

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A TERMONOCICEPCIÓ VIZSGÁLATA
HAGYOMÁNYOS IN VITRO ÉS ÚJ, A NOCICEPTÍV
HŐKÜSZÖB MÉRÉSÉN ALAPULÓ IN VIVO
MÓDSZEREKKEL**



Dr. Pethő Gábor

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet**

2017

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	4
1.1. A nociceptorok fajtái, különös tekintettel a termonociceptorokra	4
1.2. A termonocicepció vizsgálómódszerei	4
1.2.1. Latenciaidő-mérésen alapuló állatkísérletes magatartási tesztek a termonocicepció vizsgálatára	5
1.2.2. A latenciaidő-mérésen alapuló termonociceptív magatartási tesztek hátrányai	6
1.2.3. A termális fájdalomküszöb mérésén alapuló magatartási tesztek	6
1.3. A termális ingerekkel aktiválható ioncsatornák	7
1.3.1. TRPV1	7
1.3.2. Egyéb hőérzékeny ioncsatornák	8
1.3.3. Hideggel aktiválható ioncsatornák	9
1.4. A peptiderg polimodális nociceptorok hármas funkciója	10
2. ÁLTALÁNOS CÉLKITŰZÉSEK, AZ ÉRTEKEZÉS LOGIKAI STRUKTÚRÁJA	10
3. IN VITRO VIZSGÁLATOK A NOCICEPTOROK FORRÓ INGERRE ADOTT VÁLASZÁVAL ÉS ANNAK SZENZIBILIZÁCIÓJÁVAL KAPCSOLATBAN	11
3.1. Módszerek	11
3.2. A ciklooxygenáz-termékek szerepe a bradikinin hőszenzibilizáló hatásában izolált patkánybőr polimodális nociceptoraiban	12
3.2.1. Előzmények és célkitűzés	12
3.2.2. Eredmények	12
3.2.3. Megbeszélés	13
3.3. A nociceptorok termális szenzibilizációja és aktivációja közötti kapcsolat a bradikinin példáján: egy vonzó hipotézis	13
3.4. A PGE₂ és PGI₂ hatása a forró ingerrel kiváltott nociceptor-kisülésre és CGRP-felszabadulásra izolált patkánybőrben	14
3.4.1. Előzmények és célkitűzés	14
3.4.2. Eredmények	14
3.4.3. Megbeszélés	15
3.5. TRPV1-receptor-antagonisták hatása a stimulált CGRP-felszabadulásra izolált patkánybőrben	15
3.5.1. Előzmények és célkitűzés	15
3.5.2. Eredmények	16
3.5.3. Megbeszélés	16
4. A MAGATARTÁSI NOCICEPTÍV HŐKÜSZÖB MÉRÉSÉRE ALKALMAS MŰSZEREK ÉS HŐKÜSZÖBCSÖKKENÉSEN ALAPULÓ TERMÁLIS ALLODYNIA-MODELLEK KIFEJLESZTÉSE ÉS VALIDÁLÁSA	17
4.1. Előzmények és célkitűzés	17
4.2. A nociceptív hőküszöb mérését alkalmazó patkánykísérletek közös metodikai elemei	17
4.3. Az emelkedő hőmérsékletű forró lap és a resiniferatoxinnal kiváltott hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodynia-moddell validálása patkányban	18
4.3.1. Célkitűzés	18
4.3.2. Módszerek	18
4.3.3. Eredmények és megbeszélés	19
4.4. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő és az enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodynia-moddell validálása patkányban	21
4.4.1. Előzmények és célkitűzés	21
4.4.2. Módszerek	21
4.4.3. Eredmények és megbeszélés	22

4.5. A sebési bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodynia-modell validálása patkányban	23
4.5.1. Előzmények és célkitűzés	23
4.5.2. Módszerek	23
4.5.3. Eredmények és megbeszélés	24
4.6. TRPV1-receptor-antagonisták összehasonlító vizsgálata patkányban a nociceptív hőküszöb csökkenésén alapuló hőallodynia-modellekben	24
4.6.1. Előzmények és célkitűzés	24
4.6.2. Módszerek	25
4.6.3. Eredmények	25
4.6.4. Megbeszélés	26
4.7. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő validálása egérfarkon történő hőküszöbmérésre és továbbfejlesztése egérbefogó hengerek alkalmazásával	26
4.7.1. Előzmények és célkitűzések	26
4.7.2. Módszerek	26
4.7.3. Eredmények	27
4.7.4. Megbeszélés	28
5. A NOCICEPTÍV HŐKÜSZÖB MÉRÉSÉNEK ALKALMAZÁSA A TRPV1-RECEPTOR FUNKCIÓJÁNAK ÉS A TERMONOCICEPCIÓ MECHANIZMUSAINAK VIZSGÁLATÁBAN	28
5.1. Módszerek	29
5.2. Az enyhe hőtraumával és a plantáris bemetszéssel kiváltott termális allodynia mediátorainak összehasonlító vizsgálata	33
5.2.1. Előzmények és célkitűzés	33
5.2.2. Eredmények és megbeszélés	33
5.3. A TRPV1-csatornán ható zsírsavamidok vizsgálata in vitro és in vivo	34
5.3.1. Előzmények és célkitűzés	34
5.3.2. Eredmények	34
5.3.3. Megbeszélés	35
5.4. A protein-kináz A és a protein-kináz C szerepe a TRPV1-receptor érzékenységének meghatározásában in vitro és in vivo	36
5.4.1. Előzmények és célkitűzések	36
5.4.2. Eredmények	36
5.4.3. Megbeszélés	37
5.5. A decentralizált nociceptorok kémiai stimulációjával kiváltott távoli antiallodyniás hatás vizsgálata	37
5.5.1. Előzmények és célkitűzés	37
5.5.2. A távoli antiallodyniás hatás vizsgálatának elvi sémája	38
5.5.3. Eredmények és megbeszélés	38
5.6. A TRPV1- és a TRPA1-ioncsatornák szerepe egérben a nociceptív hőküszöb meghatározásában és a mustárolajjal kiváltott nociceptív reakciókban	40
5.6.1. Előzmények és célkitűzések	40
5.6.2. Eredmények és megbeszélés	40
5.7. A TRPV1-receptor-agonistákkal kiváltott deszenzibilizáció vizsgálata a nociceptív hő- és hideg küszöb mérésével	41
5.7.1. Előzmények és célkitűzések	41
5.7.2. Eredmények és megbeszélés	42
5.8. A nociceptív hőküszöb és a latenciaidő összehasonlító vizsgálata a carrageninnel kiváltott termális szenzibilizációban	43
5.8.1. Előzmények és célkitűzés	43
5.8.2. Módszerek	44
5.8.3. Eredmények és megbeszélés	44

6. A FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS FELISMERÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA	45
7. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	47
8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	48
9. IRODALOMJEGYZÉK	50
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	55

1. BEVEZETÉS

Az értekezés a forró ingerekkel kiváltott fájdalom állatkísérletes vizsgálata során nyert eredményeken alapul. A fájdalom csak emberben vizsgálható érzéskvalitás, amelynek állatkísérletes megfelelője a **nocicepció**, vagyis a (potenciálisan) szövetkárosító ingerek által kiváltott elkerülő, **nocifenzív magatartási reakció**, amely alapján feltételezhető, hogy az állat hasonló érzetet él át, mint fájdalom esetén az ember. A **hiperalgédia** az enyhe fájdalmas ingerek által kiváltott fokozott fájdalomérzetet; a tesztingernek megfelelően lehet termális, mechanikai vagy kémiai. Az **allodynia** – egészséges szervezetben – nem-fájdalmas ingerekkel kiváltott fájdalomérzet, amely szintén lehet termális, mechanikai, illetve kémiai.

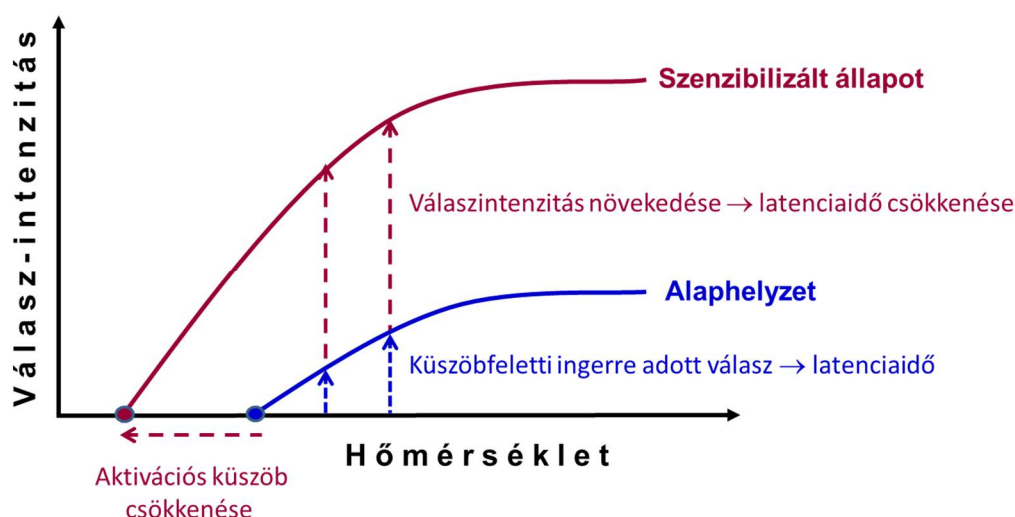
1.1. A nociceptorok fajtái, különös tekintettel a termonociceptorokra

A forró ingerekkel aktiválható termonociceptorok legjelentősebb populációját a – C vagy A δ rostokkal bíró – „**mechano–heat-sensitive**” (C-MH, A-MH) **nociceptorok**, képezik, amelyek nevüket onnan kapták, hogy erős mechanikai és forró ingerekkel aktiválhatók. Kiderült, hogy ezek számos kémiai ágenssel is aktiválhatók, így ezek valójában **polimodális nociceptorok** (Perl, 1996). Jelentőségüket egyrészt magas arányuk (a patkány bőrében az összes afferens C rost kb. felét teszik ki) adja, másrészt az a tény, hogy kiemelt szerepük van mind a forró ingerek, mind a kémiai ágensek detektálásában. A C polimodális nociceptorok hőküszöbe szignifikánsan alacsonyabb, mint az A δ típusúaké (Leem *et al.*, 1993). Neurokémiai alapon a C polimodális nociceptorok két alcsoportba oszthatók (Nagy és Hunt, 1982). Az egyik alpopuláció neuronjai jelentős mennyiségben tartalmaznak neuropeptideket (pl. substance P [SP], neurokinin A és B [NKA, NKB], kalcitonin-gén-rokon peptid [CGRP], szomatosztatin [SOM]). A másik alcsoportba tartozó nociceptorok peptidtartalma minimális, és membránjukban található egy szénhidrátcsoporthoz, amely képes kötni egy növényi lektint, az izolektin-B₄-et (IB₄). Mind az IB₄-negatív (**peptiderg**), mind az IB₄-pozitív (praktikusan **nem-peptiderg**) nociceptív szenzoros neuronok aktiválhatók forró ingerrel.

1.2. A termonocicepció vizsgálómódszerei

A tágabb értelemben vett termonocicepció vizsgálata során lehetőség van forró ingerrel kiváltott membrán-ionáramok, Ca²⁺-akkumuláció formájában történő idegi aktiváció mérésére szenzoros neuronok sejttestén *in vitro*. Klasszikus módszer az idegi aktivitás (akciós potenciál) elvezetése nociceptív szenzoros rostokról (egyrost-elvezetés) *in vitro* vagy *in vivo*. A peptiderg nociceptorok aktivációja követhető a neuropeptid-felszabadulás mérésével, szintén *in vitro* vagy *in vivo*. Klasszikus és sokszor alkalmazott eljárás a nociceptív magatartási tesztek végzése éber állatokon, amely során hőingerekkel kiváltott nocifenzív (fájdalomelkerülő) reakciókat vizsgálnak különféle elrendezésekben. A termonocicepció vizsgálatára használatos módszerek elméleti hátterét az **1. ábra** demonstrálja. Az alkalmazott termális inger intenzitása (praktikusan a hőmérséklet) és a kiváltott válasz nagysága közötti összefüggés egy hipotetikus függvénnyel írható le. E függvény jellegzetes pontja az **aktivációs küszöb**, vagyis az a legalacsonyabb (forró) hőmérséklet, amelyik választ képes kiváltani. Válaszon a kísérleti paradigmától függően érthetünk ionáramot, akciós potenciált vagy nocifenzív magatartási reakciót. Értelemszerűen minden küszöbfeletti hőmérsékletre tartozik a válaszreakció egy adott nagysága. Az állatkísérletes magatartási vizsgálatokban típusosan mért **latenciaidő** (az elkerülő, nocifenzív reakció kiváltásáig eltelt idő) a válaszintenzitás által valamilyen módon meghatározott, indirekt paramétere a függvénynek.

Amennyiben a hőérzékeny nociceptorok érzékenyítődése jön létre (termális szenzibilizáció), a függvény képe karakterisztikusan megváltozik. Típusos esetben az aktivációs küszöb lecsökken, azaz alacsonyabb hőmérséklet is képes válasz kiváltására, mint ami alaphelyzetben szükséges volt ehhez, illetve a küszöbfeletti ingerek nagyobb válaszokat váltanak ki (emiat lecsökken a latenciaidő); mindezek következményeként a görbe balra tolódik, és függőleges irányban megnyúlik.



1. ábra. Hipotetikus ingerintenzitás–hatás összefüggés a nociceptorok termális aktivációjára és annak szenzibilizációjára vonatkozóan. A részleteket lásd a szövegben.

1.2.1. Latenciaidő-mérésen alapuló állatkísérletes magatartási tesztek a termonocicepció vizsgálatára

Ezeknél a módszereknél küszöbfeletti intenzitású hőingert irányítanak az állat adott testrészére (típusosan fark, végtagok), és az elkerülő, nocifenzív reakció bekövetkeztéig eltelt latenciaidőt mérik (**1. ábra**).

Standard módszer a „tail-flick” **teszt**, amelynek során sugárzó hőt irányítanak a kézben tartott vagy más módon mozgásában akadályozott állat (patkány, egér) farkára, és a fark elrántásáig eltelt időt mérik (D’Amour és Smith, 1941). A latenciaidő függ a fark bőrének – dominánsan a fark perfúziója és az aktuális környezeti hőmérséklet által meghatározott – kiindulási hőmérsékletétől: alacsonyabb bőrhőmérséklet hosszabb latenciaidőt eredményez és fordítva (Berge *et al.*, 1988; Eide és Tjolsen, 1988). Hangsúlyozandó, hogy a fark fontos szerepet játszik a patkány és egér hőszabályozásában, emiat a farkbőr hőmérséklete jelentősen ingadozhat, sőt még termoneutrális környezetben is jelentős fluktuáció detektálható a fark bőrének hőmérsékletében (El Bitar *et al.*, 2014).

A „tail-flick” teszt egyik variánsa, amikor a kézben tartott egér vagy patkány farkát konstans hőmérsékletű forró vízbe mártják, és a fark kirántásáig eltelt latenciaidőt mérik („tail immersion” vagy **farkbemerítéses teszt**, Ben-Bassat *et al.*, 1959). Lehetőség van különböző hőmérsékletű (típusosan 48–56 °C) vízfürdők alkalmazására, amelyek értelemszerűen eltérő latenciaidőket eredményeznek: alacsonyabb hőmérsékletnél hosszabb a latenciaidő és fordítva. Egy másik variáns esetében az egyik hátsó végtagot merítik állandó hőmérsékletű forró vízbe („paw immersion” vagy **lábbemerítéses teszt**).

A **Hargreaves-féle „paw withdrawal”** vagy **„plantar” teszt (plantárteszt)** elvében hasonló a „tail-flick” teszthez, de ebben az esetben az átlátszó plexilapon szabadon mozgó patkány vagy egér talpára irányítanak hőszugárzást, és a láb emeléséig eltelt időt mérik (Hargreaves *et al.*, 1988). Előnye, hogy a termoregulációban fontos szerepet játszó farok helyett a hátsó végtag reakcióját méri. Mindazonáltal patkányban kimutatták, hogy a kiindulási bőrhőmérséklet – ami függ az aktuális környezeti hőmérséklettől – ennél a tesztnél is befolyásolja a latenciaidőt, és még termoneutrális környezetben is jelentős periodikus fluktuáció mutatható ki a hátsó végtag bőrének hőmérsékletében (El Bitar *et al.*, 2014). A környezeti hőmérséklet csekély, 2–4 °C-os változása már szignifikáns eltérést eredményez a latenciaidőben. A módszer további hátránya, hogy az állat talpa nem mindig egyforma mértékben simul hozzá az aljzathoz.

A **„hot plate” (forró lap) teszt** (Woolfe és Mac-Donald, 1944) esetében az egér vagy patkány szabadon mozog egy fémfelületen, amelynek hőmérsékletét állandó értéken (48–56 °C) tartják; gyakran használt hőmérséklet az 52 vagy 55 °C. A típusos nocifenzív reakció valamelyik végtag nyalása, illetve az állat ugrása, de egyéb magatartásformák is előfordulhatnak. A módszer esetében jelentős a kiindulási (kontroll) latencia állatcsoportok közötti variabilitása, ami abban nyilvánul meg, hogy ugyanazon laboratóriumban különböző vizsgálatok keretében végzett mérések eltérő latenciaidőket mutatnak (Vierck és Cooper, 1984).

1.2.2. A latenciaidő-mérésen alapuló termonociceptív magatartási tesztek hátrányai

Attól függően, hogy milyen intenzitású forró ingert alkalmaznak, változik a latenciaidő. A forró lap, farok- és lábbemerítéses tesztek esetében az alkalmazott küszöbfeletti ingerintenzitás °C-ban egzakt módon megadható, de a sugárzó hőt alkalmazó „tail-flick” és a plantárteszt esetében ez többnyire csak indirekt módon (energia formájában vagy relatív skála segítségével) jellemezhető. Ez utóbbi tesztek esetében a módszernek más készülékre való „transzportálhatósága” rendkívül problémás, ami megnehezítheti vagy akár lehetetlenné teheti a különböző ingerintenzitásokra beállított készülékekkel nyert eredmények összevetését. A latenciaidő függ az ingerelt testrész(ek) bőrének a teszt végzésének idején fennálló aktuális hőmérsékletétől, ami viszont a bőr perfúziója által meghatározott (lásd feljebb). A latenciaidő nem vethető össze az *in vivo* vagy *in vitro* elektrofiziológiai kísérletekben, főleg az egyrost-elvezetést, illetve a „patch-clamp” technikát alkalmazókban rutinszerűen meghatározott aktivációs küszöbvel, vagyis azzal a legalacsonyabb forró hőmérséklettel, amely a nociceptív rost receptív területére alkalmazva akciós potenciál(oka)t, illetve a „patch-clamp” kísérletben ionáramot vált ki. Hasonlóképpen humán vizsgálatokban is a hőküszöböt, a termális fájdalomküszöböt mérik, amely megint csak nem vethető össze a latenciaidővel. A latenciamérés elvéből következően ezzel a módszerrel a klinikailag releváns termális allodynia nem vizsgálható, hiszen ez utóbbi *per definitionem* a hőküszöb csökkenését jelenti, míg a latenciaidő mérése mindig küszöbfeletti ingerrel történik.

1.2.3. A termális fájdalomküszöb mérésén alapuló magatartási tesztek

Ezeknél a módszereknél nem-fájdalmas (küszöb alatti) kiindulási hőmérsékletről indulva fokozatosan növekvő intenzitású (emelkedő hőmérsékletű) hőingert irányítanak az ember (vagy állat) adott testrészére, és azt a legalacsonyabb forró hőmérsékletet határozzák meg, amelynél emberben fájdalomérzet jelentkezik (**termális fájdalomküszöb**), illetve állatban bekövetkezik az elkerülő, nocifenzív reakció (**nociceptív hőküszöb**, lásd 1. ábra). A termális fájdalomküszöb mérése emberben már régóta alkalmazott módszer a pszichofizikai és elektrofiziológiai vizsgálatokban egyaránt (Hardy *et al.*, 1950; Meyer és Campbell, 1981; LaMotte *et al.*, 1982).

Állatkísérletekben is történtek próbálkozások a nociceptív hőküszöb meghatározásán alapuló készülékek kifejlesztésére (Oden és Oden, 1982; Szolcsányi, 1985; 1987b; Hunskaar *et al.*, 1986; Farré *et al.*, 1989), azonban egyik módszer sem terjedt el, a legtöbb esetben a módszert leíró közleményen kívül más publikáció nem számolt be a velük szerzett adatokról.

1.3. A termális ingerekkel aktiválható ioncsatornák

A termoszenzitív ioncsatornára vonatkozó referenciákat illetően lásd Nilius és Szállási, 2014; Mickle *et al.*, 2015.

1.3.1. TRPV1

A csípős paprikában található kapszaicin régóta ismert irritáns, amely a bőrre vagy nyálkahártyára adva intenzív, égő fájdalmat képes kiváltani. A kapszaicin hatása nagymértékben szelektív a C és A δ polimodális nociceptorokra (Szolcsányi, 1987a; 1987b; Szolcsányi *et al.*, 1988). A kapszaicin farmakológiai receptorát 1997-ben klónozták (Caterina *et al.*, 1997), ma „Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid-1” (TRPV1) néven ismert. A TRPV1 a polimodális nociceptoroknak mind a peptiderg, mind a nem-peptiderg alcsoportjában kifejeződik. A TRPV1 6 transzmembrán doménből épül fel, aktivációjakor megnyílik az a kationcsatorna, amelyet négy TRPV1-fehérjelánc képez homotetramer formációban. A nem-szelektív kationcsatorna leginkább Ca²⁺-ra permeábilis, kisebb mértékben Na⁺ és K⁺ ionokat is átenged. Az aktivációjakor fellépő domináns, befelé irányuló Na⁺ és Ca²⁺ ionáram a membrán depolarizációját váltja ki. A TRPV1 a kapszaicinen kívül számos más növényi eredetű irritánssal (pl. resiniferatoxin [RTX], olvanil, piperin), alacsony extracelluláris pH-val, valamint speciális módon fizikai ingerrel, 43 °C-nál magasabb hőmérséklettel is aktiválható. Egyes gyulladásos mediátorok, mint pl. a bradikinin, PGE₂, szerotonin, ATP ugyan nem kötődnek TRPV1-hez, azonban saját receptoruk izgatásával olyan jelátviteli folyamatokat indítanak el, amelyek a TRPV1 foszforilációjához és ezáltal annak szenzibilizációjához és/vagy aktivációjához vezetnek. Mindezek alapján a TRPV1 nagyszámú exogén és endogén fájdalomkeltő kémiai ágens, valamint a forró ingerek egyfajta molekuláris integrátorának tekinthető. A TRPV1-receptor agonisták iránti érzékenységének szabályozásában lényeges szerepet játszik a receptorfehérje foszforilációja, amely érzékenyíti a receptort, míg a defoszforiláció deszenzibilizáló hatású (a referenciákat illetően lásd Varga *et al.*, 2006). Számos gyulladásos mediátor (pl. bradikinin, ATP) képes a protein-kináz C (PKC), illetve a prosztaglandinok, szerotonin a protein-kináz A (PKA) aktiválása révén foszforilálni és így érzékenyíteni a TRPV1-et.

Amint arra már korábban utalás történt, a TRPV1-receptort számos olyan endogén mediátor képes aktiválni, amelyek gyulladás, szövetkárosodás, idegsérülés során szintetizálódnak vagy szabadulnak fel. Ez a tény vetette fel először annak lehetőségét, hogy a TRPV1 farmakológiai blokkolása fájdalomcsillapító hatást eredményezhet. 2000-ben hozzáférhetővé váltak TRPV1-génhiányos egerek, amelyek vizsgálata során kiderült, hogy a TRPV1 hiánya gyulladásos modellekben a termális hiperalgéziát szinte teljesen kivédte (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000). Mindez számos gyógyszergyárnak nagy lendületet adott TRPV1-receptor-antagonisták mint új típusú, perifériás támadáspontú analgetikumok fejlesztéséhez, ennek során több mint 20 vegyület került preklinikai vizsgálatra (Trevisani és Gatti, 2013; Tabrizi *et al.*, 2017). Állatkísérletes vizsgálatokban megerősítették hatékonyságukat mechanikai hiperalgézia-modellekben is. A klinikai kipróbálás fázisában két nem várt mellékhatásukra derült fény. Az egyik a testhőmérséklet megemelkedése (hipertermia), amelynek pontos mechanizmusa máig nem tisztázott. A másik nem

várt probléma a termális fájdalomküszöb megemelkedése volt (emellett a küszöbfeletti hőingerek detektálása is károsodást mutatott), ami forrázásos sérülésekhez vezetett pl. zuhanyozás vagy meleg italok fogyasztása kapcsán. Mindazonáltal sikerült olyan vegyületet előállítani, amelyik mentes a hipertermiától, és vannak megalapozott stratégiák a forró ingerek detektálásának megőrzésére is.

Ismert, hogy a TRPV1-csatorna aktivációs küszöbe 43°C (Caterina *et al.*, 1997). Ez az érték hasonló az izolált primer afferens neuronok, a forró ingerekre érzékeny polimodális nociceptorok aktivációs küszöbéhez, valamint az ember bőrén mért termális fájdalomküszöbhez. Mindezek alapján jogosnak tűnt a feltételezés, hogy a nociceptív hőküszöb döntően a TRPV1-csatorna által meghatározott érték. Meglepő módon a TRPV1-génhiányos egereken végzett vizsgálatok ezt a nézetet nem támasztják alá. Egyfelől a latenciaidő-mérésen alapuló termonociceptív magatartási módszerekkel az alacsonyabb (küszöbközel) ingerintenzitások esetén nem sikerült eltérést kimutatni sem a farkon, sem a talpon; ugyanakkor magasabb ingerlési intenzitások/hőmérsékletek esetén a latenciaidő megnyúlását tapasztalták (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2011; Hoffmann *et al.*, 2013; Marics *et al.*, 2014). Hasonló adatokat nyertek TRPV1-antagonisták alkalmazásával egérben és patkányban. Ezzel szemben a TRPV1-antagonisták emberben történő tesztelése során a termális fájdalomküszöb megemelkedését tapasztalták a küszöbfeletti hőingerek detektálásának károsodásával együtt.

Kapszaicin vagy más TRPV1-receptor-agonista, mint pl. RTX magasabb koncentrációban és/vagy hosszabb ideig és/vagy ismételten történő alkalmazása esetén a kezdeti izgató, fájdalomkeltő hatás lecsengése után egy másodlagos effektus, a csökkent válaszkészség formájában manifesztálódó ún. deszenzibilizáció alakul ki (Szolcsányi, 1987a; 1987b; Szolcsányi *et al.*, 1988; Szolcsányi, 1993). Ennek két formája, illetve stádiuma különböztethető meg. Alacsonyabb agonistakoncentrációk és rövidebb expozíciós idők mellett csak maga a TRPV1-receptor deszenzibilizálódik, vagyis a TRPV1-et expresszáló nociceptív idegvégződés csak azon ingerekkel szemben mutat csökkent válaszkészséget, amelyek a TRPV1-en hatnak (pl. kapszaicin, RTX). Ennek a jelenségnek a hátterében a TRPV1 defoszforilációja áll: a TRPV1-en keresztül beáramló nagyobb mennyiségű Ca^{2+} a kalmodulinnal komplexet képezve aktiválja a kalcineurint (= protein-foszfataz-2B), amely defoszforilálja a TRPV1-et, csökkentve annak válaszkészségét (Cholewinski *et al.*, 1993; Docherty *et al.*, 1996; Koplas *et al.*, 1997). Magasabb agonistakoncentrációknál és hosszabb expozíciós időknél a TRPV1-et expresszáló egész idegvégződésre kiterjed a deszenzibilizáció, azaz hő, mechanikai és kémiai ingerekkel szemben egyaránt csökken a polimodális nociceptorok reaktivitása (Szolcsányi, 1987a). Az idegvégződés-szintű deszenzibilizáció hátterében a nociceptív idegvégződés funkcionális/morfológiai károsodása áll.

1.3.2. Egyéb hőérzékeny ioncsatornák

A TRPV2 transzfektált sejtekben 53°C feletti hőingerrel aktiválható. Expresszióját a közepes és nagy méretű DRG neuronok egy alcsoportjában mutatták ki. A TRPV2 nem játszik szerepet a nociceptív hőküszöb beállításában, nemcsak magas aktivációs küszöbe, hanem a TRPV2-génhiányos egerekben tapasztalt fenotípus miatt sem: sem a farokimmerziós, sem a forró lap, sem a Hargreaves-féle plantártesztben nem volt különbség a génhiányos és a vad típusú állatok latenciáideje között, még 54–58 °C-on végzett stimuláció esetén sem.

A TRPV3-csatornát humán szenzoros neuronokból és rágsálók keratinocytaiból klónozták. Termális aktivációs küszöbe 33 °C körül van. A hőmérséklet fájdalmas tartományba való emelésével a csatorna által közvetített áram intenzitása nő. A TRPV3-génhiányos egerekben latenciamegnyúlást tapasztaltak a farokimmerziós teszt és a forró lap esetében is, de csak a

masszívan küszöbfeletti stimulációs hőmérsékleteknél (50, illetve 55 °C), a 45–48 °C-os tartományban nem.

A **TRPV4**-ioncsatornát mint hipoozmotikus közeggel aktiválható nem-szelektív kationcsatornát azonosították. Később derült ki, hogy hőingerekkel is aktiválható, küszöbe az expressziós rendszertől függően 25–34 °C. A TRPV4-génhiányos egerek a forró lapon (45–50 °C), vagy a plantártesztben vizsgálva nem mutattak fenotípusos eltérést a termonocicepciót illetően. Ezzel ellentétben a farokimmerziós tesztben – noha a 47–50 °C-os tartományban nem volt különbség a TRPV4 KO állatokban – 45 és 46 °C-on vizsgálva a génhiányos állatokban hosszabb latenciaidőt mértek, mint a vad típusúakban. Egy ismételt analízisben kétfajta genetikai alapon (C57BL6 és 129S6) konstruált törzseket felhasználva vizsgálták TRPV3-génhiányos, valamint kettős (TRPV3 és TRPV4) KO egerek nociceptív magatartási válaszkészségét a farokimmerziós tesztben (48–52 °C), a forró lapon (52,5 és 55 °C) és a plantártesztben. Nem találtak szignifikáns különbséget a vad típushoz képest egyik esetben sem (kivéve a kettős KO-t a plantárteszt esetében, amelynél enyhe latenciamegnyúlás volt mérhető).

A TRP melastatin-3 (**TRPM3**) csatornát hipoozmotikus környezettel aktiválható nem-szelektív kationcsatornaként azonosították. Kimutatták, hogy a csatorna hővel (>30 °C) is aktiválható. TRPM3-génhiányos egerekben a farokimmerziós tesztben a 45–57 °C-os tartományban a latenciaidő megnyúlt, míg a forró lapon 50 °C-on nem, de az 52–58 °C-on volt latenciaidő-megnyúlás a vad típushoz képest.

Az **anoktamin 1** (ANO1) Ca^{2+} -aktiválta Cl^- -csatornaként azonosított fehérje. Az ANO1 transzfektált sejtekben hővel is aktiválható, 44 °C-os küszöbhőmérséklettel befelé irányuló Cl^- -áramot közvetít. A DRG neuronokban expresszáldó ANO1 aktivációjakor viszont a Cl^- -ionok *kifelé* áramlanak, ezáltal okozva depolarizációt. Ezt az teszi lehetővé, hogy e neuronokban magas intracelluláris Cl^- -koncentráció jön létre a $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -kotranszporter fokozott expressziója és működése révén. Az ANO1 szelektív genetikai ablációja egér DRG neuronokban („conditional” KO) a forró ingerek érzékelésének zavarát okozta: a farokimmerziós tesztben az 50–54 °C-os tartományban, illetve a plantártesztben alkalmazott magasabb ingerintenzitás esetében latenciaidő-megnyúlást tapasztaltak. Mindez azt mutatja, hogy az ANO1 részt vesz a forró ingerek detektálásában mind az egér farkán, mind a talpán, de igazoltan csak a küszöbfeletti hőingerek esetében.

1.3.3. Hideggel aktiválható ioncsatornák

A **TRPM8** szintén nem-szelektív kationcsatornát foglal magába, és homotetramer formában működik. Aktivációs küszöbe 26 °C körül van, a kiváltott ionáram mind a nem fájdalmas (15 °C-ig), mind a fájdalmas hidegtartományban (15–8 °C) növekszik. A hűsítő kémiai ágensek (mentol, eukaliptol, icilin) hatásos aktivátorai a TRPM8-nak. A TRPM8-génhiányos egerekben súlyosan károsodik a nem fájdalmas hidegingerek detektálása, a fájdalmas hidegingerekkel szembeni válaszkészség is csökken, de nem szűnik meg teljesen, jelezve a TRPM8 nem kizárólagos szerepét a fájdalmas hidegingerek felfogásában. Az elvárásnak megfelelően a forró ingerek detektálásában nem találtak eltérést a TRPM8-génhiányos egerekben.

A **TRPA1** aktivációs küszöbe 17 °C. A TRPA1-et kifejező neuronok döntő többsége TRPV1-et és CGRP-t is expresszál, de TRPM8-cal nem mutat kolokalizációt. A TRPA1 hidegérzékelésben betöltött szerepére vonatkozóan ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre. Ezt jól illusztrálják a TRPA1-génhiányos egereken végzett vizsgálatok: öt munkacsoport nem talált eltérést a fájdalmas hideg ingerekkel kiváltott magatartási reakciókban, illetve egyrost-aktivitásban

a vad típushoz képest, másik három viszont igen. Az elvárásnak megfelelően a forró ingerek detektálásában nem találtak eltérést a TRPA1-génhiányos egerekben a vad típushoz. Egy újabb tanulmány azonban meglepő adatokat szolgáltatott: a TRPA1-génhiányos egerekben a n. saphenusról történt egyrost-elvezetési kísérletekben a C polimodális nociceptorok csökkent hőválaszát detektálták a rostok aktivációs küszöbének megemelkedésével, illetve magas ingerlési intenzitás esetén a Hargreaves-tesztrel mért latenciaidő is megnyúlt (Hoffmann *et al.*, 2013).

1.4. A peptiderg polimodális nociceptorok hármas funkciója

A különböző neuropeptideket expresszáló polimodális nociceptorok perifériás végződése – a nem-peptiderg primer szenzoros neuronok terminálisaihoz hasonlóan – rendelkeznek **afferens funkcióval**: adekvát inger hatására membránjukban lokális depolarizáció (receptorpotenciál) alakul ki, amely, ha eléri a feszültségfüggő Na^+ -csatornák aktivációs küszöbét, tovaterjedő akciós potenciálokat vált ki. Az inger intenzitására vonatkozó információ frekvenciakód formájában továbbítódik a központi idegrendszerbe.

A járulékos neuropeptidtartalom többletfunkciókat biztosít a peptiderg érző neuronoknak (a referenciákat illetően lásd Szolcsányi, 2014). Adekvát inger vagy antidróm elektromos ingerlés hatására – a fent említett afferens funkcióval párhuzamosan – a vezikulákban tárolt neuropeptid exocytosis révén felszabadulnak az extracelluláris térbe. Ennek a folyamatnak a kiváltásához az intracelluláris Ca^{2+} -szint megemelkedése szükséges. A felszabaduló neuropeptid parakrin mediátorokként hatva az idegvégződés közelében különféle szöveti válaszokat hoznak létre: az SP főleg plazma-extravazációt, a CGRP vazodilatációt, az NKA a nem vaszkuláris simaizomzat kontrakcióját, a CGRP annak relaxációját; mindezen hatások együttesen képezik az idegvégződés **lokális, efferens funkcióját**.

A peptiderg nociceptorok harmadik funkciója egy **távoli, szisztémás hatás**, amelyet Pintér és Szolcsányi írt le. Altatott patkányokban és tengerimalacokban a hátsó gyökök, a n. ischiadicus vagy a n. vagus antidróm elektromos ingerlése, illetve a bőr nociceptorainak fájdalomkeltő irritánsokkal való kémiai ingerlése gátolta a test távoli területein a mustárolajjal, dextránnal vagy carrageninnel kiváltott gyulladásos reakciót (a referenciákat illetően lásd Pintér *et al.*, 2006; Szolcsányi *et al.*, 2004; 2011). Mindezeket a távoli gyulladásgátló hatásokat csökkentette a szomatosztatin receptorantagonistája, depletáló ágense vagy az ellene termelt poliklonális antitest. Ez a távoli gyulladásgátló hatás a plazma szomatosztatinszintjének emelkedésével járt együtt. Mindezek alapján arra lehetett következtetni, hogy a távoli gyulladásgátló hatást a perifériás nociceptorokból felszabaduló és a szisztémás keringésbe bejutó szomatosztatin közvetíti. Az érző neuronokból származó szomatosztatin szisztémás, hormonszerű működése alapján javasolta Szolcsányi a harmadik funkció elnevezéseként a „**szenzokrin**” jelzőt.

2. ÁLTALÁNOS CÉLKITŰZÉSEK, AZ ÉRTEKEZÉS LOGIKAI STRUKTÚRÁJA

Kutatói pályám kezdetétől fogva a primer afferens neuronok perifériás végződéseinek élettani és farmakológiai aspektusaival foglalkoztam Szolcsányi professzor munkacsoportjában. A disszertációban vázolt kísérleteink elsődleges célja a termonocicepció vizsgálata volt annak érdekében, hogy olyan célpontokat és mechanizmusokat azonosítsunk a perifériás nociceptorokban, amelyek farmakológiai befolyásolása új típusú, perifériás támadáspontú és ezáltal kevesebb

mellékhatással bíró analgetikumok kifejlesztéséhez vezethet. A jelen disszertáció alapját képező 16 közlemény három logikai egységbe sorolható. Az elsőbe 4 olyan vizsgálat tartozik, amelyek célja az volt, hogy *in vitro* rendszerben vizsgáljam a perifériás nociceptorok forró ingerre adott válaszát, illetve annak szenzibilizációját. Az egyrost-elvezetési elektrofiziológiai és a neuropeptid-felszabadulás mérését alkalmazó neurokémiai kísérletek egyik célja a bradikinin és a prosztaglandinok termális nociceptor-szenzibilizáló hatásának analízise volt. A másik cél a TRPV1 szerepének vizsgálata volt a forró ingerrel kiváltott bőrbeli neuropeptid-felszabadulásban. A második egységbe 5 olyan közlemény anyaga került, amelyek célja egy komplex metodikai fejlesztés volt: az „elfeledett” magatartási nociceptív hőküszöböt éber patkányban, illetve egérben mérő készülékek kifejlesztése és az azokra kidolgozott allodynia-modellek validálása, ennek részeként konvencionális és új, perifériás támadáspontú, potenciális analgetikumok vizsgálata. A harmadik egységbe (7 közlemény) olyan *in vivo* kísérletek kerültek, amelyek célja a termonocicepció mechanizmusának vizsgálata volt normál, szenzibilizált és deszenzibilizált állapotban a hőküszöbmérés mint érzékeny módszer alkalmazásával.

3. IN VITRO VIZSGÁLATOK A NOCICEPTOROK FORRÓ INGERRE ADOTT VÁLASZÁVAL ÉS ANNAK SENZIBILIZÁCIÓJÁVAL KAPCSOLATBAN

3.1. Módszerek

Egyrost-elvezetés polimodális nociceptorokról patkány lábháti bőr–n. saphenus preparátumon in vitro

A németországi kollaborációs partnerem laboratóriumában kifejlesztett szervfürdőt alkalmaztam, amelyben elhelyezhető patkány hátsó lábháti bőre és a vele összeköttetésben levő n. saphenus (Reeh, 1986). A 32 °C-on szintetikus intersticiális folyadékkal (SIF) superfundált bőr C polimodális nociceptorairól vezettem el egyrostaktivitást a n. saphenus idegtörzsének ismételt disszekcióját követően. A Spike/Spidi szoftver (Forster és Handwerker, 1990) segítségével történt az akciós potenciálok megkülönböztetése és off-line analízise. A forró ingerrel való tesztelés során a bőr corium felőli oldalán a hőmérsékletet 20 s alatt 32-ről 46 °C-ra növeltük, ami az epidermális oldalon 32-ről 52 °C-ra való felmelegítésnek felel meg. A hőválasz nagyságát a 20 másodperces ingerlési periódus alatt kialakuló akciós potenciálok számával jellemeztük.

Az immunreaktív CGRP felszabadulásának mérése patkány vagy egér lábháti bőrből enzimimmunesszé segítségével

A forró ingerekkel kiváltott immunoreaktív (i) CGRP-felszabadulást mértük izolált patkánybőrből enzimimmunesszé (EIA) segítségével (Kessler *et al.*, 1999). Patkányok mindkét hátsó végtag lábháti részéről nyert bőrlebenyeket műanyag rudakra rögzítettük a corium felőli résszel kifelé. A preparátumot 1,3 ml SIF-et tartalmazó üvegcsőbe tettük, és ezeket 32 °C-on temperált rázófürdőbe helyeztük. Limitált számú kísérletben vad típusú és TRPV1-génhiányos egerek hátsó lábának bőrlebenyeit használtuk. A CGRP koncentrációját az eluátumban EIA kit (Cayman, SPIbio, Franciaország által forgalmazott) és mikrolemez-olvasó (Dynatech, USA) segítségével határoztuk meg.

3.2. A ciklooxygenáz-termékek szerepe a bradikinin hőszenzibilizáló hatásában izolált patkánybőr polimodális nociceptoraiban

3.2.1. Előzmények és célkitűzés

Ismert, hogy a bradikinin számos hatásának közvetítésében prosztaglandinok vesznek részt (a részleteket illetően lásd Pethő és Reeh, 2012). Célunk annak eldöntése volt, hogy a bradikinin termális nociceptor-szenzibilizáló hatásában szerepet játszanak-e ciklooxygenáz (COX)-termékek (elsősorban prosztaglandinok) az izolált patkánybőr–n. saphenus preparátumban vizsgálva. Ehhez a flurbiprofen – egy királis szerkezetű, a COX-1-et és COX-2-t egyaránt gátló nem-szteroid gyulladásgátló (NSAID) – két enantiomerjét használtuk, amelyek közül az S(+)-flurbiprofen kb. 500-szor potensebb, mint az R(–)-flurbiprofen (Brune *et al.*, 1991), jelezve hogy ez az aktív izomer a COX-gátlás szempontjából. Patkányban a flurbiprofen racemizálódása kisebb mint 2%. A szert ezen tulajdonságai különösen alkalmassá teszik annak eldöntésére, hogy egy adott hatásban a COX-termékek szerepet játszanak-e.

3.2.2. Eredmények

A kísérletekben 38 olyan C polimodális nociceptort vizsgáltunk, amelyek vezetési sebessége kisebb volt 1 m/s-nál, reagáltak mechanikai és ingerre forró ingerre, de nem a hidegingerlésre, és amelyek bradikinin hatására legalább 50%-os hőválasz-növekedést mutattak. Bár egy korábbi vizsgálat (Liang *et al.*, 2001) ugyanezen a preparátumon kimutatta, hogy a bradikinin hőszenzibilizáló hatása rövid ideig tart és nem mutat tachyphylaxiát, 6 roston újra megvizsgáltuk ezeket a – jelen analízis szempontjából kritikus fontosságú – jellegzetességeket. A bradikinin hőválaszt fokozó hatása 10 percen belül teljesen lezajlott, és 10 perc múlva ismételt expozíció esetén nem tapasztaltunk érdemleges változást a szenzibilizáció mértékében.

Az S(+)-flurbiprofen hatását 18 roston vizsgáltuk. A szer adását megelőzően a bradikinin (10 μ M, 5 perc) jelentős hőszenzibilizációt váltott ki: szignifikánsan, kb. háromszorosára megnövelte a hőingerléssel kiváltott akciós potenciálok számát és ugyancsak szignifikánsan lecsökkentette az aktivációs hőküszöböt ($39,9 \pm 0,7$ -ről $34,3 \pm 0,7$ °C-ra). A receptív terület S(+)-flurbiprofennel történő superfúziója (1 μ M, 10 perc) praktikusán kivédte a bradikinin hőszenzibilizáló hatását: a peptid sem a hőválasz nagyságát nem tudta szignifikánsan megnövelni, sem pedig a hőküszöböt nem tudta szignifikánsan lecsökkenteni.

A kívülről adott prosztaglandinok hatását az S(+)-flurbiprofen okozta gátlásra 9 roston vizsgáltuk. Az S(+)-flurbiprofen ebben a rostpopulációban is blokkolta a bradikinin hőszenzibilizáló hatását mind a hőválasz nagyságának növekedését, mind a hőküszöbcsökkenést. A bradikininrel együtt adott PGE₂ és PGI₂ keveréke (mindkettő 10 μ M) részlegesen helyreállította a bradikinin hőszenzibilizáló hatását: a hőválasz-növekedést 43 ± 12 , a hőküszöbcsökkenést $40 \pm 19\%$ -ban.

Az R(–)-flurbiprofen hatását 14 roston vizsgáltuk. A receptív terület R(–)-flurbiprofennel (1 μ M, 10 perc) történő superfúzióját követően a bradikinin (10 μ M, 5 perc) még képes volt szignifikáns mértékű hőszenzibilizációt kiváltani, ugyanakkor a szenzibilizáció mértéke kisebbnek tűnt. A hőválasz növekedésének százalékos értéke alapján az R(–)-flurbiprofen okozta gátlás $33 \pm 21\%$ -os csökkenésnek felelt meg, ami nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. Hasonlóképpen a hőküszöbcsökkenés gátlása sem volt statisztikailag szignifikáns.

3.2.3. Megbeszélés

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a bradikinin hőszenzibilizáló hatása a patkány n. saphenusban futó C polimodális nociceptorokra jelentős mértékben COX-függő jelenség. Ezt a nézetet támogatja, hogy a hatást a nem-szelektív COX-gátló flurbiprofen aktív enantiomere praktikusán megszüntette, míg a kevésbé aktív izomer csak egy kisebb mértékű, statisztikailag nem szignifikáns gátlást okozott. Az S(+)-flurbiprofen valószínűsíthetően a COX-gátlás révén védte ki a bradikinin szenzibilizáló hatását, hiszen (i) az R(–)-flurbiprofen hatástalan volt; (ii) a szer hatása – legalábbis részben – felfüggeszthető volt kívülről adott prosztaglandinokkal (PGE₂ és PGI₂); (iii) a szert olyan koncentrációban adtuk, amelyben a racém keverék képes teljes mértékben gátolni a nyugalmi és a bradikinnel stimulált PGE₂-szintézist a patkány bőrében (Sauer *et al.*, 1998). Kimutatták, hogy a PGE₂ és a PGI₂ képes szenzibilizálni a nociceptorokat hővel szemben (Mizumura *et al.*, 1987; Rueff és Dray, 1993). A prosztaglandinok zöme feltehetően nem-neuronális eredetű, mivel a patkánybőr krónikus denervációja nem csökkentette a bradikinnel kiváltott PGE₂-felszabadulást (Sauer *et al.*, 2000).

3.3. A nociceptorok termális szenzibilizációja és aktivációja közötti kapcsolat a bradikinin példáján: egy vonzó hipotézis

Ez a hipotézis az alábbi ellentmondás feloldására született (a referenciákat illetően lásd Reeh és Pethő, 2000). Az *in vitro* lábháti bőr–n. saphenus preparátumon patkányban a bradikinin izgató (akciós potenciált kiváltó) és hőszenzibilizáló hatását döntően a B₂ bradikininreceptor közvetíti, amely hajlamos a deszenzibilizációra. Ennek megfelelően ismételt alkalmazás esetén a bradikinin izgató hatása jelentős tachyphylaxiát mutat, ezzel ellentétben a peptid termális szenzibilizáló hatása csökkenés nélkül ismételt, azaz nem mutat tachyphylaxiát (lásd 3.2. pont). Ismert volt az is, hogy a kapszaicin, bradikinin képes DRG neuronok, illetve TRPV1-gyel transzfektált sejtek termális aktivációs küszöbét 25–30 °C alá csökkenteni; illetve a receptív terület hűtésével a kapszaicin vagy a mustárolaj fájdalomkeltő, illetve akcióspotenciál-generáló hatása gátolható.

A fentiek alapján hipotézisünk az volt, hogy a bradikinin nem rendelkezik nociceptor-aktiváló hatással, primer hatása a hővel szembeni szenzibilizáció, amely során a nociceptorok aktivációs hőküszöbe az aktuális környezeti hőmérséklet alá csökken. Ennek hatására a normál környezeti hőmérséklet hőingerként hat, és ezáltal akciós potenciálok kisülését váltja ki, létrehozva a bradikinin (látszólagos) izgató hatásaként értelmezett választ. Feltételezésünk szerint a hőküszöbcsökkenés részleges deszenzibilizációt mutat: a bradikinin jelenlétében a legalacsonyabb kezdeti értékről gyorsan emelkedik, majd stabilizálódik egy, a környezeti hőmérséklethez közeli szinten. Előbbi magyarázza a látszólagos aktiváló hatás csökkenését, míg utóbbi lehetővé teszi, hogy a nociceptor hőre adott válasza szenzibilizált formában többé-kevésbé állandó nagyságú maradjon. Tehát a hőszenzibilizáló hatás is mutatja a deszenzibilizáció jelenségét, de ennek kimutatását megakadályozza a kezdeti folyamatos nociceptor-kisülés. A hipotézist alátámasztó adatokat sikerült nyerni aktívan 15–20 °C-ra lehűtött lábháti bőr–n. saphenus preparátumon. Ilyen alacsony hőmérsékleten a bradikinin 10⁻⁵ M koncentrációban – amely magas frekvenciájú kisüléseket okozott 32 °C-on – egyetlen akciós potenciált sem váltott ki. Ezen túlmenően a hűtött preparátumon sikerült igazolni, hogy a bradikinin hatására a hőküszöb jóval a normál bőrhőmérséklet (32 °C) alá, akár 20 °C-ig csökkenhet, majd egyértelmű visszatérést mutat úgy, hogy 5–10 percig a hőküszöb 32 °C alatt marad.

Hipotézisünk megfogalmazása óta további mediátorokról mutatták ki, hogy a nociceptív hőküszöböt a mag- vagy akár a bőrhőmérséklet alá tudják levinni: ATP, szerotonin, PGE₂/PGI₂ (Tominaga *et al.*, 2001; Sugiura *et al.*, 2004; Moriyama *et al.*, 2005). Hipotézisünk segítségével számos jelenség jól magyarázható. Közismert, hogy a lokális hűtés akut gyulladásos (pl. appendicitis vagy pulpitis esetében) vagy traumás fájdalom esetén analgetikus hatású. A kapszaicintartalmú csípős paprikával készült étel okozta égő fájdalom a szájnyálkahártya hűtésével (hideg folyadék ivása révén) azonnal és teljesen kikapcsolható.

3.4. A PGE₂ és PGI₂ hatása a forró ingerrel kiváltott nociceptor-kisülésre és CGRP-felszabadulásra izolált patkánybőrben

3.4.1. Előzmények és célkitűzés

Korábbi kísérletsorozatunkban (lásd 3.2. pont) a polimodális nociceptorok bradikininnel kiváltott hőszensibilizációjában COX-termékek, főként prosztaglandinok (PGE₂ és/vagy PGI₂) jelentős közvetítő szerepét tártuk fel az izolált patkánybőrben. Amint arról a bevezetésben említés történt, a peptiderg nociceptorok nemcsak afferens, azaz akcióspotenciál-generáló funkcióval bírnak, hanem a neuropeptidek felszabadítása révén lokális-efferens működéssel is rendelkeznek. Kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a kívülről adott prosztaglandinok (PGE₂ és PGI₂) képesek-e szensibilizálni a perifériás nociceptorok forró ingerrel kiváltott afferens és efferens funkcióját az izolált patkánybőrben. A két funkciót polimodális nociceptorokról történő akcióspotenciál-elvezetéssel, illetve az immunreaktív CGRP (iCGRP) felszabadulásának mérésével vizsgáltuk.

3.4.2. Eredmények

Összesen 18 C polimodális (C-MH) nociceptorról történt elvezetés, amelyek hő- és mechanikai ingerre reagáltak, de hidegingerlésre nem. A rostok egyike sem reagált akcióspotenciál-kisüléssel a receptív területre alkalmazott prosztaglandin(ok)ra. A 10 µM PGE₂ vagy 10 µM PGI₂ nem fokozta a hőingerléssel kiváltott akciós potenciálok számát, illetve nem befolyásolta a rostok hőküszöbét. A 100 µM PGE₂ hatására nem-szignifikáns módon megnőtt a hőingerléssel kiváltott akciós potenciálok száma a két prosztaglandin kombinációja (100 µM PGE₂ plusz 100 µM PGI₂) már szignifikáns növekedést eredményezett. A két adatcsoport összevonása szintén szignifikáns növekedést eredményezett. A nociceptorok hőküszöbe nem mutatott szignifikáns eltérést (az összevont adatok alapján 37,1±1,3 °C *versus* 35,7±0,8 °C).

A 47 °C-on történő hőstimuláció 7,6-szeresére növelte az iCGRP felszabadulását a 32 °C-on mért második bazális értékhez képest. Sem a 10 µM PGE₂, sem a 10 µM PGI₂ nem befolyásolta a hőingerlés peptidfelszabadító hatását. Az endogén prosztaglandinokkal való esetleges okklúzió kizárására a 10 µM PGE₂ hatását a COX-gátló flurbiprofen jelenlétében is megvizsgáltuk. A 10 µM PGE₂ az endogén prosztaglandin-bioszintézis kikapcsolása után sem tudta fokozni a hővel kiváltott iCGRP-felszabadulást. A tízszer magasabb koncentrációban (100 µM) adott PGE₂ sem fokozta a hőinger hatását, inkább egy nem-szignifikáns gátlás volt megfigyelhető. Hasonló volt a helyzet a 100 µM PGE₂ és 100 µM PGI₂ kombinációjával is. Pozitív kontroll keresése céljából megvizsgáltuk, hogy az alacsony pH-val kiváltott választ képesek-e befolyásolni a prosztaglandinok. Az 5,7-es pH-jú közeg közel kétszeresére fokozta az iCGRP-felszabadulást, és a 100 µM PGE₂ szignifikánsan fokozta a protonnal kiváltott választ. Az adenilil-ciklázt aktiváló forskolin (10 µM), illetve a PKC-t aktiváló forbolészter PMA (10 µM) szignifikánsan fokozta a

hőingerléssel kiváltott iCGRP-felszabadulást. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt megnövelő ionomycin (10 μM) szignifikáns módon csökkentette a hővel kiváltott választ.

3.4.3. Megbeszélés

A $\text{PGE}_2/\text{PGI}_2$ elektrofiziológiai szenzibilizáló hatása a C polimodális nociceptorok forró ingerrel kiváltott válaszára nem meglepő eredmény, hiszen ugyanebben a modellben ezek az ágensek részlegesen felfüggesztették a bradikinin hőszenszibilizáló hatásának flurbiprofennel kiváltott gátlását (lásd 3.2.2. pont). A két prosztaglandin csak magas koncentrációban volt hatékony. Kiemelendő, hogy modellünkben csak a küszöbfeletti hőingerrel kiváltott akciós potenciálok száma fokozódott, a hőküszöb változatlan maradt. Ezzel összhangban membránpermeabilis cAMP-analógok hasonlóképpen viselkedtek ugyanebben a preparátumban (Kress *et al.*, 1996). Emlékeztetünk arra, hogy a prosztaglandinok különböző nociceptor-szenzibilizáló hatásaiban a cAMP-PKA jelátviteli út a domináns (Mizumura *et al.*, 1993; Cui és Nicol, 1995).

Meglepő módon a 100 μM PGE_2 sem egyedül, sem 100 μM PGI_2 -vel kombinálva nem fokozta a hővel kiváltott iCGRP-felszabadulást, holott ugyanolyan patkánybőrben növelte a hővel kiváltott nociceptor-kisülések számát. Az a tény, hogy mind az adenil-cikláz aktiváló forskolin (ami aktiválja a PKA-t), mind a PKC-aktivátor PMA fokozta a hővel kiváltott iCGRP-felszabadulást, jelzi, hogy a termális szenzibilizáció mechanizmusai működőképesek voltak a modellben. Ugyanebben a preparátumban a hővel kiváltott iCGRP-felszabadulást kb. felére gátlódott a TRPV1-génhiányos egerekben, jelezve a TRPV1 szerepét a válaszban (Zimmermann *et al.*, 2005). Mivel mind a PKA, mind a PKC képes direkt foszforiláció révén facilitálni a TRPV1 működését (lásd Varga *et al.*, 2006), ez a mechanizmus lehet felelős – legalábbis részben – a forskolin és PMA kísérleteinkben tapasztalt hőszenszibilizáló hatásáért. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt növelő ionomycin gátló hatása a hővel kiváltott iCGRP-felszabadulásra meglepő, hiszen az exocytosis révén végbemenő neuropeptid-felszabadulás Ca^{2+} -függő folyamat. Az ionomycin hőszenszibilizációt gátló hatásának lehetséges mechanizmusa, hogy az általa kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -szignál deszenzibilizálta a TRPV1-et a calcineurin közvetítette defoszforiláció révén (Cholewinski *et al.*, 1993; Docherty *et al.*, 1996). Az a tény, hogy a PGE_2 fokozta az alacsony pH-val kiváltott iCGRP-felszabadulást pozitív kontrollként jelzi, hogy a szer „működőképes” volt a rendszerünkben.

Legérdekesebb eredményünk, hogy a prosztaglandin(ok) hőszenszibilizációt okoztak az egyrostelvezetési kísérletekben, de nem az iCGRP-felszabadulás esetében, leginkább azzal magyarázható, hogy az akciós potenciálok kialakulásának és a neuropeptid-felszabadulásnak a mechanizmusa – beleértve az ioncsatorna-háttérét – jelentősen eltérő. Előbbi kialakulásához nélkülözhetetlenek a feszültségfüggő Na^+ -csatornák, ellenben az akciós potenciálok (és így a Na^+ -csatornák) szerepe elhanyagolható a peptidfelszabadulásban (Brock *et al.*, 1998; Gover *et al.*, 2003; Németh *et al.*, 2003). Ugyanakkor a neuropeptid-felszabadulás az extracelluláris térből történő Ca^{2+} -beáramlás következménye.

3.5. TRPV1-receptor-antagonisták hatása a stimulált CGRP-felszabadulásra izolált patkánybőrben

3.5.1. Előzmények és célkitűzés

Mindkét klasszikus TRPV1-antagonistáról, a kapszaicin kompetitív antagonistájának tartott capsazepinről, valamint a TRPV1-receptor ioncsatorna részét blokkoló ruténiumvörösről

kimutatták, hogy nemcsak a kapszaicin, hanem a forró ingerek hatását is gátolják TRPV1-gyel transzfektált sejtekben és natív DRG-neuronokban (Tominaga *et al.*, 1998; Kirschstein *et al.*, 1999; Nagy és Rang, 1999; Savidge *et al.*, 2001). Ezzel összhangban a forró ingerek (43–55 °C) semmiféle specifikus ionáramot nem váltottak ki TRPV1-génhiányos egérből származó DRG-neuronokon (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2005), jelezve a TRPV1 kulcsszerepét a forró ingerek detektálásában a nociceptív elsődleges érző neuronok sejttestén. Ezekben a génhiányos egerekben végzett egyrost-elvezetési kísérletek azt mutatták, hogy a forró ingerek perifériás detektálása nem vagy csak minimálisan károsodott (Caterina *et al.*, 2000; Woodbury *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2005; Banik és Brennan, 2009; Hoffmann *et al.*, 2013). A fenti adatok azt sugallták, hogy a TRPV1 szerepe a forró ingerek detektálásában kizárólagos a nociceptív afferensek sejttestén, de csak minimális a perifériás végződésben. Kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a bőr perifériás nociceptoraiból történő, hővel kiváltott iCGRP-felszabadulást hogyan befolyásolja a ruténiumvörös és a capsazepin.

3.5.2. Eredmények

Mind a 10 μM ruténiumvörös, mind a 10 μM capsazepin gátolta az 1 μM kapszaicinnal kiváltott iCGRP-felszabadulást, míg a szerek 100 μM -os koncentrációja praktikusán megszüntette a kapszaicin hatását. A 10 μM ruténiumvörös – hasonlóan a 100 μM capsazepinhez – nem befolyásolta szignifikánsan a magas koncentrációjú K^+ -ion okozta membránpolarizációval kiváltott iCGRP-felszabadulást. Ezzel szemben a 100 μM ruténiumvörös jelentősen gátolta azt. A ruténiumvörös sem a 10, sem a 100 μM -os koncentrációban nem volt képes szignifikánsan csökkenteni a 47 °C-os hőstimulációval kiváltott iCGRP-felszabadulást. A capsazepin hasonlóan viselkedett, sőt, egy nem-szignifikáns fokozó hatás volt megfigyelhető. Kisebb intenzitású (45 °C) hőstimuláció kapcsán a 10 μM capsazepint továbbra is szignifikáns hatás nélküli volt, de 100 μM esetén az iCGRP-felszabadulás fokozódása már szignifikánsnak bizonyult. Ezen túlmenően a 100 μM capsazepin fokozta a 32 °C-on mért bazális peptidfelszabadulást is. Ez a hatás kiesett TRPV1-génhiányos egerek bőrmintáinak vizsgálata során.

3.5.3. Megbeszélés

Alapvető eredményeink, hogy sem a ruténiumvörös, sem a capsazepin nem gátolta a 47 °C-on történő hőstimuláció hatására létrejövő iCGRP-felszabadulást (a kapszaicin hatásának dózisfüggő gátlása/blokkolása mellett, ami jelentős TRPV1-blokkádot jelez) egybevágnak egyrészt azzal, hogy izolált patkány n. ischiadicus preparátumon ezek a TRPV1-antagonisták szintén hatástalanok voltak a forró ingerrel kiváltott iCGRP-felszabadulással szemben (Sauer *et al.*, 1999; 2001), másrészt azzal a nézettel, hogy a forró ingerek perifériás transzdukciójában a TRPV1 szerepe minimális, legalábbis a patkány és egér lábán (lásd 4.3.2., 4.6.3. és 5.6.2. pont). A 10 μM ruténiumvörös hatása modellünkben szelektívnek mondható a TRPV1-receptorra, hiszen a magas koncentrációjú K^+ -ionnal kiváltott peptidfelszabadulást nem befolyásolta, ellenben a szer magasabb koncentrációja (100 μM) már nem tekinthető szelektívnek. Ugyanakkor eredményeink éles ellentétben állnak azzal, hogy 10 μM ruténiumvörös vagy capsazepin a TRPV1-által közvetített hőválaszt transzfektált nem neuronális sejtekben erősen (Tominaga *et al.*, 1998), tenyésztett DRG neuronok forró ingerrel kiváltott ionáramát kisebb mértékben, de szignifikánsan gátolta (Kirschstein *et al.*, 1999; Nagy és Rang, 1999; Savidge *et al.*, 2001).

A capsazepin – a ruténiumvörössel ellentétben – fokozta a hőingerléssel kiváltott iCGRP-felszabadulást, azonban ez a tendencia csak az alacsonyabb, 45 °C-os stimuláció és a magasabb

capsazepinkoncentráció mellett vált szignifikánssá. Ez utóbbi hatás és a 100 μM capsazepin 32 °C-on mért bazális iCGRP-felszabadulást növelő hatása – amely kiesett a TRPV1-génhiányos egerek bőrmintái esetében – amellet szól, hogy a capsazepin parciális agonistaként viselkedett modellünkben a TRPV1-receptoron. A ruténiumvörössel ellentétben a magasabb capsazepinkoncentráció is szelektív maradt a TRPV1-re, mivel nem gátolta K^+ -ion hatását. Emiatt valószínűsíthető, hogy a 100 μM hatása 47 °C-on azért nem volt szignifikáns, mert okklúzió lépett fel, nem hagyva teret a további válaszfokozódásnak. Eredményeink – az irodalmi adatokkal egyetértésben – azt mutatják, hogy a forró ingerek transzdukciójának farmakológiája a TRPV1-antagonisták vonatkozásában nagymértékben különbözik a perifériás idegvégződéseken és a TRPV1-gyel transzfektált sejtekben, illetve tenyésztett DRG neuronok sejttestén. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy míg a forró ingerre adott válaszban a TRPV1 szerepe a nociceptív primer afferens neuronok sejttestén (közel) kizárólagos, a perifériás végződésben csak minimális. Ennek hátterében az állhat, hogy a perifériás nociceptorokban a TRPV1-en kívül más – ruténiumvörössel nem blokkolható – hőérzékeny ioncsatorna vagy csatornák is expresszálnak, amelyek redundáns hőszenzorként képesek átvenni a TRPV1 funkcióját annak farmakológiai blokkolása vagy genetikai hiánya esetén (lásd 1.3.2. pont).

4. A MAGATARTÁSI NOCICEPTÍV HŐKÜSZÖB MÉRÉSÉRE ALKALMAS MŰSZEREK ÉS HŐKÜSZÖBCSÖKKENÉSEN ALAPULÓ TERMÁLIS ALLODYNIA-MODELLEK KIFEJLESZTÉSE ÉS VALIDÁLÁSA

4.1. Előzmények és célkitűzés

A Bevezetésben részletesen volt szó arról, hogy a termonocicepció állatkísérletes vizsgálatában – számos hátrányuk ellenére – dominálnak a latenciaidő mérésén alapuló módszerek (forró lap, „tail-flick”, Hargreaves-féle plantárteszt). Bár történtek szórványos próbálkozások a nociceptív hőküszöb mérésén alapuló paradigmák kifejlesztésére (lásd 1.2.3. pont), egyik módszert sem alkalmazták hosszabb távon, így a hőküszöbmérés nem vált a fájdalomtesztok repertoárjának részévé. Ebben szerepet játszhatott az a tény, hogy egyik készülékre sem fejlesztettek ki termális allodyniamodelt, azaz nem alkalmaztak olyan fizikai vagy kémiai stimulust, amely a nociceptív hőküszöböt lecsökkentette volna, termális allodyniát eredményezve. Ismert, hogy a hiperalgéria/allodynia állapotában az analgetikumok alacsonyabb dózisokban hatékonyak, mint a nem érzékenyített alapállapotban. Munkacsoportunk látott fantáziát a hőküszöbmérésben – elsősorban az elektrofiziológiailag meghatározott hőküszöbvel való összevethetőség miatt –, és célul tűzte ki a hőküszöb mérésére alkalmas készülékek kifejlesztését, valamint a hőküszöb csökkenésén alapuló különböző paradigmák kidolgozását és validálását.

4.2. A nociceptív hőküszöb mérését alkalmazó patkánykísérletek közös metodikai elemei

A kísérleti protokollok megfeleltek a nemzetközi etikai útmutatásoknak (Zimmermann, 1983), és ezeket jóváhagyta a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottsága. Kísérleteink zömét 140–200 g-os nőstény Wistar patkányokon (Charles River Hungary Ltd, Budapest) végeztük. A kísérletek folyamán mindig ugyanaz a személy kezelte az állatokat. Ekkor egy kondicionáló hőküszöbmérés (lásd lejjebb) történt adaptációs célból, amelynek eredményét nem használtuk fel az analízis során. A kísérlet napján két hőküszöbmérés történt 30 perces időközzel; ezek átlagát tekintettük a kiindulási, kontroll nociceptív hőküszöbnek.

Az analgetikumok vagy másfajta szerek különféle stimulussal (RTX-injekció, hőtrauma vagy plantáris bemetszés) kiváltott hőküszöbcsökkenésre kifejtett gátló hatásának vizsgálata során mindig aktuális szolvenskontrollt használtunk: a hőküszöbcsökkentő stimulus (RTX-injekció, hőtrauma, plantáris bemetszés) előtt az állatcsoport egyik felét a vizsgált szerrel, a másik felét annak szolvensével kezeltük. A hőküszöbmérést végző személy nem ismerte a kezelés fajtáját (aktív vagy szolvens). A szisztémás előkezelés mindig i.p. történt (0,3 ml/100 g), az intraplantáris (i.pl.) injekciót 100 µl-es térfogatban adtuk. Az analgetikumok hőküszöbcsökkenést gátló hatását százalékosan adtuk meg következő képlet segítségével: $(\text{Drop}_{\text{szolv}} - \text{Drop}_{\text{szer}}) / \text{Drop}_{\text{szolv}} \times 100$, ahol $\text{Drop}_{\text{szolv}}$ és $\text{Drop}_{\text{szer}}$ az adott stimulussal (RTX injekció, hőtrauma, plantáris bemetszés) kiváltott hőküszöbcsökkenés átlagát jelenti a szolvenssel, illetve a szerrel kezelt állatokban egy adott időpontban vagy különböző időpontokban mért hőküszöbcsökkenések összegére vonatkozóan. A százalékos gátlás alapján dózis–hatás görbéket vettünk fel. Meghatároztuk a szerek minimális hatékony dózist (a legkisebb adott dózis, amely szignifikánsan gátolta a stimulus hőküszöbcsökkentő hatását) és ED_{50} -értékét (a szer maximális gátló hatásának a feléhez tartozó dózis, amelyet a dózis–hatás görbén interpolációval határoztunk meg).

4.3. Az emelkedő hőmérsékletű forró lap és a resiniferatoxinnal kiváltott hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodynia-modell validálása patkányban

4.3.1. Célkitűzés

Egy számítógéppel vezérelt, emelkedő hőmérsékletű forró lap kifejlesztését és validálását tűztük ki célul. Ehhez a pécsi Supertech Kft. biztosította a műszaki-technikai támogatást. A készülék validálása során vizsgáltuk a hőküszöb reprodukálhatóságát, referencia-analgetikumok iránt érzékenységiét mind alapállapotban, mind hőküszöbcsökkenéssel járó termális allodynában.

4.3.2. Módszerek

A kiindulási (kontroll) nociceptív hőküszöb mérése az emelkedő hőmérsékletű forró lappal és a kontroll hőküszöb farmakológiai modulációjának vizsgálata

Az emelkedő hőmérsékletű forró lap három részből állt: fűtőegység (20-szor 15 cm-es fémlap), amely alatt volt a fűtőegység, felette pedig a plexiből készült megfigyelő kamra, vezérlőegység, személyi számítógép. A speciális célprogram lehetővé tette a fémlap fűtését különböző fűtési sebességek megválasztásával. Ellenőrző mérések szerint a fűtés közel egyenletes volt, és a fémlap különböző pontjain termoelemmel egyidejűleg mért hőmérsékletek eltérése kisebb volt, mint 0,5 °C. A „cut-off” hőmérséklet 50 °C-ra volt beállítva. A hőküszöbmérés során az állatokat a készülék fémlapja feletti megfigyelő kamrába helyeztük, 30 °C-os kiindulási laphőmérséklet mellett. Ezután a lapot számítógépes vezérlés segítségével egyenletesen, 6 °C/perc sebességgel fűtöttük mindaddig, amíg az állat valamely végtagján nocifenzív reakció meg nem jelent. Ekkor az állatot azonnal kiemeltük a kamrából, a fűtést megszakítottuk, majd a lapot jéghideg acélfedő ráhelyezésével 30 °C alá hűtöttük. A típusos nociceptív válaszreakció valamelyik hátsó láb megnyalása volt, a végtag rázása, megemlése, vagy az állat felugrása ritkán volt megfigyelhető. Azt a laphőmérsékletet, amelyik a fenti reakciók bármelyikét kiváltotta bármely lábon, tekintettük a nociceptív hőküszöbnek. A küszöbmérést 30 perc múlva megismételtük, és a két küszöb átlaga adta a kiindulási (kontroll vagy alap) nociceptív hőküszöböt. A hőküszöb reprodukálhatóságát vizsgáló, limitált számú kísérletben mindkét hátsó végtag hőküszöbét meghatároztuk: az egyik láb nocifenzív

reakciójának bekövetkezése után tovább folytattuk a lap fűtését mindaddig, amíg a másik láb is reakciót nem mutatott. Az analgetikumok alap hőküszöbre kifejtett hatásainak vizsgálata során a kontroll hőküszöb meghatározása után az állatcsoport egyik felét a vizsgált szerrel, a másik felét annak szolvansével kezeltük i.p. 30 perccel később megismételtük a hőküszöbmérést.

Az RTX nociceptív hőküszöbre kifejtett akut hatásának, valamint az akut hatás farmakológiai modulációjának vizsgálata

Ezekben a kísérletekben az egyik hátsó végtag nociceptív küszöbét mértük 15 °C-os kiindulási laphőmérséklet és 12 °C/perc fűtési sebesség alkalmazásával (a mérési paraméterek változtatását az RTX masszív küszöbcsökkentő hatása tette szükségessé). Az első mérés esetén a lapot addig fűtöttük, amíg bármelyik hátsó végtag nocifenzív reakciót nem mutatott. A 30 perccel később megismételt mérés során addig fűtöttük a lapot, amíg annak a lábnak a reakciója be nem következett, amelyik az első mérésakor először mutatott reakciót. A két küszöbérték átlaga szolgáltatta a vizsgált láb kontroll hőküszöbét. Ezután 0,048 nmól RTX-et vagy annak szolvansét adtunk intraplantáris injekció formájában, majd 5, 10, 15, 20 és 25 perc múlva megismételtük mindkét hátsó láb hőküszöbének mérését. Az analgetikumok RTX-indukálta hőküszöbcsökkenésre kifejtett hatásának vizsgálata során mindig aktuális szolvens kontrollt használtunk (lásd 4.2. pont).

Az RTX nociceptív hőküszöbre kifejtett hosszú távú hatásának vizsgálata

Az állatok mindkét hátsó lábába 0,048 nmól RTX-et vagy annak szolvansét adtunk intraplantáris injekció formájában, majd 1, 2, 4, 6 és 24 óra elteltével, ezt követően naponként megismételtük a hőküszöbmérést az elsőként reagáló lábra vonatkozóan. Ha elértük a „cut-off” értéket, az állatot eltávolítottuk a lapról, és 50 °C-nak vettük a küszöböt. A kétoldali kezelésre azért volt szükség, hogy elkerüljük a nem kezelt láb égési sérülését, amely abból származott volna, hogy az RTX hosszú távú hatásként megemeli a hőküszöböt.

4.3.3. Eredmények és megbeszélés

A kezeletlen patkányok hátsó lábán mért hőküszöb $45,3 \pm 0,3$ °C ($n=36$) volt. A hőküszöbmérés adott állatcsoporton belüli variabilitásának vizsgálata során 3 állatcsoportban ($n=12$) 5 percenként, 30 percenként, illetve naponként ismételtük a hőküszöböt mindkét hátsó végtagon 6–6 alkalommal. Ezen eredmények statisztikai analízise során nem találtunk szignifikáns különbséget (i) ugyanazon láb különböző időpontokban mért küszöbei között; (ii) az állat különböző időpontokban mért nociceptív küszöbértékei között (a két láb küszöbértéke közül az alacsonyabbat tekintettük az állat küszöbének); (iii) a bal és jobb láb egyazon időpontban mért küszöbértékei között. Mindez a nociceptív hőküszöb mérésének rendkívül jó reprodukálhatóságát jelzi. A szisztémásan adott morfin, diclofenac és paracetamol egyaránt dóziszfüggő módon megemelte a nociceptív hőküszöböt, míg szolvenseik hatástalanok voltak. A morfin bizonyult a leghatékonyabbnak. A szerek minimális hatékony dózisát és az 1 °C-os küszöbemelkedésnek megfelelő (számított) dózist az **1. táblázat** tartalmazza.

Az RTX szolvansének intraplantáris injekciója nem okozott sem nocifenzív reakciót, sem változást az emelkedő hőmérsékletű forró lapon mért hőküszöbben. Az RTX intraplantáris injekciója (0,048 nmól) típusosan maximum 5 percig tartó nocifenzív reakciót váltott ki, amely a talp nyalásában, harapásában, ritkán annak emelésében nyilvánult meg. Ennek lezajlása után az emelkedő hőmérsékletű forró lapon tesztelve az első nocifenzív reakció a láb emelése volt (ami nem kezelt állatoknál nagyon ritkán fordult elő). A lábemelési reakció 34–41 °C-os laphőmérsékletnél

következett be, majd 4–6 °C-kal magasabb hőmérsékletnél jelent meg a láb nyalási reakciója. Mindkét reakcióra nézve a hőküszöb 5 perccel az RTX adása után volt a legalacsonyabb, és fokozatosan tért vissza a kontroll értékre a 25. percre. A nem kezelt láb csak a nyalási reakciót mutatta, a kontrollhoz képest változatlan küszöbérték mellett, jelezve, hogy az RTX hatása lokális volt. A TRPV1-antagonista I-RTX-szel történt intraplantáris előkezelés (0,05 nmól, 5 perccel az RTX-injekció előtt) nem változtatta meg a hőküszöböt, de szignifikánsan mérsékelte az RTX hőküszöbcsökkentő hatását, igazolva a TRPV1-receptor közvetítő szerepét. Az RTX okozta küszöbcsökkenést hőallodyniaként értelmezhetjük, hiszen normál körülmények között a 34–41 °C-os hőmérsékleti ingerek nem váltanak ki nocifenzív reakciót.

A szisztémásan adott morfin, diclofenac és paracetamol egyaránt gátolta az RTX-szel kiváltott nociceptív hőküszöbcsökkenést mind a négy mérési időpontban a szolvással összehasonlítva. Az analgetikumok gátló hatásának jellemzésére két paramétert használtunk: az 5. percben mért hőküszöbcsökkenés az RTX hatásának maximumát jelenti, míg az 5., 10., 15. és 20. percben mért hőküszöbcsökkenések összege integratív paraméterként a teljes RTX-hatást tükrözi. A dózis–hatás görbék alapján meghatározott minimális hatékony dózisokat és ED₅₀-értékeket az **1. táblázat** tartalmazza. Eszerint mindhárom szer minimális hatékony dózisa az antiallodyniás hatásra nézve jóval alacsonyabb, mint a kontroll hőküszöb emelkedésére vonatkozóan. Emiatt az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenés gátlásán alapuló nociceptív teszt érzékenyebb paradigma a morfin, diclofenac és paracetamol termális antinociceptív hatásának kimutatására, mint a kontroll küszöb megemelésén alapuló vizsgálat. Hangsúlyozandó, hogy a morfin és a diclofenac minimális hatékony antiallodyniás dózisa közel van a klinikai gyakorlatban használt humán dózisokhoz, ami szintén a paradigma farmakológiai érzékenységet jelzi.

1. táblázat. *A morfin, diclofenac és paracetamol minimális hatékony dózisa a kontroll hőküszöb emelésére és az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenés gátlására vonatkozóan.*

	<i>Morphine</i>			<i>Diclofenac</i>		<i>Paracetamol</i>	
Elevation of the heat threshold	Minimum effective dose (mg kg ⁻¹)	ED _{1·C} (mg kg ⁻¹)		Minimum effective dose (mg kg ⁻¹)	ED _{1·C} (mg kg ⁻¹)	Minimum effective dose (mg kg ⁻¹)	ED _{1·C} (mg kg ⁻¹)
	3	4.5		10	40	200	160
Inhibition of the RTX-induced threshold drop	Minimum effective dose (mg kg ⁻¹)	ED ₅₀ (mg kg ⁻¹)		Minimum effective dose (mg kg ⁻¹)	ED ₅₀ (mg kg ⁻¹)	Minimum effective dose (mg kg ⁻¹)	ED ₅₀ (mg kg ⁻¹)
	1	0.8		1	0.7	100	120
	1	0.5		1	0.6	100	115

Az RTX hőküszöbcsökkentő hatásának fázikus jellege (gyorsan kialakuló és rövid hatás) valószínűtlenné teszi, hogy a válasz során számottevő mértékű gyulladásos reakció alakuljon ki. Emiatt a diclofenac hatása primer antinociceptív hatásként értékelendő, és nem tekinthető a gyulladásgátló hatás következményének. Ebből a szempontból az RTX-hőallodynia modell előnyös, mivel számos más használatos hiperalgésia-modellben (pl. carregenin, Freund-adjuváns) jelentős gyulladásos komponenssel kell számolni, ami akadályozza a gyulladásgátló és az antinociceptív hatások elkülönítését.

Kétoldali RTX-injekció (0,048 nmól/láb) után 1 órával szignifikáns hőküszöb-emelkedést mértünk, ami hasonló mértékben jelentkezett a 2., 4. 6. és 24. órában, majd ezt követően az 5. napig. Ezen teljes időszakban a lábemelési reakciót egyetlen esetben sem tapasztaltuk, az állatok mindig valamely hátsó láb nyalásával reagáltak a termális ingerlésre. A maximális hőküszöb-emelkedés 3 °C körüli volt. Az 1 óra után mért tartós, de reverzibilis hőküszöb-emelkedést az RTX

szenzoros deszenzibilizáló hatásának megnyilvánulásaként értelmezhetjük, amely a TRPV1-et expresszáló idegvégződések funkcionális károsodásának eredményeképpen alakul ki. Hasonló hatást írt le a kapszaicinre Szolcsányi (1985; 1987b) az általa kifejlesztett módszerrel, amely azonban csak a nociceptív hőküszöb hozzávetőleges meghatározását tette lehetővé (lásd 4.4.1. pont). Mindezek alapján elmondható, hogy a nociceptív hőküszöb mérése alkalmas a TRPV1-agonisták szenzoros deszenzibilizáló hatásának *in vivo* vizsgálatára (a további kísérleteket lásd az 5.7.2. pontban).

Limitált számban 28–42 g-os nőstény C57BL6 egereken (vad típusú, illetve TRPV1-génhiányos) is végeztünk hőküszöbmérést. Nem találtunk szignifikáns eltérést a TRPV1-génhiányos és a vad típusú egerek nociceptív hőküszöbe között ($45,6 \pm 0,5$ versus $45,2 \pm 0,4$ °C). Ez arra utal, hogy alaphelyzetben a TRPV1 nem járul hozzá az egér hátsó lábán a nociceptív hőküszöb beállításához.

4.4. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő és az enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodynia-modell validálása patkányban

4.4.1. Előzmények és célkitűzés

Az emelkedő hőmérsékletű forró lap módszerrel nyert eredményeink igazolták, hogy a nociceptív hőküszöb mérése ígéretes megközelítés a termonocicepció vizsgálatára. Ugyanakkor az általunk kifejlesztett készülékkel kapcsolatban sorozatos meghibásodások léptek fel, amelyek korrekciója nem sikerült kielégítő mértékben. Ezért alternatív megoldásként egy másik, szintén a nociceptív hőküszöb mérésére alkalmas készülék kifejlesztését tartottuk célravezetőnek, amelynek „őse” a korábbiakban már bevált. Szolcsányi János már 1985-ben végzett olyan kísérleteket (Szolcsányi, 1985), amelyekben éber patkány egyik hátsó lábát állandó hőmérsékletű vízfürdőbe mártotta, oly módon, hogy a vízfürdő hőmérsékletét 1°C-os lépésekben növelte mindaddig, amíg az állat a lábát ki nem rántotta a vízből. Ezzel az új módszerrel közelítőleg tudta mérni a nociceptív hőküszöböt. Ebből kiindulva kívántunk kifejleszteni olyan emelkedő hőmérsékletű vízfürdőt, amely képes a nociceptív hőküszöb pontos meghatározására.

4.4.2. Módszerek

A nociceptív hőküszöb mérése az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel

Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdőt az Experimetria Kft-vel (Budapest) együttműködve fejlesztettük ki. A készülék két részből áll: egy műanyag hengerből (12 cm belső átmérő, 14 cm magasság), amelynek az alján található az elektromos fűtőegység és a vezérlőegységből, amelynek segítségével a hengerben levő víz gyorsan és viszonylag egyenletesen felmelegíthető. A vezérlőegység mutatja a vízfürdő aktuális hőmérsékletét, amelyet a fürdő közepén, a vízfelszín alatt 35 mm-rel mér egy termoelem. A készüléken beállítható a fűtés kiindulási hőmérséklete (30 vagy 40 °C) és sebessége (6, 12 vagy 24 °C/perc). A fűtés egy lábkapcsolóval megállítható, ilyenkor az aktuális vízhőmérséklet kimerevedik a kijelzőn. A víz visszahűtése oly módon történik, hogy egy pumpa hideg vezetékes vizet szív be a vízfürdőbe, ahonnan a túlfolyó víz elvezetődik. A kiindulási (kontroll) hőküszöb méréséhez 30 °C-os kiindulási hőmérsékletet, 24 °C/perc fűtési sebességet és 53 °C „cut-off” hőmérsékletet állítottuk be. A patkányt függőleges testhelyzetben gyengéden kézbe fogva az egyik hátsó lábát kb. 3–4 cm mélyen belemártottuk a vízfürdőbe. Ezután elindítottuk a fűtést. Amikor az állat kihúzta a lábát a vízből, azonnal leállítottuk a fűtést, és a készülék által

kijelzett hőmérsékletet tekintettük a láb nociceptív hőküszöbének. A küszöbmérést 30 perc múlva megismételtük ugyanazon a végtagon, és a két küszöb átlaga adta a kiindulási nociceptív hőküszöböt. A hőküszöb reprodukálhatóságát vizsgáló kísérletben mindkét hátsó végtag hőküszöbét meghatároztuk: először az egyikét, majd 10 perc múlva megismételtük ugyanazon a lábon a küszöbmérést, egészen a 60. percig. Ezt követően a másik lábon végeztük el 10 percenként a méréseket.

Az enyhe hőtrauma nociceptív hőküszöbre kifejtett hatásának, valamint e hatás farmakológiai modulációjának vizsgálata

A kiindulási hőküszöb mérése után az állatokat dietiléter alkalmazásával bódítottuk, és az egyik hátsó lábat 51 °C hőmérsékletű vízbe mártottuk 20 másodpercig. Az enyhe hőtrauma ezen paramétereit előkísérletekben választottuk oly módon, hogy az állatok ébredés után nocifenzív reakciót ne mutassanak, de jelentős hőküszöbcsökkenés jöjjön létre. Az állatok felébredését követően a hőtrauma után 0,5, 1, 1,5, 2, 4 és 24 órával történt hőküszöbmérés a termális allodynia kinetikájának vizsgálata céljából. A referencia-analgetikumok hatásának vizsgálata során a hőtrauma után 10 és 20 perccel történt hőküszöbmérés a termális allodynia verifikálása céljából. Ezt követően a szert vagy annak szolvensét adtuk i.p. vagy intraplantárisan a 20 perces küszöbmérés után közvetlenül. Ezután a 40., 50. és 60. percben mértük a hőküszöböt.

4.4.3. Eredmények és megbeszélés

A kezeletlen patkányok hátsó lábán az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mért nociceptív hőküszöb $43,5 \pm 0,4$ °C volt. Hat alkalommal 10 percenként ismételt küszöbmérés során nem találtunk szignifikáns eltérést a bal vagy a jobb láb különböző időpontokban mért hőküszöbei között. Ez arra utal, hogy a nociceptív hőküszöb az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel ugyanolyan jól reprodukálható módon mérhető, mint az emelkedő hőmérsékletű forró lappal. A hőtrauma (51 °C, 20 s) után az állatok néhány percen belül felébredtek az éternarkózisból. Ezt követően nocifenzív reakció nem volt megfigyelhető. A hőtrauma hatására a 30. percben 7–8 °C-kal lecsökkent a hőküszöb, és ez a termális allodyniaként értékelhető hatás a 2. óra végéig közel állandó mértékben fennállt. A kísérleteinkben kimutatott hőküszöbcsökkenést termális allodyniaként értékelhetjük, amelynek kinetikája hasonló, mint a latenciamérési állatkísérletekben kimutatott hőtraumával kiváltott termális hiperalgéziáé (Coderre és Melzack, 1987; Nozaki-Taguchi és Yaksh, 1998). Az enyhe hőtraumával kiváltott termális allodynia a klinikailag releváns elsőfokú égési sérülés állatkísérletes modelljének tekinthető, emiatt transzlációs szempontból is jelentős.

A szisztémásan adott morfin, diclofenac, ibuprofen és paracetamol egyaránt gátolta az enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenést. A 40., 50. és 60. percben mért hőküszöbcsökkenés összege alapján számított százalékos gátlások felhasználásával nyert dózis–hatás görbék szerint a morfin legnagyobb dózisa közel teljes gátlást okozott, de a másik három szernél is 50% fölött volt a maximális gátlás. A szerek minimális hatékony dózisait és ED₅₀ értékét a **2. táblázat** tartalmazza. Figyelemreméltó, hogy ezek az értékek mindegyik szernél igen alacsonyak, jelezve a paradigma nagy érzékenységet mind az ópoid, mind a nem-ópoid típusú standard analgetikumok iránt.

2. táblázat. *A morfin, diclofenac, ibuprofen és paracetamol legkisebb hatékony dózisa (MED) és ED₅₀ értéke az enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenésre kifejtett gátló hatására vonatkozóan.*

	MED (mg/kg i.p.)	ED ₅₀ (mg/kg i.p.)
Morphine	0.3	0.5
Diclofenac	0.3	3
Ibuprofen	10	18
Paracetamol	30	100

Paradigmánk utánozta a klinikai gyakorlatot abban az értelemben, hogy az analgetikum adása a hiperalgémia kialakulása után, és nem előkezelés formájában történt. Ennek megfelelően a szerek hatásának vizsgálata a hőtraumától számított 40–60 perces intervallumban történt, amikor már számottevő gyulladásos reakció alakulhatott ki. Emiatt nem zárható ki, hogy a diclofenac és az ibuprofen esetében a mért antiallodynias hatás egy része a szerek gyulladásgátló hatásának másodlagos következményeként jött létre. Az intraplantárisan adott morfin, diclofenac és ibuprofen szintén gátolta a hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenést olyan dózisokban, amelyek alacsonyabbak, mint a szisztémás adásnál meghatározott minimálisan hatékony adagok, jelezve a szerek lokális hatását. Ezzel összhangban mind a morfin, mind a COX-gátló szerek perifériás támadáspontjára vonatkozó támogató adatok ismertek (Ferreira *et al.*, 1978; Stein *et al.*, 1988).

4.5. A sebészi bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodynia-modell validálása patkányban

4.5.1. Előzmények és célkitűzés

A patkányban vagy egérben a hátsó láb talpi részén sebészi bemetszéssel (incízióval) keltett termális és mechanikai hiperalgémia a posztoperatív fájdalom elfogadott állatkísérletes modellje (Brennan *et al.*, 1996). Korábbi – az emelkedő hőmérsékletű forró lappal, illetve vízfürdővel végzett – kísérleteinkben két akut modellben tudtuk kimutatni a nociceptív hőküszöb csökkenését: RTX hatására kb. fél óráig, az enyhe hőtrauma esetében 2 óráig tartott a küszöbcsökkenés (lásd 4.3.2. és 4.4.3. pont). Mindezek fényében célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy kimutatható-e a nociceptív hőküszöb csökkenése a sebészi bemetszéssel kiváltott szubakut/krónikus hiperalgémia során.

4.5.2. Módszerek

A plantáris incízió nociceptív hőküszöbre kifejtett hatásának és e hatás farmakológiai modulációjának vizsgálata

A kiindulási (preoperatív) nociceptív hőküszöb emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel történő mérése (lásd 4.4.2. pont) után a patkányok bal hátsó lábán plantáris incíziót végeztünk Brennan és munkatársai (1996) módszere szerint, kis módosításokkal. Az állatokat 50 mg/kg pentobarbitállal elaltattuk, majd a bal hátsó láb talpi részén steril előkészítés után a sarok proximális életől 1 cm-re kezdve 10-es pengével hosszanti irányban az ujjak felé bemetszést ejtettünk, átvágva a bőrt, fasciát és a plantáris izomzatot. A sebet két varrattal zártuk, majd povidon-jód-oldattal bekentük. Az állatok 18 óráig tartó periódus során tértek magukhoz. Ébredés után a posztoperatív hőküszöb mérése érdekében került sor, majd az egyik szériában kezelésben nem részesülő állatok incindált lábának

hőküszöbét mértük naponta, egy héten át. Egy másik sorozatban a legalább 3 °C-os küszöbcsökkenést mutató állatokban – aktuális szolvenskontroll (lásd 4.2. pont) mellett – morfin, diclofenac vagy paracetamol i.p. vagy intraplantáris adására került sor, és ezután 10 percenként történt hőküszöbmérés.

4.5.3. Eredmények és megbeszélés

A patkányok preoperatív kontroll hőküszöbe $43,7 \pm 0,4$ °C volt ($n=16$). 18 órával a sebészi bemetszés után a narkózisból magukhoz tért állatok nem mutattak semmiféle nocifenzív reakciót. Az általános érzéstelenítés nem váltott ki olyan utóhatást, amely befolyásolta volna a hőküszöböt, hiszen az ellenoldali, nem incidált láb küszöbe nem változott meg a preoperatív kontrollhoz képest. Az ismételt küszöbmérések során kiderült, hogy az incízió hatására 5–7 °C-os hőküszöbcsökkenés, azaz termális allodynia jött létre, amely nagyjából változatlan mértékben legalább 7 napon keresztül fennállt. Ez a kinetika hasonló, mint a latenciaméréssel kimutatott incízió indukálta termális hiperalgéziáé (Zahn és Brennan, 1999), jelezve, hogy a hőküszöbmérés ugyanúgy alkalmas a jelenség vizsgálatára, mint a konvencionális megközelítés. Kimutatták *in vitro* elektrofiziológiai kísérletekben, hogy patkány hátsó végtagjának bőrében incízió hatására a polimodális C nociceptorokban spontán aktivitás és termális aktivációs küszöb csökkenése jön létre (Banik és Brennan, 2004). Mindez jó példát szolgáltat a hőküszöbmérés azon előnyére, hogy segítségével a magatartási és az elektrofiziológiai eredmények közvetlenül összevethetők.

A referencia-analgetikumok antiallodynias hatásának vizsgálatakor a szerek adása az incízió okozta allodynia kialakulása után, az első posztoperatív hőküszöbmérést követően történt, utánaozva a klinikai gyakorlatot, ahol az analgetikumot többnyire a fájdalomállapot fellépése után adják. Az első posztoperatív hőküszöbmérést (18 órával az incízió után) követően szisztemásan adott morfin, diclofenac és paracetamol egyaránt dózisfüggő módon csökkentette az incízióval kiváltott hőküszöbcsökkenést a szolvenséhez viszonyítva, azaz antiallodynias hatást fejtett ki. A morfin gátló hatása volt a legnagyobb, 60% körüli, a paracetamol valamivel kisebb (55%-os) maximális hatást váltott ki, mint a morfin, de csak nagyobb dózisokban. A diclofenac maximális gátló hatása 40% körül volt. Mindhárom vizsgált analgetikum esetében az incízió okozta hőküszöbcsökkenés gátlására vonatkozó minimális hatékony dózis hasonló volt, mint a korábbi kísérleteinkben RTX-szel vagy az enyhe hőtraumával indukált küszöbcsökkenésre nézve (lásd 4.3.3 és 4.4.3. pont). Az intraplantárisan adott morfin és diclofenac egyaránt csökkentette az incízióval kiváltott hőküszöbcsökkenést a szolvenséhez viszonyítva, Az i.pl. adott dózisok kisebbek, mint a szisztémás adásnál meghatározott minimálisan hatékony adagok, jelezve a szerek lokális hatását.

4.6. TRPV1-receptor-antagonisták összehasonlító vizsgálata patkányban a nociceptív hőküszöb csökkenésén alapuló hőallodynia-modellekben

4.6.1. Előzmények és célkitűzés

Kísérleteink idejében az SB705498 (Rami *et al.*, 2006), a BCTC (Valenzano *et al.*, 2003; Pomonis *et al.*, 2003) és az AMG9810 (Gavva *et al.*, 2005) a gyógyszerfejlesztés homlokterében álló, szelektív TRPV1-antagonisták voltak. Az általunk kifejlesztett, a patkány hátsó lábán mért nociceptív hőküszöb csökkenésén alapuló három hőallodynia-modell mindegyikében igazoltuk a TRPV1-receptor szerepét (lásd 4.3.3 és 5.2.2. pont). Ez lehetővé tette, hogy a fent említett – három különböző gyár által előállított – TRPV1-antagonista hatékonyságát és hatáserősségét direkt módon összehasonlítsuk az általunk kifejlesztett hőallodynia-modellekben. Ezenkívül az RTX-

modell felhasználásával össze akartuk hasonlítani a hőküszöbmérésen és a hagyományos, latenciaidő-mérésen alapuló metodikai megközelítés TRPV1-antagonisták iránti érzékenységet.

4.6.2. Módszerek

A nociceptív hőküszöb mérése a különböző hőallodynia-modellekben

Az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenés vizsgálata során (lásd 4.3.2. pont) a nociceptív hőküszöböt az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mértük, és az RTX intraplantáris dózisa 0,01 μ g volt. Mindhárom TRPV1-antagonistát per os (0,5 ml/100 g) adtuk 1 órával az RTX injekciója előtt. Az enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenés vizsgálata során (lásd 4.4.2. pont) mindhárom TRPV1-antagonistát i.p. adtuk, mert a validált protokoll szerint a szer adása és az első hőküszöbmérés között csak 20 perc telt el. A plantáris bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenés vizsgálata során (lásd 4.5.2. pont) a per os (0,5 ml/100 g) történő antagonistaadás után 1, 2, 3 és 4 órával történt hőküszöbmérés.

Az RTX latenciaidőre kifejtett hatásának vizsgálata a Hargreaves-féle plantártesztben

A mérésekhez „Plantar Test Type 7371” készüléket (Ugo Basile, Comerio, Italy) használtunk. A patkányt egy műanyagdoboz üvegből készült aljára helyeztük, és a hőingerként szolgáló fénysugarat az egyik hátsó végtag plantáris felszínére irányítottuk. Amint az állat elrántotta a lábát, a hőstimuláció automatikusan leállt, és a stimuláció elejétől eltelt időt kijelezte a készülék, mint latenciaidőt. Két kontrollmérés után – amelyek átlaga szolgáltatta a kiindulási latenciaidőt – a megfelelő TRPV1-antagonistát per os (0,5 ml/100 g) adtuk, majd 1 óra elteltével RTX-et (0,06 μ g) adtunk intraplantárisan, és 10 perc múlva megismételtük a latenciaidő mérést.

4.6.3. Eredmények

Mindhárom TRPV1-antagonista p.o. előkezelést követően dózisfüggő módon gátolta az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenést minden mérési időpontban. Mindhárom szer minimális hatékony dózisa 1 mg/kg volt. Az SB705498 legmagasabb dózisa teljesen megszüntette a hőküszöbcsökkenést, míg a BCTC és az AMG9810 maximális gátló hatása 74,5, illetve 66,2%-os volt. Mindhárom TRPV1-antagonista i.p., a hőtrauma után adva dózisfüggő módon gátolta az enyhe égési sérüléssel kiváltott hőküszöbcsökkenést. A vizsgált 1–30 mg/kg-os dózistartományban a leghatékonyabb szer a BCTC volt 74,2%-os gátlással, a legkevésbé aktív az SB705498 volt 54,1%-os gátlással. Az AMG9810 minimális hatékony dózisa volt a legalacsonyabb, míg az SB705498-é a legmagasabb. Mindhárom TRPV1-antagonista p.o. alkalmazása – az incízióval keltett termális allodynia verifikálása után – dózisfüggő módon gátolta a bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenést. A legnagyobb hatékonyságot az AMG9810 mutatta 84,4%-os gátlással, a legkevésbé aktív az SB705498 volt 40,5%-kal. A minimális hatékony dózis alapján az AMG9810 és a BCTC voltak a legpotensebbek. A kiindulási hőküszöb meghatározása után i.p. 30 mg/kg-os dózisban adott TRPV1-antagonisták egyike sem változtatta meg a bazális hőküszöböt. A plantártesztben a kiindulási lábviasszahúzási latenciaidő $11,0 \pm 0,3$ s volt, amely RTX intraplantáris injekciójának hatására $4,4 \pm 0,3$ s-re csökkent le, jelezve a termális hiperalgédia kialakulását. Mindhárom TRPV1-antagonista per os adása 1 órával az RTX előtt csak a legmagasabb, 30 mg/kg-os dózisban gátolta az RTX-szel kiváltott latenciaidő-rövidülést 40% körüli gátlási százalékok mellett.

4.6.4. Megbeszélés

Az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenést mindhárom antagonista a legmagasabb dózisban jelentős mértékben gátolta, és mindhárom szer már 1 mg/kg-os dózisban hatékony volt. Korábbi vizsgálatokban ezen antagonistáknak csak 3–10-szer magasabb dózisaival tudtak kimutatni termális és mechanikai antihiperalgetikus hatást (Rami *et al.*, 2006; Pomonis *et al.*, 2003; Gavva *et al.*, 2005), ami a hőküszöbmérési paradigma kiváló érzékenységet jelzi. Még inkább hangsúlyozandó, hogy a termonocicepció vizsgálatának egyik „gold standard”-jának számító plantártesztben (Hargreaves *et al.*, 1988) – ahol a küszöbfeletti ingerre adott nocifenzív reakció latenciaidejét mérik – az RTX-szel kiváltott latenciarövidülést csak 30-szor (!) magasabb dózisú antagonistával lehetett gátolni, mint ami az RTX hőküszöbcsökkentő hatásának gátlásához szükséges. Ez azt jelenti, hogy a hőküszöbmérési paradigma a perifériás nociceptorokon ható TRPV1-antagonisták antiallodyniás hatásának kimutatására sokkal érzékenyebb, mint a latenciamérésen alapuló megközelítés. Az enyhe hőtraumával, illetve a plantáris bemetszéssel kiváltott küszöbcsökkenés a vizsgált TRPV1-antagonisták iránt hasonló érzékenységet mutatott. Másfajta hiperalgéziamodellekben az antagonista szerek minimális hatékony adagjai hasonlóak vagy magasabbak voltak (Rami *et al.*, 2006; Pomonis *et al.*, 2003; Gavva *et al.*, 2005), mutatva hogy e két, hőküszöbmérésen alapuló modell legalább akkora vagy nagyobb érzékenységgel mutatja ki a TRPV1 szerepét. Említésre méltó, hogy egyik tesztelt antagonista sem módosította a kiindulási, bazális nociceptív hőküszöböt, jelezve, hogy a TRPV1 nem játszik szerepet a hőküszöb beállításában. Mivel a TRPV1-antagonizmus továbbra is ígéretes gyógyszerfejlesztési iránynak tekinthető (lásd 1.3.1. pont), a jelen eredmények e szerek preklinikai tesztelését jelentős mértékben támogatják.

4.7. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő validálása egérfarkon történő hőküszöbmérésre. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő továbbfejlesztése egértartó hengerek alkalmazásával

4.7.1. Előzmények és célkitűzések

Az antinociceptív gyógyszerhatások vizsgálatában mind az alap kutatásban, mind a gyógyszergyári tesztelés során kiterjedten alkalmaznak egereket. Ezért az emelkedő hőmérsékletű vízfürdőt adaptálni kívántuk az egér farkán történő mérésre. Ennek során referencia-analgetikumok és pszichoaktív szerek hőküszöbre és pszichomotoros aktivitásra kifejtett hatásait analizáltuk. Mindezekon túlmenően célunk volt a hőküszöbmérés módszerének olyan módosítása, amelynél nem kell kézbevenni az egeret.

4.7.2. Módszerek

A nociceptív hőküszöb mérése az egér farkán az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel

A nociceptív hőküszöböt 25–35 g-os CD1 egerek farkán mértük meg az általunk kooperációban (Experimetria Kft, Budapest) kifejlesztett emelkedő hőmérsékletű vízfürdő segítségével. Az egeret függőleges pozícióban tartottuk gyengéd fogással a vízfürdő fölött úgy, hogy az állat farka kb. 2 cm mélyen beérjen a vízbe. A kiindulási hőmérséklet 40 °C, a fűtési sebesség 24 °C/perc volt. A tipikus végpont a farok kirántása vagy megrázása volt. Ezek bármelyikének bekövetkezésekor az állat farkát kiemeléssel eltávolítottuk a vízfürdőből, a fűtést leállítottuk, és az aktuális víz hőmérsékletet tekintettük a nociceptív hőküszöbnek. A „cut-off” hőmérsékletet 53 °C-ra állítottuk be. A készülék metodikai továbbfejlesztéseként kialakítottunk egy olyan elrendezést, amelynél az egeret nem kell kézbe venni, mivel a mérés előtt 10 perccel az állat műanyagból készült, felül zárható hengerbe kerül, amelyből lefelé kilóg a farka, a henger oldalán

levő lyukak pedig biztosítják a szabad légzést. A hengerek függőleges helyzetben lógtak egy állványon, amelyen vízszintes irányban el tudtak csúszni. A küszöbmérés során a soron következő hengert a vízfürdő fölé pozícionáltuk olyan magasságban, hogy az állat lefelé kilógó farka kb. 4 cm-re lógott be a vízbe. Ezután megindítottuk a víz felfűtését 30 °C-os kiindulási hőmérsékletről 24 °C/perc sebességgel. A fűtést addig végeztük, amíg az állat ki nem rántotta a farkát a vízből. Az ekkori vízhőmérsékletet tekintettük a fark nociceptív hőküszöbének.

A pszichomotoros aktivitás vizsgálata az „open field” tesztben

Az állatok lokomotoros aktivitását és exploratív viselkedését az „open field” tesztben vizsgáltuk. Az állat magatartását videokamerával rögzítettük, majd utólag elemeztük. Az alábbi három paramétert határoztuk meg az 5 perces (300 másodperces) teljes vizsgálati periódus 3 egyforma, 100 másodperces részében: meglátogatott négyzetek száma, a lokomóció időtartama, az ágaskodások száma.

4.7.3. Eredmények

Az egér farkán a kiindulási (alap) nociceptív hőküszöb $45,80 \pm 0,13$ °C volt. A hőküszöbemelési paradigmában a morfin volt a leghatékonyabb és a legpotensebb (mg-os alapon): a maximális hőküszöb-emelkedés közel 5 °C volt, és a legkisebb hatékony (szignifikáns hőküszöb-emelkedést kiváltó) dózisa 6 mg/kg volt. A diclofenac és a metamizol csak a legmagasabb alkalmazott dózisban tudta megemelni a hőküszöböt, és a hatás jóval kisebb volt, mint a morfiné. A diazepam két magasabb, míg a droperidol legmagasabb dózisa emelte meg a hőküszöböt.

Az „open field” tesztben a morfin csak az ágaskodások számát csökkentette, lényegében csak a 12 és 24 mg/kg-os dózisokban. A diclofenac nem mutatott semmiféle hatást. A metamizol közép- és legmagasabb dózisa jelentős gátló hatást fejtett ki a legtöbb vizsgált paraméterre. A diazepam és a droperidol jelentős gátló hatásokat fejtett ki minden paraméterre nézve.

A morfin legkisebb alkalmazott dózisát (3 mg/kg) – amelyik mind a nociceptív tesztben, mind az „open field” tesztben hatástalan volt –, a diclofenac, metamizol, diazepam és droperidol olyan adagjaival kombináltuk, amelyeknek szintén nem volt szignifikáns hőküszöbemelő hatása. Az összes kombináció (kivéve a diclofenac–metamizol párost) szignifikánsan megemelte a nociceptív hőküszöböt, vagyis a szerek mindegyike hatékonyabban tette a szubliminális morfint. A morfin diclofenac-kal történő kombinációja esetén nem volt pszichomotoros gátlás, míg a morfin plusz metamizol esetében kisebb volt, mint a metamizol egyedüli alkalmazásakor. A morfin diazepammal vagy droperidollal történő kombinációja esetén a pszichomotoros gátlás csak kissé volt nagyobb, mint a pszichoaktív szer egyedüli alkalmazásakor.

Egy sorozatban az egerek farkán a hőküszöböt az állattartó hengerekkel kiegészített emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mértük. Az 5% AITC 30% DMSO-ban oldva/emulgeálva – ellentétben a paraffinban vagy 96%-os etanolban adott szerrel – jelentős mértékben, mintegy 10–11 °C-kal lecsökkentette a nociceptív hőküszöböt úgy, hogy a vehikulum (30% DMSO) önmagában nem befolyásolta azt. A 30% DMSO-ban adott 0,5 %-os AITC csak 5–7 °C-os, a beadás utáni első 20 perces időszakra korlátozódó hőküszöbcsökkenést váltott ki, ezzel szemben az 1% AITC jelentős mértékben (10–14 °C-kal) és a teljes vizsgálati periódusban (60 perc) lecsökkentette a hőküszöböt. Emiatt az AITC-vel kapcsolatos további kísérleteinkben (lásd 5.6. pont) ezt a koncentrációt alkalmaztuk.

4.7.4. Megbeszélés

Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel a CD1 egerek farkán meghatározott nociceptív hőküszöb ($45,80 \pm 0,13^\circ\text{C}$) hasonló, mint a korábbi kísérleteinkben C57Bl/6 egerek hátsó végtagjának a talpán az emelkedő hőmérsékletű forró lappal meghatározott hőküszöb ($45,2 \pm 0,4^\circ\text{C}$; pont). Mivel az NSAID típusú analgetikum diclofenac legmagasabb dózisa (30 mg/kg) megemelte a nociceptív hőküszöböt anélkül, hogy befolyásolta volna a pszichomotoros aktivitást, valódi antinociceptív effektusként értékelhető a hőküszöb megemelkedése. Vizsgálataink a morfin valódi antinociceptív hatását is igazolták, mivel (i) a szer dózisfüggően megemelte a hőküszöböt; (ii) minimális effektív dózisa (6 mg/kg) csak az ágaskodások számát csökkentette az „open field” tesztben; (iii) két magasabb dózisa is csak az ágaskodásokra hatott, hasonló mértékben, de ezeknél a dózisoknál a küszöbemelkedés jelentősen különbözött; (iv) a diazepam és a droperidol magasabb adagjai jelentős pszichomotoros gátlás mellett csak jóval kisebb küszöbemelkedést okoztak, mint a morfin. A metamizol csak a legmagasabb alkalmazott dózisban emelte meg a nociceptív hőküszöböt, jelentős pszichomotoros gátlás mellett. Adataink azt is alátámasztják, hogy akár egy jelentős pszichomotoros gátló hatás sem vezet feltétlenül a nociceptív hőküszöb emelkedéséhez: a diazepam, a droperidol és a metamizol kisebb-nagyobb gátló hatása az „open field” tesztben nem társult hőküszöbemelő hatással. Kísérleteinkben a diclofenac és a metamizol – klinikailag jól ismert – morfinspóroló hatását is sikerült demonstrálni, amennyiben e szerek küszöbalatti antinociceptív dózisa együttadva a morfin szintén szubliminális dóziséval, szignifikáns hőküszöb-emelkedést okozott. A küszöbalatti morfindózis diazepammal vagy droperidollal való kombinálása is úgy emelte meg a hőküszöböt, hogy a pszichomotoros gátlás csak minimálisan volt nagyobb, mint a pszichoaktív szeré önmagában. A diazepam és a droperidol morfinspóroló effektusa felveti annak lehetőségét, hogy alacsony dózisu anxiolitikum vagy neuroleptikum érzékenyítheti a termonociceptív teszteket az ópoidok iránt.

Pozitív tapasztalatokat szereztünk az állattartó hengerek használatával kapcsolatban, amennyiben ez lehetővé tette egyrészt az állat megfogásából eredő stressz állandóvá tételét, másrészt a mérést végző személy „állatmegfogási” módszerének variabilitásából származó hiba kiküszöbölését. Az alkalmazott metodikai fejlesztés létjogosultságát eredményeink is alátámasztják, miszerint az inert 30% DMSO-val végzett perkután kezelés után 7 alkalommal, 10 perces időközökkel mért hőküszöbök nem mutattak szignifikáns eltérést. Minthogy a gyógyszergyári vizsgálatoknak egyik fontos kritériuma a minél nagyobb fokú standardizálhatóság, a küszöbmérést végző személy manuális beavatkozásából eredő variabilitásnak a kiküszöbölése és a módszer automatizálhatóságának lehetősége a metodikai fejlesztést az ipari környezetben zajló tesztelés számára is vonzóvá teheti.

5. A NOCICEPTÍV HŐKÜSZÖB MÉRÉSÉNEK ALKALMAZÁSA A TRPV1-RECEPTOR FUNKCIÓJÁNAK ÉS A TERMONOCICEPCIÓ MECHANIZMUSAINAK VIZSGÁLATÁBAN

Ebben a fejezetben olyan kísérleti eredményeket mutatok be, amelyeket főként a nociceptív hőküszöb mérésével nyertünk. Ezekben a vizsgálatokban a emelkedő hőmérsékletű forró lapon vagy az emelkedő hőmérsékletű vízfürdőben végzett hőküszöbmérést mint eszközt alkalmaztuk valamely elméleti probléma analízise során. A vizsgálatok mindegyike – legalábbis részben – a TRPV1-receptor valamely aspektusával foglalkozott, és a termonocicepció tágabban értelmezett fogalomkörébe sorolható be.

5.1. Módszerek

Állatok

Kísérleteink zömét 140–200 g-os nőstény Wistar patkányokon végeztük. Egy sorozatban TRPV1- (TRPV1^{-/-}), illetve TRPA1-génhiányos (TRPA1^{-/-}) egereket, valamint vad típusú megfelelőiket (TRPV1^{+/+} és TRPA1^{+/+}) vizsgáltuk.

A nociceptív hőküszöb mérése az emelkedő hőmérsékletű forró lap vagy az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő alkalmazásával patkány hátsó lábán

E módszerek leírását lásd a 4.3.2. és 4.4.2. pontokban. Újabb kísérleteinkben az IITC Life Sciences Inc. (Woodland Hills, CA, USA) által gyártott „incremental hot/cold plate analgesia meter”-t használtuk. A készülék emelkedő hőmérsékletű üzemmódban a forró küszöb, csökkenő hőmérsékletű üzemmódban a nociceptív hideg küszöb mérésére alkalmas (lásd lejjebb).

A nociceptív hideg küszöb meghatározása patkányban hátsó végtagjának talpi részén

A nociceptív hideg küszöb meghatározásához az „incremental hot/cold plate analgesia meter”-t (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA) használtuk csökkenő hőmérsékletű üzemmódban. 25 °C-os kiindulási hőmérsékletet és 6 °C/perc hűtési sebességet alkalmaztunk; a hűtést addig folytattuk, amíg az állat valamelyik hátsó végtag nyalásával vagy emelésével nem válaszolt. Az ekkor mért laphőmérsékletet tekintettük a nociceptív hideg küszöbnek. A „cut-off” érték 0 °C-ra volt beállítva, de a lap spontán tovább hűlt –1 °C-ra, ezért az utóbbi értéket tekintettük a végértéknek.

Tesztanyagok hatásának vizsgálata a hőtraumával vagy sebési bemetszéssel kiváltott termális allodynia-modellben

Mindkét modell esetében a tesztanyagot vagy annak szolvensét intraplantáris injekcióban adtuk a hőküszöbcsökkentő noxa alkalmazása után 10 perccel (hőtrauma) vagy 18 órával (bemetszés) történő hőküszöbmérést követően. Ezután 10 percenként történt hőküszöbmérés, összesen 4 alkalommal. A szerek hatását statisztikailag a 10. és 20. percben mért küszöbcsökkenés összege alapján ítéltük meg és százalékban fejeztük ki (lásd 4.2. pont).

Patkány TRPV1-receptorral transzfektált HT5-1 sejtek ⁴⁵Ca²⁺-felvételének vizsgálata

A különféle ágensekkel kiváltott ⁴⁵Ca²⁺-felvételt a HT5-1-es sejtvonal sejtjeiben vizsgáltuk. A HT5-1 sejtekbe a patkány TRPV1 cDNS-ét tartalmazó expressziós vektort (pEGFP-N1; Clontech) juttattunk be (Sándor *et al.*, 2005). A transzfektált sejtvonalban a sejtek 75%-a expresszálta a TRPV1–EGFP fúziós fehérjét, amely hasonló tulajdonságokkal bír, mint a natív TRPV1-receptor. A transzfektált sejteket Dulbecco-féle módosított médiumban növesztettük. A sejtek ⁴⁵Ca²⁺-felvételét 200 µCi/ml ⁴⁵Ca²⁺-izotóp hozzáadása után vizsgáltuk Tri-Carb 2800 TR (Packard) szcintillációs számlálóval.

Az intracelluláris Ca²⁺-szignálok mérése fura-2 mikrofluorimetriával HT5-1 sejtvonal sejtjeiben és tenyésztett patkány trigeminális neuronokban

Az egyedi sejtek szintjén a Ca²⁺-felvételt fluoreszcens raciométrikus Ca²⁺-„imaging” módszerrel vizsgáltuk fura-2 festékkel töltött HT5-1 sejtekben, illetve trigeminális neuronokban. A HT5-1 sejtvonal leírását lásd feljebb. A trigeminális neuronok primer kultúráját 2–4 napos újszülött

Wistar patkányok trigeminális dúcából készítettük (lásd Szőke *et al.*, 2000). Az analízist Olympus BX50WI (Tokió, Japán) fluoreszcens mikroszkóp felületén végeztük felváltva 340, illetve 380 nm-es, monokromátorral generált fénnel. Az 510 nm-en egy adott lapon 2–18 elkülönült területről kibocsátott fluoreszcenciát digitális kamerával detektáltuk. A felváltva alkalmazott 340, illetve 380 nm-es gerjesztő fény hatására kibocsátott, 510 nm-nél nagyobb hullámhosszúságú fényintenzitás-arányokat 1 Hz-es frekvenciával detektáltuk. Az adatok rögzítéséhez és a raciométrikus 340/380-arány analíziséhez Axon Imaging Workbench 2.1 szoftvert használtunk. A gyűjtött adatok további feldolgozásához a Microcal Origin 7.0 programot alkalmaztuk.

Idegátmetzés patkány jobb hátsó végtagján és az idegátmetzett láb kémiai izgatása

Pentobarbital-narkózisban (50 mg/kg i.p.) a jobb hátsó lábon feltártuk a n. saphenust és a n. ischiadicust, majd éles ollóval átvágtuk mindkét ideget. Ezután a műtési sebet varrattal zártuk. A kísérletek többségében az idegátmetzés (és az ugyanazon ülésben elvégzett plantáris bemetszés, lásd lejjebb) után 18 órával (szubakut denerváció) történt az állatok vizsgálata a nociceptív tesztekben. A kapszaicint vagy annak szolvensét intraplantáris injekció formájában adtuk a idegátmetzett jobb hátsó végtag talpának bőre alá. A mustárolajat vagy annak szolvensét vattapálcika segítségével kentük a jobb hátsó láb bőrére. Egy állatsoport esetében krónikus denerválást végeztünk oly módon, hogy a plantáris incíziót 4 nappal és 6 órával az idegátmetzés után ismételt narkózisban végeztük el, és az állatok vizsgálata a nociceptív tesztekben 18 órával ez után (azaz az idegátmetzés után 5 nappal) történt, amikor a decentralizált idegvégződések degenerálódtak (lásd lejjebb).

A mustárolajjal kiváltott plazma-extravazáció vizsgálata a hátsó lábon az idegátmetzés utáni különböző időpontokban

Annak megítéléséhez, hogy 18 órával az idegátmetzés után megváltozott-e a peptiderg nociceptorok neuropeptid-kibocsátó funkciója, megmértük a mustárolajjal kiváltott plazma-extravazációt a denervált hátsó lábon *in vivo* fluoreszcencia „imaging” segítségével az idegátmetzés után különböző időpontokban. Ennek során ketamin–xylazinnal (72–8 mg/kg i.p.) altatott patkányokban 0,5 mg/kg indocianin-zöld festéket adtunk i.v., majd az idegátmetzett jobb hátsó végtagon 5%-os mustárolajat alkalmaztunk a bőrre kenve. A fluoreszcenciát 20 perccel a mustárolaj alkalmazása után mértük a kezelt és a kontrollként szolgáló ellenoldali (bal) hátsó lábon optikai detektorral (IVIS Lumina II; Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA).

A kapszaicinérzékeny érzőideg-végződések deszenzibilizációja a jobb hátsó láb talpi részén

A kapszaicinérzékeny nociceptorok funkciójának „kikapcsolása” (idegvégződés-szintű deszenzibilizáció, lásd 1.3.1. pont) érdekében 3 nappal a távoli antihiperalgetikus hatás vizsgálata előtt 100 µg kapszaicint adtunk i.pl. a jobb hátsó lábba olyan állatokban, amelyek nem estek át idegátmetzésen.

A sebészi bemetszéssel kiváltott termális allodynia vizsgálata a bal hátsó lábon

A bal hátsó láb kiindulási nociceptív hőküszöbét az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel határoztuk meg (lásd 4.4.2. pont), és ezt az értéket tekintettük preoperatív kontrollnak. Ezt követően ugyanabban a sebészi ülésben az állatokon narkózisban elvégeztük a jobb hátsó lábon az idegátmetzést (lásd fent), és a bal hátsó lábon a standardizált plantáris bemetszést (lásd 4.5.2. pont). 18 órával később, a narkózis hatásainak teljes elmúltával ismét meghatároztuk a bal láb

nociceptív hőküszöbét, és ezt az értéket tekintettük posztoperatív kontrollnak. Az ellenoldali (jobb) láb kapszaicinnal, illetve mustárolajjal (vagy ezek szolvensével) történő kezelését követően a bemetszett (bal) lábon 10 percenként mértük a nociceptív hőküszöböt 40 percen át.

A n. ischiadicus részleges lekötésével kiváltott neuropátiás mechanikai allodynia vizsgálata a bal hátsó lábon

Limitált számú kísérletben a bal hátsó végtagon a Seltzer és munkatársai (1990) által kidolgozott neuropátiás mechanikai allodynia-modellt alkalmaztuk. Ennek során Randall–Selitto készülékkel (Analgesimeter, Ugo Basile, Olaszország) mértük meg patkányok bal hátsó lábán a grammal mért mechanonociceptív küszöböt (preoperatív kontroll). Ezt követően pentobarbital-narkózisban (50 mg/kg i.p.) feltártuk a n. ischiadicust a comb felső részének magasságában, majd atraumatikus 6-0 fonállal lekötöttük az ideg kb. egyharmadát. Ezután a sebet zártuk. Két nappal később egy újabb narkózis során ezek az állatok is átestek a fentiekben leírt, jobb lábon elvégzett idegátmetszésen. 18 órával az idegátmetszés után újra megmértük a bal hátsó láb mechanonociceptív küszöbét, és ezt tekintettük a posztoperatív kontroll értéknek. Az ellenoldali (jobb) láb kapszaicinnal, illetve mustárolajjal (vagy ezek szolvensével) történő kezelését követően a részleges ideglekötésen átesett (bal) lábon 20 és 40 perc elteltével mértük meg a mechanonociceptív küszöböt.

A plazma szomatosztatinszerű immunreaktivitásának meghatározása

18 órával (szubakut idegátmetszés) vagy 5 nappal (krónikus denerváció) a jobb hátsó végtagon elvégzett idegátmetszés (és 18 órával a bal hátsó láb talpán végzett bemetszés) után az állatokat újra elaltattuk pentobarbitállal, majd az idegátmetszett jobb hátsó lábba 100 µg kapszaicint vagy annak szolvensét adtunk intraplantárisan. Tíz és 20 (krónikus denerváció esetén csak 10) perccel később szívpunkció révén vérmintát (kb. 3 ml) nyertünk, amelynek plazmájából radioimmunszérum segítségével határoztuk meg a szomatosztatinszerű immunreaktivitást az intézetünkben korábban kidolgozott módszerrel (Németh *et al.*, 1996).

A nociceptív hőküszöb mérése egér farkán, illetve a hátsó láb talpi részén

Az egér farkán a nociceptív hőküszöböt az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mértük, állattartó hengerek alkalmazásával (lásd 4.7.2. pont). Az egér hátsó lábának talpi részén a nociceptív hőküszöböt emelkedő hőmérsékletű forró lappal (IITC Life Science, Woodland Hills, USA) mértük. Az egeret az eszköz melegíthető fémlapjára helyezett plexi megfigyelő kamrába tettük, ahol szabadon mozoghatott. A fémlap hőmérsékletét 30 °C-os kiindulási hőmérsékletről 12 °C/perc sebességgel növeltük mindaddig, amíg az állat valamilyen nocifenzív reakciót (típusosan valamelyik hátsó láb emelése, rázása, megnyalása) nem mutatott. Ekkor a fűtést megszakítottuk, és a készülék által kijelzett laphőmérsékletet tekintettük az érintett talp nociceptív hőküszöbének. A „cut-off” hőmérséklet 53 °C volt.

A nociceptív hidegérzékenység vizsgálata az egér farkán

Ezeknél a kísérleteknél is a fentiekben leírt állattartó hengereket alkalmaztuk. Segítségükkel az egér farkát jeges, azaz 0 °C-os vizet tartalmazó tartályba mártottuk, és a típusos nocifenzív reakció (a fark erőteljes rázása) bekövetkeztéig eltelt időt mértük. A „cut-off” idő 180 s volt.

A mechanonociceptív küszöb meghatározása egér hátsó lábának talpi részén

A hátsó láb talpán a mechanonociceptív küszöböt dinamikus plantáris eszteziométerrel (Ugo Basile Aesthesiometer 37400, Olaszország) mértük. Az egerek szabadon mozogtak a készülék részét képező fémhálón, amelyen keresztül alulról egy egyenes fémszálat irányított a talpra a készülék egyenletesen növekvő intenzitással (2 g/s) mindaddig, amíg az állat el nem húzta a lábát. A kijelzőn megjelenő aktuális – grammal kifejezett – nyomóerőt tekintettük a láb mechanonociceptív küszöbének. A „cut-off” érték 10 g volt. Három egymás utáni mérés átlagát tekintettük a kiindulási mechanonociceptív küszöbnek.

Az AITC-vel kiváltott termális allodynia vizsgálata az egér farkán, illetve hátsó láb talpi részén

30% DMSO-ban oldott 1%-os AITC hatását vizsgáltuk a fark, illetve a talp nociceptív hőküszöbére emelkedő hőmérsékletű vízfürdőt, illetve forró lapot alkalmazva. Az AITC vehikulumát és koncentrációját előkísérletekben határoztuk meg (lásd 4.7.3. pont). A kiindulási (alap) hőküszöb mérése után az egér farkát vagy egyik hátsó lábát 1%-os AITC oldatba mártottuk 30, illetve 60 másodpercre (mivel a talp esetében a 30 s expozíciós idővel nyert adatok nem voltak konzisztensek, a koncentráció emelése helyett a behatás időtartamát növeltük meg). Ezután 10 percenként mértük a nociceptív hőküszöböt 1 órán keresztül az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel, illetve forró lappal.

Az AITC-vel kiváltott mechanikai allodynia vizsgálata az egér hátsó lábának talpi részén

A kontroll mechanonociceptív küszöb mérése után az egér hátsó lábát 1%-os, 30% DMSO-t tartalmazó AITC oldatba mártottuk 60 másodpercre. 30, 60, 120 és 180 perccel később ismételtén meghatároztuk a mechanonociceptív küszöböt. A mechanikai allodynaiaként értelmezett küszöbcsökkenést a kiindulási küszöb százalékában adtuk meg.

Az AITC-vel kiváltott nocifenzív reakció vizsgálata az egér farkán

Az egér farkát 1%-os, 30% DMSO-t tartalmazó AITC oldatba mártottuk mindaddig, amíg a típusos nocifenzív reakció (a fark erőteljes rázása) be nem következett, és az addig eltelt időt mértük. A „cut-off” idő 180 s volt. A nocifenzív reakció után az állat farkát kiemeltük az AITC-oldatból és szárazra töröltük, lehetőség szerint eltávolítva az irritáns anyagot.

A TRPV1-receptor-agonisták idegvégződés-szintű deszenzibilizáló hatásának vizsgálata

Mindkét hátsó láb kiindulási (kontroll) hőküszöbének mérése után az állatok mindkét hátsó lábába kapszaicint, RTX-et vagy OLDA-t, illetve annak szolvénsét adtunk intraplantáris injekció (100 µl) formájában, majd naponként megismételtük a hőküszöbmérést az elsőként reagáló hátsó lábra vonatkozóan. A kétoldali kezelésre azért volt szükség, hogy elkerüljük a nem kezelt, intakt hőérzékenységgű lábának égési sérülését, amely abból származott volna, hogy a szer hosszú távú hatásként megemeli a hőküszöböt. Egy külön kísérletsorozatban a nociceptív forró és hideg küszöböt párhuzamosan mértük naponként ugyanabban az állatcsoportban kapszaicin vagy RTX bilaterális intraplantáris injekciója előtt és után naponta.

A TRPV1-receptor-agonisták TRPV1-re korlátozódó deszenzibilizáló hatásának vizsgálata

Ezekben a kísérletekben az egyik hátsó végtagba intraplantárisan adott TRPV1-agonisták (RTX, OLDA) által kiváltott akut nociceptív válaszokat hasonlítottuk össze az első és második

expozíció során: a nocifenzív reakció (láb nyalása, emelése) időtartamát, illetve a beadás után 5 (RTX) vagy 10 perc (OLDA) múlva a nociceptív hőküszöb csökkenését mértük.

5.2. Az enyhe hőtraumával és a plantáris bemetszéssel kiváltott termális allodynia mediátorainak összehasonlító vizsgálata

5.2.1. Előzmények és célkitűzés

Az enyhe hőtraumával és a sebészi bemetszéssel kiváltott termális allodynia két közvetlen klinikai relevanciával bíró fájdalommodell, amelyeket a 4.4 és 4.5. pontban tárgyaltunk. A két paradigma között jelentős különbség áll fenn az időbeli lefutás tekintetében: a hőtraumával keltett hőküszöbcsökkenést gyors kezdet és rövid hatástartam jellemzi, míg az incízió esetében a hőallodynia lassabban alakul ki, de jóval tartósabb. Célunk az volt, hogy a két termális allodynia perifériás mediátorhátterét intraplantárisan adott tesztanyagok segítségével összehasonlítsuk.

5.2.2. Eredmények és megbeszélés

A B₂-bradikininreceptor-antagonista HOE140 (icatibant) mind a hőtrauma, mind az incízió által kiváltott hőküszöbcsökkenést szignifikánsan gátolta a szolvenséhez képest (**3. táblázat**). Ezzel szemben a B₁-bradikininreceptor-antagonista [des-Arg¹⁰]-HOE 140 csak az incíziós modellben volt egyértelműen hatékony, a hőtrauma hatását csak a 20. percben gátolta ami miatt az összegzálás

3. táblázat. Az alkalmazott tesztanyagok hatása az enyhe hőtraumával vagy plantáris incízióval kiváltott hőküszöbcsökkenésre.

Drug	Concentration	Heat injury		Plantar incision	
		Overall effect P value	Percentage inhibition	Overall effect P value	Percentage inhibition
HOE 140	10 µM	<0.05	32.6%	<0.05	31.6%
[des-Arg ¹⁰]-HOE 140	10 µM	NS	10.0%	<0.01	79.0%
NDGA	10 µM	<0.001	18.0%	NS	13.6%
	30 µM	<0.05	28.0%	NS	17.9%
L-NOARG	100 µM	<0.001	62.4%	<0.01	52.4%
TNP-ATP	0.3 µM	<0.05	61.6%	<0.05	54.5%
AMG9810	1 µM	0.073	25.8%	–	–
	10 µM	<0.05	48.2%	NS	–
SB-366791	10 µM	–	–	NS	6.1%
	100 µM	–	–	<0.05	46.9%

mértéke nem érte el a szignifikancia szintjét. A B₂ és B₁-receptorok szerepe az incíziós modellben lényeges eredmény, mivel egy korábbi vizsgálat (Leonard *et al.*, 2004) – latenciamérést alkalmazva a plantártesztben – egyik receptor-altípus szerepét sem tudta kimutatni 24 órával a bemetszés után. Mint ismeretes, a B₂-receptorok konstitutívan kifejeződnek a nociceptív idegvégződéseken, míg a B₁-receptorok indukálhatók (lásd Hall 1997); valószínűleg a 18 órás időtartam elegendő volt utóbbiak számottevő kifejeződéséhez. A hőtrauma esetében csak a B₂-receptorok szerepét sikerült kimutatni, ami nem meglepő, hiszen ebben a paradigmában a noxa utáni 20–50. percben történt a mérés, amikor még számottevő B₁-receptor-kifejeződés nem várható.

Előző vizsgálatainkban (4.4. és 4.5. pont), amelyekben validáltuk a két modellt, kimutattuk, hogy az intraplantárisan adott COX-gátlók mérsékeltek a hőtraumával vagy plantáris bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenést, igazolva a COX-termékek (prosztanoidok) közvetítő szerepét. A prosztanoidok, különösen a PGE₂ és PGI₂ típusos nociceptor-szenzibilizáló ágensek (a részleteket illetően lásd Pethő és Reeh, 2012). A jelen vizsgálatainkban a lokálisan adott nem-szelektív lipoxigenáz-gátló NDGA csak a hőtrauma hatását gátolta (**3. táblázat**), jelezve hogy a lipoxigenáz-

termékek csak ebben a modellben játszanak szerepet. A nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) nem-szelektív gátlója, az L-NOARG mindkét modellben gátolta a hőküszöbcsökkenést, jelezve az NO közvetítő szerepét (**3. táblázat**). A P2X purinoceptorok szerepét is mindkét modellben igazolni tudtuk a szelektív antagonistá TNP-ATP alkalmazásával (**3. táblázat**). A TRPV1-receptor közvetítő szerepére is találtunk bizonyítékot két szelektív antagonistá alkalmazásával: az AMG9810 a hőtrauma, míg az SB366791 az incízió esetében gátolta a hőküszöbcsökkenést (**3. táblázat**). A TRPV1 szerepét e két modellben saját párhuzamos vizsgálataink direkt módon megerősítették szisztémásan adott antagonistákkal (4.6. pont).

Érdekes és lényeges eredmény, hogy az egyes antagonistákkal, illetve enzimgátlókkal nyert gátlási százalékok összege meghaladja a 100-at (**3. táblázat**). Ez azt valószínűsíti, hogy e két allodynia-modellben a mediátorok nem egymástól függetlenül, párhuzamosan hatnak, hanem közöttük közös célstruktúra(ko)n való konvergencia áll fenn, és ez a célstruktúra aktivációját egy limitált maximális értékre állítja be, azaz szaturáció következik be. Egy ilyen lehetséges konvergenciapont a TRPV1-receptor, amelyről ismert, hogy „molekuláris integrátorként” számos endogén ágens hatásainak a közvetítésében részt vesz (lásd 1.3.1. pont).

5.3. A TRPV1-csatornán ható zsírsavamidok vizsgálata *in vitro* és *in vivo*

5.3.1. Előzmények és célkitűzés

Két zsírsavamidról, az *N*-arachidonil-etanolamidról (anandamid) és az *N*-oleoil-dopaminról (OLDA) kimutatták, hogy agonistaként viselkednek a TRPV1-receptoron (Zygmunt *et al.*, 1999; Smart *et al.*, 2000; Chu *et al.*, 2003). Egy további zsírsavamid, az *N*-oleoil-etanolamid (OEA) TRPV1-aktiváló képességét több *in vitro* és *in vivo* vizsgálatban is kimutatták (Ahern, 2003; Wang *et al.*, 2005; LoVerme *et al.*, 2006), de ennek ellentmondóan mind zsigeri, mind gyulladásos fájdalommodellben antinociceptív hatásúnak találták (Suardiaz *et al.*, 2007). A fentiek alapján célunk az volt, hogy a nociceptív primer afferens neuronok sejttestén végzett *in vitro* és a perifériás nociceptorok működésén alapuló *in vivo* módszerek alkalmazásával megvizsgáljuk az OLDA-nak, két újonnan szintetizált származékának, a 3-metil-*N*-oleoil-dopaminnak (3-MOLDA), illetve a 4-metil-*N*-oleoil-dopaminnak (4-MOLDA), valamint az OEA-nak a TRPV1-receptorra kifejtett hatását. Ezenkívül az anandamid vizsgálatára is sor került, de csak az *in vivo* modellben, mivel ezen ágenszt korábban részletesen vizsgálták *in vitro* módszerekkel.

5.3.2. Eredmények

Mind a referencia TRPV1-agonistaként használt kapszaicin, mind az OLDA $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -akkumulációt váltott ki HT5-1 sejtekben. Az OLDA által kiváltott maximális válasz 60%-a volt a kapszaicinének, és az EC_{50} -értéke 50-szer nagyobb volt, mint a kapszaiciné. A 3-MOLDA is $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -akkumulációt váltott ki a HT5-1 sejtekben. A hatékonysága a kapszaicinhez képest 70% volt, míg az EC_{50} -értéke több mint 500-szor kisebb volt. A 4-MOLDA és az OEA nem váltott ki $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -akkumulációt a HT5-1 sejtekben, de koncentrációfüggő módon csökkentette a 100 nM kapszaicinnal kiváltott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -akkumulációt, ami azt jelzi, hogy e két vegyület TRPV1-antagonista hatású.

Mind a kapszaicin (330 nM), mind az OLDA (3 μM), mind a 3-MOLDA (10 μM) Ca^{2+} -tranzienseket váltott ki tenyésztett trigeminális neuronokban, amelyek amplitúdója ismételt adás esetén csökkent, jelezve a deszenzibilizációt. Ezzel szemben sem a 4-MOLDA, sem az OEA nem váltott ki Ca^{2+} -tranzienst a neuronokban.

Az OLDA intraplantáris injekciója mind patkányban (5 nmól), mind egérben (50 nmól) nocifenzív reakciót (a láb emelése és nyalása) váltott ki, amely 10 percen belül megszűnt. A nocifenzív reakció időtartama szignifikánsan kisebb volt TRPV1-génhiányos egerekben, mint a vad típusúakban. Patkányban az OLDA 6–9 °C-kal lecsökkent a nociceptív hőküszöb a 10–30 perces időintervallumban úgy, hogy az a 60. percre visszatért a kontroll értékre. A szintén intraplantárisan adott TRPV1-antagonista I-RTX-szel végzett előkezelés (0,05 nmól, 5 perc) minden mérési időpontban szignifikánsan gátolta az OLDA hőküszöbcsökkentő hatását. A 3-MOLDA intraplantáris injekciója (5 nmól) szintén nocifenzív reakciót váltott ki, amely 10 percen belül megszűnt. Ezt követően a vegyület hatására lecsökkent a nociceptív hőküszöb legalább 30 percig. Ezt a küszöbcsökkenést is gátolta az I-RTX-szel végzett 5 perces intraplantáris előkezelés.

Sem a 4-MOLDA, sem az OEA intraplantáris injekciója nem váltott ki nocifenzív reakciót vagy hőküszöbcsökkenést. Ugyanakkor a 4-MOLDA-val, illetve az OEA-val végzett intraplantáris előkezelés gátolta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását. Az arachidonil-etanolamid (anandamid) intraplantáris injekciója (0,03 nmól) nem váltott ki nocifenzív reakciót, és nem befolyásolta a nociceptív hőküszöböt a beadás után 30 percig vizsgálva. Ugyanakkor szintén gátolta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását. Az anandamid gátló hatását a CB₁-receptor-antagonista SR141716A (0,18 nmól, i.pl.) együttes adása teljesen kivédte.

5.3.3. Megbeszélés

A vizsgált zsírsavamidok közül az OLDA és a 3-MOLDA TRPV1-receptor-agonista hatására találtunk bizonyítékot: mindkét ágens ⁴⁵Ca²⁺-akkumulációt váltott ki TRPV1-gyel transzfektált sejtekben, Ca²⁺-tranzienseket indukált trigeminális szenzoros neuronokban, intraplantáris adás után nocifenzív reakciót és a nociceptív hőküszöb csökkenését (termális allodynia) okozta, ezáltal utánozta a TRPV1-agonista kapszaicin, illetve RTX hatásait. A hőküszöbcsökkentési paradigmában mindkét ágens hatása blokkolható volt TRPV1-antagonistával, igazolva, hogy hatásukat TRPV1-receptorok közvetítik. Mindkét ágens mind az *in vitro*, mind az *in vivo* modellekben jóval kevésbé potens TRPV1-agonistának bizonyult, mint a kapszaicin vagy az RTX.

A 4-MOLDA és az OEA viselkedése a különféle vizsgált modellekben TRPV1-antagonista hatásra utal: nem váltottak ki ⁴⁵Ca²⁺-akkumulációt a TRPV1-gyel transzfektált sejtekben, sem Ca²⁺-tranzienseket a trigeminális szenzoros neuronokban, intraplantáris adás után nem okoztak sem nocifenzív reakciót, sem a nociceptív hőküszöb csökkenését. Ugyanakkor gátolták a kapszaicinnal kiváltott ⁴⁵Ca²⁺-akkumulációt a TRPV1-gyel transzfektált sejtekben, és mérsékeltek az RTX hőküszöbcsökkentő hatását. Az eredmények alapján nem állapítható meg egyértelműen a TRPV1-antagonizmus típusa; a két legvalószínűbb mechanizmus a TRPV1-receptor kompetitív antagonizmusa, illetve a TRPV1 ioncsatorna részének a blokkolása.

Bár az OEA jelen kísérleteinkben egyértelműen TRPV1-antagonistának mutatkozott, az irodalmi adatok ellentmondásosak (lásd feljebb). Nem zárható ki, hogy az OEA alacsony intrinszik hatékonyságú parciális agonista a patkány és egér TRPV1-receptoron, hasonlóan a humán TRPV1-hez (Movahed *et al.*, 2005). Ezáltal az OEA kompetitíve gátolhatja a nagyobb intrinszik hatékonyságú agonisták (kapszaicin, RTX) hatását, de magas koncentrációban TRPV1-agonista hatásokat produkálhat.

Az anandamid az *in vivo* modellünkben nem váltott ki nocifenzív reakciót és hőküszöbcsökkenést, de gátolta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását, és ezt CB₁-receptor-

antagonistával teljes mértékben ki lehetett védeni. Mindez arra utal, hogy a szer kizárólag CB₁-receptor-agonistaként viselkedett.

5.4. A protein-kináz A és a protein-kináz C szerepe a TRPV1-receptor érzékenységének meghatározásában in vitro és in vivo

5.4.1. Előzmények és célkitűzések

Ismert, hogy a TRPV1 foszforilációs státusza fontos szerepet játszik a receptor érzékenységének meghatározásában: a foszforiláció növeli, a defoszforiláció csökkenti a receptor válaszkésztségét (lásd 1.3.1. pont). Kísérleteink célja a PKA és PKC egymáshoz viszonyított szerepének összehasonlítása volt a TRPV1-receptor érzékenységének beállításában egyrészt alaphelyzetben, másrészt az említett enzimek farmakológiai stimulálása mellett.

5.4.2. Eredmények

A kapszaicin (0,33 μ M, 3 s kontaktusidő) vagy RTX (1 nM, 3 s) hatására megemelkedett a racimetrikus fluoreszcenciaválaszként (F340/F380) mért intracelluláris Ca²⁺-koncentráció tenyésztett patkány trigeminális neuronokban. Az 5 perccel később ismételt alkalmazott kapszaicin vagy RTX szignifikánsan kisebb választ váltott ki (93, illetve 59%), jelezve a tachyphylaxia kialakulását. A másodszorra adott kapszaicin hatását – a tachyphylaxiához képest – gátolta a ruténiumvörös (0,2 μ M), illetve az EGTA-val kalciummentessé tett szuperfúziós médium, mutatva a TRPV1-receptorok és az extracelluláris Ca²⁺-ionok beáramlásának közvetítő szerepét a válaszban. A PKA-t szelektíven gátló KT5720 (0,2 μ M) 5 perces előkezelés után gátolta mind a kapszaicin (34%-ra), mind az RTX hatását (34%-ra) olyan mértékben, ami szignifikánsan nagyobb volt, mint a tachyphylaxia. A szelektív PKC-gátló chelerythrin-klorid (1 és 10 μ M), illetve a PKC-t és PKA-t egyaránt gátló staurosporin (10 nM és 1 μ M) csak annyira csökkentette a második választ, mint a tachyphylaxia. A sejtmembránon áthatolni képes és a PKA-t aktiváló cAMP-analóg dibutiril-cAMP (dbcAMP, 200 μ M, 15 s) 57%-kal fokozta a kapszaicinnal kiváltott Ca²⁺-tranzienst, míg a szelektív PKC-aktivátor forbolészter PMA (1 μ M, 10 s) hasonlóképpen szignifikánsan (a tachyphylaxiához képest), 48%-kal megnövelte a kapszaicinnal kiváltott Ca²⁺-akkumulációt. Egyik proteinkináz-gátló, illetve aktivátor sem okozott szignifikáns változást a magas K⁺-koncentrációval kiváltott depolarizáció révén kialakuló Ca²⁺-akkumuláció mértékében, jelezve hogy a hatékony szerek hatásai nem a TRPV1-től független nem-specifikus hatások.

Az RTX (0,5 μ M, 100 μ l) előtt 5 perccel szintén intraplantárisan adott KT5720 (0,2 μ M, 50 μ l) szignifikánsan (62%-kal) gátolta az RTX 5. percben mért hőküszöbcsökkentő hatását. Hasonló eredményt kaptunk a staurosporinnal (1 μ M, 50 μ l), amelynek gátló hatása 43% volt, míg a chelerythrin-kloriddal (5 μ M, 50 μ l) végzett előkezelés nem befolyásolta szignifikánsan az RTX hatását. A protein-kinázok aktivátorainak vizsgálatokor 10-szer kisebb koncentrációban (0,05 μ M) adtuk az RTX-et intraplantárisan az esetleges „ceiling” fenomenon elkerülése céljából. A PKA-t aktiváló forskolin (2,5 μ M, 50 μ l) szintén 5 perces előkezelést követően 121,9%-kal fokozta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását az 5 perces mérés alapján. A PMA (1,6 μ M, 50 μ l) hasonló hatást váltott ki (118,7%). Önmagában (RTX nélkül) adva egyik szer sem befolyásolta a nociceptív hőküszöböt.

5.4.3. Megbeszélés

In vitro adataink szerint a PKA szelektív gátlása csökkentette mind a kapszaicinnal, mind az RTX-szel kiváltott Ca^{2+} -akkumulációt a trigeminális neuronokban, ezzel ellentétben a PKC szelektív gátlása nem okozott szignifikáns változást. Az *in vitro* nyert adatokkal egybevágó eredményeket szolgáltatottak az *in vivo* kísérletek: az intraplantárisan adott szelektív PKA-gátló gátolta a szintén helyileg adott RTX hőküszöbcsökkentő hatását, ugyanakkor a lokális PKC-gátlás nem belyásolta az RTX-okozta termális allodyniát. Mindez arra utal, hogy alaphelyzetben a PKA révén végbemenő foszforiláció lényeges szerepet játszik a TRPV1-receptor agonisták iránti válaszkészségének fenntartásában mind a trigeminális nociceptorok sejttestében, mind a talp nociceptorainak perifériás terminálisaiban, ellenben a PKC ilyen irányú szerepe nem mutatható ki. Említésre érdemes, hogy más kísérletes paradigmákban a PKA szerepét a TRPV1 alapérzékenységeinek beállításában nem tudták kimutatni sem TRPV1-gyel transzfektált sejtekben, sem egér vagy patkány DRG-neuronjaiban, sőt, inkább a PKC-re ilyen irányú szerepére vonatkozóan találtak bizonyítékot (Jerman *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001; Shu és Mendell, 2001; Hu *et al.*, 2002; Bonnington és McNaughton, 2003; Amadesi *et al.*, 2004). Mindez a trigeminális és a DRG neuronok közötti különbségre utal. A nem-szelektív (PKA-t és PKC-t egyaránt gátolni képes) staurosporin nem hatott a kapszaicinnal vagy RTX-szel kiváltott Ca^{2+} -akkumulációra a trigeminális neuronokban, de gátolta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását. Ennek magyarázata az eltérő szöveti környezet lehet a két modellben: a szer valószínűleg jelentősen gátolta a PKA-t a bőr nociceptoraiban, de valami oknál fogva csak kevésbé a trigeminális neuronokban.

Mind a PKA-aktiváló dbcAMP, mind a PKC-stimuláló PMA növelte a kapszaicinnal kiváltott Ca^{2+} -akkumulációt a trigeminális neuronokban, anélkül, hogy befolyásolta volna a K^{+} -ionnal kiváltott választ, jelezve, hogy mindkét protein-kináz serkentése képes fokozni a TRPV1-receptor agonista iránti érzékenységet *in vitro*. Az RTX-allodynia vizsgálata során nyert eredmények kompatibilisek ezzel a nézettel, hiszen mind az adenilil-cikláz-aktivátor forskolin, mind a PMA fokozta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását, anélkül, hogy befolyásolta volna a bazális hőküszöböt. A PKA és a PKC TRPV1-érzékenyítő szerepére bőszeges irodalmi adat áll rendelkezésre, elsősorban TRPV1-gyel transzfektált sejtek és tenyésztett DRG-neuronok vizsgálata alapján (a referenciákat illetően lásd Varga *et al.*, 2006).

5.5. A decentralizált nociceptorok kémiai stimulációjával kiváltott távoli antiallodyniás hatás vizsgálata

5.5.1. Előzmények és célkitűzés

Pintér és Szolcsányi különféle kísérleti elrendezésekben kimutatta, hogy a kapszaicinérzékeny primer afferens neuronok perifériás végződéséből elektromos vagy kémiai ingerlés hatására felszabaduló szomatosztatin bekerül a szisztémás keringésbe, és hormonként hatva a test távoli részeire eljutva gyulladásgátló hatásokat fejt ki, ami ezen idegvégződések „szenzokrin” funkcióját jelenti (Szolcsányi *et al.*, 1998a, 1998b). Mivel a szomatosztatin képes perifériás támadásponttal antinociceptív/analgetikus hatás kifejtésére (Pintér *et al.*, 2006), feltételezhető volt, hogy a szenzokrin hatás részeként a kapszaicinérzékeny nociceptorok izgatásakor távoli antinociceptív hatás is fellép. A fentiek alapján célunk az volt, hogy egy hasonló kísérletes elrendezésben, mint amelyben a távoli, szomatosztatin által közvetített gyulladásgátló hatást korábban sikerült kimutatni, megvizsgáljuk, hogy a „szenzokrin” hatás részeként direkt antiallodyniás hatás fellép-e.

5.5.2. A távoli antiallodyniás hatás vizsgálatának elvi sémája

A perifériás nociceptorok izgatásakor akciós potenciálok sorozata jut be a központi idegrendszerbe (ún. nociceptív input), ami nemcsak a fájdalomérzet kialakulásához vezethet, hanem ellenregulációs, antinociceptív mechanizmusokat is aktiválhat. Ezek közé tartoznak a(z) (i) „diffuse noxious inhibitory controls” (DNIC; Le Bars, 2002); (ii) a középagyból a gerincvelői hátsó szarvba leszálló gátló (antinociceptív) pályák (Ossipov *et al.*, 2010); (iii) szegmentális és más antinociceptív ideghálózatok (Gear *et al.*, 1999; Ferrari *et al.*, 2010). Ezeknek a kikapcsolása érdekében a kémiai ingerelt jobb lábon 18 órával korábban mind a n. saphenust, mind a n. ischiadicust átvágtuk ugyanabban az altatási ciklusban, mint amelyben a plantáris incíziót végeztük az ellenoldalon. A patkányok jobb hátsó lábának idegátmetszéssel decentralizált nociceptorait ingereltük intraplantárisan adott kapszaicinnal vagy perkután alkalmazott mustárolajjal, és az ellenoldali lábon – előzetesen elvégzett – standardizált plantáris bemetszéssel kiváltott nociceptív hőküszöbcsökkenést mértük. A 18 órás várakozást az indokolta, hogy ennyi idő volt szükséges ahhoz, hogy a pentobarbital-narkózis magatartási utóhatásai elmúljanak.

5.5.3. Eredmények és megbeszélés

A fluoreszcenciamérési vizsgálatok azt igazolták, hogy 18 órával az idegátmetszés után mintegy 31%-kal, statisztikailag nem szignifikáns módon csökkent a perkután alkalmazott mustárolajjal kiváltott plazma-extravazáció a patkány hátsó lábán. Ez arra utal, hogy ennyi idő elteltével az axotómia után nem változik érdemben a polimodális nociceptorok neuropeptid-kibocsátó képessége. Ezzel szemben 5 nappal az idegátmetszés után érdemleges plazma-extravazáció nem volt mérhető, ami annak tudható be, hogy ennyi idő alatt már degenerálódnak az idegvégződések.

A 18 órával korábban idegátmetszett hátsó láb talpbőre alá injektált kapszaicin (10–100 µg) nem váltott ki semmiféle nocifenzív reakciót, de szignifikánsan csökkentette az ellenoldali hátsó lábon 18 órával korábban ugyanazon műtéti ülésben elvégzett plantáris incízióval kiváltott hőküszöbcsökkenést. Hasonló ellenoldali antiallodyniás hatást fejtett ki az idegátmetszett láb bőrére kent 5%-os mustárolaj, amelyet a polimodális nociceptorokban a TRPV1-gyel koexpresszálandó TRPA1-ioncsatorna aktivátorának tartanak. A hatás mindkét irritáns esetében már 10–20 perccel az alkalmazás után kimutatható volt, ami valószínűtlenné teszi, hogy egy primer gyulladásgátló hatás másodlagos következményéről lenne szó. Krónikus denerváció (5 nappal az idegátmetszés után), illetve lokális, idegvégződés-szintű deszenzibilizáció (100 µg 3 nappal korábban, idegátmetszés nélkül) után a talpba adott legmagasabb kapszaicindózis (100 µg) hatására nem alakult ki az ellenoldalon termális antiallodyniás hatás. Ez azt bizonyítja, hogy a kapszaicin hatása a talp területén található kapszaicinérzékeny idegelemek izgatása révén jön létre, és nem annak a következménye, hogy a szer felszívódik a talpból, és a keringéssel a test valamely részébe eljutva fejt ki az antiallodyniás hatást. A kisebb hatékony kapszaicindózis (10 µg) nem idegátmetszett állatokban is mérsékelte – kb. 5 percig tartó nocifenzív reakciót követően – az ellenoldali lábon az incízióval kiváltott hőküszöbcsökkenést mind a négy mérési időpontban, igazolva, hogy az axotómia nem *sin equa non-ja* a távoli antiallodyniás hatásnak.

A szisztémásan adott cikloszomatostatin (C-SOM, 20 µg/kg i.p.) – amely a szomatostatinreceptoroknak mind az öt altípusát (sst1–5) gátolja –, jelentősen mérsékelte a 20 perccel később alkalmazott kapszaicinnal vagy mustárolajjal kiváltott távoli termális antiallodyniás hatást. Idegátmetszésen nem, de plantáris incízióval átesett állatokban a kívülről bevitt, szisztémásan adott szomatostatin (100 µg/kg i.p.) gátolta a bemetszett lábon kialakuló hőküszöbcsökkenést; ezt

a hatást is gátolta a C-SOM-előkezelés, igazolva a C-SOM receptorblokkoló képességét a modellünkben. Tizennyolc órával az idegátmetszés és a plantáris incízió után a jobb talpba adott kapszaicin (100 µg) szignifikáns mértékben, mintegy 72%-kal megnövelte a plazma szomatosztatinszerű immunreaktivitását a 10. percben mérve. A fenti eredmények egyértelműen igazolják a szomatosztatin közvetítő szerepét a decentralizált nociceptorok izgatásával kiváltott távoli antiallodyniás hatásban. Az a tény, hogy 5 nappal az idegátmetszés után a kapszaicin i.p.l. injekciója nem váltott ki érdemleges növekedést a plazma szomatosztatinszerű immunreaktivitásában azt mutatja, hogy a többlet-szomatosztatin forrása a plazmában neuronális eredetű, vagyis a kapszaicinnal stimulált láb peptiderg nociceptoraiból származik. Ezt alátámasztja, hogy a szomatosztatint primer afferens neuronok perifériás végződéseiben mind a P-anyaggal kolokalizációban (Kashiba *et al.*, 1996), mind külön alpopulációban (Höckfelt *et al.*, 1976) kimutatták. Mivel nagy valószínűséggel a szomatosztatin nem képes bejutni a központi idegrendszerbe (Meisenberg és Simmons, 1983), modellünkben az antiallodyniás hatásának legvalószínűbb támadáspontját azok a sst-receptorok jelentik, amelyek expresszióját igazolták a perifériás nociceptorokon (Carlton *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2008).

Az ópioidreceptor-antagonista naloxonnal történt előkezelés (3 mg/kg i.p.) csökkentette a 20 perccel később alkalmazott kapszaicinnal kiváltott távoli termális antiallodyniás hatást mind a négy mérési időpontban. Ennek alapján arra következtethetünk, hogy endogén ópioidok is részt vesznek a folyamat közvetítésében. Egy lehetséges scenárió szerint az ópioid peptidek a stimulált nociceptorokból és/vagy leukocitákból szabadulnak fel, majd bejutnak a plazmába, és a keringéssel eljutnak az ellenoldali lábba, ahol a nociceptorokon levő ópioidreceptorok (Stein *et al.*, 2009) izgatásával fejtenek ki antiallodyniás hatást. Tekintettel arra, hogy bizonyos ópioidpeptidek pl. az enkefalinok képesek átlépni a vér-agy gáton (Banks és Kastin, 1990), az ópioidok esetleges centrális hatáskomponense nem zárható ki.

Az idegátmetszés után 18 órával intraplantárisan adott kapszaicin, illetve perkután alkalmazott mustárolaj szignifikánsan csökkentette az ellenoldali lábon a parciális ideglekötéssel (az idegátmetszés előtt 48 órával korábban végzett Seltzer-műtét; Seltzer *et al.*, 1990) kiváltott mechanonociceptív küszöbcsökkenést (mechanikai allodynia) mindkét mérési időpontban. Mindkét stimuláló ágens gátló hatása a mechanikai allodyniára közel teljes volt. Mindez azt jelenti, hogy a decentralizált nociceptorok kémiai izgatásával kiváltott távoli antinociceptív hatás nemcsak a bemetszéssel kiváltott termális allodynia ellen hatékony, hanem a neuropátiás mechanizmusú mechanikai allodynia ellen is.

Eredményeink alapján a peptiderg perifériás nociceptorok Pintér és Szolcsányi által leírt harmadik, „szenzokrin” funkciója nemcsak gyulladásgátló, hanem antinociceptív, közelebbről antiallodyniás hatást is magába foglal. Regulációs szempontból kiemelendő, hogy a perifériás nociceptorok nemcsak a fájdalmas intenzitású ingerek felfogásában (transzdukciójában és transzformációjában) játszanak szerepet, hanem perifériásan indukálódó szisztémás antiallodyniás hatás mediátorá(ái)nak forrását és valószínű támadáspontját is jelentik egyben. Eredményeinknek van egy további lényeges és gyakorlati aspektusa. Az ellenirritáció régóta ismert jelenség, amely során a test egyik részének (fájdalmas) ingerlése analgetikus, illetve antihiperalgetikus hatást eredményez a test más területein. A humán viszonylatban újabb terminológia szerint „conditional pain modulation”-nak vagy „heterotopic noxious conditioning”-nek nevezett jelenség (Sprenger *et al.*, 2011) hátterében döntő mértékben központi idegrendszeri ellenregulációs (antinociceptív) mechanizmusokat tételeznek fel (a részleteket lásd korábban). A jelen eredmények egy új,

perifériásan iniciálódó mechanizmust kínálnak az ellenirritációval kiváltott analgetikus hatások magyarázatára.

5.6. A TRPV1- és a TRPA1-ioncsatornák szerepe egérben a nociceptív hőküszöb meghatározásában és a mustárolajjal kiváltott nociceptív reakciókban

5.6.1. Előzmények és célkitűzések

Latenciaidő-méréseken alapuló módszerekkel TRPV1-génhiányos egerekben vizsgálva alacsony ingerintenzitások (véltetően küszöbközelű ingerek) esetében a talp és a fark hőingerrel kiváltott nocifenzív reakciójában a TRPV1-nek nincs számottevő szerepe (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2011; Hoffmann *et al.*, 2013; Marics *et al.*, 2014). Ez azt sugallja, hogy a nociceptív hőküszöb meghatározásában a TRPV1 nem játszik lényeges szerepet. Korábbi adatokkal ellentétben a hideg ingerrel aktiválható TRPA1-génhiányos egerekben latenciaidő-megnyúlást mértek a plantártesztben és hőküszöb-emelkedést a lábháti bőr C polimodális nociceptoraiban (Hoffmann *et al.*, 2013). A TRPA1 esetleges szerepéről a fark nociceptív hőválaszában nem álltak rendelkezésre irodalmi adatok. A fenti adatok fényében célszerűnek láttuk megvizsgálni a TRPV1 és TRPA1 szerepét a forró ingerrel kiváltott nocicepcióban saját fejlesztésű módszereink alkalmazásával, amelyek a tényleges nociceptív hőküszöböt mérik az egér talpán, illetve farkán. A mustárolaj (allil-izotiocianát, AITC) régóta használt tesztanyag, amely fájdalomkeltő, termális és mechanikai hiperalgéziát kiváltó hatásokkal egyaránt rendelkezik. Az AITC-t korábban mint a TRPA1-csatorna aktivátorát írták le (Jordt *et al.*, 2004; Bandell *et al.*, 2004; Bautista *et al.*, 2006; Kwan *et al.*, 2006), de újabb adatok szerint a TRPV1-et is képes aktiválni, de csak mintegy 100-szor kisebb hatásérősséggel (Ohta *et al.*, 2007; Everaerts *et al.*, 2011; Gees *et al.*, 2013). Célunk annak analízise volt, hogy az AITC-vel kiváltott termális és mechanikai allodynában, illetve nocifenzív reakcióban milyen szerepet játszik a TRPV1 és TRPA1.

5.6.2. Eredmények és megbeszélés

A farkon mért nociceptív hőküszöb a TRPV1-génhiányos állatokban szignifikánsan, legalább 2 °C-kal magasabb volt, mint a nemben és korban megfelelő vad típusúakban. Ez az eredmény meglepő, hiszen korábbi adatok arra utaltak, hogy sem a farkon, sem a talpon a küszöbközelű ingerekkel kiváltott termonociceptív válaszban a TRPV1-nek nincs számottevő szerepe (lásd fent). Adataink tehát először szolgáltatnak bizonyítékot arra, hogy az egérfarok tényleges, azaz hőmérséklet formájában mért nociceptív hőküszöbének meghatározásában a TRPV1 lényeges szerepet játszik. Azon eredményünk, hogy a talpon mért hőküszöb nem volt eltérő a TRPV1-génhiányos állatokban a vad típusúakhoz képest, összhangban áll saját korábbi hőküszöbmérési vizsgálatainkkal (lásd 4.3.3. pont) és a latenciaméréseken alapuló termonociceptív tesztek (forró lap, plantárteszt) eredményeivel. Egyben arra utal, hogy a talpon más hőérzékeny csatornák felelősek a nociceptív hőküszöb meghatározásáért. Az elvárásnak megfelelően a hideg ingerekkel aktiválható TRPA1 génjét nélkülöző egerekben sem a farkon, sem a talpon mért hőküszöb nem mutatott eltérést a vad típusú kontrollokhoz képest.

A farokra lokalizált, nociceptív hideg (0 °C-os) ingerre adott farokkirántási reakció latenciaideje nem volt eltérő a vad típusú kontrollhoz képest a TRPV1-génhiányos állatokban, de jelentősen megnyúlt a TRPA1-génhiányos egerekben. Ez utóbbi eredmény az első adat a TRPA1

hidegnocicepcióban betöltött szerepéről a farok vonatkozásában, és azt támasztja alá, hogy a TRPA1-csatorna e testtájékon lényeges szerepet játszik a fájdalmas hideg ingerek detektálásában.

Az AITC-okozta termális allodynia vizsgálata során a szert topikálisan alkalmaztuk, és a nociceptív hőküszöböt mind a farkon (emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel), mind a talpon (emelkedő hőmérsékletű forró lappal) ismételten mértük 10 perces időközökkel. Az 1% AITC (30% DMSO-ban oldva, lásd 4.7.3. pont) a nociceptív hőküszöb csökkenését váltotta ki mindkét testtájékon. A TRPV1-génhiányos egerekben az AITC hőküszöbcsökkentő hatása mind a farkon, mind a talpon szignifikánsan kisebb volt a vad típusú kontrollokban mérthez képest. Ezzel ellentétben a TRPA1 génhiányos egerekben az AITC hatására fellépő küszöbcsökkenés nem tért el szignifikánsan a vad típusú kontrollokhoz képest sem a farkon, sem a talpon. A fenti eredmények alapján levonható az a következtetés, miszerint az AITC-vel kiváltott hőküszöbcsökkenésben – amit termális allodyniaként lehet értelmezni – a TRPV1, ellentétben a TRPA1-gyel, lényeges szerepet játszik mind a farkon, mind a talpon. Ez összhangban van azzal, hogy számos termális hiperalgéria/allodynia-modellben (pl. carragenin, komplett Freund-adjuváns, enyhe hőtrauma, plantáris incízió) a TRPV1 jelentős, közel 100%-os mediátor szerepét igazolták (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2003; Pomonis *et al.*, 2003; Gavva *et al.*, 2005; Honore *et al.*, 2005; Bölcskei *et al.*, 2005; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2005). A TRPA1 szerepének hiánya az AITC-vel kiváltott hőküszöbcsökkenésben meglepő, hiszen heterológ expressziós rendszerben az AITC 100-szor kisebb koncentrációban váltott ki ionáramot TRPA1-csatornán keresztül, mint a TRPV1-en át, jelezve, hogy az AITC TRPA1 iránti affinitása jóval nagyobb (Everaerts *et al.*, 2011).

A vad típusú állatokban az AITC jelentősen, mintegy 40–55%-kal lecsökkentette a talpon a mechanonociceptív küszöböt a teljes vizsgálati periódusban (180 perc), azaz mechanikai allodyniát okozott. A mechanonociceptív küszöb csökkenése a TRPV1-génhiányos állatokban minden vizsgált időpontban szignifikánsan kisebb volt a vad típusú kontrollhoz képest, ellenben a TRPA1-KO egerek nem mutattak eltérést saját vad típusú kontrolljaikhoz képest. A TRPV1 jelentős szerepe az AITC által kiváltott mechanikai allodyniában nem várt eredmény. Egyrészt ugyanez a válasz a von Frey-féle módszerrel mérve változatlan maradt TRPV1-génhiányos egerekben (Caterina *et al.*, 2000). Másrészt heterológ expressziós rendszerben az AITC a TRPA1 iránti nagyobb affinitást mutatott, mint a TRPV1 iránt (Everaerts *et al.*, 2011). Ennek fényében meglepő, hogy a TRPA1 egyáltalán nem játszik szerepet a küszöbközelítő koncentrációban alkalmazott AITC mechanikai allodyniát okozó hatásában.

A vad típusú egerekben a topikálisan alkalmazott AITC szignifikánsan lerövidítette a farokkirántás latenciáidejét a vehikulumhoz viszonyítva, ami pronociceptív hatásként értelmezhető. A latenciáidő mind a TRPV1-, mind a TRPA1-génhiányos állatokban statisztikailag szignifikáns mértékben hosszabb volt a megfelelő vad típusú állatokhoz képest. Mindezek alapján elmondható, hogy mind a TRPV1, mind a TRPA1 szerepet játszik az AITC-vel kiváltott nocifenzív reakció latenciáidejének a megszabásában.

5.7. A TRPV1-receptor-agonistákkal kiváltott deszenzibilizáció vizsgálata a nociceptív hő- és hideg küszöb mérésével in vivo

5.7.1. Előzmények és célkitűzések

A TRPV1-receptor bizonyos agonistái (pl. kapszaicin, RTX) szenzoros izgató hatásuk lezajlása után koncentráció- és időfüggő módon kétféle szenzoros deszenzibilizációt képesek kiváltani: alacsonyabb koncentrációknál és rövidebb behatási időknél a TRPV1-receptorra

korlátozódó deszenzibilizáció alakul ki, amelynél a nociceptív idegvégződés csak azon ingerekkel szemben mutat csökkent válaszkészséget, amelyek a TRPV1-en hatnak; magasabb koncentrációk és hosszabb behatási idők esetében az egész idegvégződésre kiterjedő deszenzibilizáció jön létre, amelynél hő, mechanikai és kémiai ingerekkel szemben egyaránt csökken a reaktivitás. Fontos, hogy bár a forró ($>43^{\circ}\text{C}$) ingerek képesek aktiválni a TRPV1-et, a bazális nociceptív hőküszöb meghatározásában patkány vagy egér talpán a TRPV1-nek nincs szerepe (lásd 4.6.3. és 5.6.2. pont). Ebből következően a TRPV1-re korlátozódó deszenzibilizációnál nem változik meg a nociceptív hőküszöb, viszont az egész idegvégződésre kiterjedő deszenzibilizáció hőküszöbemelkedéssel jár. Vizsgálataink célja az volt, hogy a klasszikus (kapszaicin, RTX) és újabban azonosított (OLDA) TRPV1-receptor-agonisták deszenzibilizáló hatásait *in vivo* összehasonlítsuk a nociceptív hőküszöb mérésével. Tekintettel arra, hogy nem álltak rendelkezésre adatok a TRPV1-receptor-agonistáknak a fájdalmas hidegingerek detektálására kifejtett hatásaira vonatkozóan, az említett ágensek nociceptív hideg küszöbre kifejtett hosszú távú hatásait is vizsgálni kívántuk.

5.7.2. Eredmények és megbeszélés

Kétoldali intraplantáris adást követően mind a kapszaicin, mind az RTX megemelte a nociceptív hőküszöböt az 1–14, illetve 1–9 napos intervallumban. A két szer minimális effektív dózisa 10, illetve 0,05 nmól volt, jelezve, hogy az RTX mintegy 200-szor potensebb deszenzibilizáló ágens, ami egybevág korábbi adatokkal (Szállási és Blumberg, 1999). A kapszaicin és az RTX által kiváltott maximális küszöbemelkedés $2,3 \pm 0,5$, illetve $2,8 \pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$ volt, mutatva, hogy a két agonista hatékonysága hasonló. Mindkét szer hatása tartós és dózisfüggő volt. Amint arra a fentiekben utalás történt, az emelkedő forró lappal mért nociceptív hőküszöb megemelkedése a talp nociceptív idegvégződéseinek egészére kiterjedő deszenzibilizáció jeleként értékelendő, hiszen sem a TRPV1 farmakológiai blokkolása (patkányban, 4.3.3. és 4.6.3. pont), sem genetikai delécioja (egérben, 4.3.3. és 5.6.2. pont) nem emelte meg a hátsó végtag talpi részén mért nociceptív hőküszöböt. Az 1,25 μmol OLDA intraplantáris injekciója 1 héten át naponta vizsgálva nem emelte meg a nociceptív hőküszöböt. Az OLDA hatástalanságának legvalószínűbb oka parciális agonista jellege (lásd 5.3.2. pont), ami miatt nem tud olyan mértékű Ca^{2+} -beáramlást okozni, mint ami az idegvégződés deszenzibilizációjához szükséges.

A kezeletlen patkányok hátsó végtagjának talpán a csökkenő hőmérsékletű hideg lappal mért nociceptív hideg küszöb $1,3 \pm 0,2$ $^{\circ}\text{C}$ -nak adódott; ez az érték 5 napon át végzett, naponta ismételt mérések során jól reprodukálható volt. Ez az érték jóval alacsonyabb, mint az emberben mért 15 $^{\circ}\text{C}$ körüli küszöbhőmérséklet (Davis és Pope, 2002). A hideg lapon ugyanolyan magatartási nocifenzív reakciókat figyeltünk meg, mint a forró lap esetében (típusosan a hátsó végtag nyalása vagy megemelése). Az ugyanazon állatokban párhuzamosan mért forró és hideg küszöb összehasonlításával kiderült, hogy mind a kapszaicin, mind az RTX esetében csak a magasabb dózisok csökkentették le a hideg küszöböt – a hőküszöb megemelése mellett –, mint amelyek az előző sorozatban a hőküszöb megemeléséhez minimálisan szükségesek voltak. A szerek hideg küszöböt csökkentő hatása 2–4 nap után visszatért a kontroll értékre; ekkor a forró küszöb még magasan a kiindulási érték fölött volt. Ez arra utal, hogy a fájdalmas hideg és forró ingereket detektáló nociceptorok különböző populációkba tartoznak. Eredményeink és az irodalmi adatok alapján feltételezhető az is, hogy a nociceptív hideg küszöb kapszaicinnal, illetve RTX-szel kiváltott tartós csökkenése azáltal jön létre, hogy olyan hidegérzékeny nociceptív idegvégzódések károsodása jön létre, amelyek a hideggel aktiválható ioncsatornák (TRPM8, TRPA1) mellett a TRPV1-et is expresszálják. Ezt a lehetőséget alátámasztja a TRPA1 és TRPV1 jelentős

koexpressziója DRG-neuronokban (Story *et al.*, 2003). Az idegvégződés-szintű deszenzibilizáció klinikai jelentőségét látványosan igazolja az a 8% kapszaicint tartalmazó dermális tapasz, amely 30 vagy 60 perces kontaktusidő után az epidermális és dermális polimodális nociceptív terminálisokat deszenzibilizálva fejt ki 3 hónapig tartó analgetikus hatást neuropátiás fájdalom különböző formáiban.

Az intraplantárisan adott RTX (0,016 nmól) nocifenzív reakciót váltott ki, amely 5 percen belül megszűnt. Ekkor jelentős hőküszöbcsökkenés (termális allodynia) volt, amely 30 percen belül lezajlott. Az RTX-kezelés után 3 órával a nociceptív hőküszöb a kontroll tartományban volt. Az ekkor megismételt RTX-injekció (0,016 nmól) az előzőleg kezelt talpba adva szignifikánsan rövidebb nocifenzív reakciót, illetve kisebb mértékű hőküszöbcsökkenést okozott, mint az RTX szolvensével végzett 3 órás előkezelést követően. Ezzel szemben ugyanilyen RTX-előkezelés (0,016 nmól, 3 óra) nem csökkentette a TRPA1-agonista formalin (McNamara *et al.*, 2007) 1%-os intraplantáris injekciójával kiváltott nocifenzív reakció időtartamát. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy van olyan RTX-dózis, amelyik 3 órás előkezelés után szelektíven csak a TRPV1 válaszkészségét csökkentette le, anélkül, hogy a polimodális nociceptív idegvégződés más aktivátorainak (forró inger, formalin) hatását mérsékelné, tehát TRPV1-receptor-deszenzibilizációt váltott ki. Hasonló eredményeket nyertünk az OLDA-val. 250 nmól OLDA-val végzett 3 órás előkezelés után a hőküszöb a kontroll tartományban volt, és az ekkor az ugyanazon lábba adott 5 nmól OLDA mindkét hatása (nocifenzív reakció és hőküszöbcsökkenés) jelentősen lecsökkent a szolvenssel végzett 3 órás előkezeléshez képest. A nagy dózisú OLDA-val végzett 3 órás előkezelés az RTX pronociceptív hatásait is gátolta, jelezve az OLDA és az RTX közötti kereszt-deszenzibilizáció kialakulását. Figyelembe véve, hogy a TRPV1 deszenzibilizációja hasonló hatást eredményez, mint annak antagonizálása, az RTX és OLDA TRPV1-receptorra korlátozódó deszenzibilizáló hatásának is van potenciális klinikai jelentősége.

5.8. A nociceptív hőküszöb és a latenciaidő összehasonlító vizsgálata a carrageninnel kiváltott termális szenzibilizációban (nem közölt eredmények)

5.8.1. Előzmények és célkitűzés

Kísérleteink során számos akut (RTX, α - β -metilén-ATP, OLDA, 3-MOLDA, AITC, hőtrauma) és egy szubakut/krónikus modellben (plantáris bemetszés) tudtuk kimutatni a nociceptív hőküszöb csökkenését, azaz a termális allodynát. Ismert, hogy a TRPV1-receptor és a P2X3-receptor aktivációja, az AITC, a hőtruma, az incízió esetében a latenciaidő-mérésen alapuló módszerekkel a latenciaidő rövidülése, azaz termális hiperalgéria is kimutatható (Gilchrist *et al.*, 1996; Yeomans *et al.*, 1996; Hamilton *et al.*, 1999; Coderre és Melzack, 1987; Cleland *et al.*, 1994; Nozaki-Taguchi és Yaksh, 1998; Field *et al.*, 1997; Zahn és Brennan, 1999). Mindez azt sugallja, hogy a nociceptív hőküszöb csökkenése és a küszöbfeletti hőingerre adott válasz nagyságának növekedése (lásd **1. ábra**) egymáshoz kapcsolt jelenségek, azaz a hőküszöb és a küszöbfeletti hőingerre adott válasz párhuzamosan változik. Ennek a hipotézisnek a teszteléséhez egy szubakut modellben, a carrageninnel kiváltott termális szenzibilizációban párhuzamosan vizsgáltuk a nociceptív hőküszöböt és a küszöbfeletti hőingerre adott válasz latenciadejét. Ismert, hogy a carragenin a plantárteszttel vizsgálva latenciarövidülést okoz (Hargraves *et al.*, 1988).

5.8.2. Módszerek

Kísérleteinkben az IITC Life Sciences Inc. által gyártott „incremental hot/cold plate analgesia meter”-t használtuk, amely emelkedő hőmérsékletű üzemmódban a forró küszöb, állandó hőmérsékletű üzemmódban a latenciaidő mérésére alkalmas. Segítségével ugyanazon állatcsoportban párhuzamosan tudtuk mérni a hőküszöböt és a latenciaidőt. Először meghatároztuk a patkányok egyik hátsó végtagján mind a kiindulási nociceptív hőküszöböt (30 °C kiindulási hőmérséklet és 6 °C/perc fűtési sebesség mellett), mind ugyanazon hátsó láb nyalásáig eltelt időt (50 °C-os laphőmérséklet mellett). Ezután carragenint (3%, fiziológiás sóoldatban diszpergálva, 100 µl térfogatban) adtuk intraplantárisan a vizsgált lábba. Mind a nociceptív hőküszöböt, mind a latenciaidőt óránként mértük.

5.8.3. Eredmények és megbeszélés

A carragenin 1 óra elteltével gyulladásos reakciót váltott ki a kezelt lábon bőrpír, ödéma formájában, amely 3–4 órán át fennmaradt. Meglepő módon a nociceptív hőküszöb nem változott érdemben a kezelés utáni 1–3 órás intervallumban, ellenben a latenciaidő szignifikáns módon lerövidült mindhárom mérési időpontban. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a termális szenzibilizáció két paramétere, az aktivációs küszöb és a küszöbfeletti hőingerre adott válasz latenciaideje nem feltétlenül kapcsolatos, ami eltérő patofiziológiai szabályozásukra utal: a küszöböt a hővel aktiválható ioncsatornák determinálják, míg a hőválasz nagyságát (ami a latenciaidőben kódolódik) a feszültségfüggő Na^+ -csatornák aktivitása. Eredményeink azt mutatják, hogy a kiváltó ágens szabja meg, hogy a termális szenzibilizáció okoz-e hőküszöbcsökkenést vagy sem.

6. A FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS FELISMERÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A termonocicepciót vizsgáló *in vitro* kísérletekben izolált patkánybőr C polimodális nociceptorairól történő egyrost-elvezetéssel kimutattam, hogy a tartós bradikininexpozíció szenzibilizáló hatása a rostok hőválaszára COX-függő folyamat, amelynek közvetítésében a PGE₂/PGI₂ szerepet játszik. Megfogalmaztunk egy hipotézist, mely szerint a bradikinin direkt akcióspotenciál-generáló hatással nem bír, az annak tartott hatás extrém fokú hőküszöbcsökkenés következménye, amely miatt a normál környezeti hőmérséklet folyamatos hőingerként hat. Feltételezhető, hogy más kémiai ágensek – mint ATP, szerotonin, prosztaglandinok –, amelyek hasonló mértékű hőküszöbcsökkenést tudnak kiváltani – legalábbis részben – így fejtik ki nociceptor-aktiváló hatásukat. A magas koncentrációban alkalmazott PGE₂/PGI₂ fokozta a polimodális nociceptorokban a hőingerléssel kiváltott akciós potenciálok számát anélkül, hogy azok hőküszöbét megváltoztatta volna, jelezve, hogy az aktivációs hőküszöb és a küszöbfeletti ingerre adott válasz szenzibilizálhatósága eltérő. Izolált patkánybőrben a PGE₂/PGI₂ magas koncentrációban sem befolyásolta a forró ingerléssel kiváltott CGRP-felszabadulást, ellenben az alacsony pH-val (protonokkal) kiváltott válaszra facilitáló hatást fejtett ki. Ez arra utal, hogy a peptiderg polimodális nociceptorok afferens (akciós potenciált generáló) és lokális efferens (neuropeptid-felszabadító) funkciójának szenzibilizálhatósága eltérő, ami a két folyamat eltérő ionális hátterével függhet össze. A forró ingerekkel kiváltott CGRP-felszabadulást nem gátolta a TRPV1-antagonista ruténiumvörös, illetve capsazepin, megerősítve, hogy a patkány lábán a TRPV1 szerepe a forró ingerek transzdukciójában a nociceptív primer afferens neuronok perifériás végződéseiben – szemben a sejttesttel – marginális.

A magatartási nociceptív hőküszöb az általunk kifejlesztett mindkét készülékkel (emelkedő hőmérsékletű forró lap és emelkedő hőmérsékletű vízfürdő) mérve kiválóan reprodukálható ismételt mérések során, alkalmassá téve a módszert kis küszöbváltozások kimutatására. Az emelkedő hőmérsékletű forró lap alkalmas nemcsak ópioid analgetikum (morfin), hanem COX-gátló fájdalomcsillapítók (diclofenac és paracetamol) hőküszöbemelő (termális antinociceptív) hatásának nagy érzékenységgel történő kimutatására. Az új műszerekre három, hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodyniamodellt dolgoztunk ki és validáltunk. A talpba adott RTX fél órán belül lezajló akut hőküszöbcsökkenést vált ki, míg az enyhe hőtrauma kb. 1 órán át fennálló szintén akut, a talpi bemetszés pedig legalább 1 hétig elhúzódó szubakut/krónikus küszöbcsökkenést okoz. A három paradigma közös előnye, hogy a morfin, diclofenac és paracetamol hőküszöbcsökkenést gátló (antiallodynias) dózisa alacsonyabbak, mint a nem érzékenyített hőküszöb emeléséhez szükséges adagok, jelezve a modellek farmakológiai érzékenységét nemcsak szisztémás, hanem lokális adásmód esetén is. Az enyhe hőtraumával, illetve a plantáris incízióval kiváltott hőküszöbcsökkenés közvetlen klinikai relevanciával bíró termális allodyniamodellek. Mindhárom modell, különösen az RTX-szel kiváltott allodynia alkalmas a perifériás nociceptorokon ható TRPV1-receptor-antagonisták hatásának vizsgálatára, nagyságrenddel nagyobb érzékenységet mutatva, mint a latenciaidő-mérési forró lap módszer. A hőküszöbmérési paradigmát sikerült adaptálni egérre a farok hőküszöbének emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel történő mérésével. Ezen módszer állattartó hengerekkel kiegészített formájában különösen alkalmas a nociceptív hőküszöb meghatározására, kiküszöbölve az állat kézbentartásából eredő stresszt és annak variabilitását. Egerek vizsgálata során analgetikumok közötti, illetve analgetikum és pszichoaktív szer közötti antinociceptív interakciók kimutatása is megtörtént.

A hőküszöbmérés segítségével sikerült analizálni az enyhe hőtraumával kiváltott akut, illetve a plantáris bemetszéssel keltett szubakut/krónikus termális allodynia perifériás mediátorhátterét arra a következtetésre jutva, hogy csak viszonylag kis különbségek állnak fenn. A potenciális TRPV1-ligandum zsírsavamidok vizsgálata során az intracelluláris Ca^{2+} -szint, valamint intraplantáris adás után a nocifenzív reakció és a nociceptív hőküszöb mérésével kimutattuk, hogy az OLDA és a 3-MOLDA TRPV1-receptor-agonista hatással bír. Ezzel szemben a 4-MOLDA és az OEA TRPV1-antagonistaként viselkedett a fenti paradigmákban, míg az anandamid kizárólag CB_1 -receptor-agonistaként viselkedett. Ismereteim szerint elsőként hasonlítottuk össze a PKA és PKC szerepét a TRPV1-receptor válaszkészségének meghatározásában, ugyanabban az *in vitro* (patkány trigeminális neuronok kapszaicinnel, illetve RTX-szel kiváltott Ca^{2+} -akkumulációja) és *in vivo* (RTX-okozta nociceptív hőküszöbcsökkenés patkányban) modellben. Az *in vitro* és az *in vivo* modellben nyert konkordáns adatok alapján alaphelyzetben a TRPV1-receptor agonisták iránti érzékenységeinek beállításában a PKA jelentős szereppel bír, a PKC viszont nem. Ugyanakkor mind a PKA, mind a PKC stimulációja képes fokozni a TRPV1 válaszkészségét mind a trigeminális érző neuronok sejttestében, mind a talpbőr perifériás nociceptoraiban.

Direkt bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a perifériás nociceptorok izgatása távoli antiallodynias hatást (termális és mechanikai) fejt ki, amelynek indukciója központi idegrendszeri ellenregulációs, antinociceptív folyamatoktól (mint pl. descendáló gátlás, DNIC) független. Ezen hatás közvetítésében igazoltuk nemcsak a szomatosztatin, hanem az endogén ópioidok szerepét is. A szomatosztatin az ingerelt nociceptorokból szabadul fel és valószínűleg a perifériás nociceptív idegvégződéseken fejt ki antiallodynias hatását. Eredményeink szerint a nociceptorok izgatásával kiváltott „szenzokrin” hatás – mint a peptiderg nociceptorok harmadik funkciója – nemcsak a korábban leírt gyulladásgátló mechanizmust foglalja magába, hanem direkt antiallodynias komponenst is involvál.

Génhiányos egerek hőküszöbmérési vizsgálatával elsőként sikerült kimutatni, hogy az egér farkán a nociceptív hőküszöb meghatározásában a TRPV1 szerepet játszik, ellenben a talpon a struktúra funkciója nem mutatható ki. A TRPA1-csatorna sem a farkon, sem a talpon nem járul hozzá a nociceptív hőküszöb meghatározásához. Az AITC-vel kiváltott hőküszöbcsökkenés (hőallodynia) mind a farkon, mind a talpon TRPV1-függő, ellenben a TRPA1 egyik testtájékon sem involvál. Hasonló a helyzet az AITC-vel a talpon kiváltott mechanikai allodynia esetében is.

Az emelkedő hőmérsékletű forró lap alkalmas a talpba adott kapszaicin és az RTX lassan kialakuló, napokig/hetekig tartó, szenzoros deszenzibilizáló (idegvégződés-károsító) hatásának a kimutatására, amely a nociceptív hőküszöb emelkedésében nyilvánul meg. Az OLDA ilyen hatást nem tud kiváltani, vélhetően parciális agonista jellege miatt. Az RTX és az OLDA alacsonyabb dózisa a TRPV1-receptorra korlátozódó deszenzibilizációt váltanak ki. Mindkét fajta deszenzibilizáció (idegvégződés- *versus* TRPV1-szintű) relevanciával bír új, perifériás támadáspontú analgetikumok fejlesztése szempontjából.

A carrageninnel kiváltott termális szenzibilizáció vizsgálata során kimutattuk, hogy a nociceptív hőküszöb csökkenése és a küszöbfeletti hőingerre adott nocifenzív válaszreakció latenciaidejének megrövidülése nem feltétlenül együttjáró jelenségek, ami a hőválasz két paraméterének eltérő patofiziológiai szabályozására utal.

7. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AITC: allil-izotiocianát
A-MH: mechano–heat-sensitive A nociceptor
ANOVA: analysis of variance
CGRP: calcitonin gene-related peptide
C-MH: mechano–heat-sensitive C nociceptor
COX: ciklooxygenáz
C-SOM: cikloszomatosztatin
dbcAMP: dibutiril-cAMP
DMSO: dimetil-szulfoxid
DNIC: diffuse noxious inhibitory controls
DRG: dorsal root ganglion
ECS: extracellular solution
I-RTX: jódresiniferatoxin
KO: knock-out
L-NOARG: N(G)-nitro-l-arginin
MOLDA: metil-*N*-oleoildopamin
meATP: α - β -metilén-ATP
NDGA: nordihydroguaiaretic acid
NGF: nerve growth factor
NK: neurokinin
NSAID: nem-szteroid gyulladásgátló analgetikum
OEA: *N*-oleoiletanolamid
OLDA: *N*-oleoildopamin
PKA: protein-kináz A
PKC: protein-kináz C
PMA: forbol-12-mirisztát-13-acetát
PPADS: piridoxál-foszfát-6-azofenil-2',4'-diszulfonát
ROI: region of interest
RTX: resiniferatoxin
SIF: synthetic interstitial fluid
SOM: szomatosztatin
SP: P-anyag
TNP-ATP: trinitrofenil-ATP
TRP: tranziens receptor potenciál

8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

(az értekezésben való megjelenés sorrendjében)

3. fejezet

1. **Pethő, G.**, Derow, A., Reeh, P.W.: Bradykinin-induced nociceptor sensitization to heat is mediated by cyclooxygenase products in isolated rat skin.
European Journal of Neuroscience, 14:210-218, 2001.
2. Reeh, P.W., **Pethő, G.**: Nociceptor excitation by thermal sensitization – a hypothesis.
Progress in Brain Research, 129:39-50, 2000.
3. Derow, A., Izydorczyk, I., Kuhn, A., Reeh, P.W., **Pethő, G.**: Prostaglandin E₂ and I₂ facilitate noxious heat-induced spike discharge but not iCGRP release from rat cutaneous nociceptors.
Life Sciences, 81:1685-1690, 2007.
4. **Pethő, G.**, Izydorczyk, I., Reeh, P.W.: Effects of TRPV1 receptor antagonists on stimulated iCGRP release from isolated skin of rats and TRPV1 mutant mice.
Pain, 109:284-290, 2004.

4. fejezet

1. Almási, R., **Pethő, G.**, Bölcskei, K., Szolcsányi, J.: Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a heat allodynia model sensitive to analgesics.
British Journal of Pharmacology, 139:49-58, 2003.
2. Bölcskei, K., Horváth, D., Szolcsányi, J., **Pethő, G.**: Heat injury-induced drop of the noxious heat threshold measured with an increasing-temperature water bath: a novel rat thermal hyperalgesia model.
European Journal of Pharmacology, 564:80-87, 2007.
3. Füredi, R., Bölcskei, K., Szolcsányi, J., **Pethő, G.**: Effects of analgesics on the plantar incision-induced drop of the noxious heat threshold measured with an increasing-temperature water bath in the rat.
European Journal of Pharmacology, 605: 63-67, 2009.
4. Tékus, V., Bölcskei, K., Kis-Varga, A., Dézsi, L., Szentirmay, E., Visegrády, A., Horváth, C., Szolcsányi, J., **Pethő, G.**: Effect of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor antagonist compounds SB705498, BCTC and AMG9810 in rat models of thermal hyperalgesia measured with an increasing-temperature water bath.
European Journal of Pharmacology, 641:135-141, 2010.
5. Boros, M., Benkő, R., Bölcskei, K., Szolcsányi, J., Barthó, L., **Pethő, G.**: Effects of reference analgesics and psychoactive drugs on the noxious heat threshold of mice measured by an increasing-temperature water bath.
Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, 113:385–390, 2013.

5. fejezet

1. Füredi, R., Bölcskei, K., Szolcsányi, J., **Pethő, G.**: Comparison of the peripheral mediator background of heat injury- and plantar incision-induced drop of the noxious heat threshold in the rat.
Life Sciences, 86:244-250, 2010.
2. Szolcsányi, J., Sándor, Z., **Pethő, G.**, Varga, A., Bölcskei, K., Almási, R., Riedl, Zs., Hajós, G., Czéh, G.: Direct evidence for activation and desensitization of the capsaicin receptor by N-oleoyldopamine on TRPV1-transfected cell line, in gene deleted mice and in the rat.
Neuroscience Letters, 361:155-158, 2004.
3. Almási, R., Szőke, É., Bölcskei, K., Varga, A., Riedl, Zs. Sándor, Z., Szolcsányi, J., **Pethő, G.**: Actions of 3-methyl-N-oleoyldopamine, 4-methyl-N-oleoyldopamine and N-oleoylethanolamide on the rat TRPV1 receptor in vitro and in vivo.
Life Sciences, 82:644-651, 2008.
4. Varga, A., Bölcskei, 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, 140:645-657, 2006.
5. **Pethő, G.**, Bölcskei, K., Füredi, R., Botz, B., Bagoly, T., Pintér, E., Szolcsányi, J.: Evidence for a novel, neurohumoral antinociceptive mechanism mediated by peripheral capsaicin-sensitive nociceptors in conscious rats.
Neuropeptides, 62:1-10, 2017.
6. Tékus, V., Horváth, Á., Hajna, Z., Borbély, É., Bölcskei, K., Boros, M., Pintér, E., Helyes, Z., **Pethő, G.**, Szolcsányi, J.: Noxious heat threshold temperature and pronociceptive effects of allyl isothiocyanate (mustard oil) in TRPV1 or TRPA1 gene-deleted mice.
Life Sciences, 154:66-74, 2016.
7. Bölcskei, K., Tékus, V., Dézsi, L., Szolcsányi, J., **Pethő, G.**: Antinociceptive desensitizing actions of TRPV1 receptor agonists capsaicin, resiniferatoxin and N-oleoyldopamine as measured by determination of the noxious heat and cold thresholds in the rat.
European Journal of Pain, 14:480-486, 2010.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Ahern GP. Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J Biol Chem* 278:30429–30434, 2003.
- Amadesi S, Nie J, Vergnolle N, Cottrell GS, Grady EF, Trevisani M, Manni C, Geppetti P, McRoberts JA, Ennes H, Davis JB, Mayer EA, Bunnett NW. Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J Neurosci* 24:4300–4312, 2004.
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41:849–857, 2004.
- Banik RK, Brennan TJ. Spontaneous discharge and increased heat sensitivity of rat C-fiber nociceptors are present in vitro after plantar incision. *Pain* 112:204–213, 2004.
- Banik RK, Brennan TJ. TRPV1 mediates spontaneous firing and heat sensitization of cutaneous primary afferents after plantar incision. *Pain* 141:41–51, 2009.
- Banks WA, Kastin AJ. Peptide transport systems for opiates across the bloodbrain barrier. *Am J Physiol* 259:E1–E10, 1990.
- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124:1269–1282, 2006.
- Ben-Bassat J, Peretz E, Sulman FG. Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by the receptacle method. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 122:434–447, 1959.
- Berge OG, Garcia-Cabrera I, Hole K. Response latencies in the tail-flick test depend on tail skin temperature. *Neurosci Lett* 86:284–288, 1988.
- Bonnington JK, McNaughton PA. Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. *J Physiol* 551:433–446, 2003.
- Bölskei K, Helyes Z, 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* 117:368–376, 2005.
- Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* 64:493–501, 1996.
- Brock JA, McLachlan EM, Belmonte C. Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *J Physiol* 512:211–217, 1998.
- Brune K, Beck WS, Geisslinger G, Menzel-Soglowek S, Peskar BM, Peskar BA. Aspirin-like drugs may block pain independently of prostaglandin synthesis inhibition. *Experientia* 47:257–261, 1991.
- Carlton SM, Du J, Davidson E, Zhou S, Coggeshall RE. Somatostatin receptors on peripheral primary afferent terminals: inhibition of sensitized nociceptors. *Pain* 90:233–244, 2001.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824, 1997.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitze KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306–313, 2000.
- Cholewinski A, Burgess GM, Bevan S. The role of calcium in capsaicin-induced desensitization in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 55:1015–1023, 1993.
- Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V, Walker JM. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem* 278:13633–13639, 2003.
- Cleland CL, Lim FY, Gebhart GF. Pentobarbital prevents the development of C fiber-induced hyperalgesia in the rat. *Pain* 57:31–43, 1994.
- Coderre TJ, Melzack R. Cutaneous hyperalgesia: contributions of the peripheral and central nervous systems to the increase in pain sensitivity after injury. *Brain Research* 404:95–106, 1987.
- Cui M, Nicol GD. Cyclic AMP mediates the prostaglandin E2-induced potentiation of bradykinin excitation in rat sensory neurons. *Neuroscience* 66:459–466, 1995.
- D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72:74–79, 1941.
- 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. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183–187, 2000.
- Davis KD, Pope GE. Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses. *Pain* 98:179–185, 2002.
- Docherty RJ, Yeats JC, Bevan S, Boddeke HW. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflüger's Archives* 431:828–837, 1996.
- El Bitar N, Pollin B, Karroum E, Pinedé I, Mouraux A, Le Bars D. Thermoregulatory vasomotor tone of the rat tail and paws in thermoneutral conditions and its impact on a behavioral model of acute pain. *J Neurophysiol* 112:2185–2198, 2014.
- Everaerts W, Gees M, Alpizar YA, Farre R, Leten C, Apetrei A, Dewachter I, van Leuven F, Vennekens R, De Ridder D, Nilius B, Voets T, Talavera K. The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil. *Curr Biol* 21:316–321, 2011.

- Farré AJ, Colombo M, Gutiérrez B. Maximum tolerated temperature in the rat tail: a broadly sensitive test of analgesic activity. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 11:303–307, 1989.
- Ferrari LF, Gear RW, Levine JD. Attenuation of activity in an endogenous analgesia circuit by ongoing pain in the rat. *J Neurosci* 30:13699–13706, 2010.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Correa FM. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur J Pharmacol* 53:39–48, 1978.
- Field MJ, Holloman EF, McCleary S, Hughes J, Singh L. Evaluation of gabapentin and S-(+)-3-isobutylgaba in a rat model of postoperative pain. *J Pharmacol Exp Ther* 282:1242–1246, 1997.
- Forster C, Handwerker HO. Automatic classification and analysis of microneurographic spike data using a PC/AT. *J Neurosci Meth* 31:109–118, 1990.
- Gavva NR, Tamir R, Qu Y, Klionsky L, Zhang TJ, Immke D, Wang J, Zhu D, Vanderah TW, Porreca F, Doherty EM, Norman MH, Wild KD, Bannon AW, Louis JC, Treanor JJ. AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2, 3-dihydrobenzo[b][1, 4]-dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 313:474–484, 2005.
- Gear RW, Aley KO, Levine JD. Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. *J Neurosci* 19:7175–7181, 1999.
- Gees M, Alpizar YA, Boonen B, Sanchez A, Everaerts W, Segal A, Xue F, Janssens A, Owsianik G, Nilius B, Voets T, Talavera K. Mechanisms of transient receptor potential vanilloid 1 activation and sensitization by allyl isothiocyanate. *Mol Pharmacol* 84:325–334, 2013.
- Gilchrist HD, Allard BL, Simone DA. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. *Pain* 67:179–188, 1996.
- Gover TD, Kao JPY, Weinreich D. Calcium signaling in single peripheral sensory nerve terminals. *J Neurosci* 23:4793–4797, 2003.
- Guo Y, Yao FR, Cao DY, Pickar JG, Zhang Q, Wang HS, Zhao Y. Somatostatin inhibits activation of dorsal cutaneous primary afferents induced by antidromic stimulation of primary afferents from an adjacent thoracic segment in the rat. *Brain Res* 1229:61–71, 2008.
- Hall JM. Bradykinin receptors. *Gen. Pharmacol* 28:1–6, 1997.
- Hamilton SG, Wade A, McMahon SB. The effects of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behaviour induced by ATP analogues in the rat. *Br J Pharmacol* 126:326–332, 1999.
- Hardy JD, Wolff HG, Goodell H. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J Clin Invest* 29:115–140, 1950.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77–88, 1988.
- Hoffmann T, Kistner K, Miermeister F, Winkelmann R, Wittmann J, Fischer MJ, Weidner C, Reeh PW. TRPA1 and TRPV1 are differentially involved in heat nociception of mice. *Eur J Pain* 17:1472–1482, 2013.
- Honoré P, Wismer CT, Mikusa J, Zhu CZ, Zhong C, Gauvin DM, Gomtsyan A, El Kouhen R, Lee CH, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF. A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 314:410–421, 2005.
- Hökfelt T, Elde R, Johansson O, Luft R, Nilsson G, Arimura A. Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin-containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat. *Neuroscience* 1:131–136, 1976.
- Hu HJ, Bhawe G, Gereau RW IV. Prostaglandin and protein kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia. *J Neurosci* 22:7444–7452, 2002.
- Hunskar S, Berge O-G, Hole K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behav Brain Res* 21:101–108, 1986.
- Jerman JC, Brough SJ, Prinjha R, Harries MH, Davis JB, Smart D. Characterization using FLIPR of rat vanilloid receptor (rVR1) pharmacology. *Br J Pharmacol* 130:916–922, 2000.
- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427:260–265, 2004.
- Kashiba H, Ueda Y, Senba E. Coexpression of preprotachykinin-A, alphacalcitonin gene-related peptide, somatostatin, and neurotrophin receptor family messenger RNAs in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci* 70:179–189, 1996.
- Kessler F, Habelt C, Averbeck B, Reeh PW, Kress M. Heat-induced release of CGRP from isolated rat skin and effects of bradykinin and the protein kinase C activator PMA. *Pain* 83:289–295, 1999.
- Kirschstein T, Greffrath W, Büsselberg D, Treede RD. Inhibition of rapid heat responses in nociceptive primary sensory neurons of rats by vanilloid receptor antagonists. *J Neurophysiol* 82:2853–2860, 1999.
- Koplas PA, Rosenberg RL, Oxford GS. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 17:3525–3537, 1997.
- Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50:277–289, 2006.

- LaMotte RH, Thalhammer JG, Torebjörk HE, Robinson CJ. Peripheral neural mechanisms of cutaneous hyperalgesia following mild injury by heat. *J Neurosci* 2:765–781, 1982.
- Le Bars D. The whole body receptive field of dorsal horn multireceptive neurones. *Brain Res Rev* 40:29–44, 2002.
- Leem JW, Willis WD, Chung JM. Cutaneous sensory receptors in the rat foot. *J Neurophysiol* 69:1684–1699, 1993.
- Leonard PA, Arunkumar R, Brennan TJ. Bradykinin antagonists have no analgesic effect on incisional pain. *Anesthesia Analgesia* 99:1166–1172, 2004.
- Liang YF, Haake B, Reeh PW. Sustained sensitization and recruitment of rat cutaneous nociceptors by bradykinin and a novel theory of its excitatory action. *J Physiol (Lond.)* 532:229–239, 2001.
- LoVerme J, Russo R, La Rana G, Fu J, Farthing J, Mattace-Raso G, Meli R, Hohmann A, Calignano A, Piomelli D. Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Pharmacol Exp Ther* 319:1051–1061, 2006.
- Marics I, Malapert P, Reynders A, Gaillard S, Moqrich A. Acute heat-evoked temperature sensation is impaired but not abolished in mice lacking TRPV1 and TRPV3 channels. *PLoS ONE* 9:e99828, 2014.
- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13525–13530, 2007.
- Meisenberg G, Simmons WH. Minireview. Peptides and the blood-brain barrier. *Life Sci* 32:2611–2623, 1983.
- Meyer RA, Campbell JN. Myelinated nociceptive afferents account for the hyperalgesia that follows a burn to the hand. *Science* 213:1527–1529, 1981.
- Mickle AD, Shepherd AJ, Mohapatra DP. Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Prog Mol Biol Transl Sci* 131:73–118, 2015.
- Mizumura K, Sato J, Kumazawa T. Effects of prostaglandins and other putative chemical intermediaries on the activity of canine testicular polymodal receptors studied in vitro. *Pflüger's Archives* 408:565–572, 1987.
- Mizumura K, Koda H, Kumazawa T. Augmenting effects of cyclic AMP on the heat response of canine testicular polymodal receptors. *Neurosci Lett* 162:75–77, 1993.
- Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Molecular Pain* 1:3, 2005.
- Movahed P, Jönsson Bo AG, Birnir B, Wingstrand JA, Jorgensen TD, Ermund A, Sterner O, Zygmunt PM, Högestätt E. Endogenous unsaturated C18 N-acylethanolamines are vanilloid receptor (TRPV1) agonists. *J Biol Chem* 280:38496–38504, 2005.
- Nagy JJ, Hunt SP. Fluoride-resistant acid phosphatase-containing neurones in dorsal root ganglia are separate from those containing substance P or somatostatin. *Neurosci* 7:89–97, 1982.
- Nagy I, Rang HP. Similarities and differences between the responses of rat sensory neurons to noxious heat and capsaicin. *J Neurosci* 19:10647–10655, 1999.
- Németh J, Helyes Z, Oroszi G, Jakab B, Pintér E, Szilvássy Z, Szolcsányi J. Role of voltage-gated cation channels and axon reflexes in the release of sensory neuropeptides by capsaicin from isolated rat trachea. *Eur J Pharmacol* 458:313–318, 2003.
- Nilius B, Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol Rev* 66:676–814, 2014.
- Nozaki-Taguchi N, Yaksh TL. A novel model of primary and secondary hyperalgesia after mild thermal injury in the rat. *Neurosci Lett* 254:25–28, 1998.
- Oden DL, Oden KL. A minimum-stress procedure for repeated measurements of nociceptive threshold and analgesia. *Life Sci* 31:1245–1248, 1982.
- Ohta T, Imagawa T, Ito S. Novel agonistic action of mustard oil on recombinant and endogenous porcine transient receptor potential V1 (pTRPV1) channels. *Biochem Pharmacol* 73:1646–1656, 2007.
- Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest* 120:3779–3787, 2010.
- Park U, Vastani N, Guan Y, Raja SN, Koltzenburg M, Caterina MJ. TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J Neurosci* 31:11425–11436, 2011.
- Perl ER. Cutaneous polymodal receptors: characteristics and plasticity. *Prog Brain Res* 113:21–37, 1996.
- Pethő G, Reeh PW. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. *Physiol Rev* 92:1699–1775, 2012.
- Pintér E, Helyes Z, Szolcsányi J. Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther* 112:440–456, 2006.
- Pogatzki-Zahn EM, Shimizu I, Caterina M, Raja SN. Heat hyperalgesia after incision requires TRPV1 and is distinct from pure inflammatory pain. *Pain* 115:296–307, 2005.
- Pomonis JD, Harrison JE, Mark L, Bristol DR, Valenzano KJ, Walker K. N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-cholorphryridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carboxamide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: II. In vivo characterization in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 306:387–393, 2003.
- Rami HK, Thompson M, Stemp G, Fell S, Jerman JC, Stevens AJ, Smart D, Sargent B, Sanderson D, Randall AD, Gunthorpe MJ, Davis JB. Discovery of SB-705498: a potent, selective and orally bioavailable TRPV1 antagonist suitable for clinical development. *Bioorg Med Chem Lett* 16:3287–3291, 2006.

- Reeh PW. Sensory receptors in mammalian skin in an in vitro preparation. *Neurosci Lett* 66:141–146, 1986.
- Reeh PW, Pethő G. Nociceptor excitation by thermal sensitization – a hypothesis. *Prog Brain Res* 129:39–50, 2000.
- Rueff A, Dray A. Sensitization of peripheral afferent fibres in the in vitro neonatal rat spinal cord-tail by bradykinin and prostaglandins. *Neuroscience* 54:527–535, 1993.
- Sauer SK, Schäfer D, Kress M, Reeh PW. Stimulated prostaglandin E2 release from rat skin, in vitro. *Life Sci* 62:2045–2055, 1998.
- Sauer SK, Bove GM, Averbeck B, Reeh PW. Rat peripheral nerve components release calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 in response to noxious stimuli: evidence that nervi nervorum are nociceptors. *Neurosci* 92:319–325, 1999.
- Sauer SK, Averbeck B, Reeh PW. Denervation and NK1 receptor block modulate stimulated CGRP and PGE2 release from rat skin. *Neuroreport* 11:283–286, 2000.
- Sauer SK, Reeh PW, Bove GM. Noxious heat-induced CGRP release from rat sciatic nerve axons in vitro. *Eur J Neurosci* 14:1203–1208, 2001.
- Savidge JR, Ranasinghe SP, Rang HP. Comparison of intracellular calcium signals evoked by heat and capsaicin in cultured rat dorsal root ganglion neurons and in a cell line expressing the rat vanilloid receptor VR1. *Neuroscience* 102:177–184, 2001.
- Sándor Z, Varga A, Horváth P, Nagy B, Szolcsányi J. Construction of a stable cell line uniformly expressing the rat TRPV1 receptor. *Cell Mol Biol Lett* 10:499–514, 2005.
- Shu X, Mendell LM. Acute sensitization by NGF of the response of small-diameter sensory neurons to capsaicin. *J Neurophysiol* 86:2931–2938, 2001.
- Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol* 129:227–230, 2000.
- Sprenger C, Bingel U, Büchel C. Treating pain with pain: supraspinal mechanisms of endogenous analgesia elicited by heterotopic noxious conditioning stimulation. *Pain* 152:428–439, 2011.
- Stein C, Millan MJ, Yassouridis A, Herz A. Antinociceptive effects of mu- and kappa-agonists in inflammation are enhanced by a peripheral opioid receptor-specific mechanism. *Eur J Pharmacol* 155:255–264, 1988.
- Stein C, Clark JD, Oh U, Vasko MR, Wilcox GL, Overland AC, Vanderah TW, Spencer RH. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. *Brain Res Rev* 60:90–113, 2009.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112:819–829, 2003.
- Suardíaz M, Estivill-Torrús G, Goicoechea C, Bilbao A, Rodríguez de Fonseca F. Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain. *Pain* 133:99–110, 2007.
- Sugiura T, Bielefeldt K, Gebhart GF. TRPV1 function in mouse colon sensory neurons is enhanced by metabotropic 5-hydroxytryptamine receptor activation. *J Neurosci* 24:9521–9530, 2004.
- Szállási Á, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51:159–212, 1999.
- Szolcsányi J. Sensory receptors and the antinociceptive effects of capsaicin. In: Hakanson R, Sundler F (eds.) *Tachykinin Antagonists*. Elsevier, Amsterdam, pp. 45–54, 1985.
- Szolcsányi J. Selective responsiveness of polymodal nociceptors of the rabbit ear to capsaicin, bradykinin and ultra-violet irradiation. *J Physiol (Lond)* 388:9–23, 1987a.
- Szolcsányi J. Capsaicin and nociception. *Acta Physiol Hung* 69:323–332, 1987b.
- Szolcsányi J, Anton F, Reeh PW, Handwerker HO. Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin. *Brain Res* 446:262–268, 1988.
- Szolcsányi J. Actions of capsaicin on sensory receptors. In: Wood J (ed.) *Capsaicin in the Study of Pain*. Academic Press, London, pp. 1–26, 1993.
- Szolcsányi J, Helyes Z, Oroszi G, Németh J, Pintér, E. Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *Br J Pharmacol* 123:936–942, 1998a.
- Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z, Oroszi G, Németh J. Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br J Pharmacol* 125:916–922, 1998b.
- Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z. Sensocrine function of capsaicin-sensitive nociceptors mediated by somatostatin regulates against inflammation and hyperalgesia. In: Brune K, Handwerker HO (eds.) *Hyperalgesia: molecular mechanisms and clinical implications*. Progress in Pain Research and Management 30. IASP Press, Seattle, pp. 113–128, 2004.
- Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z, Pethő G. Inhibition of the function of TRPV1-expressing nociceptive sensory neurons by somatostatin 4 receptor agonism: mechanism and therapeutical implications. *Curr Top Med Chem* 11:2253–2263, 2011.
- Szolcsányi J. Capsaicin and sensory neurones: a historical perspective. In: Capsaicin as a therapeutic molecule. In: Abdel-Salam OME (ed.) *Progress in Drug Research*. pp. 1–37, 2014.
- Tabrizi MA, Baraldi PG, Baraldi S, Gessi S, Merighi S, Borea PA. Medicinal Chemistry, Pharmacology, and Clinical Implications of TRPV1 Receptor Antagonists. *Med Res Rev* 37:936–983, 2017.

- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531–543, 1998.
- Tominaga M, Wada M, Masu M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6951–6956, 2001.
- Trevisani M, Gatti R. TRPV1 antagonists as analgesic agents. *Open Pain J* 6:108–118, 2013.
- Valenzano KJ, Grant ER, Wu G, Hachicha M, Schmid L, Tafesse L, Sun Q, Rotshteyn Y, Francis J, Limberis J, Malik S, Whittemore ER, Hodges D. N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carboxamide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: I. In vitro characterization and pharmacokinetic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 306:377–386, 2003.
- Varga A, Bölcskei K, Szöke E, Almási R, Czéh G, Szolcsányi J, Pethő G. Relative roles of protein kinase A and protein kinase C in modulation of transient receptor potential vanilloid type 1 receptor responsiveness in rat sensory neurons in vitro and peripheral nociceptors in vivo. *Neuroscience* 140:645–657, 2006.
- Vierck CJ, Cooper BY. Guideline for assessing pain reactions and pain modulation in laboratory animal subjects. In: Kruger L, Liebeskind JC (eds.) *Advances in Pain Research and Therapy*. Vol 6. Raven Press, New York, pp 305–322, 1984.
- Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ, McIntyre P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 304:56–62, 2003.
- Wang X, Miyares RL, Ahern GP. Oleoylethanolamide excites vagal sensory neurones, induces visceral pain and reduces short-term food intake in mice via capsaicin receptor TRPV1. *J Physiol* 564:541–547, 2005.
- Woodbury CJ, Zwick M, Wang S, Lawson JJ, Caterina MJ, Koltzenburg M, Albers KM, Koerber HR, Davis BM. Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have normal heat responses. *J Neurosci* 24:6410–6415, 2004.
- Woolfe G, MacDonald AL. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J Pharmacol Exp Ther* 80:300–307, 1944.
- Yeomans DC, Pirec V, Proudfit HK. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors of the rat: behavioral evidence. *Pain* 68:133–140, 1996.
- Zahn PK, Brennan TJ. Primary and secondary hyperalgesia in a rat model for human postoperative pain. *Anesthesiology* 90:863–872, 1999.
- Zhou Y, Zhou ZS, Zhao ZQ. PKC regulates capsaicin-induced currents of dorsal root ganglion neurons in rats. *Neuropharmacol* 41:601–608, 2001.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109–110, 1983.
- Zimmermann K, Leffler A, Fischer MM, Messlinger K, Nau C, Reeh PW. The TRPV1/2/3 activator 2-aminoethoxydiphenyl borate sensitizes native nociceptive neurons to heat in wildtype but not TRPV1 deficient mice. *Neurosci* 135:1277–1284, 2005.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sörgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452–457, 1999.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni mindenekelőtt **Szolcsányi János** akadémikusnak, aki mesteremként irányította kutatómunkámat végzésem óta. Tőle elsősorban lényeglátást, a megoldáskeresés igényét és kitartást tanultam. Kreativitását csak csodálni tudtam, elsajátítani sajnos nem. Köszönettel tartozom **Barthó Loránd** professzornak, aki felkeltette érdeklődésemet a kísérletes kutatómunka iránt, és diákköri munkámat irányította. Támogatását pályafutásom során végig éreztem. Kettőjüknek mint intézetvezetőknek is köszönetet szeretnék mindani, akik mindenben támogatták munkámat. Ugyanez vonatkozik **Pintér Erika** professzorra is, aki nemcsak jelenlegi intézetvezetőként, hanem kollaborációs partnerként és nem utolsósorban barátként végig támogatott. Köszönettel tartozom dr. **Bölcseki Kata** munkatársamnak, aki a kísérletes munkában és a kéziratok megírásában rengeteget segített. Rajta kívül két további volt PhD-hallgatómat, **dr. Almási Róbertet** és **dr. Füredi Rékát** illeti köszönet több kísérletsorozatban való alkotó közreműködésükért. Egy-egy projektben való együttműködésért köszönet illeti **Helyes Zsuzsanna** professzort, **dr. Varga Angelikát**, **dr. Sándor Zoltánt**, **dr. Szőke Évát**, **dr. Boros Melindát**, **dr. Tékus Valériát**. Az intézeti asszisztensek közül **Góglné Keserű Katalinnak** és **Bagoly Teréznek** szeretnék köszönetet mondani odaadó és precíz munkájukért. A disszertáció elkészítésében nyújtott technikai segítségért **Schweibert Istvánt** illeti köszönet. Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok **feleségemnek** támogatásáért és türelméért.

Külföldi kollaborációs partnereim közül köszönet illeti **Peter Reeh** professzort (Erlangen, Németország), akivel igen gyümölcsöző együttműködést sikerült kialakítani. Az erlangeni munkacsoportból szeretnék még köszönetet mondani **Alexandra Derow** PhD hallgatónak és **Iwona Izydorezyk** asszisztensnőnek is.

Köszönet az **OTKA**-nak, az **ETT**-nek és a **Humboldt Alapítványnak** a kutatásokhoz nyújtott anyagi támogatásért.