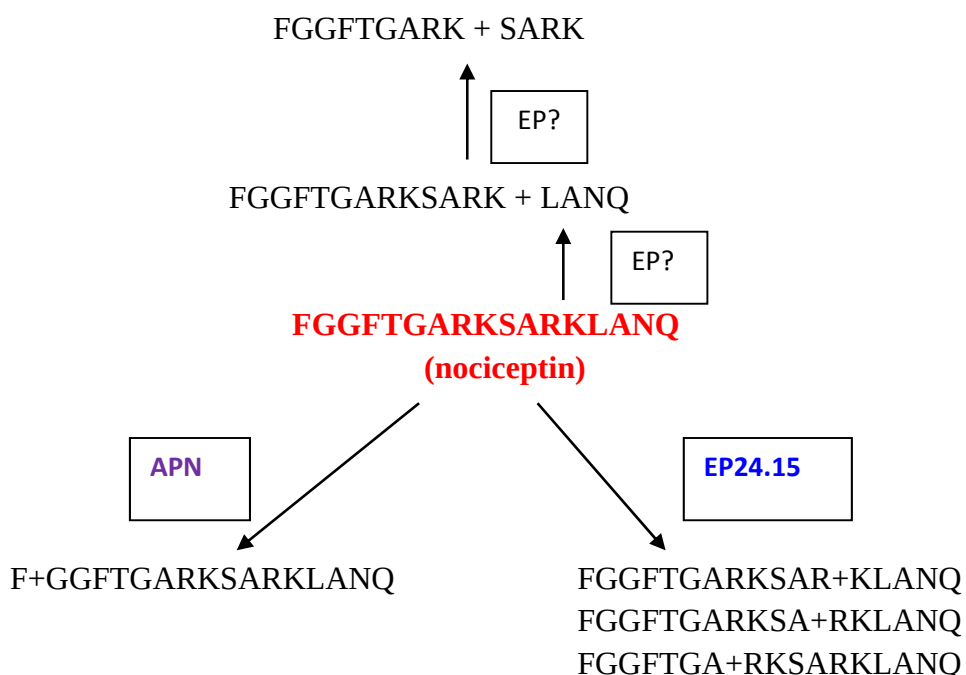
A prepronociceptin (ppOFQ) és a nociceptin (OFQ) előfordulása patkány központi idegrendszerében (Darland et al. 1998)

(I-VI-kérgi rétegek; ABL-basolateral amygdaloid nucleus; AC-anterior commissure; ACB-nucleus accumbens; ACE-central amygdaloid nucleus; ACO-cortical amygdaloid nucleus; AD-anterodorsal thalamus; AL-anterior lobe, pituitary; AMB-nucleus ambiguus; AME-medial amygdaloid nucleus; AON-anterior olfactory nucleus; ARC-arcuate nucleus, hypothalamus; BST-bed nucleus, stria terminalis; CC-corpor callosum; CE-central canal; CL-centrolateral thalamus; CM-centromedial thalamus; CPU-caudate putamen; CRB-cerebellum; DG-dentate gyrus; DH-dorsal horn, spinal cord; DMH-dorsomedial hypothalamus; DPG-deep gray layer, superior colliculus; DTN-dorsal tegmental area; ENT-entorhinal cortex; EPL-external plexiform layer, olfactory bulb; FCX-frontal cortex; G-nucleus gelatinosus, thalamus; GL-glomerular layer, olfactory bulb; GP-globus pallidus; HL-lateral habenula; HM-medial habenula; HPC-hippocampus; IC-inferior colliculus; IGR- intermediate granular layer, olfactory bulb; IL-intermediate lobe, pituitary; ING-intermediate gray layer, superior colliculus; IntP-interposed cerebellar nucleus; IP-interpeduncular nucleus; LC-locus coeruleus; LD-laterodorsal thalamus; LG-lateral geniculate thalamus; LHA-lateral hypothalamic area; LRN-lateral reticular nucleus; LS-lateral septum; MD-mediadorsal thalamus; ME-median eminence; Med-medial cerebellar nucleus; MG-medial geniculate thalamus; Mi-mitral cell layer, olfactory bulb; MM-medial mammillary nucleus; MS-medial septum; MV-medial vestibular nucleus; NDB-nucleus diagonal band; NL-neural lobe, pituitary; NRGC-nucleus reticularis gigantocellularis; NTS-nucleus tractus solitarius; OB-olfactory bulb; ot-optic tract; OTU-olfactory tubercle; PAG-periaqueductal gray; PBN-parabrachial nucleus; PCX-parietal cortex; PIR-piriform cortex; PN-pons; PnR-pontine reticular; PO-posterior nucleus thalami; POA-preoptic area; POR-periolivary region; PrS-presubiculum; PV-paraventricular thalamus; PVN-paraventricular hypothalamus; RD-dorsal raphe; RE-reuniens thalami; RM-raphé magnus; RME-median raphé; SC-superior colliculus; SCP-superior cerebellar peduncle; SG-substantia gelatinosa; SNc-substantia nigra, pars compacta; SNr-substantia nigra, pars reticulata; SNT- sensory trigeminal nucleus; SON-supraoptic nucleus; STCX-striate cortex; STN-spinal trigeminal nucleus; SUG-superficial gray layer, superior colliculus; TCX-temporal cortex; VH-ventral horn, spinal cord; VL-ventrolateral thalamus; VM-ventromedial thalamus; VMH-ventromedial hypothalamus; VP-ventral pallidus; VPL-ventroposterolateral thalamus; VTA-ventral tegmental area; ZI-zona incerta.)

A felnőtt emberi agy egyes területeinek nociceptin-szintjeit (Witta et al. 2004) kvantitatíve is meghatározta. A ppNC, a NC és receptorának megjelenését a fejlődő emberi agyban a 16. gesztációs héten már igen kifejezettnek találták (Neal et al. 2001).

2.2.1. A nociceptin metabolizmusa

A nociceptin metabolikus inaktivációjáért két cink-metallopeptidáz, a membrán-kötött aminopeptidáz-N (APN) és a főként a citoszolban elhelyezkedő, a nociceptinre specifikus, endopeptidáz 24.15 (EP24.15) enzim a felelős. A heptadekapeptid nociceptint az APN, ill. az EP 24.15 négy kritikus helyen hasítja a Phe¹-Gly², Ala⁷-Arg⁸, Ala¹¹-Arg¹², és Arg¹²-Lys¹³ kötéseknel (9. ábra). Az így keletkezett metabolitok inaktívak a NOP receptoron, mert a NOP aktiválásához szükséges minimális szekvenciát, a nociceptin (1-13)-at már nem tartalmazzák.



9. ábra

A nociceptin inaktivációját az aminopeptidáz-N (ANP) és az endopeptidáz 24.15 (EP24.15) végzi (Salvadori et al. 1999)

(EP?=nem azonosított endopeptidáz, G-glicin, A-alanin, L-leucin, F-fenilalanin, S-szerin, T-treonin, N-aszpargin, Q-glutamin, K-lizin, R-arginin)

2.3. A prepronociceptin egyéb biológiai aktivitású szekvenciái: a nocistatin, a NCII és a NCIII.

2.3.1. A nocistatin

A ppNC bPNP3 szekvenciájának biológiai aktivitását, a különböző állatfajokban fellelhető szerkezetét és a nociceptin-kiváltotta hyperalgéziát és allodyniát gátló hatását elsőként (Okuda-Ashitaka et al. 1998) írták le. A ppNC-ből a prohormon-konvertáz II hatására keletkező nocistatin számos hatásában a nociceptin funkcionális antagonistájaként viselkedik (Mogil and Pasternak 2001, Chen et al. 2010). Bizonyítást nyert, hogy a nocistatin-hatásért a különböző állatfajokban és emberben is a konzervatív C-terminális a felelős (Crescenzi et al. 2000), de szerepének feltárását nagyban gátolja, hogy receptora a mai napig sem ismert (Johnson and Connor 2007). A legújabb közlések szerint a NIPSNAP1 fehérjéhez kötődik nagy affinitással és specifikusan (Okuda-Ashitaka et al. 2012). A nocistatin (NS) önálló, $G_{i/o}$ -fehérje kötött receptorának létét in vitro (Zeilhofer et al. 2000) és in vivo (Inoue et al. 2003) vizsgálatok vetették fel. A nocistatin jelenlétét az emberi agyban és liquorban (Lee et al. 1999) bizonyította, a felnőtt emberi agyban megtalálható két formájának (NST-17 és NST-30) felismerése (Joseph et al. 2006) nevéhez fűződik.

A nocistatin élettani szerepét kezdetben a bovin NS hatásainak vizsgálatával kutatták. Megállapították, hogy egérben visszafordítja a scopolamin-kiváltotta tanulási és memória-deficitet (Hiramatsu and Inoue 1999), fájdalomcsillapító a formalin-teszt I. fázisában (Yamamoto and Sakashita 1999), patkánynak i.c.v. adva gátolja a gyulladásos hyperalgéziát (Nakagawa et al. 1999), a thalamus gátló neuronjainak gátlásával dysinhibitoros hatást fejt ki (Albrecht et al. 2001), gátolja a morfinra kialakuló akut és krónikus toleranciát (Sun et al. 2001b). Saját vizsgálatainkban igazoltuk, hogy az i.c.v. adott NS hatékonyan (1 nmol) gátolja az alkohol-kiváltotta akut gyomor-mucosa károsodást (Zadori et al. 2008).

Molekuláris hatásmódjára vonatkozóan az első adatok azt bizonyították, hogy $G_{i/o}$ fehérje-kapcsolt útvonalon gátolja a szerotonin felszabadulást egér neocortex preparátumon (Fantin et al. 2007). A legújabb adatok szerint (a nociceptinnel

ellentétben) depolarizálja a centrális amygdala-PAG útvonal neuronjait megnyitva a receptor-aktiválta nem-szelektív (TRPC) kation csatornákat (Chen et al. 2009).

2.3.2. A NCII és NCIII

A NCII a ppNC-ban található heptadekapeptid (FSEFMRQYLVLSMQSSQ) szekvencia, mely rágcsálókban és emberben azonos. Szerkezetét (Amodeo et al. 2000) vizsgálta és hatékony fájdalomcsillapítónak találták. Más vizsgálatok szerint fájdalomcsillapító hatására vonatkozó adatok ellentmondásosak (Mogil and Pasternak 2001). A NCIII a NCII-Arg-Arg-Arg szerkezettel rendelkezik. A vegyület nem kötődik a NOP receptorhoz és biológiai hatásával kevés vizsgálat foglalkozott idáig (Florin et al. 1999).

2.4. A nociceptinerg rendszer és a biogénamin neurotranszmisszió kapcsolata

2.4.1. A nociceptin és a hisztamin

A nociceptin-hatások vizsgálatának kezdeti időszakában az exogén nociceptinnek a klasszikus opioidokkal azonos, ill. különböző hatásait igyekeztek feltárni. A vizsgálatok tervezését jelentősen hátráltatta, hogy az endogén nociceptin-szintek nem voltak ismertek. Bizonyítást nyert, hogy a morfinnal ellentétben a NC dóziszfüggően és reverzibilisen (posztszinaptikus NOP receptoron keresztül) hiperpolarizálva a patkány tuberomamilláris neuronjait (mely terület a hisztamin-szintézis kizárólagos helye az agyban) gátolja a hisztamin-felszabadulást. A nociceptin gátolja az opioid-kiváltotta hisztamin-felszabadulást, mely a fájdalomcsillapító hatásában fontos elem (Eriksson et al. 2000).

A nociceptin NOP receptoron keresztül gátolja a hízósejt degranuláló peptid- (MCDP), és a bradykinin- kiváltotta plazma extravazációt, de nincs hatással se a szerotoninnal se a hisztaminnal kiváltott plazma extravazációra (Nemeth et al. 1998, Moriyama et al. 2009). Az intradermálisan alkalmazott NC érpermeabilitást

fokozó hatású, fokozza a gyulladásos reakciókat a hízósejtekből felszabadított hisztamin révén (Kimura et al. 2000). Az akut gyulladás helyén megemelkedő nociceptin szint feltételezhetően a leukocitákból származik. A NC neurogén gyulladást csökkentő hatása a szenzoros idegvégződésekből a SP és a CGRP felszabadulásának gátlásával magyarázható (Helyes et al. 1997).

A NC vérnyomáscsökkenést és értágulatot okozó hatását (Brookes et al. 2007) *in vivo* kísérletekben a hízósejtekből felszabaduló hisztamin hatásával magyarázzák és a NC-NOP rendszert a gyulladásos mikrocirkuláció fontos szabályozójának tartják.

Az i.t. adott NC jellegzetes nociceptív viselkedés-mintázatot (harapdálás, nyaldosás) okoz, melyet a GABA_A és a GABA_B receptor agonisták gátolnak, mely a nociceptinerg és a GABA-erg rendszer kapcsolatára utal. Az adatok azt mutatják, hogy a NOP receptoron megvalósuló NC hatás a hisztaminerg neuronok dezinhibícióját, azaz hisztamin-kiáramlás fokozódást eredményez, ami a SP-t tartalmazó gerincvelői neuronokon a H₁ receptorok aktiválását idézi elő (Sakurada et al. 2004).

2.4.2. A nociceptin és a szerotonin

A raphe magvak, melyekben a központi idegrendszeri szerotonin szintézis folyik, rendkívül gazdagok NOP receptorban és a nociceptint is nagy mennyiségben tartalmazzák. E területeken a NC a K⁺-áram fokozásán keresztül gátolja a neuronális aktivitást (Montiel et al. 1997). A nucleus raphe magnus magas NC koncentrációja arra enged következtetni, hogy a szerotonerg rendszerre hatva a fájdalomérzés supraspinalis kontrolljában játszik fontos szerepet.

Patkány nucleus raphe dorsalisban és nucleus accumbensben a nociceptin dózisfüggően gátolja a szerotonin effluxot, mely a NOP receptor antagonistá [Nphe¹]nociceptin(1-13)NH₂ -nel gátolható (Tao et al. 2007).

A nociceptin patkány cortex-ben is a NOP receptor izgatásával gátolja az elektromos ingerléssel kiváltott szerotonin felszabadulást (Siniscalchi et al. 1999).

Patkány cortex szinaptoszóma szuperfuzátumon nyert igazolást, hogy a NC NOP receptoron hatva gátolja mind a spontán mind a K^+ -kiváltotta szerotonin effluxot (Sbrenna et al. 2000), mely hatással sem a szelektív δ - receptor agonista deltorphin I sem a szelektív μ -receptor agonista endomorfín I nem rendelkezik. Az adatok azt bizonyítják, hogy a NC a preszinaptikus NOP receptor aktiváció révén a központi idegrendszeri szerotonerg funkciók egyik legfontosabb modulátora (Sbrenna et al. 2000).

A PAG-ból induló gerincvelői leszálló fájdalom-pálya működésében a szerotoninnak fontos szerepe van (Furst 1999). A PAG ventrolaterális részébe injektált NC igen erősen gátolja a szerotoninon kívül a noradrenalin és a GABA felszabadulását is, míg a glutamát felszabadulását serkenti a gerincvelő hátsó szarvában. Nociceptin hatására a fájdalom-pálya kitüntetett szerepű nucl. raphe magnus-ában szintén erősen gátolt a szerotonin és a noradrenalin-felszabadulás, de érdekes módon a GABA felszabadulás fokozódását és a glutamát-felszabadulás gátlását lehetett tapasztalni. A szintén kitüntetett szerepű nucl. reticularis gigantocellularis-ban a szerotonin- és a glutamin- felszabadulás fokozódása és a noradrenalin- valamint a GABA-felszabadulás gátlása alakult ki. Az adatok további bizonyítékát adják a nocicetinerger rendszer szerepének a fájdalomérzés szabályozásában (Lu et al. 2010).

A i.c.v. adott NC funkcionális szerepét igazolták egerek felderítő (exploratory) viselkedésében „hole-board” teszten végzett kísérletekben. Kimutatták, hogy a kis dózisú nociceptin anxiolitikus hatású, míg nagy dózis anxiogén. Nocistatin előkezelés szignifikánsan csökkentette a NC hatását, de önmagában nem befolyásolta a felderítő viselkedést. Az anxiolitikus dózisú NC a hippocampusban fokozta a szerotonin turnover-t, míg az anxiogén dózis csökkentette a szerotonin-turnover-t az amygdalában (Kamei et al. 2004).

Stressz-hatásnak kitett patkányokban a NC szerotonin-felszabadulásra gyakorolt gátló hatása méginkább kifejezett, melyet sem az antalarmin sem a bicucullin nem befolyásol. Az adatok felvetik a stressz-kiváltotta kórképekben a NOP-receptoron ható vegyületek potenciális terápiás alkalmazhatóságát (Nazzaro et al. 2009).

Az agykérgi preszinaptikus NOP receptor közvetítette 5HT felszabadulásgátló hatás egérben jelentősebb mértékű, mint patkányokban, ami az egyes állatfajokon mért adatok összehasonlíthatóságának korlátaira hívják fel a figyelmet (Sbrenna et al. 2000, Mela et al. 2004).

Humán neocorticalis agyszeleteken a nociceptin már igen alacsony koncentrációban gátolja a szerotonin felszabadulást, amit a NOP receptor antagonist J-113397 előkezelés gátolni képes (Berger et al. 2006).

A bemutatott adatok egyértelműen igazolják, hogy a nociceptin a szerotonin-felszabadulás egyik legfontosabb preszinaptikus modulátora és arra engednek következtetni, hogy a nociceptinerg rendszernek fontos szerepe van a központi idegrendszeri szerotonin-mediált biológiai funkciók szabályozásában.

2.4.3. A nociceptin és a dopamin

A NOP receptor jelentős mértékű expresszáldása a patkány és az emberi substantia nigra-ban és a ventrális tegmentális areában arra utal, hogy a nociceptinerg rendszer hatással lehet a mozgás-koordináció, a motiváció, a hangulat és a gondolkodás dopaminerg szabályozására (Maidment et al. 2002, Norton et al. 2002).

A NOP receptort a substantia nigra pars compacta (SNc) területén a dopaminerg neuronok mintegy 50%-a expresszálja. A nociceptin mRNS-e legnagyobb mennyiségben a GABA-erg neuronokban, míg a NOP receptor mRNS-e a dopaminerg neuronokban van (Norton et al. 2002).

Több állatfajon is igazolást nyert, hogy a NC a NOP receptor izgatása révén hatékonyan gátolja a striatumban, az eminencia mediana-ban, a hypothalamus paraventricularis magjában a dopamin felszabadulását és hatással van a metabolizmusára (Flau et al. 2002, Shieh and Pan 2001).

Érdekes módon DA-transportert expresszáló CHO sejteken és patkány striatum szinaptoszóma preparátumon a NC-t hatékony DA-visszavétel-gátlónak találták. Miután a NC a GABA-transzportert is gátolta in vitro kísérletekben, feltételezhető,

hogy a NC közvetett és közvetlen hatással egyaránt képes a dopaminerg neurotranszmissziót befolyásolni (Liu et al. 2001). Ugyanakkor patkány középgygi primér dopaminerg sejt kultúrán a nociceptin hatékonyan és dóziszfüggően gátolja a dopamin és a GABA- felszabadulást, de a glutamaterg transzmisszióra nincs hatással (Murphy et al. 2004).

A NOP receptor szelektív peptid (UFP-101) és nem-peptid (J-113397) antagonistái serkentőleg hatnak a nigrostriatalis dopaminerg transzmisszióra és a motoros funkciókra (Calo et al. 2002), és gátolják a substantia nigra pars reticulatában a glutamát felszabadulást. A NOP receptor antagonisták a Parkinson kór kezelésében új gyógyszer-targetként szerepelnek (Marti et al. 2005, Marti et al. 2010).

A ventrális tegmentális areába juttatott NC átmeneti gátlás után erősen fokozza a dopamin-felszabadulást és érzékenyíti a sejteket a cocain-hatás iránt (Narayanan and Maidment 1999), gátolja a morfin-, az alkohol-, és az amfetamin-származékok okozta dependenciát (Zaveri 2011). A cocain-dependencia okozta hatásokat nemcsak gátolja, de vissza is fordítja (Bebawy et al. 2010). A NOP receptor nem-peptid agonistái (pl. a Ro 64-6198) a drogfüggőség kezelésére klinikai vizsgálat alatt állnak (Zaveri 2011).

2.4.4. A nociceptin és a noradrenalin

A nociceptinerg és a noradrenerg rendszer kapcsolata a nociceptinnek a fájdalomérzést, a szorongást, a félelem-érzést, a stressz-tűrést, a tanulást és a memóriát valamint az opioid dependenciát és toleranciát befolyásoló hatása alapján már a nociceptin-kutatás kezdeti időszakában felmerült (Mogil and Pasternak 2001).

Az első közlések patkány, egér és tengerimalac agykéreg-szelet szuperfúziós kísérletekben a központi idegrendszeri (Schlicker et al. 1998), patkányfark-artérián pedig perifériás szövetben (Bucher 1998) megerősítették, hogy a nociceptin a preszinaptikusan/prejuncionálisan elhelyezkedő NOP receptor izgatásával közvetett módon, az α_2 -adrenoreceptorok izgatását váltja ki, mely

következményesen és dózisfüggően gátolja a noradrenalin felszabadulást. A hatás újszülött patkányokban is megfigyelhető (Siniscalchi et al. 2002). Emberi neocortex [^3H]-noradrenalin-felszabadulását vizsgálva (Rominger et al. 2002) hasonló eredményt kaptak.

A szelektív NOP receptor antagonist J-113397 csökkenti a nociceptin noradrenalin felszabadulást gátló hatását, ezért feltételezték, hogy a NOP antagonistákat a drogfüggőség kezelésére alkalmas vegyületekként érdemes fejleszteni (Ciccocioppo et al. 2000, Ueda et al. 2000, Koob 2008).

Az amygdala basolateralis magvaiban, éber patkányokon, mikrodialízis kísérletekben a nociceptin gátolja a noradrenalin felszabadulást, de a kompetitív NOP -antagonista J-113397 önmagában is mintegy kétszeresére emeli a noradrenalin-szintet. A basalis noradrenerg neuronok feltételezhetően az endogén nociceptinnek NOP receptoron kifejtett, gátló hatása alatt állnak, mert a J-113397 noradrenalin felszabadulást fokozó hatását a nociceptin képes meggátolni (Kawahara et al. 2004).

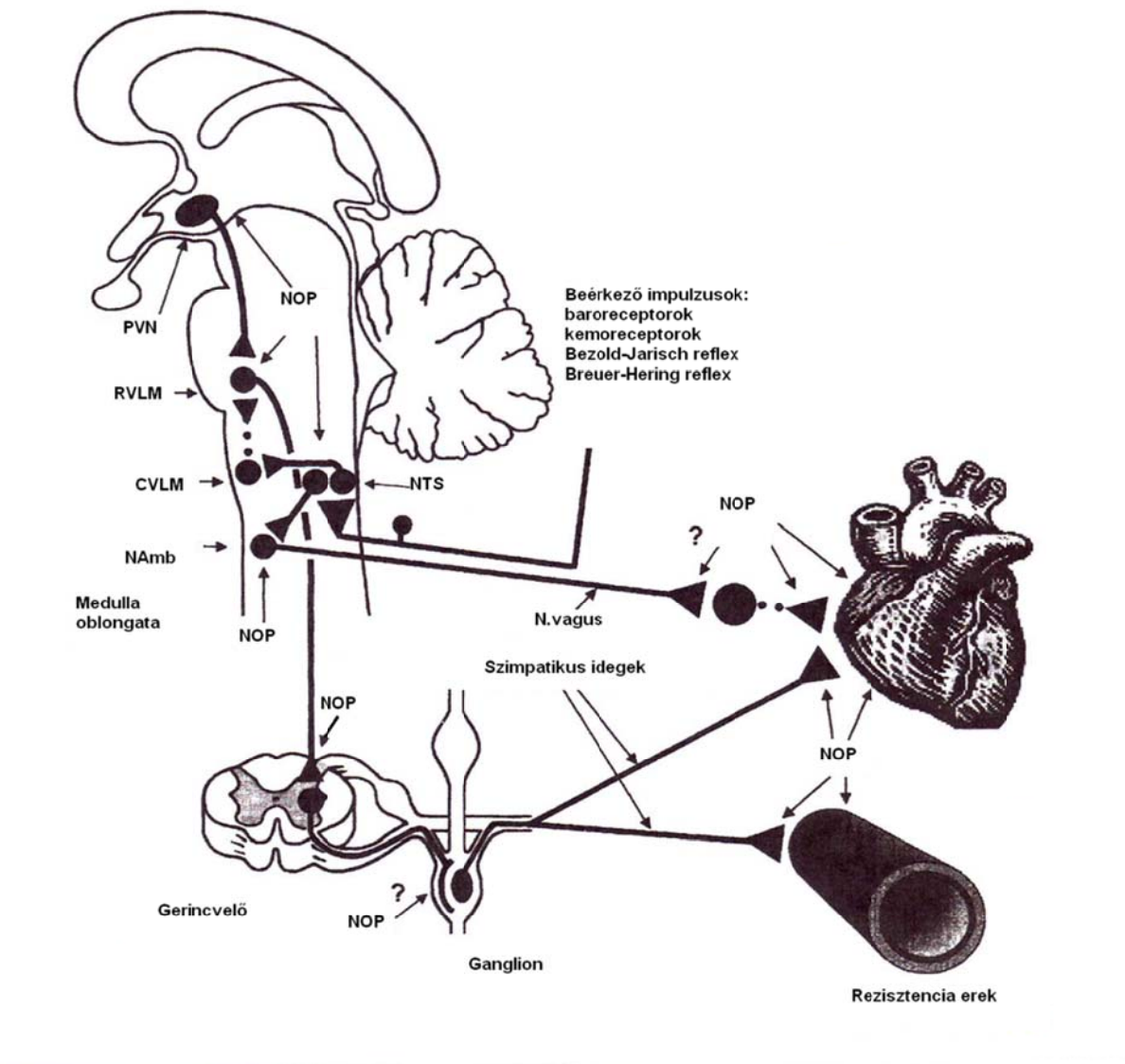
Az amygdala basolateralis complexében, mely kitüntetett szerepű az érzellemmel motivált tanulási és memória-funkcióban, a nociceptin a noradrenerg rendszeren keresztül hatékonyan befolyásolja a memóriát (Rooszendaal et al. 2007).

A nociceptin szív- és ér-hatásait, az adrenerg rendszerrel való együttthatását a periférián elsőként (Malinowska et al. 2002) foglalta össze (10. ábra).

A NC az artériákon és a vénákon egyaránt hatékony értágító és jelentős bradycardizáló hatású (Abdelrahman and Pang 2002). A legújabb vizsgálatok a NC bradycardizáló hatásában a ggl. stellatum Ca^{2+} -csatornáinak gátlását fontos tényezőnek találták, mely a $\text{G}\beta 2$ and $\text{G}\beta 4$ fehérjéken valósul meg (Mahmoud et al. 2012).

Kimutatást nyert, hogy a perifériás nociceptin és a perifériás noradrenalin-szint között negatív korreláció van, a NC hatékony értágító hatása a perifériás noradrenalin-szint csökkenését okozza (Hashiba et al. 2003). Egészséges felnőttekben terhelés hatására a perifériás nociceptin-szint emelkedés mértéke az adrenerg tónus nagyságától függ (Fontana et al. 2010).

A NOP agonista ZP 120 mint hatékony értágító és nátrium-spóroló aquaretikus diuretikum (Simonsen et al. 2008) a fokozott adrenerg tónussal járó kardiovaszkuláris kórképekben klinikai vizsgálat alatt áll (Mustazza and Bastanzio 2011).



10. ábra

A NOP receptor szerepe a kardiovaszkuláris rendszer szabályozásában

(az izgató neuronok folyamatos vonallal, a gátló hatások szaggatott vonallal vannak jelölve, CVLM: caudális ventrolaterális medulla, Namb: nucl. ambiguus, NTS nucl. tractus solitarii, PVN: nucl. paraventricularis, RVLM: rostralis ventrolateralis medulla) (Malinowska et al. 2002)

3. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálatainkat a nociceptin-kutatásnak abban a kezdeti időszakában indítottuk, amikor a nociceptinerg rendszer élettani/farmakológiai szerepéről kevés adat állt rendelkezésre, ill. klinikai jelentősége még nem körvonalazódott.

Célul tűztük ki:

1. Annak vizsgálatát, hogy mely klinikai kórképekben van szerepe a perifériás nociceptin-szint elváltozásoknak

- 1.1 Vizsgálni kívántuk, hogy a genetikai determináltságú Wilson kór-nak van-e hatása a perifériás nociceptin-szintre, ill. a NOP receptor aktivitására
- 1.2 Vizsgálni kívántuk, hogy az autoimmun eredetű primer biliáris cirrhosis hatással van-e a perifériás nociceptinerg anyagcserére
- 1.3 Vizsgálni kívántuk, hogy a hepatocelluláris carcinoma, ill. más daganatos betegségek hatással vannak-e a perifériás nociceptinerg anyagcserére
- 1.4 Vizsgálni kívántuk, hogy a primer fejfájás-betegségekben érintett-e a perifériás nociceptinerg anyagcsere
- 1.5 Vizsgálni kívántuk, hogy akut ischémiás stroke valamint krónikus ischémiás kardio-vaszkuláris kórképekben változik-e a perifériás nociceptinerg anyagcsere

2. Annak vizsgálatát, hogy a streptozotocinnal kiváltott krónikus diabetes, mint neuropathiás fájdalom-modell hatással van-e a központi idegrendszeri, ill. a perifériás nociceptinerg valamint a nocistatin anyagcserére

3. Annak állatkísérletes vizsgálatát, hogy a központi idegrendszeri nociceptinerg és hisztaminerg anyagcsere kapcsolatban áll-e

4. Annak állatkísérletes vizsgálatát, hogy az újszülöttkori nociceptin, ill. nocistatin –kezelés rendelkezik-e hormonális imprinting aktivitással, ill. befolyással van-e a központi idegrendszer felnőttkori szerotonin és dopamin anyagcseréjére

5. Annak állatkísérletes vizsgálatát, hogy az acetilkolieszteráz reaktivátor K27 és K203 hatással van-e a központi idegrendszeri szerotonin, ill. dopamin anyagcserére

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Állatmodellek

Vizsgálatainkat Wistar (Charles River, Budapest, ill. Toxicop, Budapest) patkányokon végeztük. Az állatok standard körülmények között tartottuk (*ad libitum* víz és táp, normál 12 órás fény-sötét ciklus). A mintákat éter narkózis alkalmazása mellett (az állatvédelmi szabályok betartásával, engedélyszám:1806/007/2004), a belső szemzugen át elvégeztettük és a *foramen occipitale magnum*-on át vettük a liquort. Az agyrészleteket jéghideg alumínium lapon preparáltuk (Glowinski and Iversen 1966) módszere szerint.

A kálium-etiléndiamin-tetraecetsavval (K_2 -EDTA) alvadásgátolt vérhez (4-8ml) azonnal 0,6 TIU/ml aprotinint (Calbiochem, Darmstadt, Németország) adtunk proteáz inhibítorként. A vért 1600 g-n, 15 percig, 4°C-on centrifugáltuk (Janetzky-K70, Berlin, Németország) és a plazmát mintavételi csövekbe gyűjtöttük. A liquor mintákat (90-170µl) közvetlenül alkalmaztuk a mérésekhez. A mintákat a felhasználásig -80°C-on tároltuk.

4.1.1 Krónikus diabetes, mint neuropathiás fájdalom-modell

A streptozotocinnal kiváltott krónikus diabetes-t a neuropathiás fájdalom metabolikus modelljeként (Courteix et al. 1993) vezette be. A vizsgálatban 180-220 g súlyú hím Wistar patkányokat használtunk. A diabetest a pentobarbitállal (50mg/ttkg i.p.) altatott állatok (n=50) vena femoralisába adott streptozotocinnal (60mg/ttkg, 0,1ml/100g) indukáltuk. A kontroll csoportba tartozó állatok (n=35) fiziológiás sóoldatot kaptak. A diabetes indukciója után, hetenként ellenőriztük a testtömeg és a vércukorszint alakulását. A vércukor-szintet GOD-POD (Reanal Diagnosztika) spektrofotometriás módszerrel mértük (Hitachi U-200, Tokyo, Japán). Azokat az állatokat tekintettük diabéteszeseknek, melyek vércukorszintje a normál vércukorszintnek legalább a háromszorosára emelkedett (>18 mmol/l).

A diabétesz kialakulása után 2, 4, 8, 12 és 16 héttel az állatok egy-egy csoportjából (n=7) vér- és liquor- mintát vettünk, melyeket a további feldolgozásig -80°C-on tároltunk.

4.1.2 *Exogén nociceptin hatásának vizsgálata a hisztamin és a szerotonin anyagcserére*

Vizsgálatainkat 170-230 g testtömegű hím patkányokon végeztük. A nociceptint (Bachem, Bubendorf, Svájc) 5,5 nmol/állat, a substance P-t (SP) (Bachem, Bubendorf, Svájc) 50 nmol/állat, a Compound 48/80-at (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 µg/kg és a cromolynt (Orion, Espoo, Finnország) 1mg/kg dózisban adtuk. A vegyületek mindegyikét fiziológiás sóoldatban *ex tempore* oldva, i.c.v., 20 µl térfogatban alkalmaztuk. A kontroll csoport azonos térfogatú, oldószert kapott. Vér- és liquor mintát vettünk 1 órával a Compound 48/80 kezelés és 2 órával a nociceptin, valamint a SP kezelést követően. A kombinált kezelések alkalmával a cromolyn-t 30 perccel a Compound 48/80 előtt adtuk.

4.2 Betegcsoportok

A vérmintákat a könyökvénából reggel 8.00 és 10.00 óra között, éhgyomorra vettük K₂-EDTA-val alvadásgátolt vacutainer-be, melyhez azonnal aprotinin proteázgátlót adtunk (Calbiochem, Darmstadt, Németország; 0,6 TIU/ml vér). A plazmát 1600 x g, 4°C, 15 perces centrifugálással (Janetzky K70, Lipcse, Németország) nyertük és a mintákat -80°C-on tároltuk a mérés megkezdéséig.

4.2.1 *Különböző etiológiájú krónikus májbetegségben szenvedők*

A Semmelweis Egyetem I.sz Belgyógyászati Klinika Hepatológiai Osztályának vezetőjével, Prof. dr. Szalay Ferencsel alakítottunk ki együttműködést és vizsgáltuk a klinikailag jól definiált betegcsoportokban a plazma nociceptin-szintjét. A vizsgálatokat a helyi Etikai Bizottság engedélye birtokában végeztük és a vérminták vételének céljáról a vizsgálati személyeket írásban tájékoztattuk.

4.2.1.1 Wilson-kóros betegek

A vizsgálatban 21 Wilson-beteg vett részt, akik a betegség standard terápiájaként D-penicillamin kezelésben részesültek a megfelelő diétával kiegészítve. A klinikai tüneteken, a laboratóriumi valamint a genetikai vizsgálatokon alapuló diagnózis megállapítása és a szérumban ceruloplazmin-vizsgálatok az I.sz. Belgyógyászati Klinikán történtek. Véradók, ill. a betegek egészséges rokonai alkották a 25 főből álló kontrol csoportot. A vizsgálatban részvevő személyek klinikai jellemzőit az 1. Táblázatban foglaltuk össze:

1. Táblázat A Wilson kórban szenvedő betegek klinikai jellemzői

	Egészséges kontroll személyek	Wilson-betegek
Személyek száma	25 (11 nő, 14 férfi)	21 (8 nő, 13 férfi)
Átlagos életkor (év $\pm$ SD)	36 $\pm$ 14	32 $\pm$ 13
D-penicillamin-terápia időtartama (hónap $\pm$ SD)	---	110,7 $\pm$ 163,6
Neurológiai tünetek	---	6
Pszichiátriai tünetek és viselkedészavar	---	3
Kayser-Fleischer gyűrű	---	12
Kóros májfunkció	---	12

4.2.1.2 Primer biliáris cirrhosisban szenvedők

A vizsgálatban 24 primer biliaris cirrhosis (PBC) diagnózissal kezelt nőbeteg vett részt (életkoruk 45-67 év között, Ludwig (Ludwig et al. 1978) szerinti klinikai stádiumbeosztás: 10 fő PBC II, 8 fő PBC III, 6 fő PBC IV), akik a betegség standard terápiájának minősülő ursodeoxycholsav terápiát kaptak (átlagos kezelés ideje $131,3 \pm 91,0$ hónap). Mindegyikük AMA M2 pozitivitást mutatott és a diagnózis klinikai, laboratóriumi és hisztológiai vizsgálatok alapján került megállapításra. Hat betegnél májbiopszia is történt, mely a cirrhosis tényét igazolta és fokát szövettani vizsgálat állapította meg.

Kontroll csoportként 25 korban illesztett egészséges nő szolgált a véradók közül.

4.2.1.3 Hepatocelluláris carcinomában szenvedők

A vizsgálatban 18 elsődleges hepatocelluláris carcinomás (HCC) beteg (13 férfi, 5 nő, átlagos életkoruk $63,8 \pm 13,6$ év) vett részt. A diagnózis klinikai, laboratóriumi, US, CT, MRI vizsgálatok valamint vékonytű aspirációs cytológiai és hisztológiai vizsgálatok alapján került megállapításra. A szérum alfa-főtoprotein (AFP) értékek 11 esetben voltak klinikailag szignifikánsan emelkedettek. A daganat átmérők 2,5 és 12 cm tartományba estek, metasztázis nem volt megállapítható. 12 beteg időszakosan nem-opiát típusú fájdalomcsillapítót szedett, 6 főnek nem voltak fájdalmai.

A kontroll csoportba 29 egészséges személyt soroltunk, akik véradók, ill. az egészségügyi személyzet tagjai voltak.

4.2.2 Elsődleges fejfájásban szenvedők

A Semmelweis Egyetem Neurológiai Klinikájával (dr. Ertsey Csaba) alakítottunk ki együttműködést és vizsgáltuk a klinikailag jól definiált elsődleges fejfájás-betegek plazma nociceptin-szintjét. A vizsgálatokat a helyi Etikai Bizottság engedélye

alapján végeztük és a vizsgált személyektől írásos beleegyező nyilatkozatot kaptunk.

4.2.2.1 Migrénes betegek

A vizsgálatban 18 migrén-beteg vett részt, akik a migrén roham-terápiájára alkalmazott gyógyszereken kívül más gyógyszeres kezelésben nem részesültek. A vérmintákat fejfájás-mentes időszakban vettük. Hat beteg esetében a migrén roham első órájában is módunk volt vérmintát kapni.

Kontroll csoportként 24 egészséges személy szolgált.

A vizsgált személyek klinikai adatait a 2. Táblázatban foglaltuk össze

4.2.2.2 Cluster-fejfájásos betegek

A vizsgálatban 14 cluster-fejfájásos beteg vett részt (3 nő és 11 férfi, átlagos életkoruk $49,1 \pm 15,4$ év). Betegségük időtartama $13,2 \pm 10,6$ év volt. Nem szerepeltek a csoportban olyan személyek, akik profilaktikus terápiában vagy egyéb betegségük miatt bármely gyógyszeres kezelésben részesültek.

Kontrollként életkor és nem szerint illesztett 22 személyből álló csoport szolgált.

2. Táblázat A migrénes betegek klinikai adatai

	Migrénes betegek		Egészséges kontroll
	fejfájás-mentes periódus	roham alatt	
Személyek száma	18 (13 nő, 5 férfi)	6 (5 nő, 1 férfi)	24 (13 nő, 11 férfi)
Átlagos életkor (év $\pm$ SD)	35,4 $\pm$ 14,7	34,2 $\pm$ 17,8	36,6 $\pm$ 13,8
A betegség fennállásának időtartama (év $\pm$ SD)	15,4 $\pm$ 15,3	16,8 $\pm$ 19,1	---
Az utolsó fejfájás-roham óta eltelt idő (óra $\pm$ SD)	72,15 $\pm$ 42,4	---	---
A vérvétel utáni roham kezdetéig eltelt idő (óra $\pm$ SD)	56,9 $\pm$ 40,3	---	---
A vérvétel idején fennálló roham kezdete (óra $\pm$ SD)	---	2,08 $\pm$ 0,74	---
A roham havi gyakorisága ($\pm$ SD)	3,56 $\pm$ 2,14	4,7 $\pm$ 1,86	---
A kezeletlen roham átlagos időtartama (óra $\pm$ SD)	28,62 $\pm$ 13,96	28,4 $\pm$ 12,5	---

4.2.3 *Kardio-vaszkuláris kórképekben szenvedő betegek*

4.2.3.1 Akut ischémiás stroke-betegek

A Fővárosi Önkormányzat Szent János Kórház Neurológiai Osztály és Stroke Centrum vezetőjével, dr. Folyovich Andrással alakítottunk ki együttműködést és vizsgáltuk 32 ischémiás stroke-betegek plazma nociceptin és szerotonin valamint 5HIAA szintjét a kórház Etikai Bizottságának engedélye alapján. A vénás vért a kórházba érkezés utáni 6 órán belül gyűjtöttük.

A stroke-ot képkötő vizsgálattal kimutatott releváns eltérés igazolta, a TIA diagnózisa a klinikai kritériumrendszer alapján került megállapításra.

A vizsgált személyek klinikai jellemzőit a 3. Táblázatban foglaltuk össze.

3. Táblázat Az ischémiás stroke-betegek klinikai jellemzői

	Kontroll csoport	Ischémiás stroke-betegek
Személyek száma	36	
átlagos életkor (év±SD)	65,6±13,7	
akiknek már volt stroke-ja, de akut történésükből felépültek (K1)	13	
átlagos életkor (év±SD)	71,7±11,5	
agyi érbetegsége nincs és nem volt (K0)	23	
átlagos életkor (év±SD)	62,3±13,8	
Személyek száma		32
átlagos életkor (év±SD)		73,5±10,1
Carotis területi keringészavar (C)		14
átlagos életkor (év±SD)		76,5±13,1
Lacunar ischaemia (L)		12
átlagos életkor (év±SD)		71,8±9,9
TIA (T)		6
átlagos életkor (év±SD)		68,6±8,9

4.2.3.2 Krónikus stabil angina pectoris és perifériás artéria-betegek

A Semmelweis Egyetem Érsebészeti Klinikáján dr. Sótónyi Péterrel kialakított együttműködésben vizsgáltuk a klinikailag jól definiált 22 krónikus stabil angina pectoris (SAP) beteg valamint 12 perifériás érbetegek (PAD) plazma nociceptin szintjét. A vizsgálatok a Semmelweis Egyetem TUKEB engedélye alapján történtek és a vérminta vételéhez a betegek írásos hozzájárulásukat adták.

A betegek részletes klinikai jellemzését a Regul Pept. 2011 Aug 8;169 (1-3): 1-5 közleményünk tartalmazza.

Kontroll csoportként 14 egészséges személy szerepelt, akik semmiféle gyógyszert a vérvételt megelőző 7 napban nem vettek be.

A vizsgált személyek összefoglaló klinikai adatait a 4. Táblázat mutatja:

4. Táblázat A stabil angina pectoris és a perifériás érbetegek összefoglaló klinikai jellemzői

	Kontroll	SAP	PAD
Személyek száma	14 (7 nő, 7 férfi)	22 (4 nő, 14 férfi)	12 (4 nő, 8 férfi)
átlagos életkor (év $\pm$ SD)	43,4 $\pm$ 8,6	72,5 $\pm$ 8,5	65 $\pm$ 7,9
BMI (kg/m ²)	---	26,2 $\pm$ 2,5	25,8 $\pm$ 3,7

4.3 Bioanalitikai módszerek

4.3.1 *Nociceptin mennyiségi meghatározása humán plazma, ill. patkány plazma, liquor, agy, máj és uterus szövetben, a módszer validálása*

A nociceptin szöveti szintjének meghatározása validált ^{125}I -radioimmunoassay (^{125}I -RIA) módszerrel történt. A plazma (1.0ml) és a liquor (100 μl) mintákból a nociceptin extrakciójához azonos mennyiségben 1%-os trifluoro-ecetsavat (TFA; Sigma-Aldrich Kft, Budapest) adtunk, majd (20 min, 17.000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$) centrifugáltuk (Hettich Mikro 22R, Németország) és a felülúszót 1%-os TFA, majd 1%-os TFA-t tartalmazó 60%-os vizes acetonitrillel előkészített 200mg-os C18 SPE (ABL&E JASCO, Budapest) oszlopra vittük. Az oszlopon lévő mintákat 1%-os vizes TFA-val mostuk és 1% TFA-t tartalmazó 60%-os vizes acetonitrillel oldottuk le. Az extrakciót követően a mintákat vakuumcentrifugában (SAVANT, Farmingdale, NY, USA) szárazra pároltuk.

Az agy, máj és uterus szövet nociceptin-tartalmának extrakciójára az alábbi módszert dolgoztuk ki:

Az agyszövet-mintákhoz 10mg/ml, a májszövet-mintákhoz 100mg/ml és az uterus-mintákhoz 250mg/ml mennyiségben 1 mol/l-es ecetsavat adtunk, majd 5 percre 95 $^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőbe, majd 0 $^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőbe helyeztük 10 percre. Ezután a mintákat késes homogenizátorral (20.000 rpm/perc, 10 sec) végzett (Ultra Turrax, Janke Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Germany) és ezt követően 10 sec-os ultrahangos homogenizálásnak (Labsonic 2000, B.Braun AG, Melsungen, Germany) vetettük alá, majd ismét 5 percig 95 $^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőbe helyeztük és 0 $^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőben 10 percig hűtöttük és üleptítettük. A mintákat centrifugáltuk (4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min 12.000 g, Hettich Mikro 22R, Tuttlingen, Németország) és a víztiszta felülúszó 1,0ml-es frakcióit a továbbiakban a plazma, ill. liquor –mintáknál leírt módon kezeltük.

A RIA mérésekhez az 1-128pg/ml tartományban, ill. a 10-1280pg/ml tartományban mérő ^{125}I -Nociceptin RIA kit-et használtunk (Phoenix Pharmaceuticals Inc, Belmont, CA, USA, ill. Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA). A

radioaktivitást 10 mintaváltós γ -mérővel (BIO-RAD, Magyarország) melyhez ISO-DATA 20/20 (ISODATA, Pittsburg, PA USA) spline-illesztéssel értékelő számítógépes program csatlakozott, ill. RIA-Mat 280 (Byk-Sangtec, Dietzenbach, Germany) készülékkel határoztuk meg.

4.3.1.1 A módszer validálása

A minta-előkészítési módszer validálása során vizsgáltuk a nociceptin stabilitását, a módszer reprodukálhatóságát és az extrakciós hatásfokot.

Három vizsgálat adatai alapján a nociceptin stabilitása megfelelőnek mutatkozott (a hozzáadott ismert mennyiségű nociceptinhez képest a csökkenés 12%-on belül maradt). Az extrakció hatékonysága 78 és 82% közöttinek adódott, ill. ugyanannak a májszövetnek a nociceptin-tartalmát három különböző vizsgálatban meghatározva az értékek relatív szórása 0,68% volt.

4.3.2 *Nocistatin mennyiségi meghatározása patkány plazma, liquor, agy, máj és uterus szövetben, a módszer validálása*

A nocistatin szöveti szintjének meghatározása szintén validált ^{125}I -radioimmunoassay (^{125}I -RIA) módszerrel történt. A szövetek RIA-mérésre történő előkészítése a nociceptin-méréssel azonos módon történt.

A RIA mérésekhez az 1-128pg/ml tartományban, ill. a 10-1280pg/ml tartományban mérő ^{125}I -Nocistatin RIA kit-et használtunk (Phoenix Pharmaceuticals Inc, Belmont, CA, USA, ill. Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA). A radioaktivitást 10 mintaváltós γ -mérővel (BIO-RAD, Magyarország) melyhez ISO-DATA 20/20 (ISODATA, Pittsburg, PA, USA) spline-illesztéssel értékelő számítógépes program csatlakozott, ill. RIA-Mat 280 (Byk-Sangtec, Dietzenbach, Germany) készülékkel határoztuk meg.

4.3.2.1 A módszer validálása

A minta-előkészítési módszer validálása során vizsgáltuk a nocistatin stabilitását, a módszer reprodukálhatóságát és az extrakciós hatásfokot.

Három vizsgálat adatai alapján a nocistatin stabilitása megfelelőnek mutatkozott (a hozzáadott ismert mennyiségű nocistatinhoz képest a csökkenés 11%-on belül maradt). Az extrakció hatékonysága a 10-500pg/mg koncentráció-tartományban $89 \pm 0,87\%$, adódott, ill. ugyanannak az agyszövetnek a nocistatin-tartalmát három különböző vizsgálatban meghatározva az értékek relatív szórása 0,77% volt.

4.3.3 *Dopamin és metabolitjai (DOPAC, HVA), szerotonin és metabolitjai (5HIAA, 5HTOL) meghatározása optimalizált HPLC-EC módszerrel*

4.3.3.1 Mintaelőkészítés

Az agymintákat négyszeres mennyiségű (mg/ml) 0,8 M-os perklórsavban (PCA) (Fluka, Neu-Ulm, Svájc) késes homogenizálóval (Ultra Turrax T25 Janke&Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Németország) homogenizáltuk (20.000 rpm/perc, 60 sec). A szérum, a vizelet, a liquor és a plazma mintákat a 0,8M-os PCA-val a következőképpen hígítottuk: 50µl szérum+1200µl 0,8M PCA; 50µl vizelet + 1950µl 0,8M PCA; 50µl liquor+150µl 0,8M PCA, 50µl plazma+1200µl 0,8M PCA. A mintákhoz hozzáadtuk az N-metil-szerotonin belső standardot (50ng/ml) és Eppendorf centrifugában (A. Hettich, Tuttlingen, Németország) centrifugáltunk (14.000g, 10perc, 4°C). A felülúszót közvetlenül használtuk a mérésekhez és a HPLC meghatározásig -80°C-on tároltuk.

4.3.3.2 A kromatográfiás rendszer

A kromatográfiás rendszer PU1580 Jasco pumpát, DG-2080-54 degassert, AS-2057 automata injektort (Tokyo, Japán) és Decade amperometriás/elektrokémiai detektort (Antec, Leyden, The Netherlands), ill. Antec Leyden Intro Digital amperometriás detektort (Zoeterwoude, The Netherlands) és JMBS Hercule 2000 Chromatography Interface-t (Le Fontanil, France) tartalmazott. A kromatográfiás

körülmények a következők voltak: loop 50µl, hőmérséklet 25°C, Eox. 0,65V, érzékenység 10nA, átfolyási sebesség 1ml/perc, filter 1,0sec. A méréshez Zorbax RX-C18 4,6x250mm (5µm) analitikai oszlopot (Agilent, USA) és Zorbax RX-C18 4,6x12,5mm (5µm), előtétoszlopot (Agilent, USA) használtunk.

A mobil fázis összetétele: 56,2mmol/l Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, Németország), 47,9mmol/l citromsav-monohidrát (Merck, Darmstadt, Németország), 0,027mmol/l Na_2EDTA (Merck, Darmstadt, Németország), 0,925mmol/l 1-oktánszulfonsav (Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország), és 75:950 acetonitril/foszfát puffer. A mobil fázis pH-ját 85% H_3PO_4 -al (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) 3,7-re állítottuk be.

A kalibrációs egyenes felvétele: A biogén aminok és metabolitjaik mindegyikéből 100µg/ml-es törzsoldatot készítettünk, majd 0,8M-os PCA-val 1µg/ml-es oldatokat és kalibrációs sorozatot (1, 2, 5, 10, 25, 50 és 100ng/ml) készítettünk. A módszert lineárisnak találtuk 10-1000ng/ml tartományban (5. Táblázat). Mérési eredményeinket ezen kalibrációs sorozatokra készült 7 pontos, 3 párhuzamossal mért és a legkisebb négyzetek módszerével számolt kalibrációs egyenesekre számoltuk ng/mg nedves agyszövet, illetve ng/ml egységben.

5. Táblázat A biogén aminok kalibrációs egyeneseinek egyenlete

anyag	a kalibrációs egyenes egyenlete	r^2
szerootonin	$y=191729x+155292$	0.9999
5HIAA	$y=241542x-3478416$	0.9996
dopamin	$y=145754x+40683$	0.9998
HVA	$y=16743x+8750$	0.9989
noradrenalin	$y=16835x-10303$	1.0

dc_520_12

A kromatográfiás kiértékelés Borwin 1.21, ill. 1.50 kromatográfiás software-rel történt (JMBS, Le Fontanil, Franciaország).

A kontroll és a kezelt állatok agyhomogenizátumában standard addícióval azonosítottuk a vizsgálandó biogén aminokat és kiszámoltuk a meghatározás alsó határát (LOQ) 1/10 zaj/jel arány mellett (6. Táblázat).

6. Táblázat A biogén aminok legkisebb meghatározható mennyisége (LOQ)

	LOQ
dopamin	0,8ng/ml
szerootonin	0,67ng/ml
HVA	1,0ng/ml
5HIAA	0,5ng/ml
noradrenalin	0,8ng/ml

4.3.4 *Hisztamin meghatározása mikroradioenzimatis módszerrel*

4.3.4.1 Hisztamin-N-Metiltranszeferáz enzim (HNMT) preparálása tengerimalac agyszövetből

A HNMT preparálása (Pollard et al. 1976) módszere szerint történt. A tengerimalacok dekapitálása után a teljes agyszövetet négyszeres térfogatú 0,25 mol/l szaharózbán, Potter csőben homogenizáltuk, majd a homogenizátumot ultracentrifugáltuk (Janetzky UP65, Lipcse, Németország) 100.000 g-n, 60 percig, 4°C-on. A nyert felülúszót NH_4SO_4 -tal telítettük és 120 perc állás után 10.000 g-n, 20 percig, 4°C-on centrifugáltuk (Janetzky UP65, Lipcse, Németország). Az üledéket 0,01 mol/l Na_3PO_4 pufferben (pH 7,9) vettük fel, egy éjszakán át dializáltuk 0,001 mol/l Na_3PO_4 -tal (pH 7,9) szemben, majd ismét centrifugáltuk 100.000 g-n, 60 percig, 4°C-on. A felülúszó HNMT-preparátum fehérjetartalmát 3,8mg/ml-re állítottuk be. Az egy kísérlethez szükséges enzim-mennyiségeket -20 °C-on tároltuk, legfeljebb 14 napig.

4.3.4.2 A hisztamin szöveti szintjének meghatározása

A hisztamin szöveti szintének meghatározása (Taylor and Snyder 1972) módszere szerint történt. A reakcióelegybe a 0,1mol/l Na_3PO_4 -pufferben (pH 7,9) felvett hím Wistar patkány agyszövet homogenizátumhoz (20 μ l), illetve liquor mintához (20 μ l), vagy plazma mintához (20 μ l) HNMT preparátumot (20 μ l) adtunk és a 37°C-on végzett 5 perces előinkubálás után a reakciót 67 μ mol/l ^3H -SAM (Amersham, Anglia, spec.akt.: 9,25MBq) hozzáadásával indítottuk. A 60 perces, 37°C-os vízfürdőben enyhe rázatással történt inkubálás után 5 μ l, 2,4N HClO_4 hozzáadásával állítottuk le a reakciót, majd 20 μ l, 10N NaOH-dal lúgosítottuk át a mintákat. A ^3H -N⁺-metil-hisztamint-t 400 μ l kloroformba extraháltuk (Vortex, 3 perc) majd az elegyet 10 perces, 2500 fordulat/perc-es centrifugálásnak vetettük alá (Janetzky-K26, Berlin, Németország). A felülúszót háromszor mostuk (100 μ l NaCl-dal telített 3N NaOH) és ismét centrifugáltuk (Janetzky-K26, Berlin, Németország; 10 perc, 2500 fordulat/perc). Végül a kloroformos fázisból 200 μ l-t N_2 gáz

áramoltatással szárazra pároltunk és a radioaktivitását 5ml Ultima Gold (Packard, Hollandia) szcintillációs koktél hozzáadása után, folyadékszscintillációs módszerrel (Beckmann 9000) határoztuk meg.

4.4 Bispiridinium aldoximok (K27 és K203) meghatározása optimalizált HPLC-UV és HPLC-EC módszerrel patkányagy, liquor, szem és szérum mintákban

A vegyületek biológiai közegből történő meghatározására olyan optimalizált módszert kellett kidolgoznunk, mellyel a K-vegyület és a biogén aminok valamint ezek metabolitjai egymás mellett meghatározhatók (Gyenge et al. 2006, Tekes et al. 2006b).

4.4.1 A K27 plazma-felezési idejének meghatározásához és a kromatográfiás csúcs azonosságának igazolására HPLC-MS módszert alkalmaztunk.

A Waters HPLC rendszer (Milford, MA, USA) 717-plusz autoinjektorból, 515 HPLC pumpából és egy 486 Tunable absorbance detektorból állt, melyet 286 nm-en használtunk. A kromatogramokat Millenium Software of Waters rendszerrel értékeltük ki. Állófázisként Supercosil LC8 (250mmx4,6mm, 5µm) szolgált (Bellefonte, PA, USA). A mozgó fázis 8% metanol és 92% foszfát-puffer elegye volt (pH=2,6), mely 1µM l-octane sulfonsav natrium monohidrátot tartalmazott. Az áramlási sebesség 1ml/perc, a hőmérséklet 26°C és az injektált térfogat 20µl volt.

A HPLC-MS készülék egy 1100 HPLC/MSD SL rendszer volt (Agilent, Waldbronn, Németország), mely binaris pumpát, degassert, automata injektort, diódasoros detektort, termosztátot és MSD-t tartalmazott. Pozitív ionizációs elektropray módot és 100-1000 amu tartományt alkalmaztunk. A "step size" 0,2 perc, a gáz áramlása és hőmérséklete 13 l/perc és 350 °C, a kapilláris feszültség 3000 V volt. Az állófázis Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6 x 150mm, 5µm), a mozgófázis

pedig methanol/0,1M ammoniumacetát 8/92 arányú keveréke volt. A detektálást 286nm-en végeztük.

4.4.1.1 Az állatok kezelése

Nőstény Wistar patkányokat ($200\pm 5\text{g}$) $50\mu\text{mol}/0,5\text{ml}$ K27 vizes oldatával kezeltünk i.p., ill. i.m., majd 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180 és 240 perc elteltével ($n=8\times 5$ mindkét adagolási mód esetében) a szemzugon át történt elvéreztetésből nyert vért $\text{K}_2\text{-EDTA}$ -val alvadásgátolt vacutainer-be gyűjtöttük és a plazmát 3500 fordulaton, 4°C -on 10 perces centrifugálással (Janetzky K70, Lipcse, Németország) nyertük. A plazma-mintákat a HPLC mérések megkezdéséig -80°C -on tároltuk (engedélyszám: 1810/003/2004 ANTSZ, Budapest).

4.4.1.2 Mintaelőkészítés

A plazma $500\mu\text{l}$ -es aliquot-jaihoz $200\mu\text{l}$ 10%-os TCA-t adva fehérje-mentesítettünk, majd $10\,000\text{g}$ -n 10 percig centrifugáltunk (A. Hettich, Tuttlingen, Németország) és a víztiszta felülúszót közvetlenül injektáltuk.

4.4.2 A K27 meghatározása optimalizált HPLC-EC módszerrel patkányagy, liquor és szérum mintákban

K27 esetében a $0,8\text{M}$ -os PCA-ban oldott K27 törzsoldatból ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) felvett 7 pontos, három párhuzamosal készült kalibráció az $5\text{--}200\text{ng}/\text{ml}$ tartományban linearitást mutatott (a regressziós egyenes egyenlete $y=165661x-70858$, a korrelációs koefficiens értéke $r^2=0,9985$). A K27 oldat egy napon belüli stabilitása megfelelőnek bizonyult ($100\pm 5\%$ SD). A mennyiségi meghatározás alsó határa (LOQ) $10\text{ng}/\text{ml}$.

A kontroll állatok agyhomogenizátumának felülúszójából felvett K27 kalibrációs egyenes $5\text{--}200\text{ng}/\text{ml}$ koncentrációtartományban szintén lineárisnak mutatkozott (a regressziós egyenes egyenlete $y=136641x-1529392$, a korrelációs koefficiens

értéke $r^2=0,9902$). Az International Conference on Harmonization (ICH) Topic Q2B számítások szerint a módszer egy napon belüli és napok közötti pontosság és torzítatlanság értékei elfogadhatónak bizonyultak a vizsgált koncentráció tartományban.

4.4.3 *A K203 plazma-felezési idejének, vér-agy-gát átjárhatóságának és a szemben kialakuló koncentrációja időfüggésének meghatározása HPLC-UV és HPLC–EC módszerrel*

4.4.3.1 Az állatok kezelése

Hím Wistar patkányokat (215 ± 5 g) $50\mu\text{mol}/0,5\text{ml}$ K203 vizes oldatával kezeltünk i.m., majd 5, 15, 30, 45, 60, 120 és 240 perc elteltével ($n=7\times 5$) a szemzugon át történt elvéreztetésből nyert vért $\text{K}_2\text{-EDTA}$ -val alvadásgátolt vacutainer-be gyűjtöttük és a szemet valamint az agyrészleteket a K27 esetében leírtak szerint készítettük elő a HPLC mérésekre (engedélyszám: 1810/003/2004 ANTSZ, Budapest).

4.5 Statisztikai analízisek

Az eredmények kiértékelését az adott vizsgálatoknak megfelelő statisztikai programmal végeztük. Az állatkísérleteket 95%-os szignifikancia-szint mellett Student féle kétmintás t-próbával értékeltük. A májbeteg, az elsődleges fejfájásban szenvedők és az ischémiás stroke-betegek esetében Mann-Whitney U-tesztet, másrészt Lillifors módszer szerinti Kolgomorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk. Az összefüggések értékelésére Spearman, ill. Pearson korrelációt használtunk.

A kardio-vaszkuláris betegek csoportjaiban Brown-Forsythe ANOVA tesztet és Games-Howell post-hoc tesztet alkalmaztunk. Faktor-analízist használtunk a betegek változó paraméterei és a plazma nociceptin-szint közötti, esetleg nem látszó összefüggések feltárására. A betegek folyamatos jellemzői és a plazma

dc_520_12

nociceptin-szint közötti összefüggések feltárására lineáris és nem-lineáris regressziós módszert alkalmaztunk. A statisztikai analíziseket a Statistica 8.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA), SPSS 15.00 (SPSS Inc. Chicago, IL. USA) programokkal, ill. saját programmal végeztük, mely MATLAB szoftver környezetben működött (The MathWorks Inc., Natick, MA. USA).

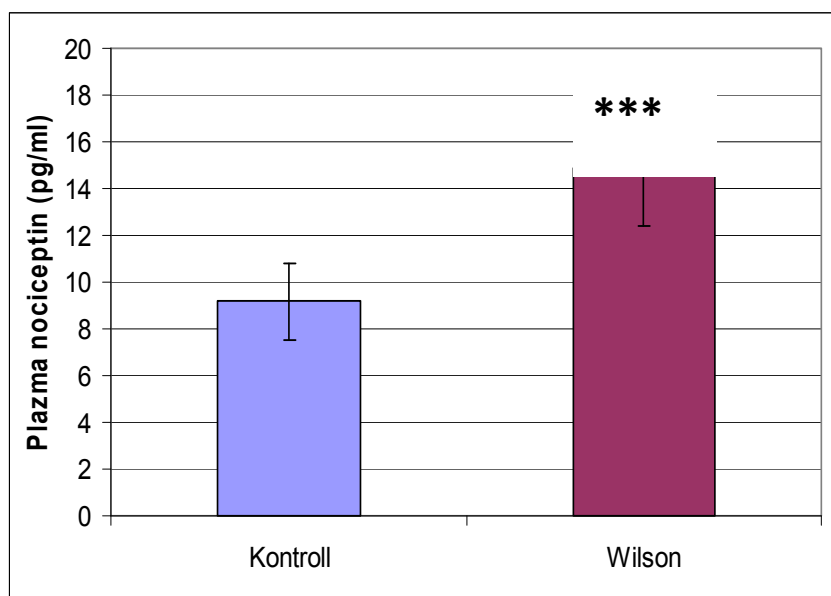
5. EREDMÉNYEK

5.1 Különböző etiológiájú krónikus májbetegségben szenvedők plazma nociceptin szintje

Vizsgálatainkat a nociceptin-kutatás azon kezdeti időszakában indítottuk, amikor mindössze öt klinikai vonatkozású közlemény jelent meg a nociceptinnel kapcsolatban, de egyik sem foglalkozott a nociceptin és a krónikus májbetegségek összefüggéseivel, holott az állatkísérletes adatok és in vitro vizsgálatok szerint a NOP receptor mRNS-ének rövid és hosszú variánsai is jelen vannak a májban (Wang et al, 1994).

5.1.1 *Wilson-kóros betegek*

Eredményeinket az 11. ábrán foglaltuk össze:



11. ábra

Plazma nociceptin-szint egészséges kontroll személyekben és Wilson-kóros betegekben

A plazma nociceptin-szint az egészséges kontroll személyekben $9,18 \pm 2,44$ (pg/ml $\pm$ SD), míg a Wilson-betegekben $14,87 \pm 1,63$ (pg/ml $\pm$ SD) értéknek adódott, mely $p < 0,001$ szinten szignifikáns. A statisztikai vizsgálatot Mann-Whitney Wilcoxon Rank Sum teszt alkalmazásával végeztük, a szignifikancia-szintet $p < 0,05$ -nek állítottuk be.

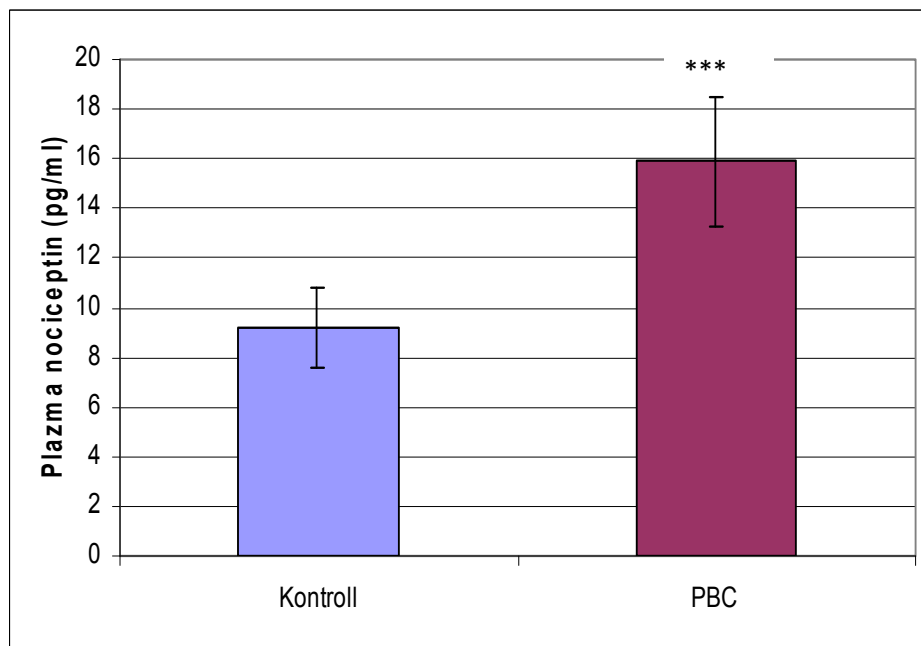
Az adott csoporton belül a férfiak és a nők plazma nociceptin-szintje között nem volt különbség. A betegek csoportjában a plazma nociceptin-szint nem mutatott korrelációt sem a májfunkciós értékekkel, sem a szérum réz-szintekkel, sem a neurológiai tünetek minőségével, sem a klinikai tünetek megjelenése óta eltelt idővel sem a D-penicillamin-kezelés időtartamával.

5.1.2 *Primer biliáris cirrhosisban szenvedők*

Eredményeinket a 12. és a 13. ábrán foglaltuk össze.

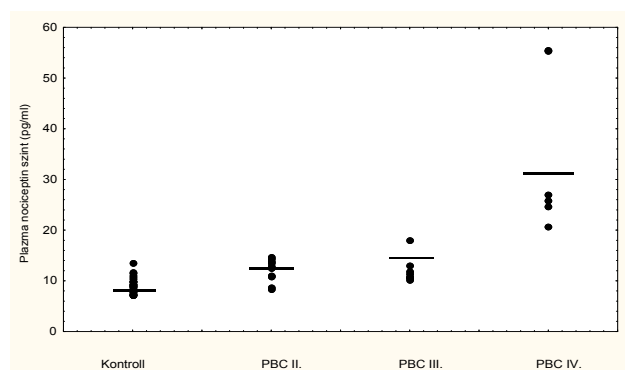
A betegek klinikai stádium-beosztását figyelmen kívül hagyva a kontroll nők $8,94 \pm 1,49$ (pg/ml $\pm$ SD) értékével szemben a PBC csoportban $15,88 \pm 12,57$ (pg/ml $\pm$ SD) értéket kaptunk, ($p < 0,001$). A PBC II. stádiumában lévők ($n=10$) esetében a plazma nociceptin-szint $10,97 \pm 3,24$ (pg/ml $\pm$ SD), a PBC III. stádiumu betegek esetén ($n=8$) $12,32 \pm 2,75$ (pg/ml $\pm$ SD) és a PBC IV. csoportban ($n=6$) $28,20 \pm 21,24$ (pg/ml $\pm$ SD) volt, mely értékek a kontroll csoportéhoz viszonyítva $p < 0,01$, $p < 0,05$ és $p < 0,001$ szinten szignifikáns eltérést mutattak.

A plazma nociceptin-szint pozitív korrelációt mutatott a SeBi ($r=0,46$, $p < 0,05$), az ASAT ($r=0,43$, $p < 0,05$) és az ALP ($r=0,44$, $p < 0,05$) értékekkel, de nem találtunk korrelációt az ALAT és a GGT értékek esetén.



12. ábra

Plazma nociceptin-szint egészséges kontroll személyekben és primer biliáris cirrhosisban szenvedő betegekben



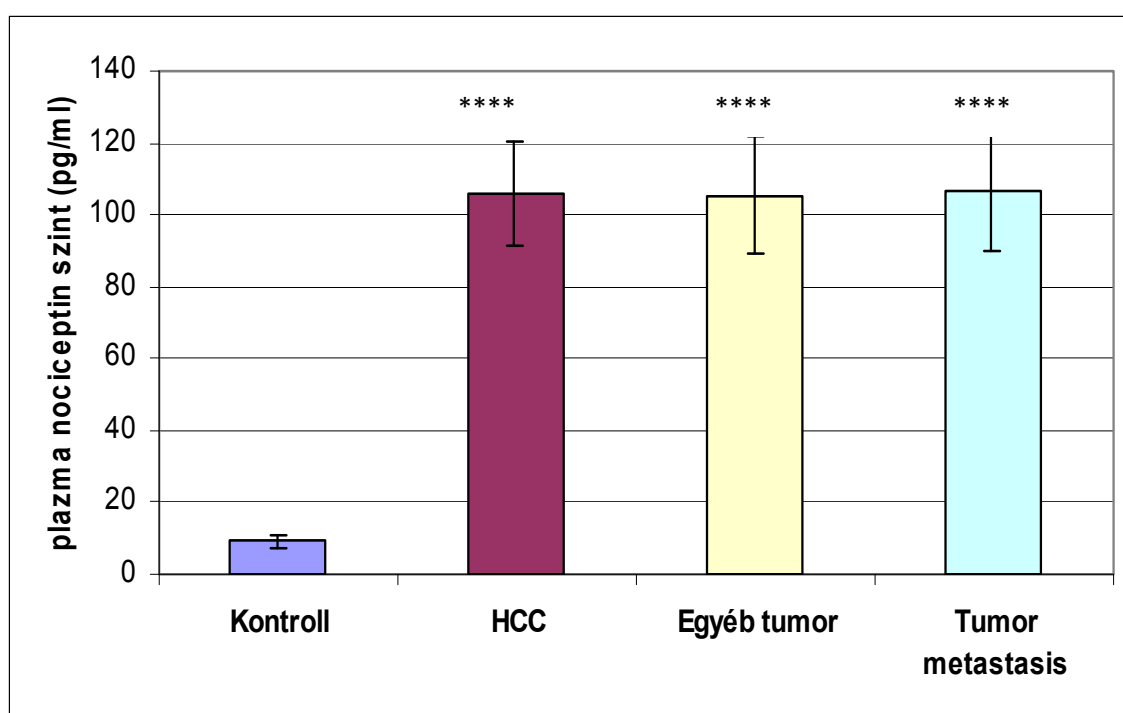
13. ábra

Plazma nociceptin szint egészséges kontroll személyekben és primer biliáris cirrhosisban szenvedő nők esetében, a betegség klinikai stádiuma alapján csoportosítva.

5.1.3 Hepatocelluláris carcinomában szenvedők

A PBC IV. csoport betegei között az egyik nőbeteg plazma nociceptin-szintje kimagaslóan magas értéket mutatott. A klinikai vizsgálatok bizonyították a hepatocelluláris carcinoma kialakulását. Ez irányította a figyelmünket a hepatocelluláris carcinomás (HCC) betegek plazma nociceptin-szintjének vizsgálata felé.

Eredményeinket a 14. ábrán foglaltuk össze.



14. ábra

Különböző etiológiájú daganatos betegek plazma nociceptin szintje

Míg az egészséges kontrol csoport plazma nociceptin szintje a jelen vizsgálatban $9,2 \pm 1,8$ (pg/ml $\pm$ SD) értéknek adódott, a HCC csoportban egy nagyságrenddel (!!) magasabb, $105,9 \pm 14,4$ (pg/ml $\pm$ SD) értéket tapasztaltunk.

A plazma nociceptin szint nem korrelált sem a tumor méretével, sem a májfunkció klinikai paramétereivel. A fájdalomról panaszkodó betegek ($104,9 \pm 14,9 \text{ pg/ml} \pm \text{SD}$, $n=12$) és a fájdalom-mentes csoport plazma nociceptin-szintjei ($107,7 \pm 14,5 \text{ pg/ml} \pm \text{SD}$, $n=6$) között szignifikáns különbség nem volt.

A 14. ábra harmadik oszlopában különböző etiológiájú daganatos betegek ($n=30$) értékei szerepelnek, akik esetében tumor hepatis ($n=9$), tumor pulmonalis ($n=9$), pancreas carcinoma ($n=1$), choledochus carcinoma ($n=1$), hypernephroma ($n=1$), medulloblastoma ($n=1$), acut lymphoid leukémia ($n=2$), emlődaganat ($n=4$) és prostata carcinoma ($n=2$) volt a diagnózis. A 14. ábra negyedik oszlopában azok a daganatos betegek szerepelnek, akiknél metastasis volt megállapítható.

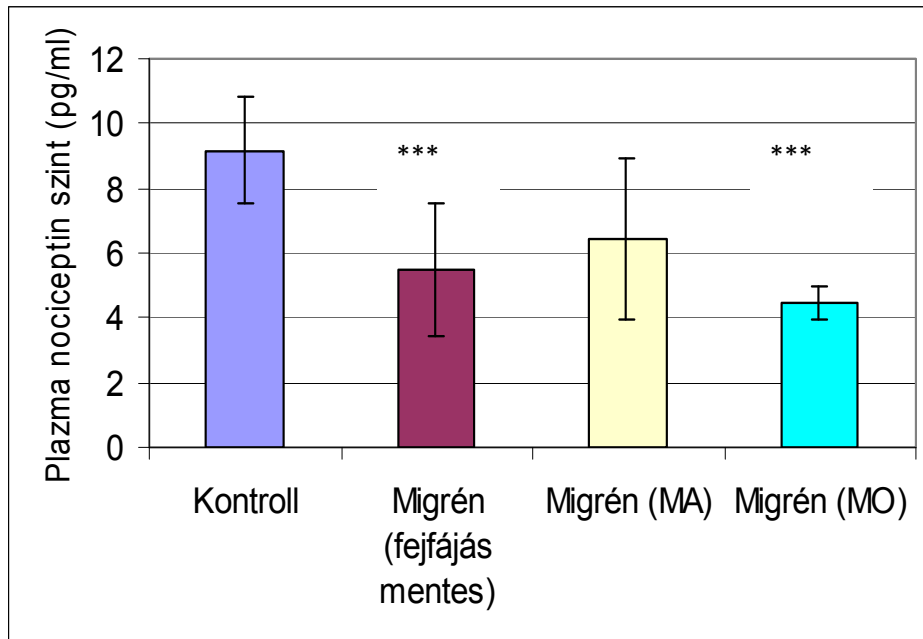
5.2 Elsődleges fejfájásban szenvedők

A nociceptin-rendszer és a fájdalom közti összefüggés jelenleg is fontos kérdése a nociceptin-kutatásnak. Vizsgálatainkat akkor kezdtük, amikor mindössze három klinikai publikáció (Brooks et al. 1998, Ko et al. 2002, Anderberg et al. 1998) ellentmondásos adatai voltak ismertek a fájdalom és a plazma nociceptin-szint összefüggése vonatkozásában, bár ezek egyike sem foglalkozott a nociceptinerg rendszer szerepével elsődleges fejfájásokban.

5.2.1 Migrénes betegek

A migrénes betegek csoportjában a plazma nociceptin szint a fájdalom-mentes periódusban (az utolsó migrén-roham után átlagosan $72,15 \pm 42,4$ órával és a vérvétel utáni roham előtt átlagosan $56,9 \pm 40,3$ órával) a kontroll csoport $9,74 \pm 2,43 \text{ pg/ml} \pm \text{SD}$) értékénél $p < 0,0001$ szignifikancia érték mellett alacsonyabbnak ($5,79 \pm 1,82 \text{ pg/ml} \pm \text{SD}$) adódott (15. ábra). Ha az aurával komplikált migréneselek értékeit ($n=4$) és az aura nélküli migrénes betegek ($n=14$) értékeit külön ábrázoljuk, mindkét alcsoportban a kontroll értéknél szignifikánsan alacsonyabb plazma nociceptin szintet találunk, de a két alcsoport között nincs szignifikáns eltérés.

Az aura nélküli migrénes betegek közül 6 esetben a migrén-roham idején is kaptunk vérmintát. A fejfájás-roham idején a plazma nociceptin szint további szignifikáns csökkenést mutatva $1,04 \pm 0,17$ (pg/ml $\pm$ SD) értékre zuhant (16. ábra).



15. ábra

Plazma nociceptin-szint migrénes betegekben, a fejfájás-mentes időszakban

A nociceptin-szint szignifikáns korrelációt mutatott a mintavételt megelőző hónapban bekövetkezett migrén-rohamok számával, de nem korrelált az életkorral, a betegség fennállásának időtartamával, az egyes rohamok időtartamával, a vérvétel és az azt megelőző, ill. a mintavétel után bekövetkező első rohamig eltelt idővel és a betegek életkorával.

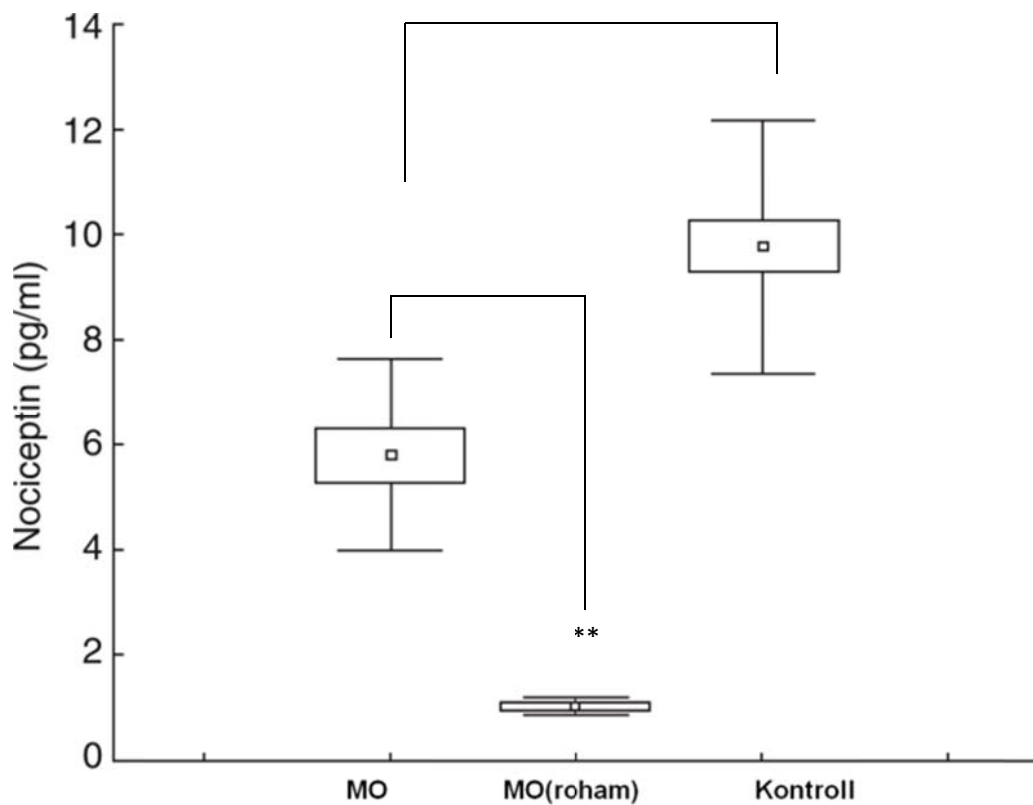
5.2.2 *Cluster-fejfájásos betegek*

A cluster-fejfájásban szenvedőktől az egyik minta-sorozatot a fejfájás-mentes periódusban, a másik minta-sorozatot a fejfájásos periódusban, de legalább 3 óra elteltével az akut fejfájás-roham után gyűjtöttük. A fejfájásos periódusban a

kontroll csoport $9,58 \pm 2,57$ (pg/ml $\pm$ SD) értékénél szignifikánsan alacsonyabb ($4,91 \pm 1,96$ pg/ml $\pm$ SD, $p < 0,01$) plazma nociceptin értékeket tapasztaltunk. Ugyanezen betegektől a fejfájás-mentes periódusban kapott vérminták plazma nociceptin szintje $8,60 \pm 1,47$ pg/ml $\pm$ SD értéket mutatott, mely a kontroll csoportétól nem különbözik.

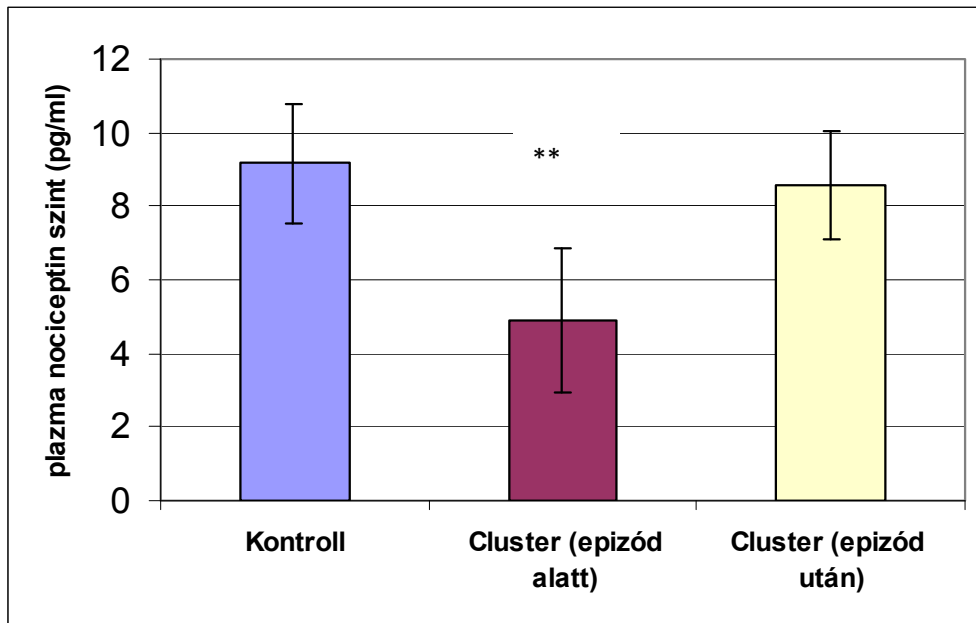
A plazma nociceptin-szint nem mutatott korrelációt sem az életkorral, sem a betegség fennállásának idejével, sem a fejfájás-rohamok időtartamával sem az egyes rohamok napi számával.

Az eredményeket a 17. ábrán foglaltuk össze.



16. ábra

Plazma nociceptin-szint aura nélküli migrénes betegeknél (M0) a fejfájás-mentes időszakban és a migrén-roham idején



17. ábra

Plazma nociceptin-szint cluster fejfájásban szenvedőkben

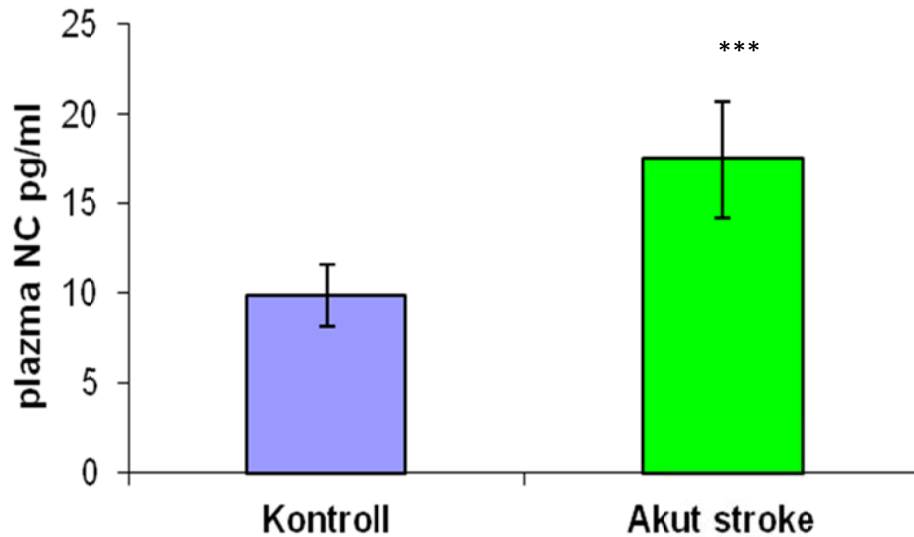
5.3 Kardia-vaszkuláris kórképekben szenvedő betegek

Vizsgálataink indítékát azok az *in vitro* és *in vivo* állatkísérletes adatok képezték (Malinowska et al. 2002, Champion and Kadowitz 1997) melyek egyértelműen igazolták az exogén nociceptin direkt és indirekt hatását a kardio-vaszkuláris rendszerre (vérnyomáscsökkenés, bradycardia, vasodilatáció), ill. kapcsolatát a biogénamin rendszerrel. (Armstead, 2000)

5.3.1 Akut ischémiás stroke-betegek

A kontroll személyek plazma nociceptin-szintje a K0 csoportban $9,9 \pm 1,75$ (pg/ml $\pm$ SD), a K1 csoportban $10,1 \pm 1,56$ (pg/ml $\pm$ SD), értéket mutatott. Miután nincs szignifikáns különbség a két alcsoport között eredményeiket egyesítve alkalmaztuk a stroke-betegekkel való összehasonlításban. A stroke betegek

értéke, ha az ischémiás stroke anatómiai helyét nem vesszük figyelembe, akkor $17,37 \pm 3,3$ (pg/ml $\pm$ SD), mely $p < 0,01$ szinten szignifikáns (18. ábra).



18. ábra

Ischémiás stroke betegek plazma nociceptin szintje

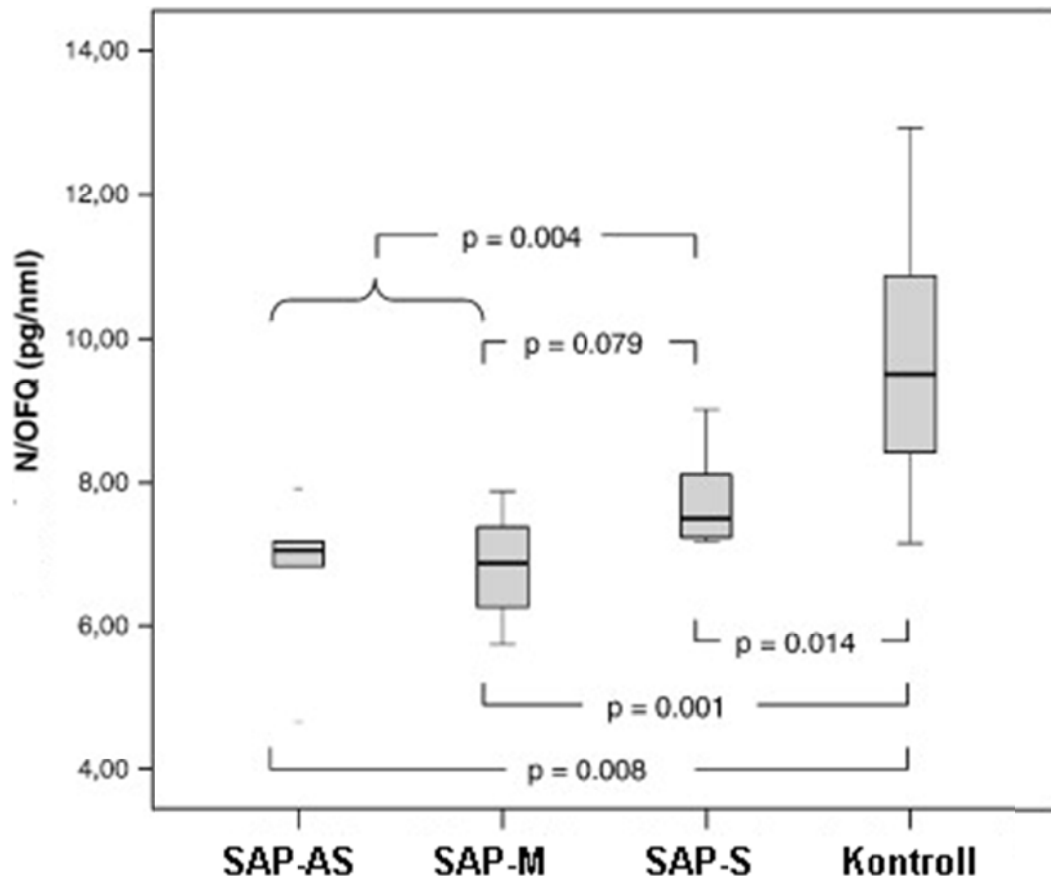
A beteg-csoportok szerinti összehasonlításban az alábbi értékeket kaptuk (7. Táblázat):

7. Táblázat Az ischémiás stroke anatómiai elhelyezkedése a vizsgált beteg-csoportban

Az ischémiás stroke anatómiai helye	Plazma nociceptin szint (pg/ml $\pm$ SD)
carotis területi keringészavar	17,12 $\pm$ 4,5
lacunáris területi keringészavar	18,09 $\pm$ 2,8
TIA	16,9 $\pm$ 2,6

5.3.2 *Krónikus stabil angina pectoris és perifériás artéria-betegek*

A stabil angina pectoris-betegek eredményeit a 19. ábrán, a számszerű adatokat a 8. Táblázatban foglaltuk össze:



19. ábra

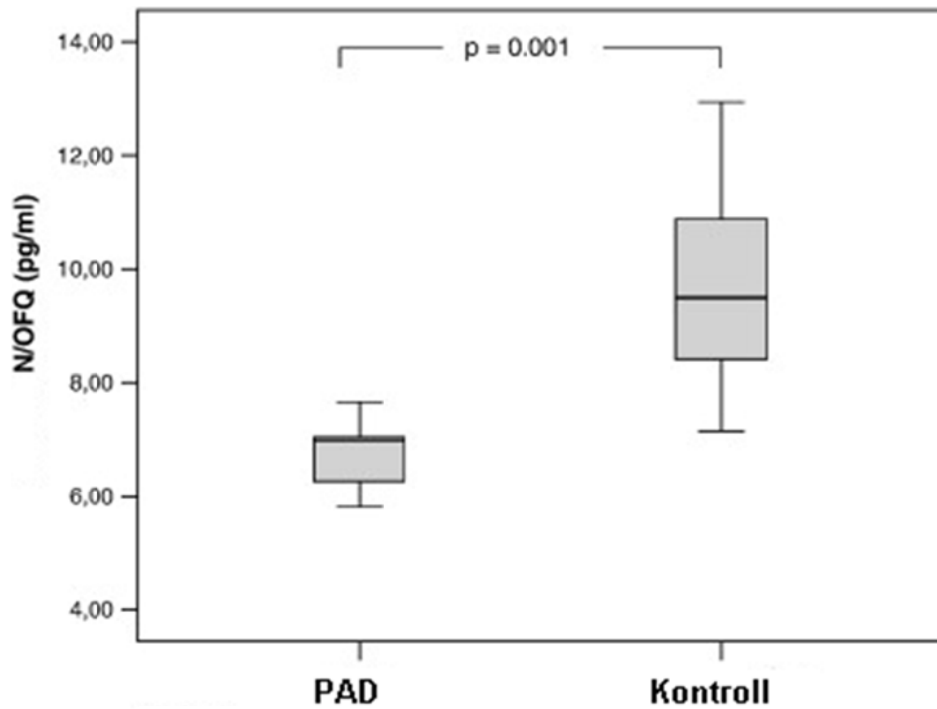
Plazma nociceptin szint stabil angina pectoris-ban a klinikai alcsoportok szerint (SAP-AS: stabil angina pectoris degeneratív kalcifikált aorta stenosisal, SAP-M: stabil angina pectoris többszörös coronaria stenosisal, SAP-S: stabil angina pectoris egyszeres coronaria stenosisal)

8. Táblázat A plazma nociceptin szint stabil angina pectoris-ban a klinikai alcsoportok szerint

Vizsgált csoportok	Plazma nociceptin szint (pg/ml)
Kontroll	9,50 (8,43-10,88)
SAP-AS	7,05 (5,75-7,54)
SAP-M	6,88 (6,27-7,46)
SAP-S	7,49 (7,23-8,12)

Az atherosclerosis miatt perifériás artéria-beteg közül kilenc mutatta a súlyos claudicatio intermittens tüneteit (séta-távolság<100m), hárman nyugalmi fájdalomról panaszkodtak és gangrénájuk is volt, de egyikük sem szenvedett éjszakai fájdalomtól. A nyugalmi fájdalom csillapítására tramadol-kezelést kaptak és a vérvétel idején legalább 7 napig sem claudicatio sem nyugalmi fájdalom nem jelentkezett esetükben.

A perifériás artéria-betegek esetében a SAP-betegekhez hasonlóan a plazma nociceptin szintjének szignifikáns csökkenését ($6,99 \pm 0,44 \text{ pg/ml} \pm \text{SD}$) tapasztaltuk a kontroll csoport értékeihez ($9,50 \pm 0,84 \text{ pg/ml} \pm \text{SD}$) viszonyítva (20. ábra).



20. ábra

Perifériás artéria-betegek (PAD) plazma nociceptin szintje

5.4 A nociceptin és nocistatin pathophysiológiai szerepének vizsgálata állatkísérletekben

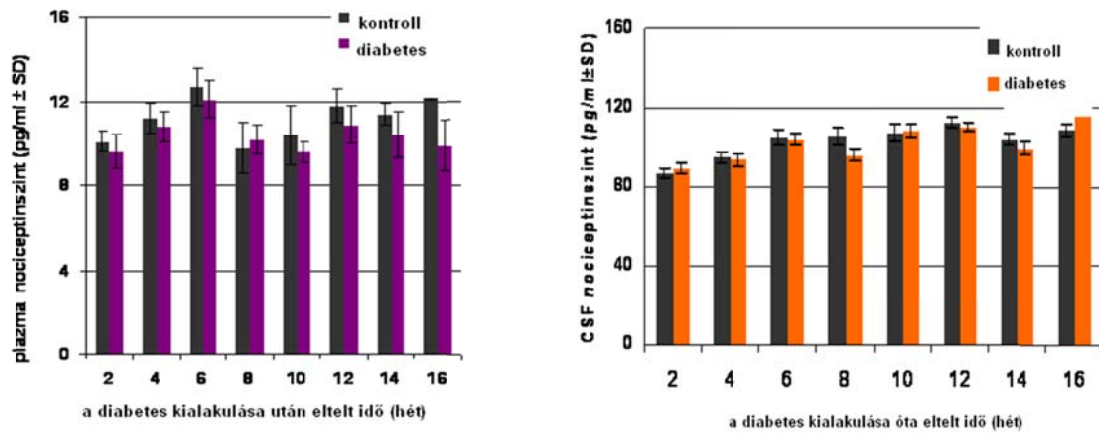
5.4.1 *A nociceptin, a nocistatin és a krónikus diabetes, mint neuropathiás fájdalom-modell*

A streptozotocin-kezelés hatását a patkányok testtömegének és vércukor-szintjének alakulására a 9. Táblázatban foglaltuk össze:

9. Táblázat A streptozotocin-kezelés hatása az állatok testtömegének és vércukor-szintjének alakulására

Diabétesz fennállásának ideje	4. hét	8. hét	12. hét	16. hét
Kontroll csoport testtömeg (g±SD)	321,6±22,9 n=7	378,3±30,7 n=7	483,8±55,8 n=7	542,7±28,1 n=7
Diabéteszes csoport testtömeg (g±SD)	214±65,3 n=7	170±19,2 n=7	186,4±7,3 n=7	201,2±5,4 n=7
Kontroll csoport vércukorszint (mmol/l±SD)	5,5±0,5 n=7	5,6±1,3 n=7	6,2±0,4 n=7	6,2±0,6 n=7
Diabéteszes csoport vércukorszint (mmol/l±SD)	25,7±6,8 n=7	38,8±6,5 n=7	37,6±3,8 n=7	40,1±4,7 n=7

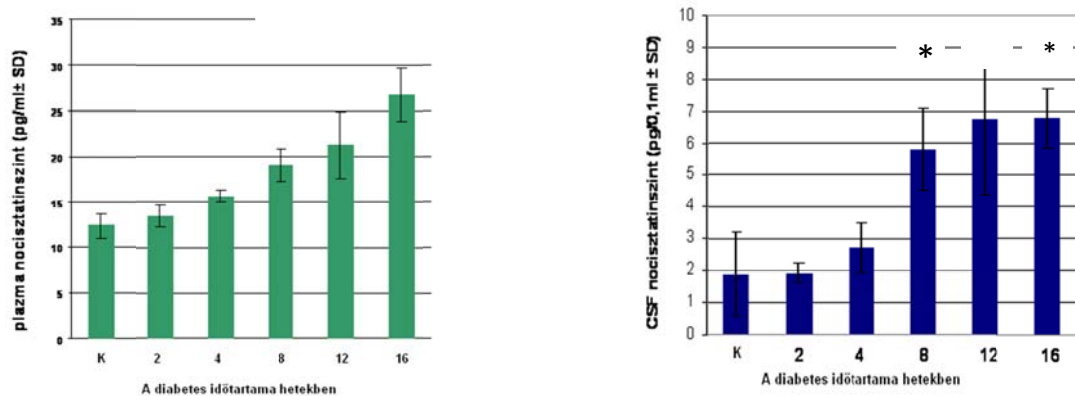
A plazma és a CSF nociceptin-szintjének alakulását a 21. ábra mutatja:



21. ábra

Streptozotocinnal indukált krónikus diabetes hatása patkányok plazma és CSF nociceptin-szintjére az idő függvényében

A plazma és a CSF nocistatin-szintjének alakulását a 22. ábra mutatja:



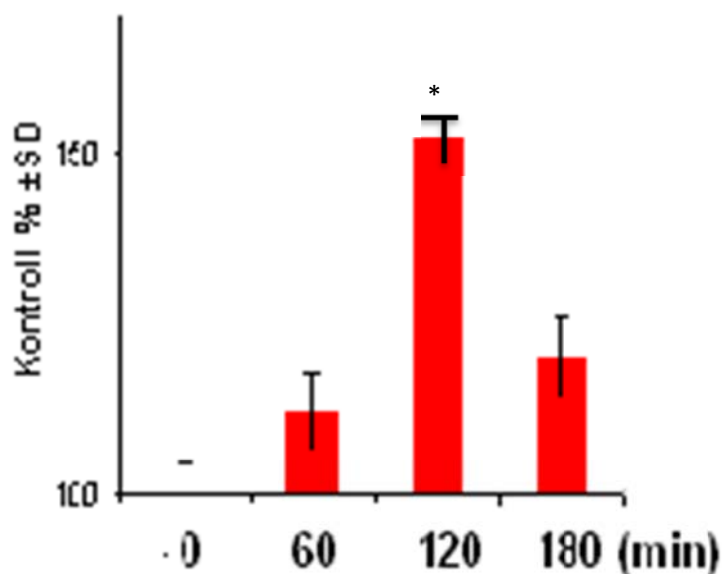
22. ábra

Streptozotocinnal indukált krónikus diabetes hatása patkányok plazma és CSF nocistatin-szintjére az idő függvényében

5.5 Exogén nociceptin hatása a központi idegrendszeri hisztamin és szerotonin szintre

A nociceptin-kutatás korai időszakától kezdődően számos közlemény bizonyította a nociceptinerg rendszer és a biogénamin (elsősorban a szerotonerg és a noradrenerg) neurotranszmisszió kölcsönhatását, de a hisztaminerg rendszerrel való kapcsolattal csak egyetlen közlemény (Sakurada et al. 2004) foglalkozott, melyben arról számoltak be, hogy az i.t. alkalmazott nociceptin a hisztaminhoz hasonlóan jellegzetes viselkedési mintázatot (nyaldosás, harapdálás) okozott.

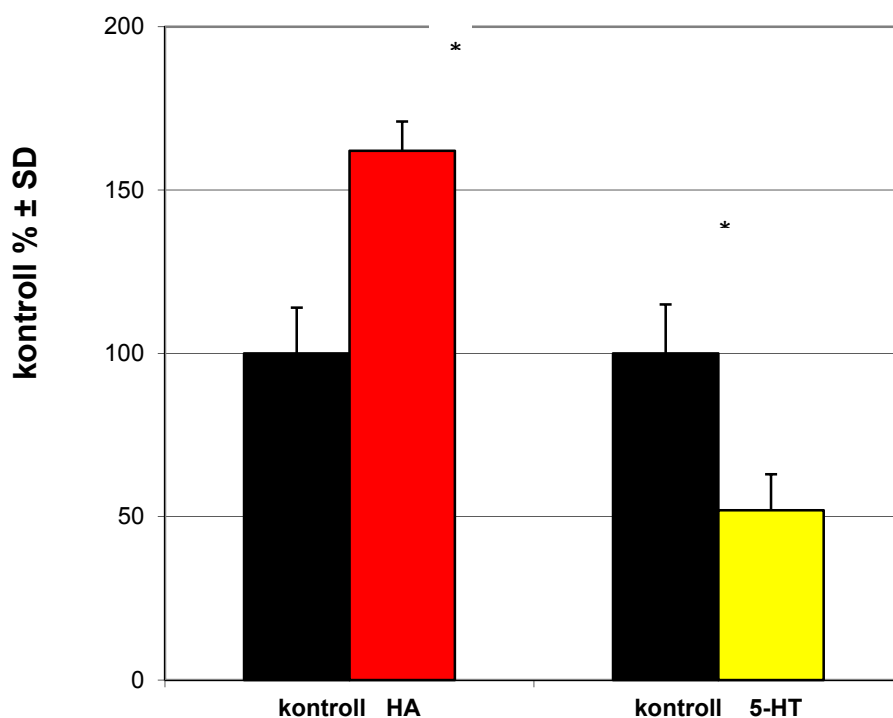
Kísérleteink első szakaszában i.c.v. alkalmazott nociceptin (5,5 nmol/állat) hisztamin-felszabadulást okozó hatását vizsgáltuk az idő függvényében a liquorból mérve a hisztamin-koncentrációt. (23. ábra) A nociceptin hisztamint felszabadító hatásának maximumát a beadás után 120 perccel mértük, ekkor a kontroll hisztamin-szinthez ($4,5 \pm 0,5 \text{ ng/ml} \pm \text{SD}$, $n=5$) képest közel másfélszeres koncentrációt tapasztaltunk, mely 180 percnél már csökkenést mutatott. A hisztamin-szint emelő hatás maximumán (120 perc) a liquor szerotonin-szintjének szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető (24. ábra).



23. ábra

Nociceptin (5,5 nmol/állat, i.c.v.) hatása patkány liquor hisztamin-szintjére az idő függvényében.

Kontroll hisztamin szint $4,5 \pm 0,5 \text{ (ng/ml} \pm \text{SD)}$; * $p < 0,05$; $n=5$.



24. ábra

Nociceptin (5,5 nmol/állat, i.c.v.) hatása patkány liquor ■ hisztamin- és ■ szerotonin szintjére 120 perccel a kezelés után.

■ kontroll hisztamin szint $4,5 \pm 0,5$ (ng/ml $\pm$ SD); kontroll szerotonin szint (5HT) $1,14 \pm 0,17$ (ng/ml $\pm$ SD), $p < 0,05$, $n=5$)

A hízósejt degranuláló Compound 48/80 (100 μ g/kg i.c.v.) után 60 perccel a liquorban $8,5 \pm 3,1$ (ng/ml $\pm$ SD), szignifikánsan magasabb ($p < 0,05$) hisztamin-értéket mértünk, a szerotonin-szint azonban nem változott.

Az i.c.v. adott nociceptin a plazmában sem a hisztamin, sem a szerotonin szintre nem volt hatással. A Compound 48/80 azonban szignifikánsan megemelte a plazmában mind a hisztamin, mind pedig a szerotonin-szintet (Tekes et al. 2005a, Tekes et al. 2006b).

A kombinált kezelések eredményeit a 10. Táblázatban foglaltam össze.

10. Táblázat A kombinált kezelések hatása a liquor , a plazma és az agyrészletek hisztamin-szintjére

	Liquor (ng/ml±SD)	Hypothalamus (ng/g±SD)	Hippocampus (ng/g±SD)	Front.cortex (ng/g±SD)	Plazma (ng/ml±SD)
Kontroll	4,2±0,55	128±13	20,1±1,9	34,4±3,6	8,85±0,6
	Liquor (%±SD)	Hypothalamus (%±SD)	Hippocampus (%±SD)	Front.cortex (%±SD)	Plazma (%±SD)
nociceptin (NC)	148±7 [*]	169±4 [*]	123±8	102±4	97±3
Cro+NC	130±5 [*]	128±3	114±8	103±5	98±4
48/80	153±5 [*]	138±6 [*]	116±10	109±12	183±6 [*]
Cro+48/80	112±11	100±16	103±6	108±4	n.a.
48/80+NC	148±2 [*]	155±3 [*]	117±13	112±10	178±9 [*]
SP	208±8 [*]	212±6 [*]	186±6 [*]	158±5 [*]	101±4
Cro+SP	100±12	106±9	108±9	109±7	n.a.

5.6 Nociceptinnel, nocistatinnal és β -endorfinnal előidézett hormonális imprinting hatása a noradrenalin, a dopamin és a szerotonin anyagcserére

Az 1970-es években (Csaba and Lantos 1973, Csaba and Lantos 1975) írták le elsőként, hogy az egysejtű *Tetrahymena* inzulin-, ill. szerotonin-kezelése olyan „válaszreakciót” alakít ki, mely az utódokban fokozott érzékenységet okoz ezen vegyületek iránt. A jelenség „hormonális imprinting” néven ismert és magasabbrendű állatokban, így patkányokon is sokszoros igazolást nyert (Salganik et al. 1978, Nagy et al. 1983).

A nociceptin-kutatás kezdeti időszakától ismert volt, hogy az exogén nociceptin jelentős hatással van a bigénaminok (szerotonin, dopamin, noradrenalin) anyagcseréjére (Werthwein et al. 1999, Siniscalchi et al. 1999, Schlicker and Morari 2000).

Kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy az újszülöttkorban adott nociceptin, ill. nocistatin rendelkezik-e imprinting aktivitással, azaz hatásuk a felnőttkori szerotonin és dopamin anyagcserére hatással van-e.

A hím (h) és a nőstény (n) állatok kontroll értékeit a 11. Táblázatban foglaltuk össze.

A nociceptinnel végzett újszülöttkori imprinting hatását a liquor és az öt vizsgált agyrészletben a 12. Táblázatban összegeztük.

A nocistatinnal végzett újszülöttkori imprinting hatását a liquor és az öt vizsgált agyrészletben a 13. Táblázatban összegeztük.

dc_520_12

11. Táblázat Felnőtt patkányok dopamin, HVA, szerotonin és 5HIAA szöveti szintjei

biogén amin	liquor (ng/ml±SD)	hypothalamus (ng/g±SD)	hippocampus (ng/g±SD)	striatum (ng/g±SD)	fr. cortex (ng/g±SD)	agytörzs (ng/g±SD)
hím DA	5,28±1,8	270,9±55,4	36,7±8,2	5068,9±1181	40,3±6,6	138,3±45,8
nőstény	4,98±1,67	217,7±77,7	52,0±14,2	5344±1151	31,2±7,2	125,0±40,3
hím HVA	26,7±3,5	63,8±14,7	62,2±17,2	1133,7±135,9	56,8±16,1	50,9±3,2
nőstény	29,9±13,0	63,6±8,5	43,1±9,0	1110,4±112,7	53,1±17,5	47,6±1,1
hím 5HT	17,0±9,2	64,1±29,7	36,6±9,1	182,7±53,4	126,5±43,8	389,2±71,2
nőstény	16,8±9,5	75,9±36,9	36,7±10,1	202,1±47,2	124,1±25,6	239,0±37,5
hím 5HIAA	164,0±36,4	155,7±17,3	87,6±29,0	192,0±69,1	457,3±46,1	1081,6±179,4
nőstény	106,3±51,0	277,7±106,0	110,6±22,5	187,9±72,2	509,7±58,3	1061,6±215,6

12. Táblázat Újszülöttkori nociceptin-imprinting hatása a felnőttkori biogénamin szintekre (h-hím, n-nőstény)

biogén amin		Nociceptin imprinting					
		liquor	hypothalamus	agytörzs	hippocampus	striatum	frontális cortex
NA	h	nd	ns	ns	nd	nd	↓
	n	nd	ns	ns	nd	nd	↓
DA	h	nd	ns	ns	ns	↓	ns
	n	nd	ns	ns	ns	↓	ns
HVA	h	ns	ns	↑	ns	ns	ns
	n	ns	ns	↑	ns	ns	ns
5HT	h	ns	↑	ns	ns	ns	↓
	n	ns	↑	ns	ns	ns	ns
5HIAA	h	ns	↑	ns	↑	↑	↓
	n	ns	↑	ns	↑	↑	↓

13. Táblázat Újszülöttkori nocistatin-imprinting hatása a felnőttkori biogénamin szintekre (h-hím, n-nőstény)

biogén amin		Nocistatin imprinting					
		liquor	hypothalamus	agytörzs	hippocampus	striatum	frontális cortex
NA	h	nd	↓	↓	nd	nd	↓
	n	nd	↓	↓	nd	nd	↓
DA	h	nd	↓	↓	ns	↓	ns
	n	nd	↓	↓	ns	↓	ns
HVA	h	↓	ns	↑	ns	ns	ns
	n	↓	ns	↑	ns	ns	ns
5HT	h	ns	↓	↓	ns	↓	nd
	n	ns	↓	↓	ns	↓	nd
5HIAA	h	↓	↑	ns	↑	↑	↓
	n	↓	↑	ns	↑	↑	↓

Korábbi adatokból (Csaba and Tekes 2005, Csaba et al. 2003b, Csaba et al. 2004b) ismert volt a β -endorfin imprinting-aktivitása patkányban. Vizsgálatainkban össze kívántuk hasonlítani a β -endorfin imprinting és a nociceptinnel valamint a nocistatinnal végzett újszülöttkori hormonális imprinting hatását a központi idegrendszeri szerotonerg ingerületátvitelre és a felnőttkori nocistatin szintekre.

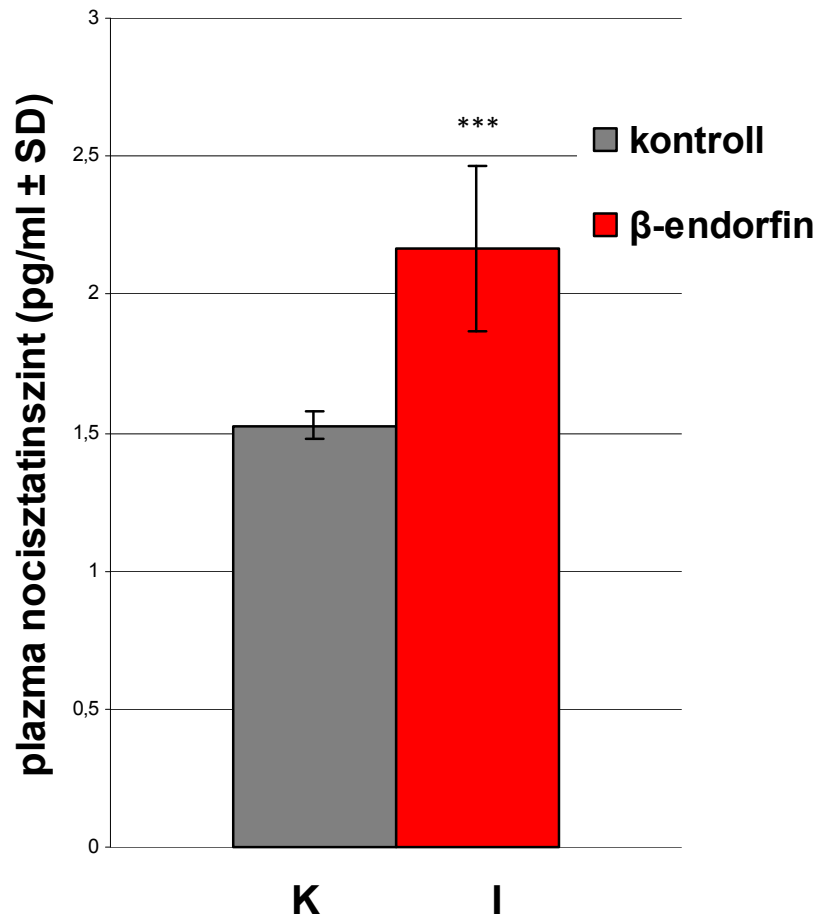
A szerotonerg ingerületátvitelre gyakorolt hatást a szerotonin (5HT) és savas karakterű metabolitja, az 5HIAA szöveti szintjeinek meghatározásával és a szerotonin turnover- értékek (5HIAA/5HT) kiszámolásával jellemeztük (14. Táblázat).

14. Táblázat Az újszülöttkori β -endorfin imprinting hatása a szerotonin turnover-re

biogén amin	hypothalamus	hippocampus	fr. kéreg	agytörzs	
állatcsoport (n=10)	(ng/g±SD)	(ng/g±SD)	(ng/g±SD)	(ng/g±SD)	
5HT	kontroll	161,0±6,5	52,1±2,4	73,3±3,1	171,6±6,5
	β-endorfin	58,6±4,3 (p=0,0004)	22,6±0,9 (p=0,0022)	21,6±7,0 (p=0,001)	71,4±3,4 (p=0,0002)
5HIAA	kontroll	915,5±19	42,5±1,6	567,0±17,2	1107,5±210,0
	β-endorfin	1255±270 (p=0,0019)	47,5±1,8 (p=0,492)	806,6±20,9 (p=0,0056)	1498,7±192,0 (p=0,0001)
5HIAA/ 5HT	kontroll	5,68±1,5	0,81±0,31	7,73±3,8	6,45±2,04
	β-endorfin	21,6±8,3 (p=0,0002)	2,1±0,11 (p=0,0026)	37,34±11,9 (p=0,00006)	20,99±12,21 (p=0,0052)

Az újszülöttkori β -endorfin imprinting hatását az 5 hónapos patkányok liquor és plazma nocistatin-szintjére a 25. ábrán és a számszerű adatokat a 15. Táblázatban foglaltuk össze.

dc_520_12



25. ábra

Újszülöttkori β-endorfin imprinting hatása a plazma nocistatin szintre 5 hónapos hím patkányokban (**p=0,0028; n=10)

15. Táblázat Újszülöttkori β -endorfin imprinting hatása a plazma nocistatin szintre 5 hónapos hím patkányokban

Állatcsoport (n=12)	Liquor nocistatin-szint (pg/100 μ l $\pm$ SD)	Szignifikancia
Kontroll hím nőstény	2,6 $\pm$ 0,64 3,95 $\pm$ 0,59	p<0,01
β-endorfin hím nőstény	17,02 $\pm$ 4,03 23,52 $\pm$ 4,35	p< 0,00001 vs. kontroll hím p< 0,00001 vs. kontroll nőstény p< 0,01 vs. β -endorfin hím

5.7 Biszpiridinium aldoximok (K27 és K203) hatása a központi idegrendszeri biogénaminok és metabolitjaik (szerotonin, dopamin, noradrenalin, 5HIAA és HVA) patkány agy, liquor és szérum koncentrációira.

Mindkét vizsgált vegyület a kolineszterázt irreverzibilisen bénító organofoszfátok okozta mérgezések potenciális új antidótumaként került szintetizálásra a K. Kuca (Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, Defence University, Hradec Kralove, Czech Republic) vezette munkacsoportban. Ismert, hogy egy ideális antidotumnak minden olyan víztérbe el kell jutnia, amelybe a mérgező anyag is eljut, de előnytelen, ha önálló farmakológiai hatással rendelkezik. Így vizsgálni kívántuk, hogy az előzetes toxikológiai tesztekben és in vitro kísérletekben (humán vörösvértestből származó acetilkolineszteráz enzimen) a két legígéretesebbnek mutatkozó K-vegyület (K27 és K203) milyen vér-agy gát (BBB) átjárhatóságot mutat, ill. van-e hatással a központi idegrendszeri biogénamin anyagcserére.

Előzetes farmakokinetikai vizsgálatainkban (Gyenge et al. 2007, Tekes et al. 2006d) megállapítottuk, hogy 50 μ mol K27 i.m. beadása után 60 perccel az agyszövetben a vérkoncentrációnak mintegy 6%-át kitevő mennyiségben (2506 $\pm$ 217ng/mg nedves szövet $\pm$ SD), míg a liquorban 1439 $\pm$ 187ng/ml $\pm$ SD mennyiségben van jelen.

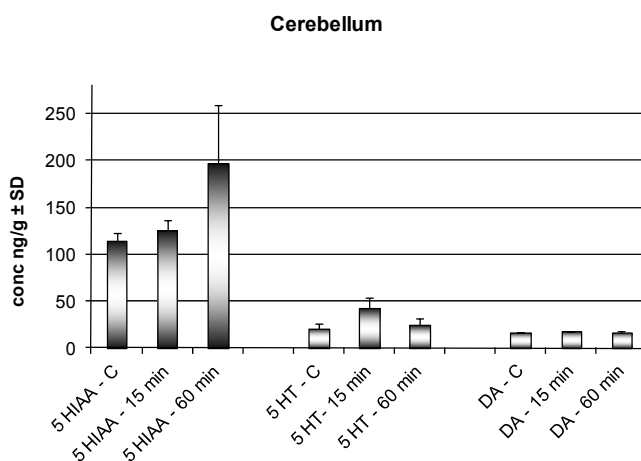
A 50 μ mol K27 i.m. beadása után 60 perccel a teljes agyszövetben mért biogénamin szinteket a 16. Táblázatban foglaltam össze.

16. Táblázat K27 hatása a biogénamin szintekre 60 perccel a beadás után

Állatcsoport (n=5)	DA (ng/mg $\pm$ SD)	HVA (ng/mg $\pm$ SD)	5HT (ng/mg $\pm$ SD)	5HIAA (ng/mg $\pm$ SD)
Kontroll	786,2 $\pm$ 29,6	81,78 $\pm$ 16,1	674,5 $\pm$ 18,8	455,5 $\pm$ 40,9
K27-kezelt	805,6 $\pm$ 53,6	70,5 $\pm$ 7,3	627,8 $\pm$ 25,2	517,2 $\pm$ 14,8

A K203-mal végzett előzetes farmakokinetikai vizsgálatainkban (Kalasz et al. 2008) megállapítottuk, hogy 50 μ mol K203 i.m. beadása után a maximális koncentráció mind az agyban mind a liquorban 15-20 percen belül kialakul és 60 percnél is alig tapasztalható csökkenés. Ennek tükrében, az egyes agyrészletekben és 15 valamint 60 perc után is megvizsgáltuk a K203 hatását a központi idegrendszeri biogénamin szintekre.

A kisagyban mért szerotonin, 5HIAA és dopamin-szinteket a 26. ábrán tüntettem fel.

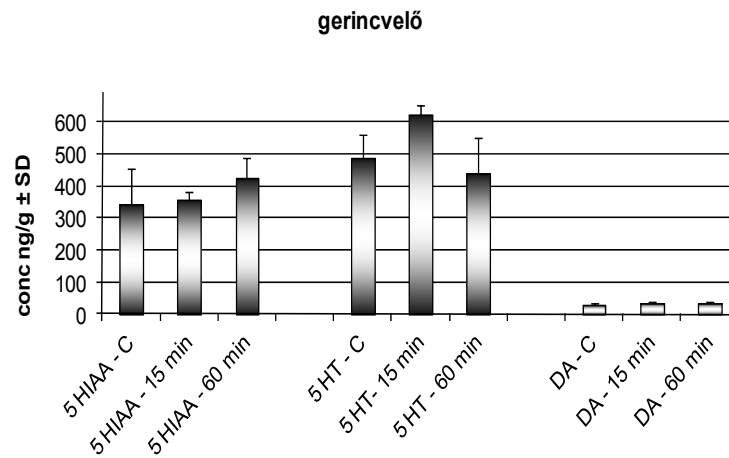


26. ábra

K203 hatása patkány kisagy szerotonin (5HT), 5-hidroxiindolecetsav (5HIAA) és dopamin (DA)-szintjére a kezelés után 15 és 60 perc elteltével (C-kontroll)

dc_520_12

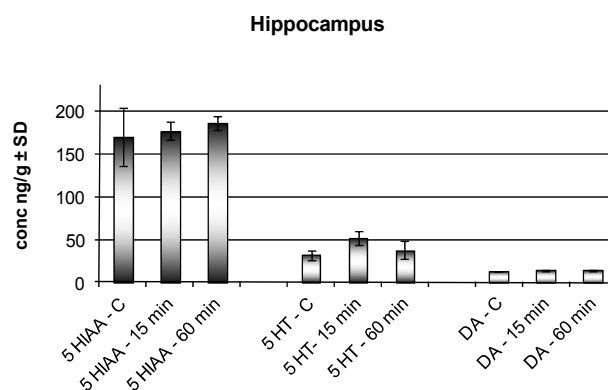
A gerincvelőben mért szerotonin, 5HIAA és dopamin-szinteket a 27. ábra mutatja.



27. ábra

K203 hatása patkány gerincvelő szerotonin (5HT), 5-hidroxiindolecetsav (5HIAA) és dopamin (DA)-szintjére a kezelés után 15 és 60 perc elteltével (C-kontroll)

A hippocampusban mért szerotonin, 5HIAA és dopamin-szinteket a 28. ábrán tüntettem fel.

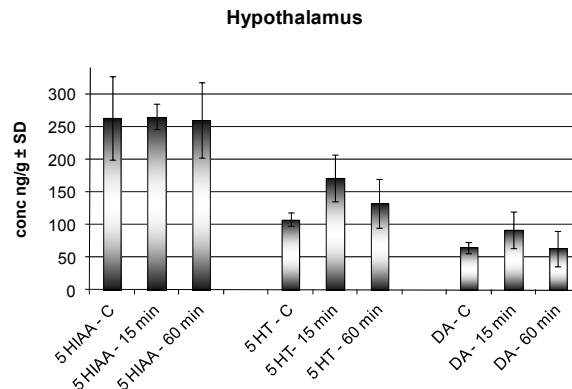


28. ábra

K203 hatása patkány hippocampus szerotonin (5HT), 5-hidroxiindolecetsav (5HIAA) és dopamin (DA)-szintjére a kezelés után 15 és 60 perc elteltével (C-kontroll)

dc_520_12

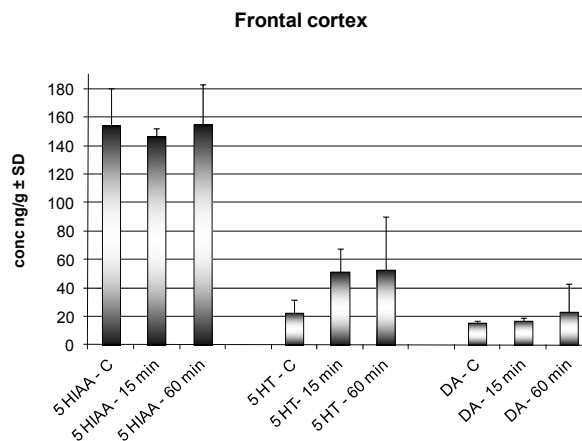
A hypothalamusban mért szerotonin, 5HIAA és dopamin-szinteket a 29. ábrán tüntettem fel.



29. ábra

K203 hatása patkány hypothalamus szerotonin (5HT), 5-hidroxiindolecetsav (5HIAA) és dopamin (DA)-szintjére a kezelés után 15 és 60 perc elteltével (C-kontroll)

A frontális kéregben mért szerotonin, 5HIAA és dopamin-szinteket a 30. ábrán tüntettem fel.

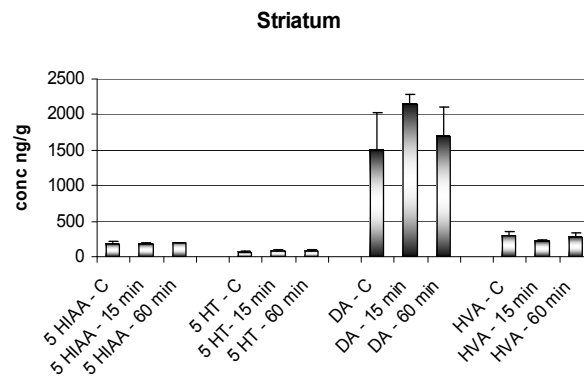


30. ábra

K203 hatása patkány frontális kéreg szerotonin (5HT), 5-hidroxiindolecetsav (5HIAA) és dopamin (DA)-szintjére a kezelés után 15 és 60 perc elteltével (C-kontroll)

dc_520_12

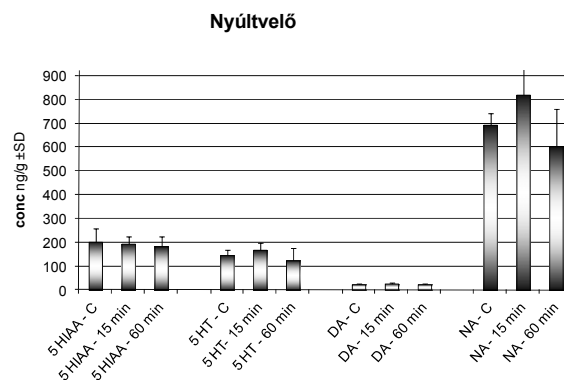
A striatumban mért szerotonin, 5HIAA és dopamin-, valamint HVA-szinteket a 31. ábrán tüntettem fel.



31. ábra

K203 hatása patkány striatum szerotonin (5HT), 5-hidroxiindolecetsav (5HIAA) és dopamin (DA), valamint homovanillinsav (HVA) szintjére, a kezelés után 15 és 60 perc elteltével (C-kontroll)

A nyúltvelőben mért szerotonin, 5HIAA és dopamin és noradrenalin-szinteket a 32. ábrán tüntettem fel.



32. ábra

K203 hatása patkány nyúltvelő szerotonin (5HT), 5-hidroxiindolecetsav (5HIAA) dopamin (DA) és noradrenalin-szintjére a kezelés után 15 és 60 perc elteltével (C-kontroll)

dc_520_12

Miután a szerotonin és az 5HIAA szöveti szintjeiben tendencia jellegű változásokat találtunk, kiszámoltuk a K203 szerotonin turnoverre gyakorolt hatását, melyet az 5HIAA/5HT hányadossal jellemeztünk (17. Táblázat).

17. Táblázat K203 hatása a szerotonin turnoverre 15 és 60 perccel a beadás után

Agyterület	5HIAA/5HT $\pm$ SD			p
	Kontroll	15 min	60 min	
kisagy	11,26 $\pm$ 4,20	4,73 $\pm$ 1,73 [*]	10,36 $\pm$ 4,23	0,015
gerincvelő	0,84 $\pm$ 0,22	0,70 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,26	0,206
hippocampus	9,08 $\pm$ 3,73	4,90 $\pm$ 0,69 [*]	8,37 $\pm$ 2,94	0,040
hypothalamus	3,13 $\pm$ 0,74	2,05 $\pm$ 0,67 [*]	2,60 $\pm$ 0,56	0,043
striatum	4,39 $\pm$ 2,04	2,79 $\pm$ 0,43	4,39 $\pm$ 2,09	0,126
nyúltvelő	1,78 $\pm$ 0,58	1,47 $\pm$ 0,16	2,44 $\pm$ 1,38	0,238
frontális kéreg	12,09 $\pm$ 6,16	3,57 $\pm$ 0,63 [*]	4,41 $\pm$ 1,77 ⁺	[*] 0,036 ⁺ 0,031

6. AZ EREMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

6.1 Plazma nociceptin szint különböző kórképekben

Vizsgálatainkat a nociceptinerg rendszer kutatásának abban a korai időszakában indítottuk, amikor az orphanin-like 1 receptor létezésének (a „reverz farmakológia” első nagy felfedezése) és a receptor endogén agonistájának (nociceptin) igazolása (Mollereau et al. 1994, Meunier et al. 1995, Reinscheid et al. 1995, Nothacker et al. 1996) után a közlemények gyakorlatilag kizárólag az exogén nociceptin farmakológiai hatásainak vizsgálatára szorítkoztak a nociceptin központi idegrendszeri, ill. perifériás endogén szintjének és a nociceptin élettani szerepének ismerete nélkül. Új megközelítést hoztak vizsgálataink abban a vonatkozásban, hogy az endogén nociceptin-szintek mérésével kerestük azokat a humán megbetegedéseket, melyekben a nociceptinerg rendszer érintettsége, klinikai jelentősége megállapítható.

6.1.1 *Különböző etiológiájú krónikus májbetegségben szenvedők*

Már az orphanin-like 1 receptor (ma NOP) kutatás kezdeti időszakában igazolást nyert humán májban a receptor mRNS-e (Wang et al. 1994), de a nociceptin és májbetegségek kapcsolatának elemzése munkacsoportunk vizsgálataival kezdődött.

6.1.1.1 **Wilson-kóros betegek**

Megállapítottuk (Hantos et al. 2002a, Hantos et al. 2002b), hogy Wilson kórban a plazma nociceptin-szint szignifikánsan magasabb ($p < 0,001$), mint az egészséges kontroll személyekben.

Ismert, hogy a Wilson kór egy autoszomálisan és recesszíven öröklődő, a 13-as kromoszóma 13q14.1 helyén lokalizálódó réz-anyagcsere betegség, mely a homozigota egyénekben alakul ki a rézet transzportáló p-típusú ATP-ázt kódoló gén mutációja miatt. Következésképpen réz-felhalmozódás indul meg számos szövetben, így elsősorban az agy lentikuláris magvaiban, a májban, a vesében és a szem Descemet membránjában. A késői gyermekkorban, ill. a fiatal felnőttkorban megjelenő klinikai tünetek elsősorban neurológiai (neuronális degeneráció) és hepatológiai (májparenchima károsodás) elváltozások. A betegség kialakulásában a rézet kötő fehérje, a cöruoplazmin mennyiségének mintegy 85%-os csökkenése is fontos tényező. A magyarországi Wilson betegek ATP7B gén mutációit (Firneisz et al. 2002) és (Folhoffer et al. 2007) térképezték fel. A nociceptin a 176 aminosavból álló prepronociceptin prekursorból prohormon konvertáz 2 aktivitás révén keletkezik. Inaktivációja hidrolízissel történik a Phe¹-Gly, Ala⁷-Arg, Ala¹¹-Arg¹² és az Arg¹²-Lys¹³ kötések hasításával a membrán-kötött neutrális aminopeptidáz (APN) és a nociceptin-metabolizmusra specifikus citoplazmatikus endopeptidáz 24.15 (EP 24.15) aktivitása révén (Montiel et al. 1997). Mindkét enzim a Zn-metalloproteázok közé tartozik és a központi Zn-atom Cu-re történő cseréje az enzim aktivitását mintegy a felére csökkenti (Noble and Roques 1997). A Wilson kór élethosszig tartó terápiájában alkalmazott D-penicillamin szintén gátolja a Zn-metalloproteázok közé tartozó kollagenázt, de nincs arra vonatkozó adat, hogy az APN-ra, ill. az endopeptidáz 24.15-re is gátló hatással lenne.

Adataink arra utalnak, hogy a Wilson betegekben a nociceptin inaktivációjáért felelős Zn-metalloproteázokban (APN és endopeptidáz 24.15) a toxikus mértékű és krónikus réz-felhalmozódás miatt Zn-Cu csere következik be, mely az enzimek gátlását, így a plazma nociceptin szintjének szignifikáns emelkedését okozza. Wilson betegekben tehát a nociceptinerg jelátvitel tartós fokozódásával kell számolni. Felmerül a tartósan magas nociceptin-szint kiváltotta NOP receptor érzékenység csökkenés (down reguláció, deszenzitizáció), de ennek kimutatása klinikai anyagban további vizsgálatokat igényel. Egér agyszeleten – (Pennock et al. 2012) legfrissebb adatai szerint – a preszinaptikus NOP receptorok nem, de a posztzinaptikusan elhelyezkedő NOP receptorok esetében nagy dózisu nociceptinnel létrehozható deszenzitizáció.

6.1.1.2 Primer biliáris cirrhosisban szenvedők

Ismert, hogy a primer biliáris cirrhosis egy krónikus, az intrahepatikus epeutak progresszív gyulladásával, destrukciójával, az epetermelés fokozatos károsodásával, a máj fibrotikus átépülésével kísért kórkép, melynek kialakulásában autoimmun kórtényezők döntő szerepet játszanak. A betegség főleg a 40-60 év közötti nőket érinti, a női nem 90%-os dominanciájának oka ismeretlen. Az antimitokondriális antitest (AMA), ill. annak M2, M4, M8 és M9 altípusa a betegek 90-95%-ában pozitív. A betegség nem izolált hepatológiai kórkép, hiszen a májlézió túl autoimmun thyreoiditis, hypothyreosis, rheumatoid arthritis, vasculitis, scleroderma, Sjögren syndroma, diabetes mellitus, neuropathia gyakran társul a klinikai képhez. Magyarországon mintegy 5000 beteg valószínűsíthető (Sherlock 1959, Nemesánszky 2012). Leggyakrabban a csillapíthatatlan bőrvizketés az első tünet, melyet sárgaság követ. A leggyakoribb biokémiai eltérés a szérum alkalikus foszfatáz aktivitás emelkedése, de emelkedett lehet az 5'-nukleotidáz vagy a gamma-glutamil transzpeptidáz, a koleszterin, és az epesavak koncentrációja is. A májcirrhosis kialakulásával más biokémiai paraméterek is megváltoznak (szérum albumin csökken, a prothrombin idő nő, a süllýedés gyorsul, anaemia alakul ki, markáns izolált IgM emelkedés mérhető).

Vizsgálatainkban 24 nőbeteg adatai alapján a plazma nociceptin-szintjének szignifikáns ($p < 0,001$) emelkedését tapasztaltuk. Pozitív korrelációt találtunk a betegség klinikai progressziója (klinikai stádium-besorolás és a laboratóriumi paraméterek) és a nociceptin-szint emelkedés között. Irodalmi adatok a PBC és a nociceptinerg rendszer kapcsolatáról nem állnak rendelkezésre. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy az antimitokondriális antigén kötődés és a citotoxikus reakció, a gyulladás, progresszíven károsítva a májparenchima sejtek működését következményesen vonja maga után a plazma nociceptin szint emelkedését (Hantos 2003, Horvath et al. 2004). A gyulladásos folyamatok és a perifériás nociceptin-szint összefüggéseit klinikai vizsgálatokban (Williams et al. 2008) és (Serrano-Gomez et al. 2011) bizonyította, az immunválaszban megemelkedő endogén nociceptin-szint állatkísérletes igazolását (Leggett et al. 2009) publikálta.

6.1.1.3 Hepatocelluláris carcinomában szenvedők

A hepatocellularis carcinoma (HCC) primer májsejt daganat, mely jelenleg a harmadik legjelentősebb daganatos halálok. Kialakulhat szerkezetileg ép májban is, de 70-90%-ban cirrhosis áll a háttérben és okai között Magyarországon legtöbbször az alkoholizmus, a krónikus C-vírus, B-vírus hepatitisz, vagy veleszületett anyagcsere-rendellenesség áll. Az újabb vizsgálatok a PBC talaján kifejlődő HCC esetekről számolnak be (Caballeria et al. 2001, Cavazza et al. 2009).

A vizsgált PBC csoportban egyik beteg esetében nagyságrenddel magasabb plazma nociceptin értéket mértünk. Klinikai kezelése során igazolást nyert a HCC kialakulása. Ez irányította figyelmünket a HCC és egyéb daganatos betegek plazma nociceptin-szintjének mérése irányába.

Vizsgálataink bizonyították (Hantos 2003, Horvath et al. 2004, Szalay et al. 2004), hogy a HCC-s és minden vizsgált daganatos betegcsoport esetében a kontroll értéknél nagyságrenddel magasabb a plazma nociceptin szint. A HCC csoportban talált kiugróan magas plazma nociceptin szintre vonatkozó eredményeinket (Spadaro et al. 2006) megerősítették, bár közleményünkben a kontroll értéket nem közlik és a „legfelső normál értéknek” a nemzetközileg elfogadott 9-10pg/ml értékkel szemben 122pg/ml-es értékkel számolnak. Adataink tükrében felmerült a plazma nociceptin-szint kórjelző szerepe a daganatos betegségek kimutatásában. A legújabb adatok megerősíteni látszanak megfigyelésünket, miszerint daganattípustól és metasztázis jelenlététől függetlenül a plazma nociceptin-szint kiugróan magas. Adataink klinikai vizsgálatokban az immunszuppresszív folyamatok és a nociceptinerg rendszer összefüggéseit igazolják. (Stamer et al. 2011) RT-PCR vizsgálatokban igazolta, hogy daganatos betegek vérmintáiban a NOP receptor expresszió szignifikánsan magasabb, viszont a prepronociceptin mRNS expressziót alacsonyabbnak találták. Ez utóbbi érték esetében metodikai hiányosságot feltételeznek, hiszen a végstádiumu betegek vérmintáiban bekövetkező változás (mononukleáris sejtek és neutrophilek számának csökkenése) méréseikben nem került korrekcióra. Az emberi perifériás vér mononukleáris sejtjei által expresszált NOP receptor (Williams et al. 2007) és

prepronociceptin (Williams et al. 2008) az immunfolyamatok szabályozásában kitüntetett szerepű.

A májcirrhosis és hepatocelluláris carcinoma vonatkozásában Fisher 344 patkányokon létrehozott állatkísérletes modellen is megerősítettük a klinikai anyagon igazolt eredményeinket, mely vizsgálatok Hantos Mónika PhD disszertációjának részét képezi (Hantos 2003).

6.1.2 Elsődleges fejfájásban szenvedők

A nociceptinerg rendszer szerepe a fájdalom percepciójában anatómiai és funkcionális adatokkal sokszorosán igazolt (Meunier 1997, Lambert 2008). A felnőtt humán agy nociceptin-tartalmának feltérképezése (Witta et al. 2004) nevéhez fűződik. A NOP receptor mind a felszálló (trigeminális és spinoretikuláris) mind a leszálló (periaqueductalis szürke állomány, nucl. raphe magnus, retikuláris rendszer) területén expresszálódik. A humán ggl. trigeminale idegsejtjeinek 70%-a mutat nociceptin immunopozitivitást (Hou et al. 2003) és CGRP, SP, NOS, és PACAP kolokalizációban található. A NOP receptor szintén jelen van a ggl. trigeminale-ban, de a basiláris erekben nem (humán kortikális artériák kontrakciójára a nociceptin nem volt hatással). Az elsődleges fejfájások pathomechanizmusában döntő szerepe van a n.trigeminus területén kialakuló neurogén gyulladásnak, ill. a trigemino-vascularis rendszer neuronális elemeiben kialakuló szenzitizációnak (Moskowitz 2008, Tajti and Vecsei 2009). Állatkísérletes adatok (Bartsch et al. 2002) igazolták, hogy a dura neurogén gyulladását a nociceptin dóziszfüggően gátolja.

6.1.2.1 Migrénes betegek

Az aktuálisan rohammentes migrén betegek plazma nociceptin-szintjét szignifikánsan ($p < 0,0001$) alacsonyabbnak találtuk, mint az egészséges kontroll személyekét. Ez az alacsony érték nem lehet a fájdalom következménye, hiszen a vérmintákat legkevesebb 10,5 órával az utolsó roham után, ill. 7,5 órával a következő roham előtt gyűjtöttük és állatkísérletes adatok szerint az exogén

nociceptin biológiai hatása 120 percnél nem tart tovább (Grisel and Mogil 2000). Emberben a fájdalom és a nociceptinerg rendszer kapcsolatáról kevés adat áll rendelkezésre és az adatok ellentmondásosak. (Brooks et al. 1998) nem talált összefüggést sem a plazma sem a liquor nociceptin-szintje és a fájdalom mértéke között, míg (Ko et al. 2002) különböző etiológiájú akut, szubakut és krónikus fájdalommal járó kórképekben egyaránt a nociceptin-szint szignifikáns emelkedését írta le. (Anderberg et al. 1998) fibromyalgiában szenvedő nők esetében csökkent plazma nociceptin szintet tapasztalt. Egészséges emberek izomzatába injektált nociceptin nem okozott közvetlen fájdalmat, de az izmok érzékenységét fokozta (Mork et al. 2002). Ugyanakkor igazolt a nociceptin gátló szerepe a dura neurogén vazodilatációjára (Hou et al. 2003) és kapcsolata a CGRP -vel a nociceptinerg rendszert a migrén terápiájában új célpontnak jelöli (Goadsby 2004). Az a megfigyelésünk, miszerint a migrén-roham alatt a plazma nociceptin szintje további drámai csökkenést mutat, további megerősítését adja a nociceptin-rendszer funkcionális jelentőségének a migrénes fejfájás kialakulásában.

6.1.2.2 Cluster-fejfájásos betegek

A cluster fejfájás és a plazma nociceptin-szintje vonatkozásában irodalmi adatok nem állnak rendelkezésre. (A Phoenix Peptides honlapján referencia-értéknek a mi mérési eredményeink szerepelnek). Patkány trigeminovazokuláris modellben (Bartsch et al. 2002) a nociceptin dózisfüggően gátolta a dura ereinek a n.trigeminus ingerlésére bekövetkező neurogén értágulatát, de önmagában nem volt hatással az ér- átmérőre. A kísérletben alkalmazott nociceptin-dózisok lényegesen magasabbak voltak, mint a plazma nociceptin-szint emberben, így a cluster fejfájás pathomechanizmusára vonatkozóan közvetlen bizonyítéknak nem tekinthetők.

Az a megfigyelésünk, hogy a cluster- betegek fejfájás-mentes periódusában a vérminták nociceptin-szintje a kontroll értékre emelkedik azt látszik bizonyítani, hogy a cluster fejfájás esetében is funkcionális szerepe van a perifériás nociceptin-szintnek.

6.1.3 *Kardio-vaszkuláris kórképekben szenvedő betegek*

Már a nociceptin-kutatás kezdeti időszakában (Gumusel et al. 1997, Chu et al. 1998) sokrétű in vitro és in vivo kísérletes adat (Malinowska et al. 2002, Lambert 2008) bizonyította a nociceptin NOP receptoron megvalósuló „direkt” és más ingerületátvivő rendszerek befolyásolásával kialakuló „indirekt” kardiovaszkuláris hatásait.

6.1.3.1 Akut ischémiás stroke-betegek

Akut ischémiás stroke-betegeken végzett vizsgálataink közvetlen indítékát (Armstead 2000c) és (Jagolino and Armstead 2001) állatkísérletes adatai képezték, melyek a nociceptin szöveti szintjének emelkedését mutatták ki akut ischémia-reperfúziós modelleken, ill. bizonyították a nociceptin szerepét a hypercapnia kiváltotta értágulat csökkentésében. Az ischémiás stroke-betegektől a kórházba kerülés idejétől számított 6 órán belül gyűjtött vérmintákban a plazma nociceptin szintet szignifikánsan magasabbnak találtuk ($p < 0,01$), mint a korban illesztett kontroll csoportban. Az ischémiás stroke anatómiai helye nem befolyásolta a nociceptin-szint emelkedés mértékét (Tekes et al. 2006a). (Armstead 2000a, Armstead 2000b) széleskörű állatkísérletes vizsgálataiban bizonyította, hogy a hypercapnia-indukált agyi értágulatot csökkentette a liquorban megemelkedett nociceptin-szint, mely a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK), és a tirozin kináz aktivitás fokozódásával is együtt jár. Humán vizsgálatok egészséges személyekben történtek (Fontana et al. 2010) megállapítva, hogy a hiperventillációs tesztel létrehozott hypocapniás alkalózis azokban a személyekben, akiknél szignifikáns vérnyomás-emelkedés és pulzusszám-emelkedés alakult ki a plazma nociceptin szint szignifikánsan magasabb volt, míg azoknál akiknél vérnyomás-emelkedés nem alakult ki, ill. vérnyomás-csökkenés jött létre a plazma nociceptin-szint szignifikáns csökkenését tapasztalták. A vizsgált személyek noradrenalin szintje a vérnyomás-csökkenéssel és a vérnyomás-emelkedéssel reagáló csoportokban egyaránt szignifikánsan emelkedett. Adataikat az egyes személyek eltérő szimpatoadrenerg aktivitásával magyarázzák. Saját vizsgálatainkban (Tekes et al. 2006a) a szerotonerg

neurotranszmisszió érintettségét mutattuk ki akut ischémiás stroke-ban. A plazma szerotonin-szintjének változását nem tapasztaltuk, de szignifikáns emelkedést mértünk a metabolitjának (5HIAA) szintjében.

6.1.3.2 Krónikus stabil angina pectoris és perifériás artéria-betegek

(Armstead 2000c) ischémia/reperfúziós állatkísérletekben bizonyította, hogy a hypoxia-kiváltotta nociceptin-szint emelkedés a reperfúzió megindítása után visszatér a kiindulási értékre. Ezeknek az eredményeknek tükrében klinikai vizsgálatokban kívántuk tartós ischémiás állapot hatását vizsgálni a plazma nociceptin szintjére. Megállapítottuk (Krepuska et al. 2011), hogy atherosclerosis talaján kifejlődött krónikus angina pectoris esetében a krónikus ischémiás klinikai állapotban a plazma nociceptin-szintje a kontroll értéktől szignifikánsan alacsonyabb. A műtéti beavatkozásra váró, súlyosan és hosszú ideje ischémiás perifériás artéria-betegek esetében szintén szignifikánsan alacsonyabb plazma nociceptin-szinteket találtunk. Adataink tükrében felmerül a kérdés, hogy az alacsony plazma nociceptin-szint a krónikus ischémiás állapot következményeként jön-e létre vagy előrejelző információval szolgál-e kardio-vaszkuláris betegség kialakulására.

6.2 A nociceptin és nocistatin pathophysiológiai szerepének vizsgálata állatkísérletekben

6.2.1 *A nociceptin, a nocistatin és a krónikus diabetes, mint neuropathiás fájdalom-modell*

Számos kísérletes vizsgálatban nyert bizonyítást mind a nociceptin (Hao et al. 1998, Sun et al. 2001a, Briscini et al. 2002, Maie and Dickenson 2004, Mika et al. 2004, Ma et al. 2004, Ma et al. 2005, Chen and Sommer 2006, Joseph et al. 2007) mind a nocistatin (Okuda-Ashitaka et al. 1998, Okuda-Ashitaka and Ito 2000, Ito et

al. 2000, Ito et al. 2001, Okuda-Ashitaka et al. 2012, Liu et al. 2012) szerepe a neuropathiás fájdalomban.

A diabetes és a nociceptinerg rendszer kapcsolata vonatkozásában az első publikáció (Kamei et al. 1999) nevéhez fűződik, aki az intratecalisan (i.t.) adott nociceptin fájdalomcsillapító hatását diabeteses egerekben dóziszfüggően nagyobbak találta, mint a kontroll állatokét mind a farok-elrántási mind a formalin-indukálta fájdalom-teszten. Patkányok streptozotocin-kiváltotta krónikus diabetes neuropathiás modelljében (Courteix et al. 2004) az exogén nociceptin hatásos fájdalomcsillapítónak bizonyult.

(Okuda-Ashitaka et al. 1998) kontroll patkányokban azt találta, hogy a nociceptin allodyniás és hyperalgesias hatását a nocistatin gátolja. A nocistatin receptor és transzdukciós mechanizmusa nem ismert, a funkcionális nociceptin-antagonista hatásért feltételezhetően a nocistatin konzervatív karboxi-terminálja, a Glu-Gln-Lys-Gln-Leu-Gln felelős (Okuda-Ashitaka and Ito 2000). Az i.c.v. adott nocistatin egerekben dóziszfüggően anti-hyperalgesias hatást mutatott a karragenin/kaolin indukálta gyulladásos hyperalgesia teszten, míg önmagában a fájdalomküszöbre nem volt hatással (Nakagawa et al. 1999).

Az endogén opioidoknak a pancreas β -sejtjei működésére gyakorolt hatását elemezve (Adeghate and Ponery 2001) kimutatták, hogy a leu-enkefalin a hasnyálmirigy inzulin- és glukagon szekrécióját egyaránt szignifikánsan emeli kontroll patkányokban, míg a diabeteses állatokban ez a hatás nem jelentkezik. A leu-enkefalin hatása atropinnal, naloxonnal és yohimbinnel egyaránt gátolható, míg a glukagon szekréciót a három vegyület közül egyedül a naloxon nem volt képes gátolni, mely a nociceptinerg rendszerrel való kapcsolatra utal. Az a megfigyelés, miszerint neuropathiás fájdalom-modellben szignifikánsan emelkedett a prepronociceptin, a nociceptin és a nocistatin szöveti szintje (Joseph et al. 2007, Liu et al. 2012) további bizonyíték a nociceptinerg rendszer érintettségére a glukagon felszabadulás szabályozásában.

A streptozotocin-indukálta krónikus diabetes neuropathiás fájdalom-modell vizsgálatainkban (Tekes et al. 2005b) 16 hétig követve a plazma és a CSF nociceptin szintjét az emelkedés egyik szövetben sem érte el a szignifikáns

szintet. Ugyanakkor a nocistatin szinteket mindkét szövetben a kontroll értéknél szignifikánsan magasabbnak találtuk a diabetes fennállásának 8. hetétől a teljes vizsgálati időszakban. A nervus sciaticus leköttével Sprague–Dawley patkányokban létrehozott neuropathiás fájdalom-modellben 10 nappal a műtét után (Joseph et al. 2007) az agyszövet, a gerincvelő és a plazma vizsgálata során szignifikánsan emelkedett prepronociceptin, nociceptin és nocistatin szinteket mértek az agyszövetben, de érdekes módon a gerincvelőben csak a prepronociceptin és a nocistatin szintjét találták szignifikánsan magasabbnak. A plazma-szintek vonatkozásában a saját adatainkkal egyezően a nociceptin-szintet nem, csak a nocistatin-szintet találták szignifikánsan emelkedettnek és meglepő módon a prepronociceptin-szintjét szignifikánsan csökkent értékűnek találták. (Liu et al. 2012) a két neuropathiás fájdalom-modellben (nervus sciaticus leköttetés és diabeteses neuropathia) kapott eredmények között nem talált különbséget, viszont (Joseph et al. 2007) és a saját adatainkkal ellentétben a plazma nociceptin-szintjét mérték szignifikánsan emelkedettnek, de a nocistatin-szintet nem és nem találtak prepronociceptin-szint csökkenést sem a plazmában. Az adatok összevetésénél figyelembe kell venni a diabetes súlyosságát (vércukorszint), fennállásának idejét (12-14-22 nap, ill. 16 hét), az alkalmazott patkány-törzset (Wistar, ill. Sprague–Dawley) egyaránt, melyek a három vizsgálat-sorozatban eltérőek. A nociceptinerg rendszer érintettsége diabetesben mindhárom vizsgálatban egyértelműen igazolást nyert. A látszólagosan ellentmondó adatok a vizsgálati időpontok, az alkalmazott patkánytörzs és a diabetes súlyosságának különbözőségével magyarázhatók. Mindenesetre figyelemreméltó az a mindhárom vizsgálatban azonos megfigyelés, hogy a nocistatin-szint és a nociceptin-szint egymástól eltérő módon változik diabetesben, mely a nociceptinerg rendszer dinamikus változására utal a betegség előrehaladásával. Fontosnak tartanánk klinikai anyagon is vizsgálni a nociceptinerg rendszer szerepét diabetesben.

6.2.2 *Exogén nociceptin hatása a központi idegrendszeri hisztamin és szerotonin szintre*

A nociceptin és hisztamin kapcsolatára vonatkozóan egyes irodalmi adatok a hisztamin felszabadító (Sakurada et al. 2004, Kimura et al. 2000) más vizsgálatok

hisztamin felszabadulást gátló (Eriksson et al. 2000, Nemeth et al. 1998) hatást írtak le. Saját kísérleteinkben az i.c.v. alkalmazott, közepes dózisú (5,5nmol/állat) nociceptin hatását kívántuk vizsgálni a hisztamin-felszabadulásra a hisztamin konkrét mennyiségének meghatározásával, mely mérések korábban nem történtek.

Megállapítottuk, hogy az i.c.v. alkalmazott NC a patkány agyban és a liquorban szignifikánsan megemeli a hisztamin-szintet.

A nociceptin által felszabadított hisztamin hízósejtes, ill. neuronális eredetének tisztázása érdekében megvizsgáltuk, hogy a hízósejtekben gazdag hypothalamusban (Edvinsson et al. 1977), a hízósejtekben szegény hippocampusban, és a hízósejteket nem tartalmazó frontális kéregben hogyan változik a hisztaminszint a nociceptin hatásmaximumának időpontjában, melyet az előzetes vizsgálatokban 120 perc-nek találtunk.

Az agyrészleteket külön vizsgálva a hízósejtekben és neuronokban gazdag hypothalamusban és a hízósejtekben szegény, de hisztaminerg neuronokban gazdag hippocampusban a NC jelentős mértékben megemelte a hisztaminszintet, míg a frontális kéregben hisztamin-szint emelő hatást nem tapasztaltunk. Ez arra utal, hogy a NC a hízósejtekből és a hisztaminerg neuronokból egyaránt képes a hisztamin-kiáramlását fokozni. Ezt bizonyítják azok az eredményeink is, melyek a hízósejt-stabilizáló cromolyn előkezelés esetében is emelkedett hisztamin-szintet mutattak (Gyenge et al. 2006, Tekes et al. 2005a, Tekes et al. 2006b).

A Compound 48/80 60 perc múlva mind a liquorban, mind pedig a hízósejtekben gazdag hypothalamusban megemelte a hisztaminszintet. A frontális cortexben és a hippocampusban nem tapasztaltunk jelentős változást. A hízósejt stabilizáló cromolyn előkezelés, mind a liquorban, mind pedig a hypothalamusban kivédte a Compound 48/80 kiváltotta jelentős hisztaminszint emelkedést, ami a Compound 48/80 okozta hisztamin kiáramlás hízósejtes eredetét bizonyítja. Érdekes megfigyelés, hogy a Compound 48/80 a plazmában is szignifikánsan megemelte a hisztaminszintet, aminek oka lehet, hogy a vegyület (az i.c.v. adott nociceptinnel ellentétben) képes átjutni a vér-agy gáton vagy növeli annak átjárhatóságát.

Az i.c.v. adott SP a NC-nél is hatékonyabban és cromolynnal gátolható módon növelte a hisztamin-szintet a liquorban, a hypothalamusban és a frontális cortexben egyaránt, míg a plazmában (a nociceptinhez hasonlóan) nem volt hatással a hisztaminszintekre. Ez arra utal, hogy a SP neuronális hisztamin-felszabadító hatással (is) rendelkezik.

Amikor a nociceptint a Compound 48/80 után 60 perccel adtuk, a hypothalamusban és a hippocampusban okozott szignifikáns hisztaminszint emelkedést, míg a liquorban és a frontális cortexben nem. A hypothalamusban és a hippocampusban a kombinált kezelés után tapasztalt nagyobb hisztaminszint emelkedés a nociceptin neuronális hisztamin-felszabadító hatását mutatja.

Adataink azt bizonyítják, hogy a nociceptin a központi idegrendszerben fokozza mind a hízósejtekből, mind a neuronálisan jelenlévő hisztamin kiáramlását. Az a megfigyelésünk, hogy a NC szignifikánsan csökkenti a központi idegrendszeri szerotonin-szintet összhangban áll az irodalmi adatokkal (Siniscalchi et al. 1999, Sbrenna et al. 2000, Mela et al. 2004, Berger et al. 2006).

6.2.3 *Nociceptinnel, nocistatinnal és β -endorfinnal előidézett hormonális imprinting hatása a dopamin és a szerotonin anyagcserére*

A hormonális imprinting jelensége magasabbrendű állatokon is sokszorosán igazolt különleges „válaszreakciója” a szervezetnek (Salganik et al. 1978, Nagy et al. 1983, Csaba et al. 2003a) legújabb review-k: (Csaba 2007, Csaba 2008, Csaba 2010, Prins et al. 2008), mely az imprinting aktivitással rendelkező vegyülettel/behatással történő újszülöttkori első találkozáskor (Tekes et al. 2007b, Tekes et al. 2007a, Csaba et al. 2009, Tekes et al. 2011) ill. az egyedi élet bizonyos „érzékeny szakaszaiban” találkozva vele (pl. patkányoknál az anyaállattól történő elválasztás ideje) (Csaba et al. 2004b, Csaba et al. 2004a, Tekes et al. 2006c, Tekes et al. 2009a) olyan „mély nyomokat” hagy az állat bizonyos receptorainak, neurotranszmissziós hálózatának, viselkedés-mintázatának működésében, mely az egész életen át, egyes esetekben az F1 utódnemzedékben is (Tekes et al. 2009b) meghatározza ezen rendszerek aktivitását.

Eredményeink igazolták, hogy nemcsak a β -endorfin, de a nociceptin és a nocistatin is rendelkezik imprinting aktivitással, azaz az újszülöttkori imprinting hatása a felnőttkorú patkányok központi idegrendszerében (Csaba and Tekes 2005) igen erőteljesen befolyásolja mind a szerotonin mind a dopamin neurotranszmissziót.

6.2.4 Újszülöttkori nociceptin imprinting

A nociceptin kezelés iránt az egyes agyterületek különböző érzékenységet mutattak (Tekes et al. 2009c). Csökkent dopamin-szintet találtunk mindkét nemből a striatumban, míg a metabolitja (HVA) emelkedett szöveti szintjét tapasztaltuk az agytörzsben. A nociceptinerg rendszer és a dopamin neurotranszmisszió kapcsolatát az utóbbi években különösen széles körben vizsgálják, részben a kábítószer addikció (Zaveri 2011), részben a NOP receptor antagonistáinak potenciális antiparkinson gyógyszerként való alkalmazhatósága okán (Liu et al. 2001, Marti et al. 2010, Volta et al. 2011). Az a megfigyelésünk, hogy a nociceptin imprinting a striatum dopamin-szintjének csökkenését okozza, jó összhangot mutat (Flau et al. 2002) eredményeivel, akik tengerimalac és egér striatum-szelet preparátumon a nociceptin dopamin-felszabadulás-gátló hatását először írták le.

A szerotonerg rendszer érintettsége minden vizsgált agyterületben (hypothalamus, hippocampus, striatum, agytörzs, frontális kéreg) megfigyelhető volt. Különösen érzékenynek a hypothalamus szerotonerg rendszerét találtuk, ahol az emelkedett szerotonin és 5HIAA szintek mindkét nemből fokozott szerotonerg aktivitásra utalnak. A hippocampus és a striatum 5HIAA szintje mindkét nemből emelkedett, mely a változatlan szerotonin-szint mellett ugyancsak a szerotonin turnover fokozódását jelenti. Érdekes megfigyelés, hogy a frontális kéreg szerotonin-szintjének csökkenését csak a hím állatokban tapasztaltuk, de a mindkét nemből tapasztalt 5HIAA szint csökkenés a frontális kéreg szerotonin turnoverének változására utal, a csökkent szerotonin-anyagcsere jelének tekinthető. Az a megfigyelésünk, hogy a liquorban sem a szerotonin sem az 5HIAA szintje szignifikáns változást nem mutatott arra utal, hogy az egyes agyterületek

szérotonerg aktivitásának változása lokális hatást eredményez. Eredményeink jó összhangot mutatnak azokkal az irodalmi adatokkal, melyekben a nociceptin a szérotonin felszabadulás egyik legfontosabb preszinaptikus modulátorának mutatkozott (Siniscalchi et al. 1999, Sbrenna et al. 2000, Schlicker and Morari 2000, Lu et al. 2010). Az a megfigyelésünk, hogy a nociceptin imprinting a frontális kéreg noradrenalin- szintjének csökkenését okozza, jó összhangot mutat (Marti et al. 2003) in vitro adataival, aki patkányagy frontális kéreg-preparátumon a nociceptint erőteljes noradrenalin-felszabadulást okozó anyagnak találta.

6.2.5 Újszülöttkori nocistatin imprinting

A nocistatinnal végzett újszülöttkori imprinting-kísérleteink azt mutatják, hogy a nocistatin iránt fokozott a biogénamin-anyagcsere érzékenysége minden vizsgált agyterületben (Tekes et al. 2009c). Mindkét nem esetében csökkent szérotonin-szintet mértünk a hypothalamusban, a striatumban és az agytörzsben és emelkedett 5HIAA-szintet a hypothalamusban, a hippocampusban és a striatumban. A hippocampusban és a frontális kéregben nem találtunk szérotonin-szint-változást, de az 5HIAA szintekben mért szignifikáns különbség egyértelműen a szérotonerg ingerületátvitel érintettségére utal ezekben az agyterületekben is. Megfigyelésünk összhangban van a nocistatin és a központi idegrendszeri szérotonerg rendszer kapcsolatára vonatkozó mindössze egyetlen eddig megjelent közlemény adataival (Fantin et al. 2007), melyben egér és patkány neocortexből készített szinaptoszóma preparátumon szuperfúziós kísérletekben a nociceptin-receptortól független preszinaptikusan elhelyezkedő és Gi/o fehérjéhez kötött mechanizmussal megvalósuló szérotonin- felszabadulást gátló hatást írtak le. A nocistatin-imprinting a dopamin-anyagcserére is számottevő hatást gyakorolt. A hypothalamusban, a striatumban és az agytörzsben szignifikáns dopamin-szint csökkenést tapasztaltunk. Bár szignifikáns HVA-szint emelkedést csak az agytörzsben mértünk, az adatok a dopamin-anyagcsere zavarát egyértelműen igazolják. Míg a nociceptin-imprinting csak a frontális kéreg noradrenalin-szintjében okozott szignifikáns csökkenést, addig a nocistatin-imprinting a hypothalamus, a frontális kéreg és az agytörzs noradrenalin-szintjében is szignifikáns csökkenést eredményezett. A nocistatin és a dopamin-,

valamint a noradrenalin-anyagcsere összefüggéseire vonatkozó más irodalmi adatok jelenleg nem ismertek.

6.2.6 Újszülöttkori β -endorfin imprinting

A β -endorfinnal végzett imprinting vizsgálatainkban (Tekes et al. 2004, Csaba et al. 2003a) a nocistatin-szint igen erőteljes (a kontrollhoz képest mintegy nyolcszoros) emelkedését tapasztaltuk mind a hím mind a nőstény patkányokban, míg a β -endorfin imprinting a nociceptin-szintre nem volt hatással. A β -endorfin és a nocistatin rendszer közötti „cross talking” módjára vizsgálatainkból nem lehet következtetni, de figyelemre méltó, hogy a β -endorfin imprinting csak a nocistatin szintjét emelte. A β -endorfin-imprinting minden vizsgált agyterületben (hypothalamus, hippocampus, frontális kéreg, agytörzs) igen erőteljes szerotonin-turnover fokozódást okozott, mely a hím állatok agresszivitásának, sexuális aktivitásának fokozódásában, a nőstény állatok esetében pedig csökkenésében is tükröződött (Tekes et al. 2004, Csaba et al. 2003a). A β -endorfinnal végzett imprinting kiváltotta szerotonin-szint csökkenés és 5HIAA szint emelkedés (5HT turnover fokozódás) vizsgálataink alapján nem eldönthetően vagy a megemelkedett nocistatin-szintnek vagy a nocistatin hatásához hozzáadódóan a β -endorfin közvetlen hatásának is betudható.

Számos állatkísérletben nyert bizonyítást az endorfin-rendszer és a szerotonerg neurotranszmisszió sokrétű kölcsönhatása. A patkányon végzett legtöbb vizsgálat a gerincvelői leszálló fájdalom-pálya modulációjában (Seo et al. 2011), és a kérgi fájdalom-pályák (Reis et al. 2011) vonatkozásában a β -endorfint és a szerotonint egyaránt elsődleges szabályozónak találta. Ismert, hogy csak a μ -opiát receptor agonistái okoznak szerotonin-felszabadulást (Tao and Auerbach 2005). Ugyanakkor a patkány és az emberi neocortex vonatkozásában jelentős species-függőség mutatható ki (Berger et al. 2006).

6.3 Biszpiridinium aldoximok (K27 és K203) hatása a központi idegrendszeri biogénaminok és metabolitjaik (szerotonin, dopamin, noradrenalin, 5HIAA és HVA) patkány agy, liquor és szérum koncentrációira.

A biszpiridínium aldoximok központi idegrendszeri biogénamin anyagcserére gyakorolt hatásának vizsgálatával egy nemzetközi együttműködés keretében foglalkoztunk. Első lépésként optimalizált HPLC módszert dolgoztunk ki az organofoszfát-mérgezések (OPm) potenciális új antidótumai (K-vegyületek) közül a legígéretesebbek bioanalitikájára (Gyenge et al. 2007, Tekes et al. 2006d) A továbbiakban vizsgáltuk a vegyületek központi idegrendszerbe való bejutásának mértékét és időfüggését (Laufer et al. 2010, Szegi et al. 2010) az OPm standard terápiájában alkalmazott pralidoximmal összevetésben (Kalasz et al. 2009b) valamint ennek mechanizmusát (Lorke et al. 2008). Adataink alapján felmerült, hogy a K-vegyületeknek a vér-agy gáton (BBB) és a vér-liquor-gáton (BCSFB) való átjutásában hordozófehérje játszik közre (karrier mediált transzport) (Lorke et al. 2008).

Farmakokinetikai vizsgálatainkban (Gyenge et al. 2007, Tekes et al. 2006d, Kalasz et al. 2008, Kalasz et al. 2009a) megállapítottuk, hogy a vegyületek erősen hidofil jellegük ellenére terápiásan hatékony mennyiségben jutnak be a központi idegrendszerbe, ezért a biogénamin anyagcserére gyakorolt hatásuk vizsgálata indokolt. A vegyületek beadása után 60 perccel a K27 esetében nem tapasztaltunk változást az agyi biogénamin szintekben, míg a K203 a frontális kéregben szignifikáns szerotonin turnover-csökkenést eredményezett az oldószeres kontroll állatokhoz viszonyítva. A K203 15 perces adatai a szerotonin-turnover csökkenését mutatják a kisagyban, a hippocampusban, a hypothalamusban és a frontális kéregben egyaránt, de a gerincvelőben, a striatumban és a nyúltagyban a K203 nem befolyásolta a szerotonin turnover-t. Érdekes megfigyelni, hogy a 15 percnél mért szerotonin-turnover-csökkenés 60 percnél már nem mutatható ki csak a frontális kéregben, ahol a 60 perces érték szignifikánsan magasabb a 15 perces értéknél, de még szignifikánsan alacsonyabb a kontrollnál, azaz 60 percnél már mintegy „rendeződni látszik” a K203 kiváltotta szerotonerg anyagcsere-zavar.

Eredményeink összhangban állnak (Sakurada et al. 2003) eredményeivel, akik a szintén erősen hidrofil pralidoxim és obidoxim esetében találtak számottevő BBB penetrációt. (Bajgar et al. 1975) azt igazolták, hogy a pralidoxim dózisnak már kis hányada (2-3%) is elég az agy megfelelő régióiban ahhoz, hogy kifejthesse farmakológiai hatását. A pralidoxim központi idegrendszerbe való bejutásának dóziszfüggését vizsgálva megállapítottuk, hogy az alacsonyabb dózisokból nagyobb hányad jut be az agyba, mint a nagyobb dózisokból (Kalasz et al. 2009b), ami szintén a karrier mediálta transzportra utalhat.

7. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI:

1. Megállapítottuk, hogy Wilson betegekben a plazma nociceptin szintje a élet teljes időtartama alatt magas, tehát a nociceptinerg jelátvitel tartós fokozódásával kell számolni. Ennek oka a betegség lényegét jelentő toxikus mértékű és krónikus réz-felhalmozódás, ami a nociceptint inaktiváló enzimek gátlását okozza.
2. Megállapítottuk, hogy primer biliáris cirrhosisban a plazma nociceptin szintje szignifikánsan emelkedik, melynek mértéke a betegség klinikai progressziójával pozitív korrelációban van. Ennek oka a betegségre jellemző májparenchima sejtek progresszív károsodásából következményesen kialakuló magas plazma nociceptin szint.
3. Megállapítottuk, hogy minden vizsgált daganatos betegcsoportban a kontroll értéknél nagyságrenddel magasabb a plazma nociceptin szint. Ennek hátterében feltételezhetően az áll, hogy a NOP receptor közvetítette hatások kitüntetett szereppel bírnak az immunfolyamatok szabályozásában. Adataink tükrében felmerül a plazma nociceptin-szint kórjelző szerepe a daganatos betegségek kimutatásában.
4. Megállapítottuk, hogy migrén betegek plazma nociceptin-szintje szignifikánsan alacsonyabb, mint az egészséges kontroll személyeké. A migrén-roham alatt a plazma nociceptin szintje további drámai csökkenést mutat, ami a nociceptin-rendszer funkcionális zavarára mutat a migrénes fejfájás kialakulásában.
5. A cluster-betegek fejfájás-mentes és fejfájásos periódusában végzett méréseinkkel bizonyítottuk, hogy a primér fejfájásoknak ebben a fajtájában is funkcionális jelentősége van a nociceptinerg rendszernek.
6. Megállapítottuk, hogy akut ischémiás stroke emelkedett nociceptin-szintet és a szerotonin-anyagcsere zavarát eredményezi.

7. Megállapítottuk, hogy krónikus ischémiás állapotokat (atherosclerosis talaján kifejlődő angina pectoris, ill. perifériás érbetegség) a klinikai állapottal korreláló alacsony perifériás nociceptin-szint jellemez.
8. Megállapítottuk, hogy a központi idegrendszerben a nociceptin a hízósejtes és neuronális hisztamint egyaránt felszabadítva fokozza a hisztaminerg neurotranszmissziót.
9. A streptozotocin-indukálta krónikus diabetes neuropáthiás fájdalom-modell vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy diabetesben a központi idegrendszeri nocistatin-szint erőteljesen emelkedik.
10. Kimutattuk, hogy mind a nociceptin mind a nocistatin erőteljes hormonális imprinting hatással bír: az újszülöttkori kezelés hatása a központi idegrendszerben megváltozott felnőttkori dopamin-, szerotonin- és noradrenalin-anyagcserét eredményez.
11. Megállapítottuk, hogy a β -endorfinnal végzett imprinting igen erőteljes nocistatin-szint emelkedést és agyi régió-szelektív szerotonin turnover fokozódást okoz, mely mind a hím mind a nőstény állatok szexuális viselkedésében, agresszivitásában jól tükröződik.
12. Optimalizált HPLC módszert dolgoztunk ki az acetilkolineszteráz reaktivátor K27 és K203 bioanalitikájára szérum-, agy- és liquor-mintákból.
13. Megállapítottuk, hogy a rendkívül hidrofil karakterük ellenére a K27 és a K203 egyaránt terápiás mennyiségben bejut a központi idegrendszerbe; intramusculáris alkalmazás után 15 perccel a K27 nem, de a K203 agyi régió-szelektív szerotonin-turnover csökkenést okoz, mely 60 perc után a frontális kéreg kivételével minden agyi régióban rendeződik.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Abdelrahman, A. M. and Pang, C. C. (2002) 'Effect of nociceptin/orphanin FQ on venous tone in conscious rats', *Eur J Pharmacol*, 455(2-3), 143-7.
- Adeghate, E. and Ponery, A. S. (2001) 'The role of leucine-enkephalin on insulin and glucagon secretion from pancreatic tissue fragments of normal and diabetic rats', *Arch Physiol Biochem*, 109(3), 223-9.
- Albrecht, D., Bluhdorn, R., Siegmund, H., Berger, H. and Calo, G. (2001) 'Inhibitory action of nociceptin/orphanin FQ on functionally different thalamic neurons in urethane-anaesthetized rats', *Br J Pharmacol*, 134(2), 333-42.
- Amodeo, P., Lopez Mendez, B., Guerrini, R., Salvadori, S., Temussi, P. A. and Tancredi, T. (2000) 'Pain peptides. Solution structure of orphanin FQ2', *FEBS Lett*, 473(2), 157-60.
- Anderberg, U. M., Liu, Z., Berglund, L. and Nyberg, F. (1998) 'Plasma levels on nociceptin in female fibromyalgia syndrome patients', *Z Rheumatol*, 57 Suppl 2, 77-80.
- Andoh, T., Yageta, Y., Takeshima, H. and Kuraishi, Y. (2004) 'Intradermal nociceptin elicits itch-associated responses through leukotriene B(4) in mice', *J Invest Dermatol*, 123(1), 196-201.
- Arjomand, J., Cole, S. and Evans, C. J. (2002) 'Novel orphanin FQ/nociceptin transcripts are expressed in human immune cells', *J Neuroimmunol*, 130(1-2), 100-8.
- Armstead, W. M. (2000a) 'NOC/oFQ contributes to age-dependent impairment of NMDA-induced cerebrovasodilation after brain injury', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279(5), H2188-95.

- Armstead, W. M. (2000b) 'NOC/oFQ PKC-dependent superoxide generation contributes to hypoxic-ischemic impairment of NMDA cerebrovasodilation', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279(6), H2678-84.
- Armstead, W. M. (2000c) 'Role of nociceptin/orphanin FQ in age-dependent cerebral hemodynamic effects of brain injury', *J Neurotrauma*, 17(9), 751-64.
- Bajgar, J., Patocka, J., Jakl, A. and Hrdina, V. (1975) 'Antidotal therapy and changes of acetylcholinesterase activity following isopropyl methylphosphonofluoridate intoxication in mice', *Acta Biol Med Ger*, 34(6), 1049-55.
- Bartsch, T., Akerman, S. and Goadsby, P. J. (2002) 'The ORL-1 (NOP1) receptor ligand nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) inhibits neurogenic dural vasodilatation in the rat', *Neuropharmacology*, 43(6), 991-8.
- Bebawy, D., Marquez, P., Samboul, S., Parikh, D., Hamid, A. and Lutfy, K. (2010) 'Orphanin FQ/nociceptin not only blocks but also reverses behavioral adaptive changes induced by repeated cocaine in mice', *Biol Psychiatry*, 68(3), 223-30.
- Berger, B., Rothmaier, A. K., Wedekind, F., Zentner, J., Feuerstein, T. J. and Jackisch, R. (2006) 'Presynaptic opioid receptors on noradrenergic and serotonergic neurons in the human as compared to the rat neocortex', *Br J Pharmacol*, 148(6), 795-806.
- Bojnik, E., Farkas, J., Magyar, A., Tomboly, C., Guclu, U., Gunduz, O., Borsodi, A., Corbani, M. and Benyhe, S. (2009) 'Selective and high affinity labeling of neuronal and recombinant nociceptin receptors with the hexapeptide radioprobe [(3)H]Ac-RYYRIK-ol', *Neurochem Int*, 55(7), 458-66.
- Briscini, L., Corradini, L., Ongini, E. and Bertorelli, R. (2002) 'Up-regulation of ORL-1 receptors in spinal tissue of allodynic rats after sciatic nerve injury', *Eur J Pharmacol*, 447(1), 59-65.

- Brookes, Z. L., Stedman, E. N., Guerrini, R., Lawton, B. K., Calo, G. and Lambert, D. G. (2007) 'Proinflammatory and vasodilator effects of nociceptin/orphanin FQ in the rat mesenteric microcirculation are mediated by histamine', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(5), H2977-85.
- Brooks, H., Elton, C. D., Smart, D., Rowbotham, D. J., McKnight, A. T. and Lambert, D. G. (1998) 'Identification of nociceptin in human cerebrospinal fluid: comparison of levels in pain and non-pain states', *Pain*, 78(1), 71-3.
- Bucher, B. (1998) 'ORL1 receptor-mediated inhibition by nociceptin of noradrenaline release from perivascular sympathetic nerve endings of the rat tail artery', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 358(6), 682-5.
- Buzas, B., Rosenberger, J., Kim, K. W. and Cox, B. M. (2002) 'Inflammatory mediators increase the expression of nociceptin/orphanin FQ in rat astrocytes in culture', *Glia*, 39(3), 237-46.
- Caballeria, L., Pares, A., Castells, A., Gines, A., Bru, C. and Rodes, J. (2001) 'Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: similar incidence to that in hepatitis C virus-related cirrhosis', *American Journal of Gastroenterology*, 96(4), 1160-3.
- Calo, G., Rizzi, A., Rizzi, D., Bigoni, R., Guerrini, R., Marzola, G., Marti, M., McDonald, J., Morari, M., Lambert, D. G., Salvadori, S. and Regoli, D. (2002) '[Nphe1,Arg14,Lys15]nociceptin-NH₂, a novel potent and selective antagonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor', *Br J Pharmacol*, 136(2), 303-11.
- Cavazza, A., Caballeria, L., Floreani, A., Farinati, F., Bruguera, M., Caroli, D. and Pares, A. (2009) 'Incidence, risk factors, and survival of hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: comparative analysis from two centers', *Hepatology*, 50(4), 1162-8.
- Champion, H. C. and Kadowitz, P. J. (1997) 'Nociceptin, an endogenous ligand for the ORL1 receptor, has novel hypotensive activity in the rat', *Life Sci*, 60(16), PL 241-5.

- Chen, Y., Fan, Y., Liu, J., Mestek, A., Tian, M., Kozak, C. A. and Yu, L. (1994) 'Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family', *FEBS Lett*, 347(2-3), 279-83.
- Chen, Y. and Sommer, C. (2006) 'Nociceptin and its receptor in rat dorsal root ganglion neurons in neuropathic and inflammatory pain models: implications on pain processing', *J Peripher Nerv Syst*, 11(3), 232-40.
- Chen, Y. L., Li, A. H., Yeh, T. H., Chou, A. H. and Wang, H. L. (2009) 'Nocistatin and nociceptin exert opposite effects on the excitability of central amygdala nucleus-periaqueductal gray projection neurons', *Mol Cell Neurosci*, 40(1), 76-88.
- Chen, Y. L., Li, A. H., Yeh, T. H., Chou, A. H., Weng, Y. S. and Wang, H. L. (2010) 'Nocistatin excites rostral agranular insular cortex-periaqueductal gray projection neurons by enhancing transient receptor potential cation conductance via G(alphaq/11)-PLC-protein kinase C pathway', *Neuroscience*, 168(1), 226-39.
- Chiou, L. C., Liao, Y. Y., Fan, P. C., Kuo, P. H., Wang, C. H., Riemer, C. and Prinssen, E. P. (2007) 'Nociceptin/orphanin FQ peptide receptors: pharmacology and clinical implications', *Curr Drug Targets*, 8(1), 117-35.
- Chu, X., Xu, N., Li, P. and Wang, J. Q. (1998) 'Profound inhibition of cardiomotor neurons in the rat rostral ventrolateral medulla by nociceptin (orphanin FQ)', *Neuroreport*, 9(6), 1081-4.
- Ciccocioppo, R., Angeletti, S., Panocka, I. and Massi, M. (2000) 'Nociceptin/orphanin FQ and drugs of abuse', *Peptides*, 21(7), 1071-80.
- Connor, M., Vaughan, C. W., Chieng, B. and Christie, M. J. (1996) 'Nociceptin receptor coupling to a potassium conductance in rat locus coeruleus neurones in vitro', *Br J Pharmacol*, 119(8), 1614-8.

- Courteix, C., Coudore-Civiale, M. A., Privat, A. M., Pelissier, T., Eschalier, A. and Fialip, J. (2004) 'Evidence for an exclusive antinociceptive effect of nociceptin/orphanin FQ, an endogenous ligand for the ORL1 receptor, in two animal models of neuropathic pain', *Pain*, 110(1-2), 236-45.
- Courteix, C., Eschalier, A. and Lavarenne, J. (1993) 'Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain', *Pain*, 53(1), 81-8.
- Crescenzi, O., Guerrini, R., Picone, D., Salvadori, S., Tancredi, T. and Temussi, P. A. (2000) 'Solution structure of nocistatin, a new peptide analgesic', *Biopolymers*, 53(3), 257-64.
- Csaba, G. (2007) 'Thoughts on the cultural evolution of man. Developmental imprinting and transgenerational effect', *Riv Biol*, 100(3), 461-74.
- Csaba, G. (2008) 'Hormonal imprinting: phylogeny, ontogeny, diseases and possible role in present-day human evolution', *Cell Biochem Funct*, 26(1), 1-10.
- Csaba, G. (2010) '[Hormonal imprinting--the unforeseeable future]', *Orv Hetil*, 151(33), 1323-30.
- Csaba, G., Knippel, B., Karabelyos, C., Inczeffi-Gonda, A., Hantos, M., Tothfalusi, L. and Tekes, K. (2003a) 'Effect of neonatal beta-endorphin imprinting on sexual behavior and brain serotonin level in adult rats', *Life Sci*, 73(1), 103-14.
- Csaba, G., Knippel, B., Karabelyos, C., Inczeffi-Gonda, A., Hantos, M., Tothfalusi, L. and Tekes, K. (2004a) 'Effect of treatment at weaning with the serotonin antagonist mianserin on the brain serotonin and cerebrospinal fluid nocistatin level of adult female rats: a case of late imprinting', *Life Sci*, 75(8), 939-46.
- Csaba, G., Kovacs, P. and Pallinger, E. (2003b) 'Effect of a single neonatal endorphin treatment on the hormone content of adult rat white blood cells and mast cells', *Cell Biol Int*, 27(5), 423-7.

- Csaba, G., Kovacs, P. and Pallinger, E. (2004b) 'Effect of endorphin exposure at weaning on the endorphin and serotonin content of white blood cells and mast cells in adult rat', *Cell Biochem Funct*, 22(3), 197-200.
- Csaba, G. and Lantos, T. (1973) 'Effect of hormones on protozoa. Studies on the phagocytotic effect of histamine, 5-hydroxytryptamine and indoleacetic acid on *Tetrahymena pyriformis*.', *Cytobiologie*, 7, 361-365.
- Csaba, G. and Lantos, T. (1975) 'Effect of insulin on the glucose uptake of protozoa.', *Experientia*, 31, 1095-1098.
- Csaba, G. and Tekes, K. (2005) 'Is the brain hormonally imprintable?', *Brain Dev*, 27(7), 465-71.
- Csaba, G., Tekes, K. and Pallinger, E. (2009) 'Influence of perinatal stress on the hormone content in immune cells of adult rats: dominance of ACTH', *Horm Metab Res*, 41(8), 617-20.
- Darland, T., Heinricher, M. M. and Grandy, D. K. (1998) 'Orphanin FQ/nociceptin: a role in pain and analgesia, but so much more', *Trends Neurosci*, 21(5), 215-21.
- Edvinsson, L., Cervos-Navarro, J., Larsson, L. I., Owman, C. and Ronnberg, A. L. (1977) 'Regional distribution of mast cells containing histamine, dopamine, or 5-hydroxytryptamine in the mammalian brain', *Neurology*, 27(9), 878-83.
- Eriksson, K. S., Stevens, D. R. and Haas, H. L. (2000) 'Opposite modulation of histaminergic neurons by nociceptin and morphine', *Neuropharmacology*, 39(12), 2492-8.
- Fantin, M., Fischetti, C., Trapella, C. and Morari, M. (2007) 'Nocistatin inhibits 5-hydroxytryptamine release in the mouse neocortex via presynaptic Gi/o protein linked pathways', *Br J Pharmacol*, 152(4), 549-55.
- Firneisz, G., Lakatos, P. L., Szalay, F., Polli, C., Glant, T. T. and Ferenci, P. (2002) 'Common mutations of ATP7B in Wilson disease patients from Hungary', *Am J Med Genet*, 108(1), 23-8.

- Flau, K., Redmer, A., Liedtke, S., Kathmann, M. and Schlicker, E. (2002) 'Inhibition of striatal and retinal dopamine release via nociceptin/orphanin FQ receptors', *Br J Pharmacol*, 137(8), 1355-61.
- Florin, S., Leblond, F., Suaudeau, C., Meunier, J. C. and Costentin, J. (1999) 'Comparison of behavioural effects of NocII or NocIII, two related pronociceptin-derived peptides', *Life Sci*, 65(25), 2727-33.
- Folhoffer, A., Ferenci, P., Csak, T., Horvath, A., Hegedus, D., Firneisz, G., Osztoivits, J., Kosa, J. P., Willheim-Polli, C., Szonyi, L., Abonyi, M., Lakatos, P. L. and Szalay, F. (2007) 'Novel mutations of the ATP7B gene among 109 Hungarian patients with Wilson's disease', *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 19(2), 105-11.
- Fontana, F., Pizzi, C., Bernardi, P., Pich, E. M., Bedini, A. and Spampinato, S. (2010) 'Plasma nociceptin/orphanin FQ levels in response to the hyperventilation test in healthy subjects', *Peptides*, 31(4), 720-2.
- Furst, S. (1999) 'Transmitters involved in antinociception in the spinal cord', *Brain Res Bull*, 48(2), 129-41.
- Glowinski, J. and Iversen, L. (1966) 'Regional studies of catecholamines in the rat brain. 3. Subcellular distribution of endogenous and exogenous catecholamines in various brain regions', *Biochem Pharmacol*, 15(7), 977-87.
- Goadsby, P. J. (2004) 'Post-triptan era for the treatment of acute migraine', *Curr Pain Headache Rep*, 8(5), 393-8.
- Grandi, D., Solenghi, E., Guerrini, R., Polidori, C., Massi, M. and Morini, G. (2007) 'Nociceptin/orphanin FQ prevents gastric damage induced by cold-restraint stress in the rat by acting in the periphery', *Peptides*, 28(8), 1572-9.
- Grisel, J. E. and Mogil, J. S. (2000) 'Effects of supraspinal orphanin FQ/nociceptin', *Peptides*, 21(7), 1037-45.

- Gumusel, B., Hao, Q., Hyman, A., Chang, J. K., Kapusta, D. R. and Lipton, H. (1997) 'Nociceptin: an endogenous agonist for central opioid like1 (ORL1) receptors possesses systemic vasorelaxant properties', *Life Sci*, 60(8), PL141-5.
- Gunduz, O., Rizzi, A., Baldisserotto, A., Guerrini, R., Spagnolo, B., Gavioli, E. C., Kocsis, L., Magyar, A., Benyhe, S., Borsodi, A. and Calo, G. (2006) 'In vitro and in vivo pharmacological characterization of the nociceptin/orphanin FQ receptor ligand Ac-RYYRIK-ol', *Eur J Pharmacol*, 539(1-2), 39-48.
- Gyenge, M., Hantos, M., Laufer, R. and Tekes, K. (2006) '[Effect of nociceptin on histamine and serotonin release in the central nervous system]', *Acta Pharm Hung*, 76(3), 127-32.
- Gyenge, M., Kalasz, H., Petroianu, G. A., Laufer, R., Kuca, K. and Tekes, K. (2007) 'Measurement of K-27, an oxime-type cholinesterase reactivator by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection from different biological samples', *J Chromatogr A*, 1161(1-2), 146-51.
- Hadrup, N., Petersen, J. S., Windfeld, S., Risom, L., Andersen, C. B., Nielsen, S., Christensen, S. and Jonassen, T. E. (2007) 'Differential down-regulation of aquaporin-2 in rat kidney zones by peripheral nociceptin/orphanin FQ receptor agonism and vasopressin type-2 receptor antagonism', *J Pharmacol Exp Ther*, 323(2), 516-24.
- Hantos, M. (2003) *A nociceptinerg rendszer jelentősége krónikus anyagcsere-betegségekben és neuropszichés kórképekben*, unpublished thesis Semmelweis University.
- Hantos, M. B., Szalay, F., Lakatos, P. L., Hegedus, D., Firneisz, G., Reiczigel, J., Torok, T. and Tekes, K. (2002a) 'Elevated plasma nociceptin level in patients with Wilson disease', *Brain Res Bull*, 58(3), 311-3.
- Hantos, M. B., Tekes, K. and Szalay, F. (2002b) '[Peripheral nociceptin levels in Wilson disease]', *Acta Pharm Hung*, 72(4), 260-4.

- Hao, J. X., Xu, I. S., Wiesenfeld-Hallin, Z. and Xu, X. J. (1998) 'Anti-hyperalgesic and anti-allodynic effects of intrathecal nociceptin/orphanin FQ in rats after spinal cord injury, peripheral nerve injury and inflammation', *Pain*, 76(3), 385-93.
- Hashiba, E., Hirota, K., Kudo, T., Calo, G., Guerrini, R. and Matsuki, A. (2003) 'Effects of nociceptin/orphanin FQ receptor ligands on blood pressure, heart rate, and plasma catecholamine concentrations in guinea pigs', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 367(4), 342-7.
- Helyes, Z., Nemeth, J., Pinter, E. and Szolcsanyi, J. (1997) 'Inhibition by nociceptin of neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals', *Br J Pharmacol*, 121(4), 613-5.
- Hiramatsu, M. and Inoue, K. (1999) 'Nociceptin/orphanin FQ and nocistatin on learning and memory impairment induced by scopolamine in mice', *Br J Pharmacol*, 127(3), 655-60.
- Horvath, A., Folhoffer, A., Lakatos, P. L., Halosz, J., Illyes, G., Schaff, Z., Hantos, M. B., Tekes, K. and Szalay, F. (2004) 'Rising plasma nociceptin level during development of HCC: a case report', *World J Gastroenterol*, 10(1), 152-4.
- Hou, M., Uddman, R., Tajti, J. and Edvinsson, L. (2003) 'Nociceptin immunoreactivity and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion', *Brain Res*, 964(2), 179-86.
- Inoue, M., Kawashima, T., Allen, R. G. and Ueda, H. (2003) 'Nocistatin and prepro-nociceptin/orphanin FQ 160-187 cause nociception through activation of Gi/o in capsaicin-sensitive and of Gs in capsaicin-insensitive nociceptors, respectively', *J Pharmacol Exp Ther*, 306(1), 141-6.
- Ito, S., Okuda-Ashitaka, E., Imanishi, T. and Minami, T. (2000) 'Central roles of nociceptin/orphanin FQ and nocistatin: allodynia as a model of neural plasticity', *Prog Brain Res*, 129, 205-18.

- Ito, S., Okuda-Ashitaka, E. and Minami, T. (2001) 'Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin', *Neurosci Res*, 41(4), 299-332.
- Jagolino, A. and Armstead, W. M. (2001) 'Nociceptin/orphanin FQ contributes to hypoxic/ischemic impairment of hypercapnic cerebrovasodilation', *Brain Res Bull*, 55(4), 465-8.
- Johnson, E. E. and Connor, M. (2007) 'Towards a receptor for nocistatin?', *Br J Pharmacol*, 152(4), 415-6.
- Joseph, T., Lee, T. L., Li, C., Siau, C., Nishiuchi, Y., Kimura, T. and Tachibana, S. (2007) 'Levels of neuropeptides nocistatin, nociceptin/orphanin FQ and their precursor protein in a rat neuropathic pain model', *Peptides*, 28(7), 1433-40.
- Joseph, T., Lee, T. L., Ning, C., Nishiuchi, Y., Kimura, T., Jikuya, H., Ou, K., Chin, Y. C. and Tachibana, S. (2006) 'Identification of mature nocistatin and nociceptin in human brain and cerebrospinal fluid by mass spectrometry combined with affinity chromatography and HPLC', *Peptides*, 27(1), 122-30.
- Kalasz, H., Furesz, J. and Tekes, K. (2009a) 'Monitoring the pharmacokinetics of pyridinium aldoximes in the body', *Mini Rev Med Chem*, 9(5), 596-610.
- Kalasz, H., Laufer, R., Szegi, P., Kuca, K., Musilek, K. and Tekes, K. (2008) 'HPLC Study of the Pharmacokinetics of K-203', *Acta Chromatographica*, 20(4), 575-584.
- Kalasz, H., Szoko, E., Tabi, T., Petroianu, G. A., Lorke, D. E., Omar, A., Alafifi, S., Jasem, A. and Tekes, K. (2009b) 'Analysis of pralidoxime in serum, brain and CSF of rats', *Med Chem*, 5(3), 237-41.
- Kamei, J., Matsunawa, Y., Miyata, S., Tanaka, S. and Saitoh, A. (2004) 'Effects of nociceptin on the exploratory behavior of mice in the hole-board test', *Eur J Pharmacol*, 489(1-2), 77-87.

- Kamei, J., Ohsawa, M., Kashiwazaki, T. and Nagase, H. (1999) 'Antinociceptive effects of the ORL1 receptor agonist nociceptin/orphanin FQ in diabetic mice', *Eur J Pharmacol*, 370(2), 109-16.
- Kawahara, Y., Hesselink, M. B., van Scharrenburg, G. and Westerink, B. H. (2004) 'Tonic inhibition by orphanin FQ/nociceptin of noradrenaline neurotransmission in the amygdala', *Eur J Pharmacol*, 485(1-3), 197-200.
- Kimura, T., Kitaichi, K., Hiramatsu, K., Yoshida, M., Ito, Y., Kume, H., Yamaki, K., Suzuki, R. and Takagi, K. (2000) 'Intradermal application of nociceptin increases vascular permeability in rats: the possible involvement of histamine release from mast cells', *Eur J Pharmacol*, 407(3), 327-32.
- Ko, M. H., Kim, Y. H., Woo, R. S. and Kim, K. W. (2002) 'Quantitative analysis of nociceptin in blood of patients with acute and chronic pain', *Neuroreport*, 13(13), 1631-3.
- Koob, G. F. (2008) 'A role for brain stress systems in addiction', *Neuron*, 59(1), 11-34.
- Krepuska, M., Sotonyi, P., Csobay-Novak, C., Szeberin, Z., Hartyanszky, I., Zima, E., Szilagyi, N., Horkay, F., Merkely, B., Acsady, G. and Tekes, K. (2011) 'Plasma nociceptin/orphanin FQ levels are lower in patients with chronic ischemic cardiovascular diseases--A pilot study', *Regul Pept*, 169(1-3), 1-5.
- Lambert, D. G. (2008) 'The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential', *Nat Rev Drug Discov*, 7(8), 694-710.
- Laufer, R., Kalasz, H., Musilek, K., Szegi, P., Darvas, F., K., K. and Tekes, K. (2010) 'Synthesis, antidotal effects and HPLC behavior of some novel pyridinium aldoximes', *Current Organic Chemistry*, (14), 447-456.
- Lee, T. L., Fung, F. M., Chen, F. G., Chou, N., Okuda-Ashitaka, E., Ito, S., Nishiuchi, Y., Kimura, T. and Tachibana, S. (1999) 'Identification of human, rat and mouse nocistatin in brain and human nocistatin in brain and human cerebrospinal fluid', *Neuroreport*, 10(7), 1537-41.

- Leggett, J. D., Dawe, K. L., Jessop, D. S. and Fulford, A. J. (2009) 'Endogenous nociceptin / orphanin FQ system involvement in hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses: relevance to models of inflammation', *J Neuroendocrinol*, 21(11), 888-97.
- Liu, E. H., Li, C., Govindasamy, M., Neo, H. J., Lee, T. L., Low, C. M. and Tachibana, S. (2012) 'Elevated prepronociceptin, nociceptin/orphanin FQ and nocistatin concentrations in rat chronic constriction nerve injury and diabetic neuropathic pain models', *Neurosci Lett*, 506(1), 104-6.
- Liu, Z., Wang, Y., Zhang, J., Ding, J., Guo, L., Cui, D. and Fei, J. (2001) 'Orphanin FQ: an endogenous antagonist of rat brain dopamine transporter', *Neuroreport*, 12(4), 699-702.
- Lohith, T. G., Zoghbi, S. S., Morse, C. L., Araneta, M. F., Barth, V. N., Goebel, N. A., Tauscher, J. T., Pike, V. W., Innis, R. B. and Fujita, M. (2012) 'Brain and whole-body imaging of nociceptin/orphanin FQ peptide receptor in humans using the PET ligand 11C-NOP-1A', *J Nucl Med*, 53(3), 385-92.
- Lorke, D. E., Kalasz, H., Petroianu, G. A. and Tekes, K. (2008) 'Entry of oximes into the brain: a review', *Curr Med Chem*, 15(8), 743-53.
- Lu, N., Han, M., Yang, Z. L., Wang, Y. Q., Wu, G. C. and Zhang, Y. Q. (2010) 'Nociceptin/Orphanin FQ in PAG modulates the release of amino acids, serotonin and norepinephrine in the rostral ventromedial medulla and spinal cord in rats', *Pain*, 148(3), 414-25.
- Ma, F., Xie, H., Dong, Z. Q., Wang, Y. Q. and Wu, G. C. (2004) 'Effects of electroacupuncture on orphanin FQ immunoreactivity and preproorphanin FQ mRNA in nucleus of raphe magnus in the neuropathic pain rats', *Brain Res Bull*, 63(6), 509-13.
- Ma, F., Xie, H., Dong, Z. Q., Wang, Y. Q. and Wu, G. C. (2005) 'Expression of ORL1 mRNA in some brain nuclei in neuropathic pain rats', *Brain Res*, 1043(1-2), 214-7.

- Mahmoud, S., Yun, J. K. and Ruiz-Velasco, V. (2012) 'Gbeta2 and Gbeta4 participate in the opioid and adrenergic receptor-mediated Ca²⁺ channel modulation in rat sympathetic neurons', *J Physiol*.
- Maidment, N. T., Chen, Y., Tan, A. M., Murphy, N. P. and Leslie, F. M. (2002) 'Rat ventral midbrain dopamine neurons express the orphanin FQ/nociceptin receptor ORL-1', *Neuroreport*, 13(9), 1137-40.
- Maie, I. A. and Dickenson, A. H. (2004) 'Cholecystokinin fails to block the spinal inhibitory effects of nociceptin in sham operated and neuropathic rats', *Eur J Pharmacol*, 484(2-3), 235-40.
- Malinowska, B., Godlewski, G. and Schlicker, E. (2002) 'Function of nociceptin and opioid OP4 receptors in the regulation of the cardiovascular system', *J Physiol Pharmacol*, 53(3), 301-24.
- Marti, M., Mela, F., Fantin, M., Zucchini, S., Brown, J. M., Witta, J., Di Benedetto, M., Buzas, B., Reinscheid, R. K., Salvadori, S., Guerrini, R., Romualdi, P., Candeletti, S., Simonato, M., Cox, B. M. and Morari, M. (2005) 'Blockade of nociceptin/orphanin FQ transmission attenuates symptoms and neurodegeneration associated with Parkinson's disease', *J Neurosci*, 25(42), 9591-601.
- Marti, M., Sarubbo, S., Latini, F., Cavallo, M., Eleopra, R., Biguzzi, S., Lettieri, C., Conti, C., Simonato, M., Zucchini, S., Quatrala, R., Sensi, M., Candeletti, S., Romualdi, P. and Morari, M. (2010) 'Brain interstitial nociceptin/orphanin FQ levels are elevated in Parkinson's disease', *Mov Disord*, 25(11), 1723-32.
- Marti, M., Stocchi, S., Paganini, F., Mela, F., De Risi, C., Calo, G., Guerrini, R., Barnes, T. A., Lambert, D. G., Beani, L., Bianchi, C. and Morari, M. (2003) 'Pharmacological profiles of presynaptic nociceptin/orphanin FQ receptors modulating 5-hydroxytryptamine and noradrenaline release in the rat neocortex', *Br J Pharmacol*, 138(1), 91-8.
- Mela, F., Marti, M., Ulazzi, L., Vaccari, E., Zucchini, S., Trapella, C., Salvadori, S., Beani, L., Bianchi, C. and Morari, M. (2004) 'Pharmacological profile of

nociceptin/orphanin FQ receptors regulating 5-hydroxytryptamine release in the mouse neocortex', *Eur J Neurosci*, 19(5), 1317-24.

Meunier, J. C. (1997) 'Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor', *Eur J Pharmacol*, 340(1), 1-15.

Meunier, J. C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J. L., Guillemot, J. C., Ferrara, P., Monsarrat, B. and et al. (1995) 'Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor', *Nature*, 377(6549), 532-5.

Mika, J., Schafer, M. K., Obara, I., Weihe, E. and Przewlocka, B. (2004) 'Morphine and endomorphin-1 differently influence pronociceptin/orphanin FQ system in neuropathic rats', *Pharmacol Biochem Behav*, 78(1), 171-8.

Mogil, J. S. and Pasternak, G. W. (2001) 'The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family', *Pharmacol Rev*, 53(3), 381-415.

Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J. L., Moisand, C., Chalon, P., Caput, D., Vassart, G. and Meunier, J. C. (1994) 'ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization', *FEBS Lett*, 341(1), 33-8.

Mollereau, C., Simons, M. J., Soularue, P., Liners, F., Vassart, G., Meunier, J. C. and Parmentier, M. (1996) 'Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(16), 8666-70.

Montiel, J. L., Cornille, F., Roques, B. P. and Noble, F. (1997) 'Nociceptin/orphanin FQ metabolism: role of aminopeptidase and endopeptidase 24.15', *J Neurochem*, 68(1), 354-61.

Moriyama, K., Liu, J., Jang, Y., Chae, Y. J., Wang, Y., Mitchell, J., Grond, S., Han, X., Xing, Y., Xie, G. X. and Pierce Palmer, P. (2009) 'Receptor mediation and nociceptin inhibition of bradykinin-induced plasma extravasation in the knee joint of the rat', *Inflamm Res*, 58(12), 873-80.

- Mork, H., Hommel, K., Uddman, R., Edvinsson, L. and Jensen, R. (2002) 'Does nociceptin play a role in pain disorders in man?', *Peptides*, 23(9), 1581-7.
- Moskowitz, M. A. (2008) 'Defining a pathway to discovery from bench to bedside: the trigeminovascular system and sensitization', *Headache*, 48(5), 688-90.
- Murphy, N. P., Tan, A. M., Lam, H. A. and Maidment, N. T. (2004) 'Nociceptin/orphanin FQ modulation of rat midbrain dopamine neurons in primary culture', *Neuroscience*, 127(4), 929-40.
- Mustazza, C. and Bastanzio, G. (2011) 'Development of nociceptin receptor (NOP) agonists and antagonists', *Med Res Rev*, 31(4), 605-48.
- Nagy, S. U., Csaba, G. and Bertok, L. (1983) 'Influence of neonatal endotoxin treatment and hormonal imprinting on thyrotropin-induced thyroxin (T4) production of adult rats', *Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 62(2), 151-3.
- Nakagawa, T., Kaneko, M., Inamura, S. and Satoh, M. (1999) 'Intracerebroventricular administration of nocistatin reduces inflammatory hyperalgesia in rats', *Neurosci Lett*, 265(1), 64-6.
- Narayanan, S. and Maidment, N. T. (1999) 'Orphanin FQ and behavioral sensitization to cocaine', *Pharmacol Biochem Behav*, 63(2), 271-7.
- Nazzaro, C., Marino, S., Barbieri, M. and Siniscalchi, A. (2009) 'Inhibition of serotonin outflow by nociceptin/orphaninFQ in dorsal raphe nucleus slices from normal and stressed rats: Role of corticotropin releasing factor', *Neurochem Int*, 54(5-6), 378-84.
- Neal, C. R., Jr., Akil, H. and Watson, S. J., Jr. (2001) 'Expression of orphanin FQ and the opioid receptor-like (ORL1) receptor in the developing human and rat brain', *J Chem Neuroanat*, 22(4), 219-49.
- Nemesánszky, E. (2012) 'A primer biliaris cirrhosis (PBC) korai stádiumban történő felismerésének jelentősége a sikeres kezelés tükrében', [online], available: http://www.gastrouupdate.hu/index.php?option=com_content&view=article&

id=81:a-primer-biliaris-cirrhosis-pbc-korai-stadiumban-toerten-felismeresenek-jelentsege-a-sikeres-kezeles-tuekreben&catid=69:kapcsolodo-cikkek&Itemid=91 [accessed 2010].

- Nemeth, J., Helyes, Z., Oroszi, G., Than, M., Pinter, E. and Szolcsanyi, J. (1998) 'Inhibition of nociceptin on sensory neuropeptide release and mast cell-mediated plasma extravasation in rats', *Eur J Pharmacol*, 347(1), 101-4.
- New, D. C. and Wong, Y. H. (2002) 'The ORL1 receptor: molecular pharmacology and signalling mechanisms', *Neurosignals*, 11(4), 197-212.
- Nicol, B., Lambert, D. G., Rowbotham, D. J., Smart, D. and McKnight, A. T. (1996) 'Nociceptin induced inhibition of K⁺ evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices', *Br J Pharmacol*, 119(6), 1081-3.
- Noble, F. and Roques, B. P. (1997) 'Association of aminopeptidase N and endopeptidase 24.15 inhibitors potentiate behavioral effects mediated by nociceptin/orphanin FQ in mice', *FEBS Lett*, 401(2-3), 227-9.
- Norton, C. S., Neal, C. R., Kumar, S., Akil, H. and Watson, S. J. (2002) 'Nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor-like receptor mRNA expression in dopamine systems', *J Comp Neurol*, 444(4), 358-68.
- Nothacker, H. P., Reinscheid, R. K., Mansour, A., Henningsen, R. A., Ardati, A., Monsma, F. J., Jr., Watson, S. J. and Civelli, O. (1996) 'Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(16), 8677-82.
- Okuda-Ashitaka, E. and Ito, S. (2000) 'Nocistatin: a novel neuropeptide encoded by the gene for the nociceptin/orphanin FQ precursor', *Peptides*, 21(7), 1101-9.
- Okuda-Ashitaka, E., Minami, T., Tachibana, S., Yoshihara, Y., Nishiuchi, Y., Kimura, T. and Ito, S. (1998) 'Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission', *Nature*, 392(6673), 286-9.

- Okuda-Ashitaka, E., Minami, T., Tsubouchi, S., Kiyonari, H., Iwamatsu, A., Noda, T., Handa, H. and Ito, S. (2012) 'Identification of NIPSNAP1 as a nocistatin-interacting protein involving pain transmission', *J Biol Chem*, 287(13), 10403-13.
- Pennock, R. L., Dicken, M. S. and Hentges, S. T. (2012) 'Multiple inhibitory g-protein-coupled receptors resist acute desensitization in the presynaptic but not postsynaptic compartments of neurons', *J Neurosci*, 32(30), 10192-200.
- Pollard, H., Bischoff, S., Llorens-Cortes, C. and Schwartz, J. C. (1976) 'Histidine decarboxylase and histamine in discrete nuclei of rat hypothalamus and the evidence for mast-cells in the median eminence', *Brain Res*, 118(3), 509-13.
- Prins, G. S., Tang, W. Y., Belmonte, J. and Ho, S. M. (2008) 'Perinatal exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis', *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 102(2), 134-8.
- Reinscheid, R. K., Nothacker, H. P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R. A., Bunzow, J. R., Grandy, D. K., Langen, H., Monsma, F. J., Jr. and Civelli, O. (1995) 'Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor', *Science*, 270(5237), 792-4.
- Reis, G. M., Rossaneis, A. C., Silveira, J. W., Dias, Q. M. and Prado, W. A. (2011) 'Stimulation-produced analgesia from the occipital or retrosplenial cortex of rats involves serotonergic and opioid mechanisms in the anterior pretectal nucleus', *J Pain*, 12(5), 523-30.
- Rominger, A., Forster, S., Zentner, J., Dooley, D. J., McKnight, A. T., Feuerstein, T. J., Jackisch, R. and Vlaskovska, M. (2002) 'Comparison of the ORL1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in human and rat neocortical slices', *Br J Pharmacol*, 135(3), 800-6.
- Rooszendaal, B., Lengvilas, R., McGaugh, J. L., Civelli, O. and Reinscheid, R. K. (2007) 'Orphanin FQ/nociceptin interacts with the basolateral amygdala

noradrenergic system in memory consolidation', *Learn Mem*, 14(1-2), 29-35.

Sakurada, K., Matsubara, K., Shimizu, K., Shiono, H., Seto, Y., Tsuge, K., Yoshino, M., Sakai, I., Mukoyama, H. and Takatori, T. (2003) 'Pralidoxime iodide (2-pAM) penetrates across the blood-brain barrier', *Neurochem Res*, 28(9), 1401-7.

Sakurada, S., Watanabe, H., Mizoguchi, H., Yonezawa, A., Orito, T., Katsuyama, S., Kuramasu, A., Sakurada, C., Yanai, K. and Sakurada, T. (2004) 'Involvement of the histaminergic system in the nociceptin-induced pain-related behaviors in the mouse spinal cord', *Pain*, 112(1-2), 171-82.

Salganik, R. I., Griaznova, I. M., Markel, A. L. and Baginskaia, N. V. (1978) '[Effect of cortisol administration and stress actions in early ontogeny on hormonal induction in adult rats]', *Ontogenez*, 9(2), 193-7.

Salvadori, S., Guerrini, R., Calo, G. and Regoli, D. (1999) 'Structure-activity studies on nociceptin/orphanin FQ: from full agonist, to partial agonist, to pure antagonist', *Farmaco*, 54(11-12), 810-25.

Sbrenna, S., Marti, M., Morari, M., Calo, G., Guerrini, R., Beani, L. and Bianchi, C. (2000) 'Modulation of 5-hydroxytryptamine efflux from rat cortical synaptosomes by opioids and nociceptin', *Br J Pharmacol*, 130(2), 425-33.

Schlicker, E. and Morari, M. (2000) 'Nociceptin/orphanin FQ and neurotransmitter release in the central nervous system', *Peptides*, 21(7), 1023-9.

Schlicker, E., Werthwein, S., Kathmann, M. and Bauer, U. (1998) 'Nociceptin inhibits noradrenaline release in the mouse brain cortex via presynaptic ORL1 receptors', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 358(4), 418-22.

Seo, Y. J., Kwon, M. S., Choi, S. M., Lee, J. K., Park, S. H., Jung, J. S., Sim, Y. B. and Suh, H. W. (2011) 'Differential cross-tolerance development between single and repeated immobilization stress on the antinociceptive effect induced by beta-endorphin, 5-hydroxytryptamine, morphine, and

WIN55,212-2 in the inflammatory mouse pain mode', *Arch Pharm Res*, 34(2), 269-80.

Serrano-Gomez, A., Thompson, J. P. and Lambert, D. G. (2011) 'Nociceptin/orphanin FQ in inflammation and sepsis', *Br J Anaesth*, 106(1), 6-12.

Sherlock, S. (1959) 'Primary billiary cirrhosis (chronic intrahepatic obstructive jaundice)', *Gastroenterology*, 37, 574-86.

Shieh, K. and Pan, J. (2001) 'Effects of orphanin FQ on central dopaminergic neuronal activities and prolactin secretion', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280(3), R705-12.

Simonsen, U., Laursen, B. E. and Petersen, J. S. (2008) 'ZP120 causes relaxation by pre-junctional inhibition of noradrenergic neurotransmission in rat mesenteric resistance arteries', *Br J Pharmacol*, 153(6), 1185-94.

Siniscalchi, A., Rodi, D., Beani, L. and Bianchi, C. (1999) 'Inhibitory effect of nociceptin on [3H]-5-HT release from rat cerebral cortex slices', *Br J Pharmacol*, 128(1), 119-23.

Siniscalchi, A., Rodi, D., Morari, M., Marti, M., Cavallini, S., Marino, S., Beani, L. and Bianchi, C. (2002) 'Direct and indirect inhibition by nociceptin/orphanin FQ on noradrenaline release from rodent cerebral cortex in vitro', *Br J Pharmacol*, 136(8), 1178-84.

Spadaro, A., Ajello, A., Luigiano, C., Morace, C., Resta, M. L., Berlinghieri, G., Campo, S., Scisca, C., Alibrandi, A., D'Arrigo, G., Alessi, N., Ferrau, O. and Freni, M. A. (2006) 'Low utility of plasma Nociceptin/orphanin FQ in the diagnosis of hepatocellular carcinoma', *World J Gastroenterol*, 12(29), 4716-20.

Stamer, U. M., Book, M., Comos, C., Zhang, L., Nauck, F. and Stuber, F. (2011) 'Expression of the nociceptin precursor and nociceptin receptor is modulated in cancer and septic patients', *Br J Anaesth*, 106(4), 566-72.

- Sun, R. Q., Wang, Y., Zhao, C. S., Chang, J. K. and Han, J. S. (2001a) 'Changes in brain content of nociceptin/orphanin FQ and endomorphin 2 in a rat model of neuropathic pain', *Neurosci Lett*, 311(1), 13-6.
- Sun, R. Q., Zhao, C. S., Wang, H. J., Jing, Z., Wang, W., Yang, K., Wang, Y., Chang, J. K. and Han, J. S. (2001b) 'Nocistatin, a peptide reversing acute and chronic morphine tolerance', *Neuroreport*, 12(8), 1789-92.
- Szalay, F., Hantos, M. B., Horvath, A., Lakatos, P. L., Folhoffer, A., Dunkel, K., Hegedus, D. and Tekes, K. (2004) 'Increased nociceptin/orphanin FQ plasma levels in hepatocellular carcinoma', *World J Gastroenterol*, 10(1), 42-5.
- Szegi, P., Kalasz, H., Laufer, R., Kuca, K. and Tekes, K. (2010) 'Pyridinium aldoxime analysis by HPLC: the method for studies on pharmacokinetics and stability', *Anal Bioanal Chem*, 397(2), 579-86.
- Tajti, J. and Vecsei, L. (2009) '[The mechanism of peripheral and central sensitization in migraine. A literature review]', *Neuropsychopharmacol Hung*, 11(1), 15-21.
- Tallent, M. K., Madamba, S. G. and Siggins, G. R. (2001) 'Nociceptin reduces epileptiform events in CA3 hippocampus via presynaptic and postsynaptic mechanisms', *J Neurosci*, 21(17), 6940-8.
- Tao, R. and Auerbach, S. B. (2005) 'mu-Opioids disinhibit and kappa-opioids inhibit serotonin efflux in the dorsal raphe nucleus', *Brain Res*, 1049(1), 70-9.
- Tao, R., Ma, Z., Thakkar, M. M., McCarley, R. W. and Auerbach, S. B. (2007) 'Nociceptin/orphanin FQ decreases serotonin efflux in the rat brain but in contrast to a kappa-opioid has no antagonistic effect on mu-opioid-induced increases in serotonin efflux', *Neuroscience*, 147(1), 106-16.
- Taylor, K. M. and Snyder, S. H. (1972) 'Isotopic microassay of histamine, histidine, histidine decarboxylase and histamine methyltransferase in brain tissue', *J Neurochem*, 19(5), 1343-58.

- Tekes, K., Gyenge, M., Folyovich, A. and Csaba, G. (2009a) 'Influence of neonatal vitamin A or vitamin D treatment on the concentration of biogenic amines and their metabolites in the adult rat brain', *Horm Metab Res*, 41(4), 277-80.
- Tekes, K., Gyenge, M., Hantos, M. and Csaba, G. (2009b) 'Transgenerational hormonal imprinting caused by vitamin A and vitamin D treatment of newborn rats. Alterations in the biogenic amine contents of the adult brain', *Brain Dev*, 31(9), 666-70.
- Tekes, K., Gyenge, M., Sotonyi, P. and Csaba, G. (2009c) 'Effect of neonatal nociceptin or nocistatin imprinting on the brain concentration of biogenic amines and their metabolites', *Brain Dev*, 31(4), 282-7.
- Tekes, K., Hantos, M., Bator, G., Gyenge, M., Laufer, R. and Folyovich, A. (2006a) '[Endogenous nociceptin level in ischemic stroke: connection to serotonin system]', *Neuropsychopharmacol Hung*, 8(2), 53-9.
- Tekes, K., Hantos, M., Bizderi, B., Gyenge, M., Kecskemeti, V. and Huszti, Z. (2005a) 'Stimulating effect of nociceptin on histamine release in the rat brain?', *Inflamm Res*, 54 Suppl 1, S38-9.
- Tekes, K., Hantos, M., Bizderi, B., Gyenge, M., Kecskemeti, V. and Huszti, Z. (2006b) 'Nociceptin-induced histamine release in the brain: comparison with compound 48/80- and substance P-induced amine secretions', *Inflamm Res*, 55 Suppl 1, S30-1.
- Tekes, K., Hantos, M. and Csaba, G. (2004) 'Single neonatal treatment with beta-endorphin (hormonal imprinting) extremely enhances nocistatin level of cerebrospinal fluid in adult rats', *Life Sci*, 74(16), 1993-7.
- Tekes, K., Hantos, M., Gyenge, M., Bizderi, B. and Kecskemeti, V. (2005b) 'Diabetes and endogenous orphanin FQ/nociceptin levels in rat CSF and plasma.', *International Journal of Diabetes and Metabolism*, 13(3), 147-153.

- Tekes, K., Hantos, M., Gyenge, M. and Csaba, G. (2007a) 'Perinatal alcohol exposure enhances nocistatin levels in adulthood', *Addict Biol*, 12(2), 173-5.
- Tekes, K., Hantos, M., Gyenge, M., Karabelyos, C. and Csaba, G. (2006c) 'Prolonged effect of stress at weaning on the brain serotonin metabolism and sexuality of female rats', *Horm Metab Res*, 38(12), 799-802.
- Tekes, K., Hasan, M. Y., Sheen, R., Kuca, K., Petroianu, G., Ludanyi, K. and Kalasz, H. (2006d) 'High-performance liquid chromatographic determination of the plasma concentration of K-27, a novel oxime-type cholinesterase reactivator', *J Chromatogr A*, 1122(1-2), 84-7.
- Tekes, K., Szegi, P., Laufer, R., Hantos, M. and Csaba, G. (2011) 'Effect of perinatal stress on the biogenic amine neurotransmitter level of the adult rat's brain', *Int J Dev Neurosci*, 29(2), 171-5.
- Tekes, K., Tothfalusi, L., Hantos, M. and Csaba, G. (2007b) 'Effect of neonatal benzpyrene imprinting on the brain serotonin content and nocistatin level in adult male rats', *Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 94(3), 183-9.
- Thompson, A. A., Liu, W., Chun, E., Katritch, V., Wu, H., Vardy, E., Huang, X. P., Trapella, C., Guerrini, R., Calo, G., Roth, B. L., Cherezov, V. and Stevens, R. C. (2012) 'Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic', *Nature*, 485(7398), 395-9.
- Ueda, H., Inoue, M., Takeshima, H. and Iwasawa, Y. (2000) 'Enhanced spinal nociceptin receptor expression develops morphine tolerance and dependence', *J Neurosci*, 20(20), 7640-7.
- Volta, M., Viaro, R., Trapella, C., Marti, M. and Morari, M. (2011) 'Dopamine-nociceptin/orphanin FQ interactions in the substantia nigra reticulata of hemiparkinsonian rats: involvement of D2/D3 receptors and impact on nigro-thalamic neurons and motor activity', *Exp Neurol*, 228(1), 126-37.

- Wang, J. B., Johnson, P. S., Imai, Y., Persico, A. M., Ozenberger, B. A., Eppler, C. M. and Uhl, G. R. (1994) 'cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant', *FEBS Lett*, 348(1), 75-9.
- Wei, Y., Ouyang, D., Liu, Y., Chang, Z., Tang, J. and Ding, J. (1999) 'Peripheral tissue distribution of orphanin FQ precursor mRNA in stroke-prone spontaneously hypertensive rats', *Chin Med Sci J*, 14(2), 67-70.
- Werthwein, S., Bauer, U., Nakazi, M., Kathmann, M. and Schlicker, E. (1999) 'Further characterization of the ORL1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the mouse brain in vitro', *Br J Pharmacol*, 127(1), 300-8.

- Williams, J. P., Thompson, J. P., McDonald, J., Barnes, T. A., Cote, T., Rowbotham, D. J. and Lambert, D. G. (2007) 'Human peripheral blood mononuclear cells express nociceptin/orphanin FQ, but not mu, delta, or kappa opioid receptors', *Anesth Analg*, 105(4), 998-1005, table of contents.
- Williams, J. P., Thompson, J. P., Rowbotham, D. J. and Lambert, D. G. (2008) 'Human peripheral blood mononuclear cells produce pre-pro-nociceptin/orphanin FQ mRNA', *Anesth Analg*, 106(3), 865-6, table of contents.
- Witta, J., Palkovits, M., Rosenberger, J. and Cox, B. M. (2004) 'Distribution of nociceptin/orphanin FQ in adult human brain', *Brain Res*, 997(1), 24-9.
- Yamamoto, T. and Sakashita, Y. (1999) 'Effect of nocistatin and its interaction with nociceptin/orphanin FQ on the rat formalin test', *Neurosci Lett*, 262(3), 179-82.
- Yamazaki, T., Akiyama, T. and Mori, H. (2001) 'Effects of nociceptin on cardiac norepinephrine and acetylcholine release evoked by ouabain', *Brain Res*, 904(1), 153-6.
- Zadori, Z. S., Shujaa, N., Koles, L., Kiraly, K. P., Tekes, K. and Gyires, K. (2008) 'Nocistatin and nociceptin given centrally induce opioid-mediated gastric mucosal protection', *Peptides*, 29(12), 2257-65.
- Zaveri, N. (2003) 'Peptide and nonpeptide ligands for the nociceptin/orphanin FQ receptor ORL1: research tools and potential therapeutic agents', *Life Sci*, 73(6), 663-78.
- Zaveri, N. T. (2011) 'The nociceptin/orphanin FQ receptor (NOP) as a target for drug abuse medications', *Curr Top Med Chem*, 11(9), 1151-6.
- Zeilhofer, H. U., Selbach, U. M., Guhring, H., Erb, K. and Ahmadi, S. (2000) 'Selective suppression of inhibitory synaptic transmission by nocistatin in the rat spinal cord dorsal horn', *J Neurosci*, 20(13), 4922-9.

9. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

9.1 Klinikai anyagon végzett vizsgálatok

1. Csobay-Novák C, Sótonyi P, Krepuska M, Zima E, Szilágyi N, Tóth S, Szeberin Z, Acsády G, Merkely B, **Tekes K.**:Decreased plasma nociceptin/orphanin FQ levels after acute coronary syndromes. Acta Physiol Hung. 2012 Jun;99(2):99-110
IF: 0.821
2. Krepuska M, Sotonyi P, Csobay-Novák Cs, Szeberin Z, Hartyánszky I, Zima E, Szilagyi N, Horkay F, Merkely B, Acsády Gy, **Tekes K**
Plasma nociceptin/orphanin FQ levels are lower in patients with chronic ischemic cardiovascular diseases-A pilot study
REGULATORY PEPTIDES 169:(1-3) pp. 1-5. (2011)
IF: 2.110
3. **Tekes K**, Hantos M, Bátor G, Gyenge M, Laufer R, Folyovich A
Endogenous nociceptin level in ischemic stroke: connection to serotonin system: Endogén nociceptin-szint vizsgálatok ischémiás stroke-ban: a nociceptinerg rendszer kapcsolata a szerotonerg rendszerrel.
NEUROPSYCHOPHARMACOLOGIA HUNGARICA 8:(2) pp. 53-59. (2006)
Függő idéző: 1 Összesen:
4. Ertsey C, Hantos M, Bozsik G, **Tekes K**
Plasma nociceptin levels are reduced in migraine without aura
CEPHALALGIA 25:(4) pp. 261-266. (2005)
IF: 4.657
Független idéző: 11 Függő idéző: 1 Összesen: 12

5. Ertsey C, Hantos M, Bozsik G, **Tekes K**
Circulating nociceptin levels during the cluster headache period
CEPHALALGIA 24:(4) pp. 280-283. (2004)
IF: 3.133
Független idéző: 12 Függő idéző: 2 Összesen: 14
6. Horváth A, Folhoffer A, Lakatos PL, Halász J, Illyés Gy, Schaff Zs, Hantos MB, **Tekes K**, Szalay F
Rising plasma nociceptin level during development of HCC: A case report
WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 10: pp. 152-154. (2004)
Független idéző: 8 Függő idéző: 2 Összesen: 10
7. Szalay F, Hantos MB, Horvath A, Lakatos PL, Folhoffer A, Dunkel K, Hegedus D, **Tekes K**
Increased nociceptin/norphanin FQ plasma levels in hepatocellular carcinoma.
WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 10: pp. 42-45. (2004)
Független idéző: 14 Függő idéző: 1 Összesen: 15
8. Hantos MB, **Tekes K**, Szalay F.:Perifériás nociceptin szint Wilson kórban
Acta Pharm Hung. 2002;72(4):260-4.
9. Hantos M B, Szalay F, Lakatos P L, Hegedus D, Firneisz G, Reiczigel J, Török T, **Tekes K**
Elevated plasma nociceptin level in patients with Wilson disease
BRAIN RESEARCH BULLETIN 58:(3) pp. 311-313. (2002)
IF: 2.283
Független idéző: 13 Függő idéző: 7 Összesen: 20

9.2. Állatkísérletes munkákból készült közlemények

10. Szegi P, Kalász H, Laufer R, Kuca K, **Tekes K**
Pyridinium aldoxime analysis by HPLC: The method for studies on pharmacokinetics and stability
ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY 397:(2) pp. 579-586.

(2010)

IF: 3.841

11. Laufer R, Kalász H, Musilek K, Szegi P, Darvas F, Kuca K, **Tekes K**
Synthesis, antidotal effects and HPLC behavior of some novel pyridinium
aldoximes
CURRENT ORGANIC CHEMISTRY 14:(5) pp. 447-456. (2010)
IF: 2.920
Független idéző: 3 Függő idéző: 3 Összesen: 6

12. Kalasz H, Szoko E, Tabi T, Petroianu GA, Lorke DE, Omar A, Alafifi S,
Jasem A, **Tekes K**
Analysis of Pralidoxime in Serum, Brain and CSF of Rats
MEDICINAL CHEMISTRY 5:(3) pp. 237-241. (2009)
IF: 1.642
Független idéző: 6 Függő idéző: 3 Összesen: 9

13. Csermely T, Kalasz H, Petroianu GA, Kuca K, Darvas F, Ludanyi K,
Mudhafar AA, **Tekes K**
Analysis of pyridinium aldoximes - a chromatographic approach.
CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 15:(23) pp. 2401-2418. (2008)
IF: 4.823
Független idéző: 3 Függő idéző: 7 Összesen: 10

14. **Tekes K**, Gyenge M, Sótónyi P, Csaba G
Effect of neonatal nociceptin or nocistatin imprinting on the brain
concentration of biogenic amines and their metabolites
BRAIN & DEVELOPMENT 31:(4) pp. 282-287. (2009)
IF: 1.743
Független idéző: 2 Függő idéző: 3 Összesen: 5

15. Lorke D E, Kalasz H, Petroianu G A, **Tekes K**
Entry of oximes into the brain: A review
CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 15:(8) pp. 743-753. (2008)
IF: 4.823
Független idéző: 37 Függő idéző: 12 Összesen: 49

16. **Tekes K**, Gyenge M, Hantos M, Csaba C
Effect of β -endorphin imprinting during late pregnancy on the brain serotonin and plasma nocistatin levels of adult male rats
HORMONE AND METABOLIC RESEARCH 39:(7) pp. 479-481. (2007)
IF: 2.254
Független idéző: 2 Függő idéző: 3 Összesen: 5
17. Gyenge M, Kalász H, Petroianu G A, Laufer R, Kuca K, **Tekes K**
Measurement of K-27, an oxime-type cholinesterase reactivator by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection from different biological samples
JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A 1161:(1-2) pp. 146-151. (2007)
IF: 3.641
Független idéző: 3 Függő idéző: 15 Összesen: 18
18. Gyenge M, Hantos M, Laufer R, **Tekes K**
Effect of nociceptin on histamine and serotonin release in the central nervous system: A nociceptin hatása a hisztamin és szerotonin kiáramlásra a központi idegrendszerben
ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA 76:(3) pp. 127-132. (2006)
Független idéző: 3 Függő idéző: 1 Összesen: 4
19. Gyenge M, Bátor Gy, Hantos M, Bizderi B, **Tekes K.**: A nociceptinerg és a hisztaminerg rendszer kapcsolatának vizsgálata hím Wistar patkányokon. Orvostudományi Értesítő (EME), 2005, 78:61-65.
20. **Tekes K**, Hasan M Y, Sheen R, Kuca K, Petroianu G, Ludányi K, Kalász H
High-performance liquid chromatographic determination of the plasma concentration of K-27, a novel oxime-type cholinesterase reactivator
JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A 1122:(1-2) pp. 84-87. (2006)
IF: 3.554
Független idéző: 5 Függő idéző: 21 Összesen: 26
21. **Tekes K**, Hantos M, Bizderi B, Gyenge M, Kecskeméti V, Huszti Z
Nociceptin-induced histamine release in the brain: Comparison with compound 48/80- and substance P-induced amine secretions

INFLAMMATION RESEARCH 55:(SUPPL. 1) pp. S30-S31. (2006)

Független idéző: 1 Összesen: 1

22. Csaba G, **Tekes K**

Is the brain hormonally imprintable?

BRAIN & DEVELOPMENT 27:(7) pp. 465-471. (2005)

IF: 1.452

Független idéző: 3 Függő idéző: 9 Összesen: 12

23. **Tekes K**, Hantos M, Bizderi B, Gyenge M, Kecskeméti V, Huszti Z

Stimulating effect of nociceptin on histamine release in the rat brain?

INFLAMMATION RESEARCH 54:(SUPPL. 1) pp. S38-S39. (2005)

33. Meeting of the European Histamine Research , Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Germany, April 28. - May 2. 2004.

Független idéző: 2 Függő idéző: 2 Összesen: 4

24. **Tekes K**, Hantos M, Gyenge M, Bizderi B, Kecskeméti V

Diabetes and endogenous orphanin FQ/nociceptin levels in rat CSF and plasma

INTERNATIONAL JOURNAL OF DIABETES AND

METABOLISM 13:(3) pp. 147-153. (2005)

Függő idéző: 2 Összesen: 2

25. Csaba G, Knippel B, Karabélyos CS, Inczefy-Gonda A, Hantos M, **Tekes K**

Endorphin excess at weaning durably influences sexual activity, uterine estrogen receptor's binding capacity and brain serotonin level of female rats

HORMONE AND METABOLIC RESEARCH 36: pp. 39-43. (2004)

IF: 1.946

Független idéző: 1 Függő idéző: 10 Összesen: 11

26. **Tekes K**, Hantos M, Csaba G

Single neonatal treatment with β -endorphin (hormonal imprinting) extremely enhances nocistatin level of cerebrospinal fluid in adult rats

LIFE SCIENCES 74:(16) pp. 1993-1997. (2004)

IF: 2.158

Független idéző: 4 Függő idéző: 12 Összesen: 16

27. Csaba G, Knippel B, Karabélyos C, Inczeffi-Gonda A, Hantos M, Tóthfalusi L, **Tekes K**

Effect of neonatal beta-endorphin imprinting on sexual behavior and brain serotonin level in adult rats

LIFE SCIENCES 73:(1) pp. 103-114. (2003)

IF: 1.944

Független idéző: 1 Függő idéző: 20 Összesen: 21

**10. A DOKTORI ÉRTEKEZÉSBEN NEM SZEREPLŐ, AZ
ORVOSTUDOMÁNY KANDIDÁTUSA FOKOZAT
MEGSZERZÉSE UTÁN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK
JEGYZÉKE (LEZÁRVA 2012. JÚLIUS 15.)**

1. Arato M, **Tekes K**, Tothfalusi L, Magyar K, Palkovits M, Frecska E, Falus A, MacCrimmon DJ
Reversed hemispheric asymmetry of imipramine binding in suicide victims
BIOLOGICAL PSYCHIATRY 29:(7) pp. 699-702. (1991)
IF: 2.300
Független idéző: 38 Függő idéző: 2 Összesen: 40
2. Arato M, Frecska E, **Tekes K**, MacCrimmon D J
Serotonergic interhemispheric asymmetry: Gender difference in the orbital cortex
ACTA PSYCHIATRICA SCANDINAVICA 84:(1) pp. 110-111. (1991)
IF: 0.984
Független idéző: 52 Függő idéző: 3 Összesen: 55
3. Arato M, Frecska E, MacCrimmon D J, Guscott R, Saxena B, **Tekes K**, Tothfalusi L
Serotonergic interhemispheric asymmetry: Neurochemical and pharmac-EEG evidence
PROGRESS IN NEURO-PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY 15:(6) pp. 759-764. (1991)
IF: 0.891
Független idéző: 44 Függő idéző: 1 Összesen: 45
4. Faludi G, **Tekes K**
Platelet 3H-imipramine binding in major depressive episodes
EUROPEAN PSYCHIATRY 6:(2) pp. 73-78. (1991)

5. Gyertyan I, Petocz L, Gacsalyi I, Fekete M I K, **Tekes K**, Kapolnai L
Psychopharmacological effects of an imino-thiazolidine derivative
antidepressant candidate, EGYT-4201
DRUG DEVELOPMENT RESEARCH 22:(4) pp. 385-399. (1991)
IF: 1.322
Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3
6. Malomvolgyi B, Tothfalusi L, **Tekes K**, Magyar K
Comparison of Serotonin Agonistic And Antagonistic Activities of A New
Antidepressant Agent Trelibet (egyt-475) And Its Metabolite Egyt-2760 ON
Isolated Rat Fundus
ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 78:(3) pp. 201-209. (1991)
IF: 0.228
Független idéző: 11 Összesen: 11
7. **Tekes K**, Faludi G
Platelet serotonin transport of drug-free panic disorder patients
PHARMACOLOGICAL RESEARCH 25:(SUPPL. 2) pp. 216-217. (1992)
8. Timar J, Gyarmati Z, **Tekes K**, Harsing G L, Knoll J
Further proof that (-)deprenyl fails to facilitate mesolimbic dopaminergic
activity
PHARMACOLOGY BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR 46:(3) pp. 709-
714. (1993)
IF: 1.529
Független idéző: 7 Függő idéző: 3 Összesen: 10
9. Faludi G, **Tekes K**, Tothfalusi L
Comparative study of platelet 3H-paroxetine and 3H-imipramine binding in
panic disorder patients and healthy controls
JOURNAL OF PSYCHIATRY & NEUROSCIENCE 19:(2) pp. 109-
113. (1994)
IF: 0.923
Független idéző: 26 Összesen: 26

10. Borcsiczky D, Szalay F, **Tekes K**, Tarcali J, Magyar K, deChatel R
Platelet serotonin (5-HT) content is decreased in patients with alcoholic liver cirrhosis, but elevated in Gilbert's syndrome.
JOURNAL OF HEPATOLOGY 25:(5) pp. 781-782. (1996)
Független idéző: 7 Összesen: 7
11. Kecskeméti V, Pacher P, Szalai G, Wollak I, **Tekes K**, Posa I, Kocsis E
Electrophysiological characteristics of ventricular muscles from diabetic hearts
ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 84:(3) pp. 295-296. (1996)
12. Magyar K, Szende B, Lengyel J, **Tekes K**
The pharmacology of B-type selective monoamine oxidase inhibitors; milestones in (-)-deprenyl research
JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION-SUPPLEMENT 48: pp. 29-43. (1996)
IF: 1.195
Független idéző: 22 Függő idéző: 11 Összesen: 33
13. Malomvölgyi B, Koltai M, **Tekes K**, Hadházy P, Magyar K
Bradykinin vazorelaxáns hatása izolált kutya renalis artériában és perfundált kutya vesében
GYÓGYSZERÉSZET 40:(7) pp. 484-485. (1996)
14. Malomvölgyi B, Hadházy P, **Tekes K**, Koltai M Zs, Pogátsa G
Comparison of the vasodilatory effects of bradykinin in isolated dog renal arteries and in buffer-perfused dog kidneys
ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 84:(1) pp. 9-18. (1996)
Független idéző: 2 Összesen: 2
15. Hrdina P, Faludi G, Li Q, Bendotti C, **Tekes K**, Sotonyi P, Palkovits M
Growth-associated protein (GAP-43), its mRNA, and protein kinase C (PKC) isoenzymes in brain regions of depressed suicides
MOLECULAR PSYCHIATRY 3:(5) pp. 411-418. (1998)
IF: 4.756
Független idéző: 31 Függő idéző: 1 Összesen: 32

16. Mészáros ZS, Borcsiczky D, Máté M, Tarcali J, **Tekes K**, Magyar K
MAO inhibitory side effects of neuroleptics and platelet serotonin content
in schizophrenic patients
JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION-SUPPLEMENT 52: pp. 79-
85. (1998)
Független idéző: 7 Összesen: 7
17. Mészáros ZS, Borcsiczky D, Máté M, Tarcali J, Szombathy T, **Tekes K**,
Magyar K
Platelet MAO-B activity and serotonin content in patients with dementia:
effect of age, medication and disease
NEUROCHEMICAL RESEARCH 23:(6) pp. 863-868. (1998)
IF: 1.677
Független idéző: 11 Összesen: 11
18. Pacher P, Ungvari Z, Timar J, Gyarmati S, **Tekes K**, Kecskeméti V
Cardiac electrophysiology of chronic fluoxetine treatment in diabetic rats
MEDICAL SCIENCE MONITOR-INTERNATIONAL MEDICAL JOURNAL
FOR EXPERIMENTAL AND CLINICAL RESEARCH 4:(2) pp. 202-
208. (1998)
19. **Tekes K**, Magyar K
Effect of MAO inhibitors of the high-affinity reuptake of biogenic amines in
rat subcortical regions.
NEUROBIOLOGY - BUDAPEST 8:(3-4) pp. 257-264. (2000)
Független idéző: 5 Függő idéző: 1 Összesen: 6
20. Kecskeméti V, Pacher P, Ungvári Z, **Tekes K**, Koller Á
The role of NO in altered sensitivity of vascular preparations to drugs in
diabetic animals
In: Gryglewski R, Minuz P (szerk.)
Nitric Oxide: Basic Research and Clinical Applications: Proceedings of the
NATO Advanced Study Institution
Amsterdam: IOS Press, 2001. pp. 199-200.
(ISBN:1-58603-164-3)

21. Szökő É, Haberle D, Halász A S, **Tekes K**, Magyar K
Protective effect of 7-nitroindazole against DSP-4 induced noradrenaline depletion in mouse hippocampus
JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION 108:(4) pp. 407-413. (2001)
IF: 1.862
Független idéző: 1 Összesen:
22. Csaba G, Knippel B, Karabélyos C, Inczeffi-Gonda A, Hantos M, **Tekes K**
Impact of single neonatal serotonin treatment (hormonal imprinting) on the brain-serotonin content and sexual behavior of adult rats
LIFE SCIENCES 73: pp. 2703-2711. (2003)
IF: 1.944
Független idéző: 2 Függő idéző: 5 Összesen: 7
23. Kalász H, Hasan M Y, Sheen R, Kuca K, Petroianu G, Ludányi K, Gergely A, **Tekes K**
HPLC analysis of K-48 concentration in plasma
ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY 385:(6) pp. 1062-1067. (2006)
IF: 2.591
Független idéző: 7 Függő idéző: 24 Összesen: 31
24. Kóti J, Háda V, Petroianu G, Hasan M Y, **Tekes K**, Szücs Z, Kalász H
Monitoring the metabolism of moexipril to moexiprilat using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry
JOURNAL OF CHROMATOGRAPHIC SCIENCE 44:(4) pp. 214-218. (2006)
IF: 0.880
Független idéző: 4 Függő idéző: 1 Összesen: 5
25. **Tekes K**, Hantos M, Gyenge M, Karabélyos Cs, Csaba G
Prolonged effect of stress at weaning on the brain serotonin metabolism and sexuality of female rats
HORMONE AND METABOLIC RESEARCH 38:(12) pp. 799-802. (2006)

IF: 1.997

Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2

26. Benko B, Kalász H, Ludányi K, Petroianu G, Kuca K, Darvas F, **Tekes K**

In vitro and in vivo metabolisms of K-48

ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY 389:(4) pp. 1243-1247. (2007)

IF: 2.867

Független idéző: 2 Függő idéző: 6 Összesen: 8

27. Kalász H, Petroianu G, **Tekes K**, Klebovich I, Ludányi K, Gulyás Zs

Metabolism of moexipril to moexiprilat: Determination of in vitro metabolism using HPLC-ES-MS

MEDICINAL CHEMISTRY 3:(1) pp. 101-106. (2007)

Független idéző: 4 Függő idéző: 3 Összesen: 7

28. **Tekes K**, Tóthfalusi L, Hantos M, Csaba G

Effect of neonatal benzpyrene imprinting on the brain serotonin content and nocistatin level in adult male rats

ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 94:(3) pp. 183-189. (2007)

IF: 0.453

Független idéző: 2 Függő idéző: 2 Összesen: 4

29. **Tekes K**, Hantos M, Gyenge M, Csaba G

Perinatal alcohol exposure enhances nocistatin levels in adulthood

ADDICTION BIOLOGY 12:(2) pp. 173-175. (2007)

IF: 2.833

Függő idéző: 3 Összesen: 3

30. Kalász H, Laufer R, Szegi P, Kuca K, Musilek K, **Tekes K**

HPLC study of the pharmacokinetics of K-203

ACTA CHROMATOGRAPHICA 20:(4) pp. 575-584. (2008)

IF: 0.621

Független idéző: 1 Függő idéző: 5 Összesen: 6

31. **Tekes K**

HPLC determination of serotonin and its metabolites from human platelet-rich plasma; shift to 5-hydroxytryptophol formation following alcohol consumption

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHIC SCIENCE 46:(2) pp. 169-173. (2008)

IF: 1.135

Független idéző: 3 Összesen: 3

32. Zadori ZS, Shujaa N, Koles L, Kiraly KP, **Tekes K**, Gyires K

Nocistatin and nociceptin given centrally induce opioid-mediated gastric mucosal protection

PEPTIDES 29:(12) pp. 2257-2265. (2008)

IF: 2.565

Független idéző: 4 Függő idéző: 2 Összesen: 6

33. Csaba G, **Tekes K**, Pállinger É

Influence of Perinatal Stress on the Hormone Content in Immune Cells of Adult Rats: Dominance of ACTH

HORMONE AND METABOLIC RESEARCH 41:(8) pp. 617-620. (2009)

IF: 2.686

Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2

34. Kalász H, Benko B, Gulyás Zs, **Tekes K**

Lipophilicity determination using both TLC and calculations

JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY & RELATED TECHNOLOGIES 32:(9) pp. 1342-1358. (2009)

IF: 0.998

Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3

35. Kalász H, Furész J, **Tekes K**

Monitoring the pharmacokinetics of pyridinium aldoximes in the body

MINI-REVIEWS IN MEDICAL CHEMISTRY 9:(5) pp. 596-610. (2009)

IF: 2.971

Független idéző: 1 Függő idéző: 2 Összesen: 3

36. Petroianu G, Szoke É, Kalász H, Szegi P, Laufer R, Benko B, Darvas F, **Tekes K**
Monitoring by HPLC of chamomile flavonoids exposed to rat liver microsomal metabolism
THE OPEN MEDICINAL CHEMISTRY JOURNAL 3: pp. 1-7. (2009)
37. Szoke E, Petroianu G, **Tekes K**, Benko B, Szegi P, Laufer R, Veress G
HPLC Monitoring of the Microsomal Stability of Rutin and Quercetin
ACTA CHROMATOGRAPHICA 21:(3) pp. 399-410. (2009)
IF: 0.676
38. **Tekes K**, Gyenge M, Folyovich A, Csaba G
Influence of neonatal vitamin A or vitamin D treatment on the concentration of biogenic amines and their metabolites in the adult rat brain
HORMONE AND METABOLIC RESEARCH 41:(4) pp. 277-280. (2009)
IF: 2.686
Független idéző: 7 Függő idéző: 2 Összesen: 9
39. **Tekes K**, Gyenge M, Hantos M, Csaba G
Transgenerational hormonal imprinting caused by vitamin A and vitamin D treatment of newborn rats. Alterations in the biogenic amine contents of the adult brain
BRAIN & DEVELOPMENT 31:(9) pp. 666-670. (2009)
IF: 1.743
Független idéző: 4 Függő idéző: 3 Összesen: 7
40. Adeghate E, Kalasz H, Veress G, **Tekes K**
Medicinal chemistry of drugs used in diabetic cardiomyopathy
CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 17:(6) pp. 517-551. (2010)
IF: 4.630
Független idéző: 5 Összesen: 5
41. Gyongyosi N, Balogh B, Katai Z, Molnar E, Laufer R, **Tekes K**, Bagdy G
Activation of 5-HT₃ receptors leads to altered responses 6 months after MDMA treatment

JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION 117:(3) pp. 285-292. (2010)

IF: 2.597

Független idéző: 1 Összesen: 1

42. Kalász H, Hasan MY, Adeghate E, **Tekes K**, Adem A
Chromatographic separation of antiviral/anticancer nucleoside reverse transcriptase inhibitor drugs
ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY 398:(1) pp. 295-312. (2010)
IF: 3.84
43. Kalasz H, Adem A, Hasan M Y, Adeghate E, Ram N, Gulyas Zs, **Tekes K**
Medicinal chemistry of antiviral/anticancer prodrugs subjected to phosphate conjugation
MINI-REVIEWS IN MEDICAL CHEMISTRY 10:(9) pp. 822-845. (2010)
IF: 2.622
44. Klukovits A, **Tekes K**, Gündüz Çinar Ö, Benyhe S, Borsodi A, Deák B H, Hajagos-Tóth J, Verli J, Falkay G, Gáspár R
Nociceptin inhibits uterine contractions in term-pregnant rats by signaling through multiple pathways
BIOLOGY OF REPRODUCTION 83:(1) pp. 36-41. (2010)
IF: 3.870
Független idéző: 2 Összesen: 2
45. Adeghate E, Adem A, Hasan MY, **Tekes K**, Kalasz H
Medicinal Chemistry and Actions of Dual and Pan PPAR Modulators
THE OPEN MEDICINAL CHEMISTRY JOURNAL 5:(Suppl 2) pp. 93-98. (2011)
Független idéző: 3 Összesen: 3
46. Lotfy M, Singh J, Kalasz H, **Tekes K**, Adeghate E
Medicinal Chemistry and Applications of Incretins and DPP-4 Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus
THE OPEN MEDICINAL CHEMISTRY JOURNAL 5:(Suppl 2) pp. 82-

92. (2011)

Független idéző: 2 Összesen: 2

47. **Tekes K**, Kalasz H, Hasan M, Adeghate E, Darvas F, Ram N, Adem A
Aliphatic and Aromatic Oxidations, Epoxidation and S-Oxidation of
Prodrugs that Yield Active Drug Metabolites
CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 18:(32) pp. 4885-4900. (2011)
IF: 4.859
48. **Tekes K**, Szegi P, Laufer R, Hantos M, Csaba G
Effect of perinatal stress on the biogenic amine neurotransmitter level of
the adult rat's brain.
INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL
NEUROSCIENCE 29:(2) pp. 171-175. (2011)
IF: 2.418
Független idéző: 1 Összesen: 1
49. **Tekes K**, Hashemi F, Szegi P, Sótónyi P, Laufer R, Kalász H
Prodrugs and active metabolites among antidepressive compounds
NEUROPSYCHOPHARMACOLOGIA HUNGARICA 13:(2) pp. 103-
110. (2011)

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akik doktori disszertációm elkészültéhez hozzájárultak, a kísérletek elvégzésének biztos hátterét, a mással nem pótolható szakmai együttműködés lehetőségét és a kölcsönös bizalom légkörét teremtették meg munkám végzéséhez.

dr. Bagdy György professzor úrnak, a Gyógyszerhatástani Intézet igazgatójának köszönettel tartozom bizalmáért, ösztönző támogatásáért, mely nélkül a disszertáció nem készült volna el.

dr. Magyar Kálmán akadémikus úrnak, aki pályám kezdetén befogadott a laboratóriumába és mindenkor élvezhettem szakmai és emberi támogatását.

dr. Csaba György professzor úrnak az imprinting-vizsgálatok elvégezhetőségéért, pótolhatatlan szakmai tanácsaiért.

dr. Huszti Zsuzsanna tudományos tanácsadónak a hisztamin-mérésekhez nélkülözhetetlen szakmai támogatásért.

dr. Kalász Huba tudományos szaktanácsadónak a kromatográfiás módszerek alkalmazásában nyújtott mással nem pótolható szakmai segítségért, támogatásáért.

dr. Kamil Kuca professzornak a K-vegyületek önzetlen biztosításáért.

dr. Reizigel Jenő egyetemi tanárnak és dr. Szilágyi Nóra egyetemi docensnek a kísérletek statisztikai analíziséért.

Köszönettel tartozom mindazon klinikus kollégáknak, akik megteremtették a klinikai mintákon végzett vizsgálataink lehetőségét:

dr. Szalay Ferenc egyetemi tanárnak a májbetegék vérmintáiért, önzetlen segítségéért.

dr. Ertsey Csaba egyetemi docensnek a fejfájás-betegek mintáiért, a kiváló szakmai együttműködésért.

dr. Folyovich András főorvos úrnak a stroke-betegek vérmintáiért és az önzetlen támogatásért.

dr. Sótonyi Péter egyetemi docens úrnak a kardiológiai betegek mintáiért és a pótolhatatlan értékű szakmai támogatásért.

néhai dr. Magyar Pál intézetigazgató egyetemi tanárnak, aki a daganatos betegek vérmintáinak biztosításával járult hozzá munkánkhoz.

néhai dr. Dizseri Tamás főigazgató úrnak, aki a beteg gyermekek vérmintáinak biztosításával járult hozzá munkánkhoz.

Külön szeretném megköszönni volt PhD hallgató kollégáimnak szorgalmas, kitartó, igényes munkáját:

dr. Borcsiczky Dóra főorvosnak a betegek klinikai adatainak feldolgozása és a HPLC-mérések során végzett munkájáért.

dr. Hantos Mónika főgyógyszerésznek, a RIA módszer meghonosításáért, a nociceptin és nocistatin- mérések elvégzéséért.

dr. Gyenge Melinda gyógyszerésznőnek, a hisztamin-mérések elvégzéséért és a biogénamin meghatározások HPLC-módszerének beállításáért.

dr. Laufer Rudolf gyógyszerész úrnak és Szegi Péter biológus úrnak a K-vegyületek HPLC-analízisének kidolgozása során végzett kiváló munkájukért.

Külön köszönet illeti dr. Lengyel József tudományos munkatársat, Divikiné Guth Györgyi, Fejes Éva, Kovács Ágnes asszisztenseket, akik a kísérletek elvégzésében nyújtott kiváló technikai segítségükkel járultak hozzá a munka elvégzéséhez.

Köszönöm a Gyógyszerhatástani Intézet valamennyi munkatársának a kiváló szakmai légkört.

dc_520_12

Hálával tartozom családom minden tagjának türelmes, áldozatos, megértő szeretetükért, biztatásukért, mely nélkül a disszertáció megírásába sosem kezdtem volna.