

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A KAPSZAICIN-ÉRZÉKENY SZENZOROS NEURONOK ÉS A
KAPSZAICIN VR1/TRPV1 RECEPTOR FUNKCIÓJÁNAK ÉS
FARMAKOLÓGIÁJÁNAK VIZSGÁLATA *IN VIVO*
NOCICEPTÍV TESZTEKBEN**

Dr. Bölcskei Kata

Elméleti Orvostudományok – Neurofarmakológia program

Programvezető: Dr. Szolcsányi János

Témavezető: Dr. Pethő Gábor, Dr. Helyes Zsuzsanna

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs

2006

BEVEZETÉS

A nociceptorok specializált idegvégződések, amelyek potenciálisan szövetkárosító ingereket érzékelnek és közvetítenek a központi idegrendszer felé. A bőrt beidegző nociceptív primer afferens neuronokat axonjaik alapján különíthetjük el a mielinizált, gyorsan vezető A δ nociceptorokra, és a mielinhüvely nélküli, lassan vezető rostokkal rendelkező C nociceptorokra. Fázikus inger esetén előbbiek a fájdalomérzet első, gyorsan kialakuló, éles komponenséért felelősek, míg utóbbiak a második, később érezhető, diffúz és tompa komponens hozzák létre. Érzékenység szempontjából a nociceptorok jelentős hányada polimodális, vagyis egyaránt aktiválható fájdalmas intenzitású hő- és mechanikai ingerekkel valamint endogén és exogén kémiai anyagokkal is.

1. A KAPSAICIN-ÉRZÉKENY NOCICEPTOROK

A nociceptív primer afferens neuronok vizsgálatában a csípős paprika hatóanyaga, a kapszaicin, szelektív tesztanyagként kitüntetett szerepet játszott. A bőrben található kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok polimodális nociceptorok, amelyek a C és A δ nociceptorok jelentős részét alkotják. A kapszaicin szelektíven izgatja ezeket a rostokat, magasabb koncentrációk és tartósabb expozíció hatására pedig az aktivációt követően a végződés tartós funkcionális blokkolása alakul ki. Ennek során minden ingerrel szemben csökken a neuron válaszkészsége, azonban a szelektivitás folytán az egyéb szenzoros funkciók (tapintás, hidegérzékelés, ízlelés stb.) nem érintettek (Jancsó, 1960; Szolcsányi, 1977).

A kapszaicin-érzékeny nociceptorok ortodrómos vagy antidrómos ingerlése a beidegzés területén vazodilatációt és plazma protein extravazációt vált ki. Ez a jelenség az ún. neurogén gyulladás (Jancsó et al., 1967; 1968) amit a kapszaicin-érzékeny rostokból exocitózissal felszabaduló szenzoros neuropeptidek, többek között tachikininek (substance P, neurokinin A és B) és calcitonin gén-rokon peptid (CGRP) hoznak létre (Maggi, 1995). A felszabaduló neuropeptidek révén a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok kettős funkcióval rendelkeznek: klasszikus, afferens működésük az ingerek felfogása és az ingerület továbbítása a perifériáról a központi idegrendszer felé, a végződésből felszabaduló neuropeptidek révén pedig lokális effektor funkciót is ellátnak (Szolcsányi, 1996). A végződések a tachikinineken és a CGRP-n kívül tartalmaznak más neuropeptideket, például szomatosztatint is, amely aktiváció hatására szintén felszabadul (Szolcsányi et al., 1998a,b).

2. A KAPSZAICIN VR1/TRPV1 RECEPTOR

A kapszaicin receptoraként azonosított VR1/TRPV1 receptor az elsőként felfedezett hőérzékeny ioncsatorna (Caterina et al., 1997), amelyet a kapszaicinen túl a fájdalmas hőingerek (>43 °C), az alacsony pH és egyéb exogén irritáns anyagok (pl. reziniferatoxin) és endogén mediátorok (anandamid, lipoxigenáz-termékek, N-oleoil-dopamin) képesek aktiválni. A TRPV1 receptor tehát különböző fizikai és kémiai fájdalmas ingerek integrátorának tekinthető (Tominaga et al., 1998). A receptor aktivációja során a csatorna megnyílásával Na⁺ és Ca²⁺ ionok áramlanak be, amely a végződés depolarizációjához, illetve akciós potenciál kialakulásához vezet, valamint a Ca²⁺ ionok hatására a végződésben tárolt neuropeptidok exocitózisa következik be.

3. A TRPV1 RECEPTOR SZEREPE A NOCICEPTOROK SENZIBILIZÁCIÓJÁBAN

Szövet-sérülés vagy gyulladás következtében hiperalgécia, azaz fokozott fájdalomérzet alakul ki: az ingerintenzitás-fájdalomérzet görbe balratorlódik és maximuma is nő. A termális hiperalgécia kifejlődésének egy jelentős komponense a nociceptorok perifériás végződéseinek szenzibilizációja, amely során az aktivációjukhoz szükséges küszöb csökken, illetve küszöb feletti ingerek nagyobb választ váltanak ki. A hőszenzibilizáció egyik lehetséges mechanizmusa, hogy a TRPV1 receptor érzékenysége foszforiláció következtében fokozódik. Egyre több adat áll rendelkezésre arról, hogy a nociceptorokat érzékenyíteni képes mediátorok (bradikinin, prosztaglandinok, ATP, szerotonin stb.) részben úgy vezetnek hőszenzibilizációhoz, hogy protein kinázok (protein kináz C – PKC, protein kináz A – PKA) működését serkentik, amelyek azután foszforilálják a TRPV1 receptort (Tominaga et al., 2001; Sugiura et al., 2002; Moriyama et al., 2005). Újabb megfigyelések szerint különböző lipoxigenáz-termékek képesek közvetlenül aktiválni a TRPV1 receptort (Hwang et al., 2000). A TRPV1 receptor jelentőségét igazolja az is, hogy receptor génhányos (knockout) egerekben nem alakul ki gyulladásos termális hiperalgécia (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). A TRPV1 receptort expresszáló neuronok tehát potenciális perifériás célpontot jelenthetnek új fájdalomcsillapító vegyületek kifejlesztésére.

4. A KAPSZAICIN-ÉRZÉKENY ROSTOKBÓL FELSZABADULÓ SZOMATOSZTATIN GYULLADÁSGÁTLÓ ÉS ANTINOCICEPTÍV HATÁSA

A kapszaicin-érzékeny rostokból felszabaduló tachikininek és CGRP az innervációs területen lokális gyulladást váltanak ki, a szomatosztatin azonban képes bejutni a keringésbe, és

szisztémás gyulladásgátló (Szolcsányi et al., 1998a,b) és antinociceptív hatást fejt ki (Helyes et al., 2000). A kapszaicin-érzékeny neuronok tehát afferens és lokális efferens hatásaikon kívül, szisztémás neurohumorális regulációs avagy „szenzokrin” funkcióval is rendelkeznek (Thán et al., 2000).

5. CANNABINOID RECEPTOROK ÉS ENDOGÉN AGONISTÁIK: TOVÁBBI ÚJ TÁMADÁSPONTOK A FÁJDALOMCSILLAPÍTÁSBAN

Az elsőként azonosított endogén cannabinoid, az anandamid elsősorban a cannabinoid CB₁ receptorokhoz kötődik, amelyek a központi idegrendszerben nagy számban fordulnak elő a nociceptív transzmisszióban résztvevő felszálló pályák, valamint a leszálló gátló pályák területein. Ez arra utal, hogy szerepet játszanak a fájdalompercepció centrális modulációjában (Pertwee, 2001). A CB₁ receptorok jelenlétét a primer afferens neuronokon is kimutatták, amelyek a cannabinoidok lehetséges perifériás antinociceptív hatását közvetíthetik. A CB₂ receptorokat korábban főleg nem-neuronális sejteken mutatták ki, amelyek feltehetően a cannabinoidok immunmoduláns hatásáért felelősek, de vannak arra utaló adatok is, hogy léteznek további, CB₂-szerű receptorok is, amelyek szintén részt vesznek a fájdalom-transzmisszió kontrolljában (Calignano et al., 1998).

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásaink a TRPV1 receptort expresszáló neuronokon található potenciális analgetikus támadáspontok és az ezeken ható szerek *in vivo* vizsgálatára irányultak állatkísérletes nociceptív modellekben. Céljaink a következők voltak:

I. Megvizsgálni a szervezetben is előforduló **cannabinoidok, az anandamid és palmitoiletanolamid hatásait** a TRPV1 receptor stimulációval kiváltott **szenzoros neuropeptid felszabadulásra és neuropátiás mechanikai hiperalgéziára.**

II. Megvizsgálni a stabil és potens heptapeptid **szomatosztatin receptor agonista TT-232 antinociceptív hatásait.**

III. Összehasonlítani vad típusú és **TRPV1 receptor génhíányos egereket akut és krónikus nociceptív modellekben** *in vivo*.

IV. Kifejleszteni egy megbízható **új, küszöbmérésen alapuló termonocicepció vizsgálmódszer.**

I. ANANDAMID (ANA) ÉS PALMITOIL-ETANOLAMID (PEA) GÁTLÓ HATÁSA *IN VIVO* REZINIFERATOXINNAL KIVÁLTOTT NEUROPEPTID FELSZABADULÁSRA ÉS NEUROPÁTIÁS MECHANIKAI HIPERALGÉZIÁRA

Az anandamid (ANA) CB₁ receptor aktiváció révén számos különböző *in vivo* állatkísérletes modellben antinociceptív hatásának bizonyult és csökkentette a gyulladáshoz hő- és mechanikai hiperalgéziát is (Calignano et al., 1998; Jaggar et al., 1998; Richardson et al., 1998). Szintén hatásos volt több nociceptív tesztben (Calignano et al., 1998, 2001; Jaggar et al., 1998) egy másik, endogén cannabinoid, a palmitoil-etanolamid (PEA), ami feltehetően egy perifériás CB₂-szerű receptoron fejti ki hatását. (Calignano et al., 1998; 2001).

Az anandamid a TRPV1 receptorokat is képes aktiválni *in vitro* (Zygmunt et al., 1999; Smart et al., 2000), azonban ezen tulajdonságának *in vivo* szerepe és jelentősége vita tárgyát képezi. A vita alapját az adja, hogy a CB₁ és TRPV1 receptorok ugyanazonokon a kis méretű neuronokon expresszálódnak (Ahluwalia et al., 2000), és a TRPV1 receptor aktivációhoz szükséges anandamid koncentráció nagyságrendekkel nagyobb, mint ami ahhoz kell, hogy a CB₁ receptorokon keresztül gátolja a szenzoros neuronok aktivációját (Szolcsányi, 2000a,b).

MÓDSZEREK

1. Reziniferatoxinnal kiváltott CGRP és szomatosztatin felszabadulás mérése *in vivo*:

Patkányokon altatásban reziniferatoxinnal (RTX, 0,6 µg/kg i.v.) váltottunk ki neuropeptid felszabadulást, amelyek szintjét az injekció utáni 5. percben levett artériás vérmintákból határoztuk meg. Az állatokat ANA és PEA különböző dózisaival (10 vagy 100 µg/kg i.v.) kezeltük elő, illetve CB₁ vagy CB₂ receptor antagonistát (SR141716A vagy SR144528, 100 µg/kg i.v.) alkalmaztunk 10 perccel a megfelelő cannabinoid kezelés előtt. A plazmából a CGRP valamint a szomatosztatin koncentrációkat érzékeny radioimmunoassay (RIA) módszerekkel határoztuk meg.

2. Részleges n. ischiadicus sérülést követő (traumás) neuropatiás mechanikai hiperalgézia (Seltzer-modell):

Patkányok mechanikai fájdalomküszöbét Randall-Selitto módszerrel határoztuk meg. Az állat lábát az ún. analgeziméter kúp alakú stimulátorai közé illesztettük, amelyek fokozatosan növekvő erővel szorították össze a lábfejet. Mechanonociceptív küszöbnek azt az erőt tekintettük, amelynél az állat elrántotta a lábát. Altatásban az egyik oldali n. ischiadicus 1/3-1/2 részét lekötöttük. Egy hét múlva megvizsgáltuk az ANA illetve PEA hatását (100 µg/kg i.p.) a kialakuló hiperalgéziára. CB₁

és/vagy CB₂ receptor antagonistát (SR141716A ill. SR144528, 3 mg/kg i.p.) 30 perccel az ANA vagy PEA kezelés előtt adtuk.

EREDMÉNYEK

1. ANA és PEA hatása a plazma CGRP és szomatosztatin koncentrációkra: Az intravénás RTX (0,1-3 µg/kg i.v.) dózisfüggően megemelte a plazma CGRP és szomatosztatin koncentrációját. A neuropeptidok bazális plazmakoncentrációját sem az ANA, sem a PEA kezelés nem befolyásolta, viszont az RTX kezeléssel kiváltott CGRP és szomatosztatin szint emelkedést az ANA dózisfüggően csökkentette, és ezt a hatást a CB₁ receptor antagonistá SR141617A előkezelés (100 µg/kg i.v.) gátolta. Hasonlóképpen a PEA is dózisfüggően csökkentette az RTX-indukálta szenzoros neuropeptid felszabadulást.

2. ANA és PEA hatása a n. ischiadicus részleges lézióját követő neuropátiás mechanikai hiperalgéziára: A n. ischiadicus részleges lekötése után 7 nappal az állatok mechanonociceptív küszöbe $29,7 \pm 0,6\%$ -kal csökkent. Az ANA kezelés (100 µg/kg i.p.) teljesen megszüntette a hiperalgéziát. A CB₁ receptor antagonistá SR141617A előkezelés (3 mg/kg i.p.) önmagában 37,1%-kal fokozta a hiperalgéziát és az ezt követő ANA kezelés antihiperalgetikus hatását teljesen kivédte. A PEA kezelés (100 µg/kg i.p.) 79,4%-kal csökkentette a mechanikai hiperalgéziát, és ezt a hatást a CB₂ receptor antagonistá SR144528 (3 mg/kg i.p.) meggátolta. A CB₁ receptor antagonistához hasonlóan ez a vegyület is fokozta a küszöbcsökkenést 47,5%-kal. A két antagonistá együttes adásakor azonban a hiperalgéziát súlyosbító hatásuk nem adódott össze.

KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink igazolták, hogy mind az anandamid (ANA), mind a palmitoil-etanolamid (PEA) gátolta a TRPV1 receptor agonista RTX injekciójával kiváltott szenzoros neuropeptid felszabadulást *in vivo*, CB₁ illetve egy CB₂-szerű receptoron keresztül, miközben a plazma bazális CGRP és szomatosztatin koncentrációját nem befolyásolták. Az ANA potenciális TRPV1 receptor aktiváló hatását feltehetően ellensúlyozza az, hogy ugyanazon a végződésen sokkal nagyobb affinitással képes a CB₁ receptorokhoz kötődni, és azokat aktiválni.

Mindkét cannabinoid agonista hatékonyan csökkentette a traumás neuropátiás mechanikai hiperalgéziát is, szintén CB₁ illetve CB₂-szerű receptor aktivációja révén. Ennek egyik lehetséges mechanizmusa, hogy képesek csökkenteni a kapszaicin-érzékeny primer afferensekből a szenzoros neuropeptidok felszabadulását. A CB₁ ill. CB₂ receptor antagonisták külön-külön és kombinációban is súlyosbították a mechanikai hiperalgéziát, ami

arra utal, hogy az endocannabinoidok tónusos gátló hatást fejtenek ki neuropátiában és így mérséklék a hiperalgéziát.

A cannabinoid receptor agonisták – különösen a centrális hatásoktól mentes szelektív CB₂ receptor agonisták – új terápiás lehetőséget jelentenek a nehezen csillapítható neuropátiás fájdalom kezelésében.

II. A HEPTAPEPTID SZOMATOSZTATIN ANALÓG, TT-232 ANALGETIKUS HATÁSA AKUT KÉMIAI ÉS TERMÁLIS NOCICEPTÍV TESZTEKBE ÉS STREPTOZOTOCINNAL KIVÁLTOTT DIABÉTESZES MECHANIKAI ALLODYNIÁBAN

A kapszaicin-érzékeny idegekből stimuláció hatására felszabaduló szomatosztatin szisztémás gyulladásgátló és antinociceptív hatása új, perifériás támadáspontú gyulladásgátló és fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztését teszi lehetővé. A natív szomatosztatin azonban nem alkalmas arra, hogy ilyen indikációval a terápiában alkalmazzák, mivel széles körű élettani hatásai révén a szervezetben befolyásol számos egyéb, endokrin és gasztrointesztinális funkciót, valamint plazma féléletideje is igen rövid ($T_{1/2} = 3$ min).

Az öt szomatosztatin receptor altípus közül (sst₁₋₅) a sst₁ és sst₄ receptorok endokrin hatásokat nem közvetítenek, azonban szenzoros neuronokon expresszálódnak, ezért potenciális szelektív támadáspontot jelenthetnek. Intézetünkben az elmúlt években endokrin mellékhatásoktól mentes stabil szomatosztatin analóg molekulák hatásainak vizsgálata kezdődött meg. Az MTA Peptidbiokémiai Kutatócsoportja által szintetizált heptapeptid TT-232 (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr-NH₂), amely potens antiproliferatív hatással rendelkezik, a növekedési hormon illetve a gasztrin szekrécióját nem befolyásolta (Kéri et al., 1996). A TT-232 elsősorban a sst₄ receptoron keresztül hat (Helyes et al., 2005). Hatékonyan csökkentette a szenzoros neuropeptidok felszabadulását *in vivo*, és több modellben potensen gátolta a neurogén és nem-neurogén gyulladáshoz vezető folyamatokat (Helyes et al., 2001; Pintér et al., 2002). Mérsékelte a komplett Freund adjuváns (CFA) kezelés következtében kialakuló ízületi duzzanatot és mechanikai hiperalgéziát (Helyes et al., 2004), valamint traumás neuropátiás hiperalgézia modellben is hatásosnak bizonyult (Pintér et al., 2002).

MÓDSZEREK

1. Formalin-teszt: Patkányokon formalin intraplantáris injekciójával (2,5%, 50 µl i.pl.) váltottunk ki nocifenzív reakciót, ami két fázisban zajlik: az első az injekciót követő 0-5.

percben, a második a 20-45. percben. A TT-232 különböző dózisait (20-80 µg/kg) 30 perccel a formalin előtt adtuk intraperitoneálisan (0,1 ml/100 g i.p.), és a szer hatását egy szolvással kezelt kontroll csoporthoz viszonyítottuk. A spontán elhárító magatartás kvantitatív értékelése a következő képlet alapján történt: (2x a lábnyalások időtartama + 1x a lábemelések időtartama)/a megfigyelés ideje (Composite Pain Score – CPS).

2. Fenilkinonnal kiváltott abdominális konstrikción („writhing”-teszt): Balb/c egereken intraperitoneális fenilkinon injekcióval (0,02%, 0,2 ml) váltottunk ki fájdalomreakciót, ami a viscerális fájdalmat modellezi. A TT-232-t 30 perccel korábban szubkután adtuk be (5-200 µg/kg s.c.). A fenilkinon injekciót követő 20 percben számoltuk az abdominális konstrikciónok számát, és az eredményeket egy szolvással kezelt csoporthoz viszonyítottuk.

3. Nociceptív hőküszöb és reziniferatoxinnal kiváltott termális hiperalgémia mérése: Patkányok nociceptív hőküszöbét emelkedő hőmérsékletű forró lappal határoztuk meg. Az állatot a fűtőelemmel ellátott fémlemezre helyeztük, amelyet ezután szobahőmérsékletre indulva egyenletes sebességgel fűtöttünk fel mindaddig, amíg a patkány nocifenzív reakciót nem mutatott, és ezt a laphőmérsékletet tekintettük hőküszöbnek. Kontroll méréseket követően TT-232-vel kezeltük az állatokat (10-200 µg/kg i.p.), majd 30 perccel később ismételt méréseket végeztünk és az eredményeket a kezelés előtti küszöbhez viszonyítottuk. Egy másik kísérletsorozatban termális hiperalgémia váltottunk ki reziniferatoxin (RTX) intraplantáris injekciójával (0,05 nmol i.pl.), és 5, 10, 15 és 20 perccel ezután ismételtük a méréseket. A TT-232 különböző dózisait (5-100 µg/kg i.p.) 10 perccel az RTX előtt adtuk be. A csoport egyik felét minden esetben szolvással kezeltük, így az eredményeket az aktuális kontroll csoporthoz tudtuk viszonyítani.

4. Diabéteszes neuropátiás mechanikai allodynia: Patkányokban 50 mg/kg i.v. streptozotocinnal váltottunk ki kísérletes diabetes mellitust. Két héttel később a farokvénából vett vérminták glükóz szintjét Accu-Check glükométerrel (Roche) határoztuk meg és a továbbiakban csak azokkal az állatokkal folytattuk a kísérleteket, amelyeknél ez az érték 15 mmol/l feletti volt. A szabadon mozgó állatok mechanonociceptív küszöbét dinamikus plantáris eszteziométerrel mértük (Ugo Basile). A készülék stimulátora előre beállított paraméterek alapján fokozatosan növekvő erővel egy tompa hegyű tűt nyom a talphoz mindaddig, amíg az állat a lábát el nem rántja. Ekkor a tű azonnal visszaesik a kiindulási helyzetbe, és a kijelzőn leolvasható a mechanonociceptív küszöb grammokban. A diabetes kialakulását követően hetente mértük a küszöböket addig, amíg a mechanikai allodynia ki

nem alakult. Ekkor az állatokat a TT-232 különböző dózisaival kezeltük (2,5-100 µg/kg i.p.) és a küszöböket 30 perccel később mértük újra.

EREDMÉNYEK

1. TT-232 hatása a formalinnal kiváltott nocifenzív reakcióra: Az intraplantáris formalin injekcióval keltett nocifenzív reakció első fázisát a CPS értékelése alapján csak a 80 µg/kg i.p. dózis csökkentette szignifikánsan. A második fázisban a TT-232 harang alakú dózis-hatás görbét eredményezett, miután a 40 és 80 µg/kg i.p. dózisoknak szignifikáns antinociceptív hatása volt, de a 160 µg/kg már nem csökkentette a CPS-t. A referencia-vegyületként alkalmazott diclofenac a második fázisban csak az 50 mg/kg i.p. dózisban gátolta szignifikánsan a nocifenzív magatartást.

2. TT-232 hatása a fenilkinonnal kiváltott abdominális konstriktóra: A TT-232-előkezelés (10-200 µg/kg s.c.) képes volt szignifikánsan csökkenteni a fenilkinon i.p. injekcióját követő „writhing” mozdulatok számát, azonban dózis-hatás összefüggést nem állapíthattunk meg. A 20 és 200 µg/kg dózisok eredményezték a legnagyobb mértékű gátlást (70 illetve 75%-os csökkenés), míg a köztes dózisok harang alakú dózis-hatás görbét eredményeztek, a formalin-tesztben tapasztaltakhoz hasonlóan.

3. TT-232 hatása a nociceptív hőküszöbre és a reziniferatoxinnal kiváltott termális hiperalgéziára: A patkányok kontroll hőküszöbe $44,5 \pm 0,2$ °C volt. A TT-232 szignifikánsan megemelte a nociceptív hőküszöböt a 20-200 µg/kg-os dózistartományban, azonban egyértelmű dózis-hatás összefüggést ebben a tesztben sem nyertünk. A maximális küszöbemelkedést ($1,48 \pm 0,4$ °C) a 200 µg/kg i.p. dózis eredményezte.

A reziniferatoxin intraplantáris injekciója $7,39 \pm 1,3$ °C-os hőküszöbcsökkenést váltott ki 5 perccel a beadás után. A TT-232 előkezelés szignifikánsan csökkentette a küszöbesést a 10-50 µg/kg i.p. közötti dózisokban, azonban az ennél magasabb, 100 µg/kg-os dózis hatása már nem volt szignifikáns.

4. TT-232 hatása a diabéteszes neuropátiás mechanikai allodyniára: A mechanonociceptív küszöb 5 héttel a streptozotocin kezelés után $28,6 \pm 3,1$ %-kal csökkent. A TT-232 szignifikánsan csökkentette a mechanikai allodyniát 10, 20 és 100 µg/kg-os dózisokban, melyek közül a 20 µg/kg fejtette ki a maximális, 54%-os gátlást. Egészséges patkányokban a TT-232 20 µg/kg-os dózisa nem befolyásolta a mechanikai küszöböt.

KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink igazolták, hogy a perifériás támadáspontú szomatosztatin receptor agonista TT-232 kifejezett analgetikus hatással rendelkezik különböző módon kiváltott nociceptív folyamatokban, patkányokon és egereken egyaránt. A hagyományos kemonocicepciós tesztekben, az újonnan kifejlesztett termonocicepciós vizsgálómódszerrel és a diabéteszes neuropátiás modellben igen alacsony dózisok hatása kimutatható volt. A TT-232 a formalin tesztben a diclofenachoz képest mintegy 1000-szer, a két termonocicepciós tesztben pedig, korábbi eredményeinkkel összevetve (Almási et al., 2003), mind a morfinnál, mind a diclofenacnál körülbelül 300-szor potensebbnek bizonyult. A TT-232 előnyét az jelenti, hogy szelektív támadáspontja révén mentes a szomatosztatin széles hatásspektrumából adódó számos mellékhatástól. A mellékhatásokat csökkenti az is, hogy a vér-agy gáton nem jut át, tehát támadáspontja kizárólag a periférián található. A TT-232 ígéretes új analgetikumjelöltnek tekinthető, mivel széles analgetikus spektrummal rendelkezik, amely magába foglalja a nehezen kezelhető neuropátiás fájdalomállapotokat is.

III. A TRPV1 RECEPTOR SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA AKUT ÉS KRÓNIKUS NOCICEPTÍV MODELLEKBEN GÉNHIÁNYOS EGEREK SEGÍTSÉGÉVEL

A TRPV1 receptort expresszáló polimodális nociceptorok funkcióinak vizsgálata a kapszaicin szelektív izgató és ezt követő blokkoló hatásának megfigyelésével kezdődött meg. A kapszaicin deszenzibilizáló hatásának vizsgálatával azonban kizárólag a teljes rost működéséről nyerhetünk információt, a kapszaicin TRPV1 receptor izolált szerepéről nem.

A receptor antagonisták többségének (kapszazepin, ruténium vörös, jodo-reziniferatoxin) alkalmazását megnehezíti, hogy nem eléggé szelektívek (Docherty et al., 1997; Liu & Simon, 1997) és *in vivo* nem mindig hatékonyak (Jakab et al., 2005), továbbá a jodo-reziniferatoxin agonista hatásokat is kiválthat, ha a szervezetben reziniferatoxinná alakul.

A TRPV1 receptor klónozását követően vált lehetővé génhiányos egerek előállítása és vizsgálata *in vivo* modellekben (Davis et al., 2000; Caterina et al., 2000). Az eredmények azt igazolták, hogy a kezeletlen génhiányos állatok hőküszöbe nem különbözött a vad típusú egerektől, ami meglepő volt annak ismeretében, hogy a kapszaicinnal deszenzibilizált állatok fájdalmas hőérzete csökken (Szolcsányi, 1985; Szolcsányi, 1987). Gyulladásos termális hiperalgécia viszont nem alakult ki a receptor hiányában, ami arra utal, hogy a nociceptorok hőszenzibilizációja a TRPV1 receptor közvetítésével jön létre.

MÓDSZEREK

Állatok: A kísérletekben TRPV1 receptor génhiányos (TRPV1^{-/-}) illetve vad típusú egereket (TRPV1^{+/+}) használtunk.

1. Forbolésterrel kiváltott akut kemonocicepció (PMA-teszt): A protein kináz C (PKC) aktivátor forboléster, forbol 12-mirisztát 13-acetát (PMA, 10 µg/ml, 20 µl) intraplantáris injekciójával váltottunk ki nocifenzív reakciót, amelyet a beadást követő 45 percen keresztül figyeltünk meg. A kvantitatív értékeléshez a lábnyalással és lábemeléssel eltöltött időt mértük meg.

2. Formalin-teszt: Formalin (2,5%, 20 µl) intraplantáris injekciójával váltottunk ki nocifenzív reakciót, ami két fázisban zajlik: az első fázis a 0-5. percre, míg a második fázis a 20-45. percre tart. A kvantitatív értékeléshez a lábnyalással és lábemeléssel eltöltött időt mértük meg.

3. Hőtraumával kiváltott hő- és mechanikai hiperalgémia: Az egerek nociceptív hőküszöbét emelkedő hőmérsékletű forró lappal mértük meg (IITC Life Science), egy másik kísérleti csoportban pedig a mechanonociceptív küszöböt mértük dinamikus plantáris eszteziométerrel (Ugo Basile). Kontroll méréseket követően az állatok egyik hátsó lábát éteres altatásban 51 °C-os vízfürdőbe mártottuk 15 másodpercre, majd ismételt méréseket végeztünk.

4. Intraplantáris carrageninnel kiváltott gyulladásos mechanikai hiperalgémia: Az állatok mechanonociceptív küszöbét eszteziométerrel mértük, majd carragenin (3%, 100 µl) intraplantáris injekciójával gyulladást idéztünk elő az egyik hátsó végtagon, majd a küszöböket 3 óra múlva újra megmértük.

5. Streptozotocinnal kiváltott diabéteszes polineuropátia: A kísérletes diabetes mellitust streptozotocin kezeléssel (STZ, 250 mg/kg i.v.) hoztuk létre. 2 héttel később a farokvénából vett vérminták glükóz szintjét Accu-Check glükométerrel (Roche) határoztuk meg és a további méréseket csak azokon az állatokon végeztük el, amelyeknél ez az érték 15 mmol/l feletti volt. A mechanonociceptív küszöböket eszteziométerrel mértük.

6. Ciszplatinnal kiváltott toxikus neuropátia: Az egereket 5 héten keresztül hetente háromszor oltottuk ciszplatinnal (2 mg/kg i.p., kumulatív dózis 30 mg/kg). A mechanonociceptív küszöböket eszteziométerrel mértük.

7. Részleges n. ischiadicus lézióval létrehozott traumás mononeuropátia: Az egereken altatásban lekötöttük a n. ischiadicus 1/3-1/2 részét. A mechanonociceptív küszöböket eszteziométerrel mértük.

8. Plazma szomatosztatin koncentrációk mérése a krónikus polineuropátia modellekben:

Az állatokat egy éjszakán keresztül éhezettük, hogy a gasztrointesztinális szomatosztatin felszabadulás minimális legyen. Altatásban artériás vérmintákat gyűjtöttünk, majd a plazmából extrahált szomatosztatin koncentrációját az intézetünkben kifejlesztett radioimmunoassay (RIA) módszerrel határoztuk meg (Németh et al., 1996). A mintavétel időpontját a szerint választottuk ki, hogy a korábbi mérések alapján melyik időszakban volt legnagyobb különbség a két egércsoport eredményei között.

EREDMÉNYEK

1. PMA-teszt: A vad típusú (TRPV1^{+/+}) egerekben a PMA injekciója akut nocifenzív reakciót váltott ki (lábnyalás és lábemelés), ami a beadást követő 5-45. percig tartott. A lábnyalások és lábemelések összes időtartama $669,2 \pm 170,8$ sec volt. A TRPV1 receptor génhányos (TRPV1^{-/-}) állatokban a PMA nem váltott ki fájdalomreakciót, vagyis annak időtartama nem különbözött szignifikánsan a szolvenssel kezelt csoporthoz képest ($16,8 \pm 8$ sec illetve $20,2 \pm 10,3$ sec).

2. Formalin-teszt: A formalin intraplantáris injekciója kétfázisú nocifenzív reakciót váltott ki. Az első fázisban (0-5. perc) a lábnyalások és lábemelések időtartama $130,7 \pm 12,6$ sec volt a TRPV1^{+/+} egerekben és $99,7 \pm 16,1$ sec a TRPV1^{-/-} csoportban, míg a második fázisban (20-45. perc) ezek az értékek rendre $268,7 \pm 50,7$ sec és $363,6 \pm 37,8$ sec voltak. Statisztikailag szignifikáns különbség nem volt kimutatható a két egércsoport között egyik fázis eredményeiben sem.

3. Hőtraumával kiváltott hő- és mechanikai hiperalgécia: A kezeletlen TRPV1^{+/+} illetve TRPV1^{-/-} egerek hőküszöbe $44,3 \pm 0,4$ °C illetve $44,4 \pm 0,3$ °C, míg mechanonociceptív küszöbeik $7,9 \pm 0,3$ g és $7,5 \pm 0,3$ g voltak, tehát a kontroll küszöbökben nem volt szignifikáns eltérés a két csoport között. Az egerek az enyhe hőtrauma után néhány perc múlva magukhoz tértek, és spontán fájdalomreakciót nem mutattak. A hő- és mechanikai hiperalgécia szignifikáns küszöbcsökkenésként jelentkezett a hőtrauma után 10 illetve 20 perccel kezdődően. Mindkét hiperalgécia szignifikánsan kisebbnek bizonyult a TRPV1^{-/-} egerekben minden mérési időpontban. A maximális hőküszöbcsökkenés $10,23 \pm 1,0$ °C illetve $3,59 \pm 0,6$ °C, a legnagyobb mechanikai hiperalgécia pedig $56,9 \pm 2,4\%$ illetve $23,6 \pm 7,9\%$ volt a TRPV1^{+/+} és a TRPV1^{-/-} egércsoportban.

4. Carrageninnel kiváltott gyulladásoz mechanikai hiperalgécia: A kontroll mechanonociceptív küszöb $7,85 \pm 0,2$ g volt a vad típusú és $7,31 \pm 0,3$ g a TRPV1 receptor génhányos egerekben. A carragenin injekció a kezelt láb gyulladásához vezetett, a végtag jól

láthatóan duzzadt és kipirosodott lett. A kezelés után 3 órával a mechanikai küszöb csökkenése volt mérhető: a TRPV1^{+/+} egerek küszöbe $5,35 \pm 0,3$ g-ra ($31,7 \pm 4,1\%$ -os hiperalgémia), a TRPV1^{-/-} állatoké pedig $4,9 \pm 0,3$ g-ra csökkent ($31,8 \pm 6,1\%$ -os hiperalgémia). Szignifikáns eltérés tehát nem alakult ki a két állatcsoport között.

5. Mechanikai hiperalgémia streptozotocinnal kiváltott diabéteszes polineuropátiában: A TRPV1^{+/+} egerek kontroll mechanonociceptív küszöbe $6,7 \pm 0,2$ g volt, míg a TRPV1^{-/-} csoportban $6,9 \pm 0,3$ g. A streptozotocin kezelés után 2 héttel minden egerben kialakult a kísérletes diabetes mellitus. A TRPV1 receptor génhiányos egerekben a mechanikai hiperalgémia már a kezelést követő 3. hétre kialakult, és a 7. hétig tartó kísérleti periódus alatt végig szignifikánsan súlyosabb volt a vad típusú egerekéhez képest. A legnagyobb különbséget az 5. héten találtuk a két csoport között (a TRPV1^{+/+} csoportban $10,29 \pm 2,6\%$ ill. a TRPV1^{-/-} csoportban $31,12 \pm 2,7\%$ hiperalgémia).

6. Mechanikai hiperalgémia ciszplatinnal kiváltott toxikus neuropátiában: A ciszplatinnal kezelt állatok mechanonociceptív küszöbe a kezelés első 3 hetében nem változott a kontroll küszöbökhez képest ($6,6 \pm 0,2$ g, mindkét csoportban). A TRPV1^{-/-} egerekben a 4. héttől alakult ki szignifikáns hiperalgémia, míg a vad típusúakban csak 4 héttel később. A 8. héttől azonban szignifikáns különbség már nem mutatkozott a két csoport eredményei között. A legnagyobb különbség a 7. héten volt mérhető (a TRPV1^{+/+} csoportban $2,64 \pm 4,0\%$ ill. a TRPV1^{-/-} csoportban $7,87 \pm 3,6\%$ hiperalgémia).

7. Mechanikai hiperalgémia traumás neuropátiában: A részleges n. ischiadicus léziót követő első héten az operált végtagon mechanikai hiperalgémia fejlődött ki, amely a mérési periódus 5 hetén keresztül fennmaradt. A mértéke a 2. héten volt a legnagyobb, ekkor a TRPV1^{+/+} állatokban $45,13 \pm 4,7\%$, a TRPV1^{-/-} állatokban pedig $40,53 \pm 4,0\%$ volt. Szignifikáns különbséget egyik mérés során sem találtunk a vad típusú és a TRPV1 receptor génhiányos egerek között.

8. Plazma szomatosztatin koncentrációk a krónikus polineuropátia modellekben: Kezeletlen állatokban a plazma szomatosztatin koncentrációja $8,5 \pm 0,2$ fmol/ml volt a TRPV1^{+/+} csoportban és $7,44 \pm 0,6$ fmol/ml a TRPV1^{-/-} egerekben. A diabéteszes neuropátiás állatoknál a kezelést követő 5. héten, míg a ciszplatinnal kiváltott neuropátiában a 7. héten történt a vérminták levétele, amikor a legnagyobb különbséget találtuk a mechanikai hiperalgémiaiban a vad típusú és a génhiányos egerek között. A neuropátiás TRPV1^{+/+} egerek plazma szomatosztatin szintje szignifikánsan magasabb volt a kezeletlen kontroll csoporthoz képest mind a diabéteszes ($10,08 \pm 0,6$ fmol/ml), mind a ciszplatinnal kezelt állatokban ($10,46 \pm 0,9$ fmol/ml). Ezzel szemben, a TRPV1^{-/-} egerekben nem alakult ki szomatosztatin szint

emelkedés, a plazma szomatosztatin koncentrációk $8,02 \pm 0,6$ fmol/ml illetve $7,63 \pm 0,5$ fmol/ml voltak.

KÖVETKEZTETÉSEK

A TRPV1 receptor génhiányos egerek vizsgálata során kimutattuk, hogy ez a fájdalmas ingerekkel aktiválható ioncsatorna kulcsfontosságú a forbolészterrel kiváltott akut nocicepció és az enyhe hőtrauma után kialakuló termális és mechanikai hiperalgémia kialakulásában. A receptor hiánya nem befolyásolta a formalinnal kiváltott nocifenzív magatartást, a carrageninnel keltett gyulladáshoz, valamint a traumás eredetű mononeuropátiában kialakuló mechanikai hiperalgémia kialakulását. Krónikus diabéteszes illetve toxikus eredetű polineuropátiában azonban protektív funkcióval rendelkezett, mivel jelenlétében a mechanikai hiperalgémia mérsékeltebb volt, és később alakult ki. Számos bizonyíték van arra, hogy a TRPV1 receptort expresszáló rostokból felszabaduló szomatosztatin szisztémás gyulladásgátló és antinociceptív hatást képes kifejteni (Szolcsányi et al., 1998a,b; Helyes et al., 2000; Carlton et al., 2001a,b; 2003; Helyes et al., 2004). Hipotézisünk az volt, hogy a polineuropátiás állapotokban a TRPV1 receptor stimulációjával ez a szomatosztatin-mediált ellenregulációs mechanizmus aktiválódik, amelynek kiesése a génhiányos egerekben a hiperalgémia mértékének fokozódását és korábbi megjelenését okozta. Ezt igazolhatja az, hogy a plazma szomatosztatin koncentrációk mérése során a vad típusú polineuropátiás állatokban szignifikáns mértékű szomatosztatin szint emelkedés volt kimutatható a kezeletlenekhez képest, míg a TRPV1 receptor génhiányos egerekben a peptid szintje változatlan maradt.

Összefoglalásképpen megállapíthatjuk, hogy míg egyes modellekben a TRPV1 receptor közvetíti, vagy fokozza a nocicepciót, a krónikus polineuropátia modellekben meglepő módon ellentétes, antinociceptív hatás kiváltásáért felelős, az aktivációjával felszabadított szomatosztatinon keresztül. Azokban a modellekben, amelyekben a TRPV1 receptor génhiányos egerek nociceptív viselkedése nem volt eltérő, a receptor feltehetően nem játszik döntő szerepet, de nem kizárt, hogy ezekben a két mechanizmus kioltja egymás hatását. Miután vizsgált nociceptív modelleinkben a TRPV1 receptor két, ellentétes funkcióját mutattuk ki, a TRPV1 receptor antagonistái és agonistái egyaránt terápiás értékkel bírhatnak az adott betegség patomechanizmusától függően.

IV. HÓTRAUMÁVAL KIVÁLTOTT HŐKÜSZÖBCSÖKKENÉSEN ALAPULÓ ÚJ TERMÁLIS HIPERALGÉZIA MODELL KIDOLGOZÁSA AZ EMELKEDŐ HŐMÉRSÉKLETŰ VÍZFÜRDŐ ALKALMAZÁSÁVAL

A termonocicepció hagyományos állatkísérletes vizsgálómódszerei azon alapulnak, hogy az állatok végtagját vagy farkát állandó intenzitású, küszöb feletti hőingernek teszik ki, például forró lapra helyezve (állandó hőmérsékletű hot plate) vagy irányított hőszugárral stimulálva (Hargreaves-féle „plantar”-teszt), és az elhárító reakció megjelenéséig tartó latenciaidőt mérik (Le Bars et al., 2001). Ezt a latenciaidőt tekintik, nem teljesen konzekvens módon, nociceptív hőküszöbnek. Ezeknek a módszereknek a hátránya az, hogy ismételt mérések során szenzibilizáció vagy habituáció miatt a latencia csökkenhet illetve növekedhet, és nem kevésbé fontos, hogy csak az opioid analgetikumok antinociceptív hatását képesek megbízhatóan mérni. További hátrány, hogy a latenciaértékek nehezen vethetők össze az elektrofiziológiai kísérletekben (pl. patch clamp módszer, egy rost elvezetések) rutinszerűen meghatározott hőküszöbvel.

Emelkedő intenzitású hőingerrel az állatok nociceptív küszöbhőmérséklete határozható meg, vagyis az a legalacsonyabb hőmérséklet, amelynél az állat nocifenzív reakciót mutat. Munkacsoportunk sikeresen alkalmazta ezt a mérési elvet az emelkedő hőmérsékletű forró lap és egy új hiperalgéria-modell kifejlesztésénél (Almási et al., 2003), és ez a módszer alkalmas volt morfin, diclofenac és paracetamol alacsony dózisainak hőküszöbemelő és antihiperalgetikus hatásának kimutatására is. A kiváló farmakológiai érzékenységen felül a küszöbmérés az etikai irányelveknek is jobban megfelel (Zimmermann, 1983), mivel az állatokat a lehető legkisebb és legrövidebb ideig tartó fájdalomnak teszi ki. Jelen kísérleteinkben szintén egy új fejlesztésű készüléket, az emelkedő hőmérsékletű vízfürdőt alkalmaztuk.

MÓDSZEREK

1. A nociceptív hőküszöb meghatározása az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel: Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdőt a budapesti Experimetria Kft.-vel közösen fejlesztettük ki. A készülék egy beépített fűtőelemmel ellátott víztartályból és egy vezérlőegységből áll, amelyen beállítható a kiindulási hőmérséklet és a fűtési sebesség, és digitális kijelzőjén leolvasható a vízfürdő aktuális hőmérséklete. A hőküszöb méréséhez a patkányt függőleges testhelyzetben, lazán szorítva tartottuk a vízfürdő fölé, biztosítva a hátsó lábak szabad mozgását, majd egyik hátsó lábát a vízfürdőbe merítettük és elindítottuk a fűtést. Minden

mérést 30 °C-ról indítottunk, a fűtési sebesség 24 °C/perc volt. Amikor az állat a lábát a vízből kihúzta, a fűtést egy pedál segítségével megállítottuk, az aktuális hőmérsékletet leolvastuk a kijelzőn, és ezt tekintettük nociceptív hőküszöbnek.

2. Termális hiperalgémia kiváltása enyhe hőtraumával és antihiperalgetikus hatások vizsgálata: Kontroll méréseket követően az állatok egyik hátsó lábát éteres altatásban egy 51 °C-os vízfürdőbe merítettük 20 másodpercre. Az anesztézia elmúlása után ismételt hőküszöbméréseket végeztünk a hőtrauma után 10 és 20 perccel, hogy meggyőződjünk a hiperalgémia kialakulásáról. A vizsgálandó anyagok adására a 20 perces mérés után került sor, ezután újabb hőküszöbméréseket végeztünk a hőtrauma utáni 40., 50. és 60. percben (azaz az anyag adását követő 20., 30. és 40. percben). Minden mérési sorozatban az állatcsoport egyik felét szolvesssel kezeltük, és az anyagok hatását a szolvesssel kezelt csoport eredményeihez viszonyítottuk.

EREDMÉNYEK

A kezeletlen állatok hőküszöbe $43,1 \pm 0,4$ °C volt és akár 10 percenként ismételt mérések során is reprodukálhatónak bizonyult, vagyis az egyes végtagokon a különböző időpontokban mért küszöbök között nem volt statisztikailag szignifikáns különbség. A hőtrauma utáni 10. és 20. percben mérve 7-8 °C-os hőküszöbcsökkenést tapasztaltunk, amely legalább egy órán keresztül változatlan mértékben fennállt. A hőtrauma után 20 perccel beadva a morfin, a nem-szelektív ciklooxygenáz gátló diclofenac és ibuprofen, továbbá a centrális támadáspontú paracetamol is dózisfüggően csökkentette a kialakult termális hiperalgéziát (minimális effektív dózisok (MED): 0,3; 0,3; 10; 30 mg/kg i.p.). A modell alkalmas volt az új analgetikumjelölt vegyület, a perifériás támadáspontú, szomatosztatin receptor agonista TT-232 hatásának kimutatására is (MED: 0,1 mg/kg i.p.). Intraplantáris injekcióban adva a morfin (10 µg), a diclofenac (100 µg) és az ibuprofen (100 µg) szintén szignifikánsan mérsékelte a hőküszöbcsökkenést. A lipoxigenáz gátló nordihidroguaiarénsav (NDGA, 10 mg/kg i.p.) nem volt hatással a termális hiperalgémia, azonban a bradikinin B₂ receptor antagonistája HOE140 (0,1 mg/kg i.p.) szignifikáns gátlást eredményezett, a TRPV1 receptor antagonistája JYL1421 (2 mg/kg i.p.) pedig majdnem teljesen megszüntette a hőküszöbcsökkenést.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő alkalmasnak bizonyult éber patkányok nociceptív hőküszöbének megbízható és reprodukálható mérésére. A hőtraumát, mint természetes szövetkárosító stimulust alkalmaztuk hiperalgémia kiváltására, azaz tulajdonképpen elsőfokú

égést modelleztünk, amely a nociceptív hőküszöb markáns csökkenését eredményezte. Az anyaghatások vizsgálatában is a mindennapi klinikai gyakorlatot követtük azáltal, hogy a trauma után kezeltük az állatokat, ellentétben a típusos kísérleti elrendezésekkel, amelyekben előkezelés történik. A modell rendkívül érzékenynek bizonyult mind a morfin, mind a ciklooxygenáz gátlók antihiperalgetikus hatásának mérésére, és a hagyományos analgetikumokon túl, az új támadáspontú szomatosztatin receptor agonista TT-232 vizsgálatára is alkalmas volt (l. II. pont). A módszerünkkel nyert minimális hatékony dózisokból átszámított humán dózisok a klinikai gyakorlatban alkalmazott dózistartományba esnek. Modellünk lokális analgetikus kezelés hatásának kimutatására is alkalmas volt.

A hőtrauma következtében kialakuló hőküszöbcsökkenés patomechanizmusának vizsgálata során megállapítottuk, hogy prosztaglandinok minden bizonnyal fontos szerepet játszanak, miután a ciklooxygenáz gátlók alacsony dózisban és lokális alkalmazás során is gátolták a hiperalgiát. Továbbá igazoltuk, hogy a bradikinin is nagy részben felelős a hiperalgiázia kifejlődéséért, és a TRPV1 receptor aktivációjának illetve szenzibilizációjának központi szerepe van a hőküszöbcsökkenés kialakulásában. Ez utóbbit a TRPV1 receptor génhányos egereknél talált eredményeink is alátámasztják (l. III. pont). Modellünkben a lipoxigenáz-gátló hatástalannak bizonyult, tehát a hőtraumával kiváltott szövetsérülés során vagy nem képződnek lipoxigenáz-termékek vagy hatásuk nem olyan jelentős, hogy annak kiesése befolyásolni tudja a hiperalgiázia mértékét.

Az általunk kifejlesztett és validált termonocicepciós teszt egy megbízható, könnyen kivitelezhető és érzékeny új módszer, ami perifériás és centrális támadáspontú analgetikumok vizsgálatára egyaránt alkalmas. A hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenés egyben kiváló *in vivo* modell a termális hiperalgiázia patomechanizmusának tanulmányozására.

A DOLGOZATBAN BEMUTATOTT ÚJ EREDMÉNYEK TÉTELES ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Eredményeink szerint az **anandamid és a palmitoil-etanolamid – a CB₁ és CB₂ receptorok szervezetben előforduló agonistái – csökkentik a TRPV1 receptor agonista reziniferatoxinnal kiváltott szenzoros neuropeptid felszabadulást *in vivo***. Kimutattuk, hogy az **anandamid és a palmitoil-etanolamid CB₁ illetve CB₂ receptoron keresztül csökkenti a traumás neuropátiás hiperalgéziát is**. A CB₁ és CB₂ receptor antagonisták fokozták a mechanikai hiperalgéziát *in vivo*, ezért feltételezésünk szerint, az **endogén cannabinoidok tónusos antinociceptív hatást fejtenek ki traumás neuropátiás hiperalgéziában**.
2. Kimutattuk, hogy a **szomatosztatin receptor agonista TT-232 potens antinociceptív és antihiperalgetikus hatást** fejtett ki akut kémiai és termális nociceptív modellekben és krónikus diabéteszes neuropátiában.
3. Génhiányos egerek segítségével kimutattuk, hogy **bizonyos akut fájdalomállapotokban elengedhetetlen a TRPV1 receptor jelenléte, másokban nincs kizárólagos szerepe, krónikus polineuropátia modellekben azonban a receptor hiánya meglepő módon súlyosbítja a mechanikai hiperalgéziát**. Hipotézisünk szerint a TRPV1 receptor krónikus aktivációja következtében ellenregulációs folyamatok indulhatnak be, amelyeknek mediátora a TRPV1 receptort expresszáló végződésekből felszabaduló és a keringésbe jutó szomatosztatin. A TRPV1 receptor az adott kórfolyamattól függően pronociceptív vagy antinociceptív hatást is közvetíthet, tehát akár az **agonistákból és az antagonistákból is lehetnek gyógyszerjelöltek**.
4. Új, saját fejlesztésű, **hőküszöbmérésen alapuló termonocicepciós tesztet dolgoztunk ki, az enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgézia modellt, amely igen megbízható és érzékeny módszernek bizonyult** különböző támadáspontú anyagok antihiperalgetikus hatásának kimutatására. A termális hiperalgézia patomechanizmusának tanulmányozása során megállapítottuk, hogy **a hőküszöbcsökkenésben ciklooxygenáz-termékek és bradikinin felszabadulása valamint a TRPV1 receptor is fontos szerepet játszik**.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőimnek **dr. Pethő Gábornak** és **dr. Helyes Zsuzsannának**, valamint a Neurofarmakológia program vezetőjének, **dr. Szolcsányi János professzornak**, és a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének **dr. Barthó Loránd professzornak** a szakmai irányításért és támogatásért, amelyben a munkám során mindvégig részesültem. Külön köszönet illeti asszisztensnőmet, **Gógl Csabáné Katit** a kísérletekben nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért. Köszönet **dr. Németh Józsefnek** a szenzoros neuropeptid koncentrációk RIA módszerrel történő méréséért. Köszönet **dr. Pintér Erikának** a sok szakmai és baráti jó tanácsért.

Köszönet **dr. Almási Róbertnek**, aki a kezdetekkor beavatott az *in vivo* mérésekbe. **Sándor Katalinnak** és **Horváth Dórának**, akik diákkörösként jelentős részt vállaltak a kísérletek elvégzésében.

Köszönöm minden PhD hallgatótársamnak és a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden dolgozójának azt a baráti légkört, amelyben az elmúlt években eredményesen végezhettem a munkámat.

Végül pedig nem lehetek eléggé hálás édesanyámnak és testvéreimnek minden szeretetért, türelemért, biztatásért és támogatásért.

IRODALOM

- Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S, Nagy I. *Neuroscience* 2000; 100: 685-688.
- Almási R, Pethő G, Bölcskei K, Szolcsányi J. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 49-58.
- Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. *Nature* 1998; 394: 277-281.
- Calignano A, La Rana G, Piomelli D. *Eur J Pharmacol* 2001; 419: 191-198.
- Carlton SM, Du J, Davidson E, Zhou S, Coggeshall RE. *Pain* 2001a; 90: 233-244.
- Carlton SM, Du J, Zhou S, Coggeshall RE. *J Neurosci* 2001b; 21: 4042-4049.
- Carlton SM, Zhou S, Kraemer B, Coggeshall RE. *Neuroscience* 2003; 120: 499-508.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. *Nature* 1997; 389: 816-824.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. *Science* 2000; 288: 306-313.
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. *Nature* 2000; 405: 183-187.
- Docherty RJ, Yeats JC, Piper AS. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 1461-1467.
- Helyes Zs, Thán M, Oroszi G, Pintér E, Németh J, Kéri G, Szolcsányi J. *Neurosci Lett* 2000; 278: 185-188.
- Helyes Zs, Pintér E, Németh J, Kéri Gy, Thán M, Oroszi G, Horváth A, Szolcsányi J. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 1571-1579.
- Helyes Zs, Szabó Á, Németh J, Jakab B, Pintér E, Bánvölgyi Á, Kereskai L, Kéri Gy, Szolcsányi J. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1677-1685.
- Helyes Zs, Pintér E, Szolcsányi J. TT-232. *Drug Future* 2005; 30: 558-566.
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6155-6160.
- Jaggari SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS. *Pain* 1998; 76: 189-199.
- Jakab B, Helyes Zs, Varga A, Bölcskei K, Szabó Á, Sándor K, Elekes K, Börzsei R, Keszthelyi D, Pintér E, Pethő G, Németh J, Szolcsányi J. *Eur J Pharmacol* 2005; 517: 35-44.
- Jancsó N. *Bull Millard Fillmore Hosp, Buffalo, NY* 1960; 7: 53-77.
- Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. *Br J Pharmacol Chemother* 1967; 31: 138-151.
- Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. *Br J Pharmacol Chemother* 1968; 33: 32-41.
- Kéri Gy, Érchegeyi J, Horváth A, Mező I, Idei M, Vántus T, Balogh Á, Vadász Zs, Bökönyi Gy, Seprődi J, Teplán I, Csuka O, Tejeda M, Gaál D, Szegedi Zs, Szende B, Roze C, Kalthoff H, Ullrich A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12513-12518.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 597-652.
- Liu L, Simon SA. *Neurosci Lett* 1997; 228: 29-32.
- Maggi CA. *Prog Neurobiol* 1995; 45: 1-98.
- Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M. *Mol Pain* 2005; 1: 3-15.
- Németh J, Helyes Zs, Görös T, Gardi J, Pintér E, Szolcsányi J. *Acta Physiol Hung* 1996; 84: 313-315.
- Pertwee RG. *Prog Neurobiol* 2001; 63: 569-611.

- Pintér E, Helyes Zs, Németh J, Pórszász R, Pethő G, Thán M, Kéri Gy, Horváth A, Jakab B, Szolcsányi J. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2002; 366: 142-150.
- Richardson JD, Kilo S, Hargreaves KM. *Pain* 1998; 75: 111-119.
- Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 227-230.
- Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H, Mizumura K. *J Neurophysiol* 2002; 88: 544-548.
- Szolcsányi J. *J Physiol (Paris)* 1977; 73: 251-259.
- Szolcsányi J. In: *Hakanson R. & Sundler F. (eds.) Tachykinin Antagonists*. Elsevier, Amsterdam, 1985; pp. 45-54.
- Szolcsányi J. *Acta Physiol Hung* 1987; 69: 323-332.
- Szolcsányi J. *Prog Brain Res* 1996; 113: 343-359.
- Szolcsányi J. *Trends Pharmacol Sci* 2000a; 21: 41-42.
- Szolcsányi J. *Trends Pharmacol Sci* 2000b; 21: 203-204.
- Szolcsányi J, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J, Pintér E. *Br J Pharmacol* 1998a; 123: 936-942.
- Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J. *Br J Pharmacol* 1998b; 125: 916-922.
- Thán M, Németh J, Szilvássy Z, Pintér E, Helyes Zs, Szolcsányi J. *Eur J Pharmacol* 2000; 399: 251-258.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. *Neuron* 1998; 21: 531-543.
- Tominaga M, Wada M, Masu M. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6951-6956.
- Zimmermann M. *Pain* 1983; 16: 109-110.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED. *Nature* 1999; 400: 452-457.

A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

EREDETI KÖZLEMÉNYEK

1. Helyes Zs., Németh J., Thán M., **Bölskei K.**, Pintér E., Szolcsányi J. Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat. *Life Sci* 2003; 73: 2345-2353. IF: 1,94
Citáció (független/összes): 7/10
2. Szolcsányi J., **Bölskei K.**, Szabó Á., Pintér E., Pethő G., Elekes K., Börzsei R., Almási R., Szűts T., Kéri Gy., Helyes Zs. Analgesic effect of TT-232, a heptapeptide somatostatin analogue, in acute pain models of the rat and the mouse and in streptozotocin-induced diabetic mechanical allodynia. *Eur J Pharmacol* 2004; 498: 103-109. IF: 2,43
Citáció (független/összes): 3/5
3. **Bölskei K.**, Helyes Zs., Szabó Á., Sándor K., Elekes K., Németh J., Almási R., Pintér E., Pethő G., Szolcsányi J. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 2005; 117: 368-376. IF: 4,3
Citáció (független/összes): 3/4

IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK

1. Helyes Zs., Németh J., Thán M., **Bölskei K.**, Pethő G., Szolcsányi J. Inhibitory effect of anandamide on neuropathic hyperalgesia and sensory neuropeptide release mediated by CB₁ receptors in the rat. *Neuropeptides* 2002; 36: 467. IF: 1,48
2. Helyes Zs., **Bölskei K.**, Pintér E., Pethő G., Németh J., Bánvölgyi Á., Szolcsányi J. Analgesic effect of TT-232, a heptapeptide somatostatin analogue, in acute and chronic pain models of the rat. *Br J Pharmacol* 2003; 138 Proc Suppl: 218. IF: 3,61
3. **Bölskei K.**, Pethő G., Szolcsányi J. Heat Injury-Induced Drop of the Noxious Heat Threshold: A Novel Method for the Study of Thermonociception and Its Pharmacological Modulation. *Pharmacology* 2004; 72: 147. IF: 1,13

KONGRESSZUSI ELŐADÁSOK / POSZTERBEMUTATÁSOK

1. Helyes Zs., Németh J., Thán M., **Bölskei K.**, Pethő G., Szolcsányi J. Inhibitory effect of anandamide on neuropathic hyperalgesia and sensory neuropeptide release mediated by

CB₁ receptors in the rat. Neuropeptides 2002, 12th Meeting of European Neuropeptide Club, May 22-25 2002, Olsztyn, Poland.

2. Helyes Zs., **Bölskei K.**, Pintér E., Pethő G., Németh J., Bánvölgyi Á., Szabó Á., Szolcsányi J. Heptapeptid szomatosztatin analóg, TT-232, analgetikus hatása akut és krónikus fájdalom modellekben patkányban. Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság V. Kongresszusa, Debrecen, 2002. december 12-14.
3. Helyes Zs., **Bölskei K.**, Pintér E., Pethő G., Németh J., Bánvölgyi Á. & Szolcsányi J. Analgesic effect of TT-232, a heptapeptide somatostatin analogue, in acute and chronic pain models of the rat. British Pharmacological Society 2002 Winter Meeting, Brighton, UK, 7-10 January 2003.
4. Helyes Zs., **Bölskei K.**, Szabó Á., Pintér E., Pethő G., Elekes K., Almási R., Börzsei R., Szűts T., Kéri Gy., Szolcsányi J. A heptapeptid szomatosztatin analóg, TT-232 analgetikus hatása akut és krónikus nociceptív modellekben patkányban. Magyar Élettani Társaság 68. Vándorgyűlése, Debrecen, 2004. június 7-9.
5. **Bölskei K.**, Pethő G., Szolcsányi J. Heat Injury-Induced Drop of the Noxious Heat Threshold: A Novel Method for the Study of Thermonociception and Its Pharmacological Modulation. 10th Scientific Symposium of the Austrian Pharmacological Society (APHAR), Vienna, Austria, 23-26 September 2004.
6. Pethő G., **Bölskei K.**, Horváth D., Szolcsányi J. Thermal hyperalgesia evoked by a mild heat injury and its pharmacological modulation as measured with a novel increasing-temperature water bath. Magyar Idegtudományi Társaság 11. Kongresszusa, Pécs, 2005. január 26-29.
7. **Bölskei K.**, Horváth D., Pethő G., Szolcsányi J. Enyhe hőtraumával indukált termális hiperalgégzia patkányokon: új állatkísérletes model analgetikumok vizsgálatára. Magyarországi Fájdalom Társaság 2005. évi Tudományos Ülése, Siófok, 2005. október 21-22.

A DISSZERTÁCIÓBAN NEM SZEREPLŐ EREDETI KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

1. Almási R., Pethő G., **Bölskei K.**, Szolcsányi J. Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a novel heat allodynia model sensitive to analgesics. Br J Pharmacol 2003; 139: 49-58. IF: 3,611
2. Lázár Zs., Benkó R., **Bölskei K.**, Rumbus Z., Wolf M., Holzer P., Maggi C.A., Barthó L. Actions of endothelin and corticotropin releasing factor in the guinea-pig ileum: no

- evidence for an interaction with capsaicin-sensitive neurons. *Neuropeptides* 2003; 37: 220-232. IF: 2,153
3. Szolcsányi J., Sándor Z., Pethő G., Varga A., **Bölskei K.**, Almási R., Riedl Zs., Hajós Gy., Czéh G. Direct evidence for activation and desensitization of the capsaicin receptor by N-oleoyldopamine on TRPV1 transfected cell line, gene deleted mice and in the rat. *Neurosci Lett* 2004; 361: 155-158. IF: 2,019
 4. Szabó Á., Helyes Zs., Sándor K., Bite A., Pintér E., Németh J., Bánvölgyi Á., **Bölskei K.**, Elekes K., Szolcsányi J. Role of TRPV1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 111-119. IF: 4,335
 5. Jakab B., Helyes Zs., Varga A., **Bölskei K.**, Szabó Á., Sándor K., Elekes K., Börzsei R., Keszthelyi D., Pintér E., Pethő G., Németh J., Szolcsányi J. Pharmacological characterization of the TRPV1 receptor antagonist JYL1421 (SC0030) in vitro and in vivo in the rat. *Eur J Pharmacol* 2005; 517: 35-44. IF: 2,432
 6. Varga A., **Bölskei K.**, Szőke É., Almási R., Czéh G., Szolcsányi J., Pethő G. Relative roles of protein kinase A and protein kinase C in modulation of TRPV1 receptor responsiveness in rat sensory neurons in vitro and peripheral nociceptors in vivo. *Neuroscience* 2006; 140: 645-657. IF: 3,45