AZ ENDOVANILLOID ÉS ENDOKANNABINOID RENDSZEREK SZEREPE AZ ELSŐDLEGES FÁJDALOMÉRZŐ IDEGSEJTEK ÉRZÉKENYSÉGÉNEK ÉS AKTIVITÁSÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

DR NAGY ISTVÁN

2018

DEBRECEN, LONDON

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönöm a laboratóriumomban rövidebb-hosszabb ideig dolgozó valamennyi munkatársamnak, (a számtalan egyetemi hallgatónak, mester és PhD hallgatónak és posztdoktorális kutatónak) a szorgos és odaadó munkát, ötletet és kritikát amellyel a laboratóriumom munkájához, közleményeimhez és ennek az akadémiai doktori értekezésnek az elkészüléséhez hozzájárult.

Köszönettel tartozom valamennyi kutatótársamnak akikkel tudományos munkám során megismerkedtem és szerencsém volt együtt dolgozni, vitatkozni és egymás munkáját segítve izgalmas és jelentős eredményeket elérni. Az ő hozzájárulásuk nélkül ez értekezésben szereplő adatok egy jelentős része nem készülhetett volna el.

Külön köszönettel tartozom mentoraimnak: Székely György professzor úrnak, aki elindította és támogatta tudományos munkámat és hitt abban, hogy sikeres kutatóvá vállhatok, Cliffor Woolf profeszor úrnak, aki bevezetett a fájdalom kutatás sokszor fájdalmas, de végtelenül izgalmas világába, Humphrey Rang profeszor úrnak, aki megismertett a farmakológia csodáival és rejtelmeivel, és Urbán László barátomnak, aki ötletekkel és őszinte kritikával több mint 35 éve önzetlenül segíti és támogatja munkámat.

Végezetül, köszönettel tartozom családom valamennyi tagjának akik végig támogatták és segítették törekvéseimet, munkámat és céljaim elérését, és elviselték az ezekhez kapcsolodó nehézségeket és megpróbáltatásokat.

TARTALOMJEGYZÉK

1. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ EREDETI	
TUDOMÁNYOS FELISMERÉSEK	1
2. ÖSSZEFOGLALÁS	4
	6
3. BEVEZETES	6
3.1. AZ ENDUVANILLUID KEDSZEK	/
3.1.1. A KAPSZAICIN KECEPTOK	9
3.1.1.1. A KAPSZAICIN RECEPTORT ALKOTO TRPV1	1.0
MOLEKULAK SZERKEZETE	12
3.1.1.1.1. AZ N-TERMINALIS SZAKASZ	12
3.1.1.1.2. AZ C-TERMINALIS SZAKASZ	13
3.1.1.1.3. A PORUS ALKOTASABAN RESZTVEVO	
SZAKASZ	14
3.1.1.1.4. S1-S4 HELIXEK ALTAL ALKOTOTT SZAKĄSZ	15
3.1.1.2. A KAPSZAICIN RECEPTOR AKTIVATORALES A	
" RECEPTOR AKTIVITAS SZABALYOZOJ	15
3.1.1.2.1. KOZVETLEN AKTIVATOROK ES AKTIVITAS	
SZABALYOZOK	16
3.1.1.2.1.1. KOZVETLEN AKTIVATOR ES AKTIVITAS	
SZABALYOZO MOLEKULAK	16
3.1.1.2.1.1.1. EXOGÉN MOLEKULÁK	16
3.1.1.2.1.1.2. ENDOGÉN MOLEKULÁK	17
3.1.1.2.1.2. NEM MOLEKULÁRIS KÖZVETLEN	
AKTIVÁTOROK ÉS AKTIVITÁS	
SZABÁLYOZÓK	22
3.1.1.2.1.2.1. PROTON	22
3.1.1.2.1.2.2. HŐ	22
3.1.1.2.1.2.3. DEPOLARIZÁCIÓ	22
3.1.1.2.2. KÖZVETETT AKTIVÁTOROK ÉS AKTIVITÁS	
SZABÁLYOZÓK	23
3.1.1.3. A KAPSZAICIN RECEPTOR AKTIVÁTORAI ÉS	
AKTIVITÁS SZABÁLYOZÓI HATÁSÁNAK	
INTEGRÁLÁSA	24
3.1.2. A KAPSZAICIN RECEPTOR AKTIVÁLÁSÁNAK	
HATÁSA	25
3.2. AZ ENDOKANNABINOID RENDSZER	28
3.2.1. AZ ENDOKANNABINOID RENDSZER RECEPTORAI	28
3.2.1.1. A CB1 RECEPTOR	28
3.2.2. A CB1 RECEPTOR AKTIVÁTORAI	31
3.2.2.1. A CB1 RECEPTOR TERMÉSZETES EXOGÉN	-
AKTIVÁTORAI	32
3.2.2. A CB1 RECEPTOR ENDOGÉN AKTIVÁTORAL	33
3.3. AZ ENDOVANILLOID ÉS ENDOKANNABINOID	20
RENDSZEREK KÖZÖS ENDOGÉN	
AKTIVÁTORAL	34
3.3.1. AZ ANANDAMID	34

3.3.1.1. AZ ANANDAMID BIOSZINTÉZISE	35
3.3.1.2. AZ ANANDAMID TRANSZPORTJA	36
3.3.1.3. AZ ANANDAMID LEBONTÁSA	38
3.4. AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJT	40
3.4.1. AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJT JELLEMZŐI	-
4.4.1.1. AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJT MORFOLÓGIAI	
TULAIDONSÁGAI	40
3.4.1.2 AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEIT FIZIOLÓGIAI	40
TULAIDONSÁGAI	41
3.4.1.3. AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEIT NEUROKÉMIAI	11
THI A IDONSÁGAI	43
342 A POLIMODÁLIS FÁIDALOMÉRZŐ ELSŐDI EGES	75
IDEGSEIT FUNKCIÓI	46
3421 A POLIMODÁLIS FÁIDALOMÉRZŐ ELSŐDI EGES	40
IDEGSEITEK SZEREPE A FÁIDALOMÉRZÉS	
KIAI AKÍTÁSÁBAN	46
3 4 2 2 A POLIMODÁLIS FÁIDALOMÉRZŐ ELSŐDLEGES	-0
IDECSEITEK SZEREDE A NEUROCÉN	
GVIII LADÁSBAN	18
3423 A DOLIMODÁLIS EÁIDALOMÉDZŐ ELSŐDLEGES	40
J.4.2.3. A I OLIMODALIS L'AJDALOMERZO ELSODLECES	
HIDED A KTIVITÁS KIALAKULÁSÁBAN	40
HIF EKAK ITVITAS KIALAKULASADAN	49
4. HIPOTÉZIS ÉS CÉLKITŰZESEK	52
4.1. HIPOTÉZIS	52
4.2. CÉLKITŰZÉSEK	52
	• -
5. EREDMÉNYEK	56
5.1. A TRPV1 KIFEJEZŐDÉSE HÁTSÓ GYÖKI	
IDEGSEJTEKEN	56
5.1.1. A TRPV1 KIFEJEZŐDÉSE HÁTSÓ GYÖKI DÚCBAN	
ÉS KULTÚRMÉDIUMBAN NÖVESZTETT	
ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN	56
5.1.2. A TRPV1 KIFEJEZŐDÉSE AZ PATKÁNY	
HÚGYHÓLYAGOT BEIDEGZŐ ELSŐDLEGES	
ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN PERIFÉRIÁS	
NYÚLVÁNYAIN	57
5. 1.3. A TRPV1 KIFEJEZŐDÉSE A HUMÁN HÚGYHÓLYAG	• •
ERNYŐ SEJTEIN	61
5.2. A TRPV1 ÁLTAL KÖZVETÍTETT AKTIVITÁS AZ	
ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN	63
5.2.1. A KAPSZAICINNEL KIVÁLTOTT VALAMINT AZ	
ALACSONY ÉS MAGAS HŐKÜSZÖBŰ	
VÁLASZOK ÖSSZEFÜGGÉSE A PATKÁNY	
KULTÚRMÉDIUMBAN NÖVESZTETT	
ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN	63

5.2.2. ALACSONY HŐKÜSZÖBÜ ÉS KAPSZAICINNEL	
KIVÁLTOTT VÁLASZOK JELLEMZŐI	
PATKÁNY KULTÚRMÉDIUMBAN	
NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ	
IDEGSEJTEKBEN	66
5.2.3. KAPSZAICINNEL KIVÁLTOTT KOBALT	00
BEÁRAMLÁS PATKÁNY	
KULTÚRMÉDIUMBAN NÖVESZTETT	
ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN	74
5.2.4. KAPSZAICINNEL KIVÁLTOTT KÁLCIUM	, .
BEÁRAMLÁS PATKÁNY	
KULTÚRMÉDIUMBAN NÖVESZTETT	
FL SŐDI EGES ÉR ZŐ IDEGSEITEKBEN	76
525 KAPSZAICINNEL KIVÁLTOTT CGRP	70
FEI SZABADUL ÁS PATKÁNV	
KUU TÚRMÉDII IMBAN NÖVESZTETT	
FL SŐDI EGES ÉR ZŐ IDEGSEITEKBŐI	77
53 A KANNABINOID 1 RECEPTOR KIEFIEZŐDÉSE	11
FI SŐDI EGES ÉRZŐ IDEGSEITEKBEN	78
5 3 1 A KANNADINOID 1 DECEDTOD KIEEIEZŐDÉSE	70
3.3.1. A KANNADINOID I RECEITOR KITEJEZODESE DATKÁNY HÁTSÓ GVÖVI DÚC ELSŐDI EGES	
ÉDZŐ IDECSEITERDEN	79
ERZU IDEUSEJI ERDEN 5 2 2 A KANNADINOID 1 DECEDTOD KIEGIEZŐDÉSE	/0
5.3.2. A KANNADINOID I KECEFIOK KIFEJEZODESE DATKÁNY KULTÚDMÉDILIMDANI	
ΓΑΤΚΑΝΤΚΟΓΙΟΚΜΕΡΙΟΜΙΒΑΝ ΝΟνεςζτεττει ςόρι εσες έρζό	
NOVESZTETT ELSODLEGES EKZO	01
IDEGSEJIEKBEN	81
5.3.3. A KANNABINOID I RECEPTOK KIFEJEZODESE	0.0
PAIKANY HUGYHULYAGBAN	86
5.4. A KANNABINUID I RECEPTOR ES A TRPVI	
EGYUTTES KIFEJEZODESE HATSO GYOKI	
DUC ES KULTURMEDIUMBAN NOVESZTETT	
PATKANY ELSODLEGES ERZO	0.0
IDEGSEJTEKBEN	88
5.5. AZ ANANDAMID METABOLIKUS ENZIMEINEK	
KIFEJEZODESE ELSODLEGES ERZO	
IDEGSEJTEKBEN	90
5.5.1. AZ ANANDAMIDOT HIDROLIZALO FAAH	
KIFEJEZODESE PATKANY ELSODLEGES	
ERZO IDEGSEJTEKBEN	90
5.5.2. AZ ANANDAMIDOT SZINTETIZÁLO ENZIMEK	
KIFEJEZODESE ELSODLEGES ERZO	
IDEGSEJTEKBEN	94
5.5.2.1. KALCIUM ERZEKENY ANANDAMIDOT	
SZINTETIZÁLO ENZIMEK KIFEJEZŐDÉSE	
ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN	94
5.5.2.2. KALCIUMRA NEM ÉRZÉKENY ANANDAMIDOT	
SZINTETIZÁLÓ ENZIMEK KIFEJEZŐDÉSE	
PATKÁNY KULTÚRMÉDIUMBAN	
NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ	
IDEGSEJTEKBEN	100

5.6. AZ ANANDAMID SZINTÉZISE PATKÁNY	
KULTÚRMÉDIUMBAN NÖVESZTETT	
ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN	103
5.6.1. AZ ANANDAMID SZINTÉZISE KÁLCIUMRA NEM	
ÉRZÉKENY ÚTVONALAKON KERESZTÜL	
PATKÁNY KULTÚRMÉDIUMBAN	
NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ	
IDEGSEJTEKBEN	103
5.6.2. AZ ANANDAMID SZINTÉZISE KÁLCIUMRA	
ÉRZÉKENY ÚTVONALAKON KERESZTÜL	
PATKÁNY KULTÚRMÉDIUMBAN	
NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ	
IDEGSEJTEKBEN	104
5.7. AZ ANANDAMID HATÁSA A KULTÚRMÉDIUMBAN	
NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ	
IDEGSEJTEKBEN	106
5.7.1. AZ EXOGÉN ANANDAMID HATÁSA A KALCITONIN	
GÉN KAPCSOLT PEPTID	
FELSZABADULÁSÁRA PATKÁNY	
KULTÚRMÉDIUMBAN NÖVESZTETT	
ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEITEKBEN	106
5.7.1.1 AZ EXOGÉN ANANDAMID EXCITATÓRIKUS	100
HATÁSA PATKÁNY KULTÚRMÉDIUMBAN	
NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ	
IDEGSEITEKEN	107
5.7.1.1.1. AZ EXOGÉN ANANDAMID EXCITATÓRIKUS	107
HATÁSA A KOBALT BEÁRAMI ÁSRA	
PATKÁNY KULTÚRMÉDIUMBAN	
NÖVESZTETT EL SŐDLEGES ÉRZŐ	
IDEGSEITEKEN	108
57112 AZ EXOGÉN ANANDAMID HATÁSA A	100
MEMBRÁN ÁRAMOKRA A	
KUI TÚRMÉDII IMBAN NÖVESZTETT	
PATKÁNY ELSŐDLEGES ÉRZŐ	
IDEGSEITEKEN	110
57113 AZ EXOGÉN ANANDAMID HATÁSA AZ	110
INTRACEI LIU ÁRIS KÁLCIUM	
KONCENTRÁCIÓRA A KULTÚRMÉDIUMBAN	
NÖVESZTETT PATKÁNY ELSŐDI EGES	
ÉRZŐ IDEGSEITEKEN	111
5.7.1.2. AZ EXOGÉN ANANDAMID GÁTLÓ HATÁSA A	111
KULTÚRMÉDIUMBAN NÖVESZTETT	
PATKÁNY ELSŐDLEGES ÉRZŐ	
IDEGSEITEKEN	112
5.7.1.2.1. AZ EXOGÉN ANANDAMID GÁTLÓ HATÁSA A	114
KAPSZAICINNEL KIVÁLTOTT	
TRANSZMITTER FELSZABADUL ÁSRA	
KULTÚRMÉDIUMBAN NÖVESZTETT	
PATKÁNY ELSŐDLEGES ÉRZŐ	
IDEGSEJTEKEN	112

5.7.1.2.2. AZ EXOGÉN ANANDAMID GÁTLÓ HATÁSA A	
CAPSAICINNEL KIVÁLTOTT ÁRAMOKRA A	
KULTÚRMÉDIUMBAN NÖVESZTETT	
PATKÁNY ELSŐDLEGES ÉRZŐ	
IDEGSEJTEKEN	113
5.7.1.2.3. AZ EXOGÉN ANANDAMID GÁTLÓ HATÁSA A	
CAPSAICINNEL KIVÁLTOTT KOBALT	
BEÁRAMLÁSRA A KULTÚRMÉDIUMBAN	
NÖVESZTETT PATKÁNY ELSŐDLEGES	
ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN	117
5.7.2. AZ EXOGÉN ANANDAMID HATÁSA AZ	
ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN	
GYULLADÁSOS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT	118
5.7.2.1. AZ EXOGÉN ANANDAMID EXCITATÓRIKUS	
HATÁSA GYULLADÁSOS KÖRÜLMÉNYEK	
KÖZÖTT	119
5.7.2.1.1. AZ EXOGÉN ANANDAMID EXCITATÓRIKUS	
HATÁSA A KALCITONIN GÉN KAPCSOLT	
PEPTID FELSZABADULÁSÁRA	
GYULLADÁSOS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT	119
5.7.2.1.2. AZ EXOGÉN ANANDAMID EXCITATÓRIKUS	
HATÁSA A KOBALT FELVÉTELRE PATKÁNY	
KULTÚMÉDIUMBAN NÖVESZTETT	
ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN	
GYULLADÁSOS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT	122
5.7.2.2. AZ EXOGÉN ANANDAMID GÁTLÓ HATÁSA	
GYULLADÁSOS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT	124
5.7.3. AZ ENDOGEN ANANDAMID HATASA AZ	
ELSODLEGES ERZO IDEGSEJTEKEN	126
5.7.3.1. A FAAH GATLAS HATASA A KOBALT	
FELHALMZODASRA A	
KULTURMEDIUMBAN NOVESZTETT	
ELSODLEGES ERZO IDEGSEJTEKBEN	127
5.7.3.2. A 20:4-NAPE ADAGOLAS HATASA A KOBALT	
FELHALMZODASRA A	
KULTURMEDIUMBAN NOVESZTETT	100
ELSODLEGES ERZO IDEGSEJTEKBEN	128
5.7.3.3. A 20:4-NAPE ADAGOLAS HATASA A MEMBRAN	
ΑΚΑΜΟΚΚΑ Α ΚULTURMEDIUMBAN	
NOVESZIEII ELSODLEGES EKZO	100
IDEGSEJTEKBEN	129
5.7.3.4. A 20:4-NAPE ADAGOLAS HATASA AZ	
ΙΝΙΚΑCELLULAΚΙΣ ΚΑΙΟΙΟΜ Κονσενιτρά σιόρα, α κιμ τύρμεριμησανι	
ΚΟΝΟΕΝΤΚΑΟΙΟΚΑ Α ΚΟΕΤΟΚΜΕΔΙΟΜΙΔΑΝ ΝΟΛΕΩΖΤΕΤΤ ΕΙ ΩΔΌΙ ΕΛΕΩ ΈΡΖΟ	
NOVESZTETT ELSODLEGES EKZO IDEGSETTEVDEN	121
ΙΔΕυδεμεκοδείν 5 9 Α CD1 DECEDTOD ΤΟ DV1 ΩΖΕΝΖΙΤΙΖΑΙ Ο ΠΑΤΆΩΑ Α	131
3.0. Α ΌΤΙ ΝΕΌΕΓΙΟΝ ΙΝΓΥΙ SZENZI ΠΖΑΕΟ ΠΑΤΑδΑ Α ΚΙΠ ΤΓΙ ΜΈΝΗ ΜΆΝΝΝΟΥ Ες7ΤΕΤΤ	
ELSŐDI EGES ÉRZŐ IDEGSEITEKBEN	122
ELSOPLEGES ENZO IDEGSEJTENDEN	155

5.8.1. AZ ANANDAMID ÉS KAPSZAICIN VÁLASZOK	
EGYÜTTES ELŐFORDULÁSA A	
KULTÚRMÉDIUMBAN NÖVESZTETT	
ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN	134
5.8.1.1. AZ ANANDAMID ÉS KAPSZAICIN VÁLASZOK	
ÁLTAL MEGHATÁROZOTT SEJTTÍPUSOK A	
KULTÚRMÉDIUMBAN NÖVESZTETT	
ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEITEKBEN	134
5812 A CB1 RECEPTOR SZEREPE ANANDAMID ÉS	101
KAPSZAICIN VÁLASZOKRA A	
KI II TÚRMÉDII IMBAN NÖVESZTETT	
ELSŐDI EGES ÉRZŐ IDEGSEITEKBEN	138
5913 A CD1 DECEDTOD VIECIEZŐDÉSE AZ ACD ÉS COD	130
5.6.1.3. A CDI RECEFIUR RIFEJEZUDESE AZ ACR ES COR EENOTÍDUCÍ VIII TÚDMÉDIUMDAN	
ΓΕΝΟΠΡΟΣΟ ΚΟΕΙ ΟΚΜΕΡΙΟΜΒΑΝ ΝΟνεαζτεττ ει αδρί εσεα έρζο	
NOVESZIEITEKDEN	1.4.1
	141
5.8.1.4. A CBI RECEPTOR ES TRPVI TERBELI	
ELRENDEZODESE AZ ELSODLEGES ERZO	
IDEGSEJTEKBEN	142
5.8.1.5. A CB1 RECEPTOR ES TRPV1 KOZVETLEN FEHERJE	
– FEHERJE KAPCSOLATA AZ ELSÖDLEGES	
ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN	149
5.9. AZ ANANDAMID TRPV1 ÉS CB1 RECEPTOR	
KÖZVETÍTETT HATÁSOK SZEREPE A	
PATKÁNY HÚGYHÓLYAG	
ÖSZZEHÚZÓDÁSÁRA	151
5.9.1. ANANDAMIDDAL KIVÁLTOTT HÓLYAG	
AKTIVITÁS FIZIOLÓGIÁS KÖRÜLMÉNYEK	
KÖZÖTT	151
5.9.2. AZ ANANDAMID SZEREPE A HÓLYAG AKTIVITÁS	
SZABÁLYOZÁSÁBAN GYULLADÁSOS	
KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT	154
6 AZ FRDMÉNYEK ÉS AZOK JELENTŐSÉGÉNEK	101
MEGBESZÉLÉSE	159
61 AZ ÉRTEKEZÉSBEN BEMLITATOTT EREDMÉNVEK	157
ÁLTAL ÁNOS IELENTŐSÉGE	150
ALTALANOS JELENTOSEUE	139
0.2. AL ENDOVANILLOID ES ENDOKANNADINOID DEDSZEDEK SZÁMOS ELEME KIEGIEZŐDIK	
KEDSZEKEK SZAMOS ELEME KIFEJEZODIK	
Α ΓΑΙΔΑΙΟΜΕΚΖΟ ΕΙ ΣΟΔΙΕΘΕΥ ΕΚΖΟ	171
IDEGSEJTEK EGY JELENTOS RESZEBEN	161
6.3. A FAJDALOMERZO ELSODLEGES ERZO IDEGSEJTEK	
KIFEJEZODO ENDOVANILLOID ES	
ENDOKANNABINOID MOLEKULAK	
MUKODOKEPESEK	165
6.4. AZ ENDOVANILLOID ES ENDOKANNABINOID	
REDSZEREK A FAJDALOMERZO	
ELSÖDLEGES ERZŐ IDEGSEJTEK EGY	
JELENTÖS RÉSZÉBEN AUTOKRIN	
JELZŐRENDSZERT ALKOTNAK	171

6.5. AZ ENDOVANILLOID ÉS ENDOKANNABINOID	
AUTOKRIN JELZŐRENDSZER SZEREPE A	
FÁJDALOMÉRZŐ ELSŐDLEGES ÉRZŐ	
IDEGSEJTEK AKTIVITÁSÁBAN	173
6.6. A CB1 RECEPTOR KONSTITUTÍV EXCITATÓRIKUS	
HATÁST FEJT KI A TRPV1-ON	176
6.7. A GYULLADÁS JELENTŐSEN BEFOLYÁSOLJA AZ	
ANANDAMIDDAL KIVÁLTOTT, TRPV1 ÉS	
CB1 RECEPTOR ÁLTAL KÖZVETÍTETT	
FOLYMATOKAT A FÁJDALOMÉRZŐ	
ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN	179
6.8. AZ ANANDAMID ÁLTAL KIVÁLTOTT TRPV1	
AKTIVITÁS ALAPVETŐEN HOZZÁJÁRUL A	
GYULLADT HÚGYHÓLYAG	
AKTIVITÁSÁNAK NÖVEKEDÉSÉHEZ.	
ILLETVE A GYULLADÁSHOZ KAPCSOLODÓ	
FÁJDALOM KIALAKULÁSÁHOZ	182
6.9. 6.9. A CB1 RECEPTOR – ANANDAMID – TRPV1 ÁLTAL	-
KÖZVETÍTETT HATÁSOK AZ ELSŐDLEGES	
ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN MINT A KÖVETKEZŐ	
GENERÁCIÓS FÁJDALOMCSÖKKENTŐK	
POTENCIÁLIS CÉLPONTJAI	183
	100
7. ANYAGOK ES MÓDSZEREK	187
7.1. ÁLLATOK	187
7.2. AZ IN VIVO KÍSÉRLETEKBEN HASZNÁLT ANYAGOK	
ÉS MÓDESZEREK	187
7.2.1. CISZTOMETRIA	187
7.2.2. EGYÉBB <i>IN VIVO</i> BEAVAKTOZÁSOK	188
7.3. MINTAVÉTELI MÓDSZEREK ÉS A MINTÁK	
ELŐKÉSZÍTÉSE	188
7.3.1. MINTAVÉTEL ÉS A MINTÁK ELÖKÉSZÍTÉSE	
IMMUNHISZTOKÉMIAI FESTÉSHEZ ÉS	
ELEKTRONMIKROSZKÓPOS	
VIZSGÁLATOKHOZ	188
7.3.2. MINTAVÉTEL ÉS A MINTÁK ELÖKÉSZÍTÉSE	
IMMUNBLOT KÉSZÍTÉSÉHEZ	189
7.3.3. MINTAVÉTEL ÉS A MINTÁK ELÖKÉSZÍTÉSE PCR	
KÉSZÍTÉSÉHEZ	189
7.4. IN VITRO KISÉRLETEKBEN HASZNÁLT ANYAGOK ES	
MÓDSZEREK	189
7.4.1. ELSŐDELEGES ÉRZŐ IDEGSEJT KULTÚRA	
KÉSZÍTÉSE	189
7.4.2. ELEKTROFIZIOLÓGIA MÉRÉSEK	190
7.4.3. KOBALT FELVÉTEL MÉRÉSE	191
7.4.4. TRANSZMITTER FELSZABADULÁS MÉRÉSE	191
7.4.5. INTRACELLULÁRIS KÁLCIUM SZINT	

7.5. A SZÖVETMINTÁK ÉS KULTÚRMÉDIUMBAN	
NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ	
IDEGSEJTEK EGYÉBB FELDOLGOZÁSA	192
7.5.1. IMMUNHISZOKÉMIAI FESTÉS	192
7.5.2. IMMUNBLOT ÉS IMMUNPRECIPITÁCIÓ KÉSZÍTÉSE	192
7.5.3. PCR KÉSZÍTÉS	193
7.5.4. ELEKTRONMIKROSZKÓPIA	194
7.5.5. FLUORESZCENS <i>IN SITU</i> HIBRIDIZÁCIÓ	194
7.6. EGYÉB ELJÁRÁSOK	194
7.6.1. FOLYADÉK KROMATOGRÁFIA ÉS TÖMEG	
SPEKTROMETRIA	194
7.7. AZ ADATOK STATISZTIKAI ELEMZÉSE	195
<i>,</i>	
8. IRODALOMJEGYZĚK	196
8.1. AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT EREDETI ÉS	
ÖSSZEFOGLALÓ TUDOMÁNYOS	
KÖZLEMÉNYEIM JEGYZÉKE	196
8.2. AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT TUDOMÁNYOS	
KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	200

<u>1. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ EREDETI TUDOMÁNYOS</u> <u>FELISMERÉSEK</u>

- Az alacsony és magas hőküszöbű elsődleges érző idegsejtek felfedezése és a két sejttípus elkülönítése (Nagy és Rang, 1999a).
- Az alacsony küszöbű hőérzékenység és a kapszaicin érzékenység össszfüggésének a felfedezése egész sejtes szinten elsődleges érző idegsejtekben (Nagy és Rang, 1999a; Nagy és Rang, 1999b).
- Az alacsony küszöbű hőérzékenység és a kapszaicin érzékenység farmakológia és biofizikai jellemzőinek felsimerése elsődleges érző idegsejtekben (Nagy és Rang, 1999b).
- Az alacsony küszöbű hőérzékenység és a kapszaicin érzékenység különválásának felfedezése egyedi csatorna szinten elsődleges érző idegsejtekben (Nagy és Rang, 1999b).
- A CB1 receptor kifejeződésének felfedezése elsődleges érző idegsejtekben (Ahluwalia és munkatársai, 2000; Ahluwalia és munkatársai, 2002b; Veress és munkatársai, 2013).
- A TRPV1 és CB1 receptor jelentős együttes kifejeződésének a felfedezése elsődleges érző idegsejtekben (Ahluwalia és munkatársai, 2000; Chen és munkatársai, 2016).
- A FAAH kifejeződésének felismerése fájdalomérző elsődleges érző idegsejtekben (Lever és munkatársai, 2009).
- A NAPE-PLD kifejeződésének felfedezése fájdalomérző elsődleges érző idegsejtekben (Nagy és munkatársai, 2009a).

- A NAPE-PLD és TRPV1 közös kifejeződésének felfedezése fájdalomérző elsődleges érző idegsejtekben (Nagy és munkatársai, 2009a; Sousa-Valente és munkatársai, 2017).
- A kalciumra nem érzékeny anandamid szintetizáló enzimek kifejeződésének felfedezése fájdalomérző elsődleges érző idegsejtekben (Varga és munkatársai, 2014).
- A kalciumra nem érzékeny anandamid szintetizáló enzimek és a TRPV1 közös kifejeződésének felfedezése fájdalomérző elsődleges érző idegsejtekben (Varga és munkatársai, 2014).
- Elsődleges érző idegsejtekből NAPE adagolással kiváltható anandamid felszabadulás felfedezése (Varga és munkatársai, 2014).
- Elsődleges érző idegsejtekből az intracelluláris kalcium szint megemelésével kiváltható anandamid felszabadulás felfedezése (Varga és munkatársai, 2014).
- Az anandamid kettős (TRPV1 közvetített excitatórikus és CB1 receptor közvetített gátló) hatásának felfedezése elsődleges érző idegsejtekből (Ahluwalia és munkatársai, 2003a).
- A CB1 receptor aktiválása által kiváltott TRPV1 aktivitás gátlásának felfedezése elsődleges érző idegsejtekben (Santha és munkatársai, 2010a; Mahmud és munkatársai, 2009).
- A gyulladásos medátorok által az anandamid TRPV1-on kifejtett excitatórikus hatása megemelésének felfedezése elsődleges érző idegsejtekben (Singh Tahim és munkatársai, 2005).
- A gyulladásos medátorok által a CB1 receptor közvetített gátló hatás csökkenésének a felfedezése elsődleges érző idegsejtekben (Soneji és munkatársai, 2010).

- Az elsődleges érző idegsejtekben szintetizálódó anandamid TRPV1 közvetített excitatórikus hatásának felfedezése (Varga és munkatársai, 2014; Chen és munkatársai, 2016).
- A CB1 receptor TRPV1-t szenzitizáló hatásának a felfedezése elsődleges érző idegsejtekben (Chen és munkatársai, 2016).
- A CB1 receptorok és a TRPV1 molekulák térbeli eloszlásának felfedezése elsődleges érző idegsejtekben (Chen és munkatársai, 2016).
- A CB1 receptor és TRPV1 fehérje fehérje kapcsolatának felfedezése elsődleges érző idegsejtekben (Chen és munkatársai, 2016).
- Az anandamid TRPV1 által közvetített hólyagaktivitást és gerincvelői fájdalom információ feldolgozást kiváltó hatásának a felfedezése (Dinis és munkatársai, 2004b).
- A hólyaggyulladás anandamid szintézist kiváltó hatásának a felfedezése (Dinis és munkatársai, 2004b).
- Az anandamid szerepének felismerése a hólyaggyulladást kísérő fokozott hólyagaktivitás létrejöttében (Dinis és munkatársai, 2004b).

2. <u>ÖSSZEFOGLALÁS</u>

Munkám célja az endovanilloid és endokannabinoid rendszerek, különös tekintettel a két rendszer fő receptora, az egyes típusú kannabinoid (CB1) receptor és a kapszaicin receptor (TRPV1), illetve ezek közös endogén aktivátora, az anandamid, szerepének jobb megértése volt az elsődleges fájdalomérző idegsejtek aktivitásának, így a perifériás szövetek megbetegedéseihez kapcsolódó fájdalmak szabályozásában. Munkám során jellemeztem a TRPV1 és a CB1 receptor kifejeződési mintázatát mind a hátsó gyöki dúcban található, mind a tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben. Jellemeztem továbbá a TRPV1 és a CB1 receptor működését a tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. Szintén leírtam az anandamidot szintetizáló és hidrolizáló enzimek kifejeződését az elsődleges érző idegsejteken. A kifejeződési mintázatok eredménye azt mutatja, hogy az elsődleges fájdalomérző idegsejtek egy jelentős hányadában egy endovanilloid-endokannabinoid autokrin jelzőrendszer található. A kifejeződési mintázatok eredményei azt is megmutatták, hogy a CB1 receptor és TRPV1 fehérje-fehérje kapcsolatban van a sejtek egy jelentős részében. A két receptor működésére vonatkozó adataim alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a fehérje-fehérje kapcsolaton keresztül, a CB1 receptor alapaktivitása által közvetítet TRPV1 szenzitizáció jön létre, amely hozzájárul a TRPV1 érzékenységéhez, beleértve a TRPV1 anandamid iránti érzékenységét. A két receptor működésére vonatkozó vizsgálataimmal kimutattam továbbá, hogy az anandamidnak a kulúrmédiumban növesztett elsődleges érző idegsejtekhez történő adagolása koncentráció függő módon vagy a CB1 receptoron keresztül gátolja a transzmitter felszabadulást és a TRPV1 aktivitást, vagy aktiválja a TRPV1-t. Kimutattam továbbá, hogy a gyulladásos mediátorok jelentősen megemelik az anandamid excitatórikus potenciálját és hatásosságát, illetve csökkentik a CB1

receptor által közvetített gátlást. Eredményeim megmutatták, hogy az elsődleges érző idegsejtek által szintetizált anandamide, az exogén anandamiddal szemben, csak TRPV1 közvetített serkentő hatást vált ki. Az *in vitro* eredményekkel összhangban, kimutattam, hogy a patkány húgyhólyag peritóneális felszínére adagolt anandamid koncentráció- és TRPV1 függő módon fokozza a gerincvelői fájdalominger feldolgozását és a hólyag ürítési reflexét, valamint hogy az anandamid lebontás gátlása is megnöveli a hólyag ürítési aktivitását. Az *in vivo* kísérletekben kimutattam továbbá, hogy a hólyag gyulladása a hólyag TRPV1 függő ürítési reflex aktivitásának növekedésével párhuzamosan szignifikánsan megemeli a hólyag anandamid tartalmát, és hogy a megemelkedett anandamid szintnek az anandamid lebontásának gátlásával történő további emelése tovább növeli az excitációt. Ezen eredmények összességében hozzájárulnak az endovanilloid és endokannabinoid rendszerek működésének teljesebb megértéséhez az elsődleges fájdalomérző idegsejtekben, és a két rendszer analgetikus potenciálja felhsználását célzó új stratégia kidolgozásához.

3. <u>BEVEZETÉS</u>

Az elsődleges érző idegsejtek alapvető feladata a központi idegrendszer értesítése a szöveteinket érő hatásokról, illetve a szöveteink aktuális állapotáról (Nagy, 2004). Ezen hatások egy része veszélyezteti a szöveteink épségét. Az ilyen szöveti épséget veszélyeztető hatások, illetve a szövetek sérülése és a sérülést követő gyulladásos reakciók, az elsődleges érző idegsejtek úgynevezett fájdalomérző csoportját aktiválva, a szövetek további sérülését megelőző reakciókat, többek között akút vagy hosszantartó fájdalmat váltanak ki (Nagy, 2004). Így, a szövetek további sérülését megelőző reakciók, köztük a fájdalmak kialakulása is az elsődleges érző idegsejtek érzékenységétől és információ továbbító képességétől függ. Ezeket a jellemzőket ugyanakkor egy sor tényező, többek között az ingereket idegi elektromos jelekké (membrán potenciál változás) átalakító molekulák (transzdúcerek) kifejeződése és poszt-transzlációs módosulása, valamint a sejteken kifejeződő egyéb receptorok és ion csatornák aktivitása határozza meg (Nagy, 2004).

Az utóbbi néhány évtized munkája egy sor transzdúcert azonosított az elsődleges érző idegsejteken. Ezen transzdúcerek mellett az elsődleges érző idegsejteken kifejeződő nagyszámú receptort, valamint a transzdúcerek és receptorok közötti molekuláris kapcsolatot is megismertünk. A kutatási eredmények rávilágítottak, hogy a transzdúcer molekulák közül az endovanilloid rendszerhez tartozó tranziens receptor potenciál ioncsatorna (TRP), V alcsalád (V), egyes tag, (TRPV1) alapvető fontosságú a fájdalmak egyik fő fájtájának, az égő fájdalomnak (hő hiperalgézia) a kialakulásában (Caterina és munkatársai, 1997; Caterina és munkatársai, 2000; Davis és munkatársai, 2000). A kutatási eredmények arra is rávilágítottak, hogy a különböző receptorok és ion csatornák közül az endokannabinoid rendszerrel kapcsolatos molekulák aktivitása jelentősen képes

csökkenteni laboratoriumi állatokban a fájdalomérző elsődleges érző idegsejtek akút aktiválásával kiváltott fájdalom reakciókat (Calignano és munkatársai, 1998; Kress és Kuner, 2009; Clapper és munkatársai, 2010). A kutatási eredmények továbbá azt is valószínűsítették, hogy az endovanilloid és endokabbaninoid rendszerek között jelentős molekuláris átfedés, valamint az egymás működését befolyásoló hatás létezhet (Di Marzo és munkatársai, 2001; Di Marzo és munkatársai, 2002; Toth és munkatársai, 2009). A jelen értekezés tudományos tevékenységem azon eredményei alapján készült amelyek az endovanilloid és endokabbaninoid rendszerek szerepét és azoknak a szerepeknek a molekuláris hátterét vizsgálták az elsődleges érző idegsejtek aktivitásának szabályozásában.

3.1. AZ ENDOVANILLOID REDSZER

Az endovanilloid rendszer egyike a legrövidebb ideje ismert jelátvivő rendszereknek, hiszen a rendszer alapító tagját a TRPV1-t vagy kapszaicin receptor-t 1997-ben különítették el és állapították meg az aminósav sorrendjét (Caterina és munkatársai, 1997). Mint valamennyi jelátvivő rendszer, az endovanilloid rendszer is receptor(ok)ból, a receptor(ok)hoz kötődni és azon kötődésen keresztül biológiai hatást kiváltani képes endogén molekulá(k)ból, és az ez(eke)t az endogén molekulá(ka)t szintetizáló és lebontó enzim(ek)ből, valamint az endogén molekulákat transzportáló molekulákból áll. Ugyan a TRPV alcsaládban 6 molekula található (TRPV1-6), az endovanilloid rendszerhez, mai ismereteink szerint, ezek közül csak egy receptor, a kapszaicin receptor tartozik (Nilius és Owsianik, 2011). A receptor elkülönítése és aminósav sorrendjének megállapítása óta egy sor, a kapszaicin receptort aktiválni képes endogén molekulát ismertek fel (Sousa-Valente és munkatársai, 2014a). Ezen aktivátorok közül az első, a legismertebb, és talán a

dc_1608_18

legfontosabb az anandamid (N-arachidon-etanol-amine) (Devane és munkatársai, 1992; Zygmunt és munkatársai, 1999). Ugyan a többi ismert endovanilloid molekulának is jelentős szerepe lehet a kapszaicin receptor aktiválásában (Sousa-Valente és munkatársai, 2014a), a jelen értekezés elsősorban a TRPV1 csatornának és ennek az endovanilloid molekulának a viszonyát vizsgálja.

Ugyan az endovanilloid redszer egyes elemei megtalálhatóak mind az idgrenszeren belül, mind az idegrendszeren kivül, legjellemzőbb előfordulásuknak az idegrendszeren belüli kifejeződésüket, azon belül is a fájdalomérző hátsó gyöki neurokon történő kifejeződésüket tartják (Caterina és munkatársai, 1997; Mezey és munkatársai, 2000; Nagy és munkatársai, 2004; Nagy és munkatársai, 2008; White és munkatársai, 2011b; Sousa-Valente és munkatársai, 2014a; Nagy és munkatársai, 2014; Toth és munkatársai, 2005; Cristino és munkatársai, 2008; Tominaga és munkatársai, 1998; Nagy és munkatársai, 2009b). Ennek a kifejeződési mintázatnak megfelelően, ugyan az endovanilloid rendszert egy sor fiziológiás és patológiás folyamattal hozzák kacsolatba, a legfontosabb funkiójának mégis a perifériás szövetek és a perifériás idegrendszer közötti, illetve az idegrendszeren belüli, a fájdalom érzésekkel kapcsolatos jelátvitelt tekintik (Nagy és munkatársai, 2014; White és munkatársai, 2011b; Sousa-Valente és munkatársai, 2014a; Nagy és munkatársai, 2004; Naziroglu, 2015; Nagy és munkatársai, 2009b). Bár a kapszaicin receptor később tárgyalandó érzékenysége a 42°C feletti hőmérsékletre predesztinálja az endovanilloid rendszert, azon belűl is elsősorban a kapszaicin receptort, a magas hőmérséklet által kiváltott akút, úgynevezett nociceptív fájdalomérzés kialkulásának elindítására, a TRPV1 génhiányos egerek viselkedése ezt a szerepet nem igazolta (Caterina és munkatársai, 2000; Davis és munkatársai, 2000). TRPV1 génhiányos egereken végzett magatártás vizsgálatok eredményei ezzel szemben azt mutatják,

hogy az endovanilloid rendszeren keresztül történő jelátvitel elsődleges eredménye a patológiás, elsősorban gyulladásos körülmények között kialakuló hő hiperalgézia létrejötte (Caterina és munkatársai, 2000; Davis és munkatársai, 2000). Ennek megfelelően a jelen értekezés az endovanilloid rendszer szerepét elsősorban a gyulladásos körülmények között kialakuló fájdalom/hő hiperalgézia létrejöttének kontexusában tárgyalja.



3.1.1. A KAPSZAICIN RECEPTOR

3.1. ábra. A TRPV1 molekula szerkezete és a kapszaicin csatorna múködését befolyásoló legfontosabb aminósavak helyzete. Rövidétések: AEA anandamid, ATP adenozintrifoszfát, CaM kálmodulin, NO nitrikoxid, PIP₂ foszfatidílinozitolbiszfoszfát, PKA proteinkináz A, PKC proteinkináz C, RTX resiniferatoxin. (Nagy és munkatársai, 2014).



A kapszaicin receptor, a tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatorna

3.2. ábra. A TRPV1 ioncsatorna szalagdiagrmja. A sárga, piros, zöld és kék színek a négy TRPV1 molekulát jelölik. Az (a) és a (b) ábra oldalnézet. A (c) ábra az S4-S6 szakaszt mutatja A TRP doménnel és a pórust alkotó helikális szakaszokkal. A (d) ábra a csatorna alulnézeti képét mutatja. (Liao és munkatársai, 2013).

családhoz tartozó fehérje, melyet aminósav sorrendje, illetve szerkezeti tulajdonságai alapján a TRP család vanilloid nevű alcsaládjába sorolunk (Caterina és munkatársai, 1997; Nagy és munkatársai, 2014). A kapszaicin receptor az első emlősökben felfedezett TRP receptor és egyben a TRP receptor család vanilloid (V) alcsaládjának alapító tagja.

A kapszaicin receptort négy TRPV1 molekula (3.1. ábra) építi fel amelyek szimmetrikus formában helyezkednek el oly módon, hogy a csatorna pórusa a molekula közepén található (3.2. ábra) (Kedei és munkatársai, 2001; Liao és munkatársai, 2013). A TRPV1 molekulák a homotetramérek mellett, heterotetraméreket is képesek létrehozni elsősorban a V alcsaládhoz tartozó más TRP molekulával (Smith és munkatársai, 2002; Fischer és munkatársai, 2014). A kapszaicin recepor egy sor más fehérjével fehérje komplexet, úgynevezett transduciszómokat hoz létre a sejtmembánban (3.3. ábra; (White és munkatársai, 2011b: Nagy és munkatársai, 2008; Nagy és munkatársai, 2009b: http://www.trpchannel.org/summaries/TRPV1). Ezek a transduciszómok a kapszaicin



3.3 ábra. A TRPV1 transzduciszóm néhány korábban megismert komponense.Továbbiprotein-proteininterakciókahttp://www.trpchannel.org/summaries/TRPV1és a címen találhatók. Rövidítések:TrkA: tirozinkináz A receptor, PtdIns(4,5)2foszfatidílinozitolbiszfoszfát, PLC-γfoszfolipáz-gamma, PKC-εproteinkinázC-epszilon, PKA (RI) proteinkinázszabályozó alegység. (Nagy és munkatársai, 2009b).

receptor mellett, a receptor aktiválásának következtében létrejövő kalcium beáramlás detektálásában, a megemelkedett kalcium szint további intracelluláris jellé történő átalakításában és az ezeket a molekulákat összekapcsoló strukturális molekulákból állnak (Vennekens és munkatársai, 2002; Rathee és munkatársai, 2002; Morenilla-Palao és munkatársai, 2004; Docherty és munkatársai, 1996; Stein és munkatársai, 2006).

3.1.1.1. A KAPSZAICIN RECEPTORT ALKOTÓ TRPV1 MOLEKULÁK SZERKEZETE

A human TRPV1 molekula 839, míg a patkány TRPV1 molekula 838 aminósavat tartalmaz (Caterina és munkatársai, 1997). A TRPV1 molekula becsült tömege 95kD (Caterina és munkatársai, 1997). A TRPV1 molekulát négy szerkezeti elemre szokás bontani: az N- és C-terminális szakaszokra, amelyek intracellulárisan helyezkednek el, illetve a közöttük elhelyezkedő membránban található részre, amelyet tovább lehet osztani az N-terminális szakaszt követő négy helikális szakaszt (S1-S4, 3.1. ábra), és az azokat összekötő néhány aminósavat tartalmazó rövid szakaszokat tartalmazó részre, valamint az S4 és S6 hélixeket és az őket összekötő és az ioncsatorna pórusának kialakításában résztvevő szakaszra (pórus formáló szakasz) (3.1. ábra).

3.1.1.1.1. AZ N-TERMINÁLIS SZAKASZ

Az N-terminális szakasz legjellemzőbb része az úgynevezett ankyrin ismétlődési domén (ARD), amely hat, 33 aminósavból álló ankyrin ismétlődést tartalmaz. Más TRPV molekulák analógiájára az ARD feltehetően a tetramérek összeállásában játszhat szerepet (Arniges és munkatársai, 2006; Erler és munkatársai, 2004). Ezen kívül, a TRPV1 molekula ARD szakasza kötőhelyeket tartalmaz a kálmodulin és ATP részére, amelyek hozzájárulnak a kapszaicin receptor egyik legjellegzetesebb tulajdonságának, a receptor deszenzitizációjának (*vide infra*) a szabályozásához (Koplas és munkatársai, 1997). Az N-terminális szakasz felelős a csatorna intracelluláris alkalikus pH által történő aktiválásában is (Dhaka és munkatársai, 2009). Az N-terminális szakasz szintén tartalmaz aminósavakat, amelyek a receptor két fontos exogén aktivátorának, a kapszaicinnek és a resiniferatoxinnak (RTX) a megkötésében játszanak szerepet (Jordt és Julius, 2002; Jung és munkatársai, 2002). Ezeken kívül, az N-terminális szakasz a csatorna válaszadó képességének a szabályozásában résztvevő aminósavak egy csoportját is tartalmazza, amelyek poszt-transzlációs módosulások révén vagy csökkentik vagy növelik a csatorna válaszadó képességét, aktivitását (Bhave és munkatársai, 2002; Jeske és munkatársai, 2006; Mohapatra és munkatársai, 2003; Zhang és munkatársai, 2005). Az N-terminális szakasz legfontosabb részeit és azoknak a csatorna aktiválásában, válaszadó képességének és aktivitásának szabályozásában játszott szerepét az 3.1. ábra mutatja.

3.1.1.1.2. AZ C-TERMINÁLIS SZAKASZ

A C-terminális szakasz legjellemzőbb szerkezeti eleme az úgynevezett TRP box, amely a TRPV1 molekulák tetramérré történő összeállásáért felelős, illetve résztvesz a csatorna funkciójának szabályozásában (Garcia-Sanz és munkatársai, 2004; Valente és munkatársai, 2008; Garcia-Sanz és munkatársai, 2007). A Cterminális szakasz többi része is elsősorban a csatorna funkciójának szabályozásában vesz részt (Vlachova és munkatársai, 2003; Numazaki és munkatársai, 2003; Kwak és munkatársai, 2000; Jung és munkatársai, 2002; Grycova és munkatársai, 2008; Brauchi és munkatársai, 2007). A csatorna hőérzékenysége is, legalább is részben, a C-terminális szakasztól függ (Brauchi és munkatársai, 2007). A C-terminális szakasztól szakasztól függ (Brauchi és munkatársai, 2007). A C-terminális szakasz, hasonlóan az N-terminalis szakaszhoz, szintén tartalmaz egy sor olyan aminosavat amelyek post-transzlációs módosulása megváltoztatja a csatorna válaszadó képességét, aktivitását (Bhave és munkatársai, 2003; Mohapatra és Nau, 2003; Numazaki és munkatársai, 202). Az C-terminális szakasz legfontosabb részeit és azoknak a csatorna aktiválásában, válaszadó képességének és aktivitásának szabályozásában játszott szerepét is az 3.1. ábra mutatja.

3.1.1.1.3. A PÓRUS ALKOTÁSÁBAN RÉSZTVEVŐ SZAKASZ

A pórus alkotásában résztvevő szakaszt a membránban található S5 és S6 hélixek és az őket összekötő úgynevezett pórus hurok (P-hurok) alkotják (3.1. ábra). Ennek megfelelően ez a szakasz egy sor olyan aminosavat tartalmaz, amelyek meghatározzák a csatorna kapuzási és ion átjárhatósági tulajdonságát. Az L681 és az Y671 aminosavak a csatornán áthaladó ionok nagyságát szabályozzák, míg az L681 a 7Å-nél nagyobb ionokat szűri ki, addig az Y671 a 2Å-él nagyobb ionokat nem engedi át (Salazar és munkatársai, 2009). A D646 a pórus extracelluláris szájánál járulhat hozzá egy negatív töltésű gyűrű létrehozásához, amely biztosítja a kationok magas koncetrációját a csatorna bejáratánál (Garcia-Martinez és munkatársai, 2000).

A csatorna extracelluláris szájánál az E600 aminosav járulhat hozzá a receptor különböző aktivátorokkal szembeni érzékenységéhez savas pH esetén (Jordt és munkatársai, 2000). Ugyanakkor, az E648 aminósav lehet a felelős a csatorna sav érzékenységéért (Jordt és munkatársai, 2000). Az S5 hélix fontos aminosavakat tartalmaz (CRAC aminosav sorrend) amelyeken keresztül a koleszterin befolyásolja a csatorna működését (Jansson és munkatársai, 2013; Morales-Lazaro és munkatársai, 2013; Picazo-Juarez és munkatársai, 2011; Santha és munkatársai, 2010b; Szoke és munkatársai, 2010). A csatorna hőérzékenységéhez a pórus alkotásában résztvevő szakasz is hozzájárul, mert a 613-627 aminosavak módosításával a csatorna elveszíti hőérzékenységét (Yang és munkatársai, 2010). Ezen kívül, a csatorna többi részéhez hasonlóan, a pórus alkotásában résztvevő szakasz is tartalmaz aminosavakat, amelyek

aktivitását (Veldhuis és munkatársai, 2012; Jahnel és munkatársai, 2001). A pórus alkotásában résztvevő szakasz legfontosabb részeit és azoknak a csatorna aktiválásában, válaszadó képességének és aktivitásának szabályozásában játszott szerepét is az 3.1. ábra mutatja.

3.1.1.1.4. S1-S4 HÉLIXEK ÁLTAL ALKOTOTT SZAKASZ

Az S1-S4 szakasz legfontosabb része az úgynevezett kapszaicin zseb amely az S2 és S3 hélixeket összekötő intracellularis rövid szakasz és az S4 hélix között helyezkedik el. Ezen a szakaszon belül a kapszaicin kötődése elsősorban az Y511, T550, S512 és az R491 aminosavaktól függ (Jordt és Julius, 2002; Gavva és munkatársai, 2004). Fontos megjegyezni, hogy az Y511A mutáció hatására a kapszaicin receptor elveszíti válaszoló képességét anandamidra (Jordt és Julius, 2002). A kapszaicin érzékenységen túl, az S1-S4 szakasz szintén tartalmaz aminosavakat (S512, R491 és V538) amelyek a csatorna proton érzékenységéhez járulnak hozzá (Jordt és Julius, 2002; Ryu és munkatársai, 2007). A csatorna feszültségfüggőségéhez hozzájárul az S4 és az S4-t és S5-t összekötő intracellularis szakasz (Voets és munkatársai, 2007). Hasonlóan a csatorna többi részéhez, az S1-S4 szakasz is tartalmaz olyan aminosavakat, amelyek post-transzlációs módosulása szabályozza a csatorna válaszadó képességét, aktivitását (Rathee és munkatársai, 2002; Numazaki és munkatársai, 2002). Ismét, az 3.1. ábra mutatja az S1-S4 szakasz legfontosabb részeit és ennek a szakasznak az aminosavait amelyek a csatorna aktiválásában, és válaszadó képességének szabályozásában játszanak fontos szerepet.

3.1.1.2. AZ KAPSZAICIN RECEPTOR AKTIVÁTORAI ÉS A RECEPTOR AKTIVITÁS SZABÁLYOZÓI

A kapszaicin receptor aktivátorait és a receptor aktivitás szabályozóit két nagy csoportba oszthatjuk: közvetlen aktivátorok, amelyek a kapszaicin receptoron kifejtett hatásuk útján emelik a csatorna nyitási valószínűségét, illetve közvetett aktivátorok, amelyek egy másik molekulán kifejtett hatásuk útján aktiválják a kapszaicin receptort.

3.1.1.2.1. KÖZVETLEN AKTIVÁTOROK ÉS AKTIVITÁS SZABÁLYOZÓK

A közvetlen aktivátorok és aktivitás szabályozó molekulák ismét két csoportba oszthatók: molekuláris és nem molekuláris aktivátorok és a receptor aktivitást szabályozó molekulák.

3.1.1.2.1.1. KÖZVETLEN AKTIVÁTOR ÉS AKTIVITÁST SZABÁLYOZÓ MOLEKULÁK

A közvetlen aktivátor és a receptor aktivitást szabályozó molekulák további két csoportot alkotnak, a szervezetben termelődő és megtalálható endogén és a más szervezetekben termelődő exogén molekulák.

3.1.1.2.1.1.1. EXOGÉN MOLEKULÁK

A receptor prototípusos exogén aktivátora a csípős paprika csípősségéért felelős transz-8-metíl-N-vanillíl-6-noneamid, vagy közismert nevén a kapszaicin (Tresh, 1876), amelyet a TRPV1 szelektív és specifikus agonistájának tartanak.



A kapszaicin 50%-os hatásos koncentrációja a kapszaicin receptoron 700nM körül van (Oh és munkatársai, 1996; Caterina és munkatársai, 1997). A kapszaicin, a

vanilloidok közé tartozó vegyület. A természetben a kapszaicinen kívül egy sor egyéb vanilloid található, amelyek különböző hatékonysággal képesek aktiválni a kapszaicin receptort. Ezek közé tartozik a piperin, piperinoil-piperidin (bors), eugenol (szegfűszeg és fahéj), gingerol (gyömbér) illetve az RTX (Euphorbia resinifera). A vanilloidokon kívül egy sor más különböző növények által szintetizált molekula is képes a kapszaicin receptor aktiválására. Ezek között a legismertebbek az allicin (fokhagyma), az allíl-isothiocianát (torma, mustár) és a kámfor (Cinnamomum camphora) (Everaerts és munkatársai, 2011; Macpherson és munkatársai, 2005; Xu és munkatársai, 2005; Ohta és munkatársai, 2007). A növényi eredetű molekulák mellett néhány állatok által szintetizált molekula is képes a kapszaicin receptort aktiválni. Ilyenek a vanillotoxin peptidek amelyek a tarantula mérgében fordulnak elő (Siemens és munkatársai, 2006). Egy sor mesterségesen szintetizált édesítő (pl. szaharin, aszpartám) és néhány só (CySO₄, ZnSO₄, FeSO₄) is képes a kapszaicin receptort aktiválni (Riera és munkatársai, 2007). Végül, az etil alkohol feltehetően a kapszaicin receptoron közvetlenül hatva lecsökkenti a kapszaicin receptor hőküszöbét 42°C-ről 37°C alá, így aktiválva a receptort a testhőmérséklet által (Trevisani és munkatársai, 2002).

3.1.1.2.1.1.2. ENDOGÉN MOLEKULÁK

A kapszaicin receptort közvetlen kötődés révén aktiváló és a receptor aktivitást szabályozó endogén molekulák egy része 18 vagy 20 szénatommal rendelkező telítettlen zsírsavakat tartalmaznak. Ezekben a molekulákban a zsírsavak különböző egyéb csoportokhoz, mint a glicerin, etanolamin vagy dopamin, kapcsolódnak. A kapszaicin receptort közvetlenül aktiváló endogén molekulákra általánosságban jellemző a szelektivitás és specificitás hiánya.

dc_1608_18

A kapszaicin receptor elsőként felismert endogén aktivátora az anandamid, amelyet korábban mint a kannabinoid 1 (CB1) receptor aktivátorát ismerték (Devane és munkatársai, 1992; Zygmunt és munkatársai, 1999; Matsuda és munkatársai, 1990). Amint fentebb említettem, a jelen értekezés elsősorban a TRPV1 csatornának és ennek az endovanilloid molekulának a viszonyát vizsgálja. Így a fontosságára való tekintettel, az anandamid részletes bemutatására az anandamidot szintetizáló és lebontó enzimekkel valamint az anandamidot transzportáló molekulával együtt a <u>BEVEZETÉS</u> egy külön fejezetében (**3.3.1**.) kerül sor.

A 20 szén atomot tartalmazó arachidonsavval rendelkező anandamid mellett, a 18 szénatomos olajsavval rendelkező N-oleoylethanolamine (OEA), amelyet mint a jóllakottság érzését közvettő és a peroxiszóma proliferátor aktivált alfa (PPARα) receptort aktiváló molekulát ismertek fel, is aktiválja a kapszaicin receptort (Ahern, 2003; Fu és munkatársai, 2003; Movahed és munkatársai, 2005). Ugyan az anandamid és az OEA hasonló hatásossággal képes a kapszaicin receptort aktiválni, az OEA hatás létrejöttéhez a kapszaicin receptor foszforilációja szükséges (Ahern, 2003). Így az OEA nagy valószínűséggel a kapszaicin receptornak a gyulladásos körülmények közötti aktiválásában játszhat szerepet, amikor a gyulladás során felszabaduló úgynevezett gyulladásos mediátorok, a saját receptoruk aktiválása útján foszforilálják a TRPV1-t (lásd később a 3.1.1.2.2. fejezetben).

Az arachidonsav domapinnal alkotott vegyülete (NADA), ami az idegrendszer számos területén megtalálható, szintén aktiválja a kapszaicin receptort, és bőrbe injektálva hő hiperalgéziát vált ki, ami a kapszaicin receptor aktiválásától függ (Huang és munkatársai, 2002).

Számos lipoxigenáz (LOX) termék, mint néhány hidroperoxi eikozatetraénsav (HPETE) és leukotrién is képes a kapszaicin receptor aktiválására (Huang és

munkatársai, 2006bé Hwang és munkatársai, 2000). A HPETE-k közül a 5-(S)-, a 12-(S)- és a 15-(S)-HPETE, míg a leukitriének közül a leukotrién 4 a leghatásosabb kapszaicin receptor aktivátor (Hwang és munkatársai, 2000). A LOX termékek megtalálhatóak a gyulladásos szövetekben, és a LOX termékek bőrbe injektálása hő hiperalgéziát vált ki (Levine és munkatársai, 1986). Fontos megjegyezni, hogy a 12-(S)-HPETE, amely a leghatásosabb kapszaicin receptort aktiválni képes LOX termék, a receptort kifejező hátsó gyöki idegsejtekben is termelődik az egyik legfontosabb gyulladásos mediátor, a bradikinin hatására. Ezt a hatást a bradikinin, a bradikinin 2 receptor aktiválásával indítja el, amelyet a foszfolipáz A2 által létrehozott arachidonsav megjelenése majd annak a LOX általi oxidálása követ (Shin és munkatársai, 2002).

A lizofoszfatid sav (LPA) egyrészt a foszfolipid bioszintézis kiinduló pontja, másrészt mint jelátvivő molekula részt vesz egy sor sejt- és szervezet szintű folyamat szabályozásában (Ueda és munkatársai, 2013). Az LPA által közvetített sejtek közötti jelátvitel túlnyomó része az LPA receptorok aktiválásán keresztül jön létre (Noguchi és munkatársai, 2009). Azonban az LPA a TRPV1 C-terminális szakaszához kötődve képes a kapszaicin receptor aktiválására is és ezen a hatáson keresztül fájdalom válaszokat kiváltani (Brauchi és munkatársai, 2007; Nieto-Posadas és munkatársai, 2011).

A kapszaicin receptorhoz közvetlenül kötődő endogén molekulák egy része önmaga nem képes a csatorna nyitási valószínűségét megemelni, azonban egy másik aktivátor által megnövelt csatorna nyitási valószínűséget képes tovább növelni, tehát képes a csatornát szenzitizálni, illetve a másik aktivátor hatásosságát megnövelni, vagy éppen ellenkezően, képes a csatornát deszenzitizálni. Ezek közül a molekulák közül kiemelkedik a fosztaditilinozitol-4-5-difoszfát (PIP2), amely a sejtmembrán

fontos alkotóeleme, és egy sor sejtszintű folyamatban résztvevő másodlagos jelátvivő molekula (DiNitto és munkatársai, 2003; Dietrich és munkatársai, 2005; Cho és Stahelin, 2005; Lemmon, 2003). A PIP2 legalább három módon képes a kapszaicin receptor aktivitását szabályozni: közvetlen kötődés útján (Brauchi és munkatársai, 2007; Chuang és munkatársai, 2001; Prescott és Julius, 2003), a PIP2 foszfolipáz C által készült bomlástermékeken, a diacilglicerinen (DAG) és inozitol-1-4-5trifoszfáton keresztül (Woo és munkatársai, 2008) valamint a TRP csatornák működését szabályozó, a sejtmembránban található foszfoinozitol interaktív szabályzón keresztül (Kim és munkatársai, 2008). A PIP2 közvetlen kötődése külön figyelmet érdemel, mert pontos szerepe vitatott. Az első vizsgálatok azt mutatták, hogy a PIP2 közvetlen kötődése gátolja TRPV1 aktivitást (Chuang és munkatársai, 2001). Az újabb eredmények azonban a közvetlen kötődés által létrejövő szenzitizáló hatást, illetve a PIP2 eltávolításával létrejövő aktivitás csökkenést (deszenzitizáció) mutatják (Liu és munkatársai, 2005; Lishko és munkatársai, 2007; Stein és munkatársai, 2006). Ugyan a DAG közvetlen kötődésén keresztül hozzá tud járulni a kapszaicin receptor aktiválásához, a DAG által kiváltott proteinkináz C (PKC) aktivitás a TRPV1 foszforilálásán keresztül szenzitizálni is képes a receptort (Bhave és munkatársai, 2003; Woo és munkatársai, 2008).

Az adenozintrifoszfát (ATP) a sejtek energia ellátása mellett fontos jelátviteli funkciót is betölt a két purinerg receptor, a P2X ion csatornák illetve a G protein kapcsolt P2Y receptorok aktiválása útján (Burnstock és Kennedy, 2011; Burnstock, 2008; Burnstock, 2009). Azonban az ATP a TRPV1 N- és C-terminálisain található kötőhelyekhez is képes kötődni és a kalmodulinnal (CaM) történő kölcsönhatás útján szabályozni tudja a receptor aktivitását (Lishko és munkatársai, 2007; Kwak és munkatársai, 2000). A CaM a kapszaicin receptoron keresztül a sejtbe bejutó

kalciumot megkötve szabályozza a receptor aktivitását. A TRPV1 két CaM kötőhellyel rendelkezik. Az N-terminális szakaszon található kötőhelyért az ATP-vel versenyez. Míg a kalcium-CaM komplex kötődés gátolja (deszenzitizálja), addig az ATP kötődés szenzitizálja a kapszaicin receptort, illetve meggátolja a receptor deszenzitizációját (Rosenbaum és munkatársai, 2004; Lishko és munkatársai, 2007; Koplas és munkatársai, 1997). A CaM C-terminálishoz történő kötődésének hatása kevésbé tisztázott (Rosenbaum és munkatársai, 2004; Numazaki és munkatársai, 2003).

Hasonlóan az eddig tárgyalt enodvanilloid molekulákhoz, a nitrikoxid (NO) is egy sor egyéb funkcióban vesz részt (Culotta és Koshland, 1992). A NO a TRP csatornák cisztein aminosavait képes nitrozilálni, és így elősegíteni a kalcium sejtbe jutását (Yoshida és munkatársai, 2006).

Az A-kinázt horgonyzó protein (AKAP) a transzduciszóm része, amely a protein kinázokat (protein kináz A (PKA), PKC) köti a complex többi molekulájához. Az AKAP79 a kapszaicin receptor komplexhez tartozik (Zhang és munkatársai, 2008). Ennek megfelelően, az AKAP79 kötődés gátlása a TRPV1 foszforiláció gátlásán keresztül képes a kapszaicin receptor aktivitás csökkentésére (Jeske és munkatársai, 2009; Fischer és munkatársai, 2013).

Egy másik állvány fehérje, a β-arresztin-2 egy foszfodieszterázt (PDE4D5) köt a TRPV1-hoz amely a kapszaicin receptor PKA általi foszforilációját csökkenti, így csökkentve a csatorna aktivitását (Por és munkatársai, 2012).

A tubilin feltehetően mind az N- mind a C-terminális szakaszon kötődik a TRPV1-hoz, és elősegíti a TRPV1 homotetramér, tehát a kapszaicin receptor létrejöttét (Goswami és munkatársai, 2004; Lainez és munkatársai, 2010; Storti és munkatársai, 2012).

3.1.1.2.1.2. NEM MOLEKULÁRIS KÖZVETLEN AKTIVÁTOROK ÉS AKTIVITÁS SZABÁLYOZÓK

A kapszaicin receptorra három nem molekuláris közvetlen aktivátor/aktivitást szabályozó hat: a protonok, a 42°C feletti hőmérséklet és a depolarizáció.

3.1.1.2.1.2.1. PROTON

A kapszaicin receptort az alacsony pH aktiválja, illetve képes a más aktivátorok hatását megnövelni (Tominaga és munkatársai, 1998; Jordt és munkatársai, 2000). Érdekes módon, a protonok mellett a protonok eltávolítása is a kapszaicin receptor aktiválását okozza (Dhaka és munkatársai, 2009).

3.1.1.2.1.2.2. HŐ

Egy sor TRP csatorna érzékeny a hőmérséklet változásra (Nilius és Appendino, 2011). Az első ilyen molekula amit megismertünk a kapszaicin receptor (Caterina és munkatársai, 1997). A kapszaicin receptor hőküszöbe 42°C körül van, az e feletti hőmérséklet megemeli a csatorna nyitási valószínűségét (Caterina és munkatársai, 1997; Nagy és Rang, 1999b). A csatorna hőérzékenységéért felelős aminosavak a TRPV1 molekula C-terminálisán illetve pórus kialakításában résztvevő szakaszán vannak (Yang és munkatársai, 2010; Brauchi és munkatársai, 2007). Azonban az nem tisztázott, hogy a hőmérséklet emelése hogyan vezet a csatorna nyitási valószínűség növekedéséhez.

3.1.1.2.1.2.3. DEPOLARIZÁCIÓ

dc_1608_18

A TRPV1 molekulának a 4. hélixe nem tartalmaz pozitív töltésű aminosavakat (Caterina és munkatársai, 1997). Ugyanakkor a csatornán átfolyó áram erős kifelé mutató rektifikációval rendelkezik (Caterina és munkatársai, 1997; Nagy és Rang, 1999b), ami arra utal, hogy a pozitív töltésű aminosavak hiánya ellenére a kapszaicin receptor feszültségfüggő. Valóban, Nilius és munkatársai meggyőzően kimutatták a kapszaicin receptor feszültségfüggőségét (Voets és munkatársai, 2007). A kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a feszültség-aktivitás görbe az egyéb módon nem aktivált receptor esetén a fiziológiásan nem releváns depolarizációs régióban található, az 50%-os aktivitást kb +100mV-os mebránpotenciálnál éri el. A feszültségfüggőség pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert, de úgy tűnik, hogy a pozitív töltésű aminosavak hiánya ellenére az S4 és az S4-t és S5-t összekötő intracellularis szakasz lehet érte felelős (Voets és munkatársai, 2007).

3.1.1.2.2. KÖZVETETT AKTIVÁTOROK ÉS AKTIVITÁS SZABÁLYOZÓK

A kapszaicin receptort aktiválásában és az aktivitás szabályozásában egy sor molekula vesz részt oly módon, hogy saját receptorukon hatva az intracelluláris másodlagos hírvivő rendszert aktiválják, amelyek aztán a TRPV1 poszt-transzlációs módosulásához vezetnek, és a kapszaicin receptor nyitási valószínűségét ezen poszttranszlációs változásokon keresztül megemelik. A közvetett aktivátorok és aktivitás szabályozók gyulladásos mediátorok, így ez az aktiválási mód különösen fontos a gyulladásos fájdalom/hő hiperalgézia kialakulásában. Ugyan a különböző közvetett aktivátorok és aktivitás szabályozók különböző másodlagos jelzőrendszereket aktiválnak, így különböző aminósavakon hozhatnak létre poszt-transzlációs változásokat, ezek a változások mind a hőküszöb jelentős csökkenéséhez vezetnek, 42°C-ról a testhőmérséklet alá (Tominaga és munkatársai, 1998; Bhave és

munkatársai, 2003; Huang és munkatársai, 2006b; Numazaki és munkatársai, 2002; Cesare és munkatársai, 1999; Cesare és McNaughton, 1996; Huang és munkatársai, 2006a; Moriyama és munkatársai, 2005; Lopshire és Nicol, 1998; Premkumar és Ahern, 2000; Studer és McNaughton, 2010; Vellani és munkatársai, 2001). A közvetett aktivátorok és aktivitás szabályozók által aktivált másodlagos jelzőrendszeri molekulák közül legfontosabbak a PKA, a PKC, a kalcium kálmodulin függő kináz II (CaMKII) és a kálcineurin, míg a gyulladásos mediárok közül a legfontosabbak, amelyek a kapszaicin receptoron keresztül (is) aktiválják a neuronokat a bradikinin (BK), a prosztaglandin E2 (PGE2) tripszin, triptáz és az idegnövekdési faktor (NGF) (Rathee és munkatársai, 2002; Bhave és munkatársai, 2003; Bhave és munkatársai, 2002; Cesare és McNaughton, 1996; Huang és munkatársai, 2006b; Cesare és munkatársai, 1999; Jung és munkatársai, 2004; Moriyama és munkatársai, 2003; Lopshire és Nicol, 1998; Mahmud és munkatársai, 2009; Numazaki és munkatársai, 2002; Studer és McNaughton, 2010).

3.1.1.3. A KAPSZAICIN RECEPTOR AKTIVÁTORAI ÉS AKTIVITÁS SZABÁLYOZÓI HATÁSÁNAK INTEGRÁLÁSA

A kapszaicin receptor aktivátorainak és aktivitás szabályozóinak fenti rövid összefoglalásából látszik, hogy a kapszaicin receptor egy polimodális receptor, azaz, egy sor különböző modalitású (p.l. kémiai, hő) ingerre válaszol. Az összefoglalásból az is látszik, hogy a különböző ingerek, bár a receptor különböző részein hatnak, egymás hatását felerősítik, azaz a kapszaicin receptor integrálja a különböző ingereket. Az integrálás mechanizmusára jelenleg két elképzelés létezik. Nilius és munkatársai azt feltételezik, hogy valamennyi inger a csatorna feszültségfüggőségét tolja negatív membránpotenciál értékek felé (Nilius és Voets, 2005). Valóban, mind a kapszaicin, mind a hő jelentős mértékben balra tolja a csatorna feszültség aktivitás görbéjét. Azonban, a kapszaicin is és a poszt-transzlációs változások is csökkentik a csatorna hőküszöbét. Tehát, amíg a feszültségfüggőség valóban lehet a csatorna nyitáshoz vezető közvetlen változás, addig a közvetlenül aktiváló molekulák valamint a poszt-transzlációs módosulások a csatorna nyitását mind a hőköszöb csökkentése mind a feszültségfüggés balra tolásával érhetik el. Az alternatív hipotézis szerint, a csatorna minden molekuláris szenzora közvetlenül hat a kapuzási mechanizmusra, azonban minden egyes molekuláris szenzor minden más molekuláris szenzorral közvetlen kapcsolatban áll (Latorre és munkatársai, 2007).

3.1.2. A KAPSZAICIN RECEPTOR AKTIVÁLÁSÁNAK HATÁSA

A kapszaicin receptor aktiválása bármelyik aktivátorával fiziológiás membránpotenciál mellett nettó befelé irányuló áramokat indukál (Wood és munkatársai, 1988; Caterina és munkatársai, 1997). Ioncserés kísérletek eredményei



3.5. ábra. Kapszaicin indukált befelé folyó áram egy tápfolyadékban növesztett hátsó gyöki dúcsejtben. Teljes sejtes feszültség zár mérés, fiziológiás ion koncentrációk, membrán potencial -60mV. (Nagy és Rang, 1999b).

azt mutatják, hogy az áram nem szelektív kation áram, amely jelentős kalcium komponenssel rendelkezik (Nagy és Rang, 1999b; Caterina és munkatársai, 1997). Amint említettem, az áram jelentős kifelé irányuló rektifikációt mutat ami a kapszaicin receptor fentebb tárgyalt feszültségfüggőségére utal (Caterina és munkatársai, 1997; Voets és munkatársai, 2007; Nagy és Rang, 1999b). A kapszaicin receptor áramai hátterében a csatorna nyitási valószínűségének növekedése áll (Caterina és munkatársai, 1997; Nagy és Rang, 1999b) (3.6. ábra). A kapszaicin receptor által közvetített áramok a hátsó gyöki idegsejteken kifejeződő és a heterológ

rendszerekben kifejeződő receptorok esetében azonosak, bár a különböző aktivátorok hatásossága és hatása nagymértékben függ a rendszertől. Fontos megjegyezni, hogy az áramok az idegsejtekben depolarizációt, akciós potenciál generálást és transzmitter felszabadulást váltanak ki (Caterina és munkatársai, 1997; Ahluwalia és munkatársai, 2003a; Sousa-Valente és munkatársai, 2014a).

Capsaicin 10msec

3.6. ábra. TRPV1-közvetített egyedi csatorna áram. Egyedi csatorna áramok egy tápfolyadékban növesztett hátsó gyöki dúcsejtből kiszakított insideout membránfoltban -60mV membránpotenciál és fiziológiás só koncentrációk mellett. (Nagy és Rang, 1999b).

A kapszaicin receptor válaszadási képességét a TRPV1 foszforilációja alapvetően meghatározza (Rathee és munkatársai, 2002; Bhave és munkatársai, 2003; Bhave és munkatársai, 2002; Cesare és McNaughton, 1996; Huang és munkatársai, 2006b; Cesare és munkatársai, 1999; Jung és munkatársai, 2004; Moriyama és munkatársai, 2003; Lopshire és Nicol, 1998; Mahmud és munkatársai, 2009; Numazaki és munkatársai, 2002; Studer és McNaughton, 2010; Nagy és munkatársai, 2009b; Nagy és munkatársai, 2014; Sousa-Valente és munkatársai, 2014a; Urban és munkatársai, 2011; White és munkatársai, 2011b). Így a PKA, PKC vagy a CaMKII gátlása csökkenti a kapszaicinnel kiváltott válaszokat. Ebben a kontextusban kell tárgyalni a kapszaicin receptor által közvetített válaszok egyik legfontosabb és legismertebb tulajdonságát, a már fentebb említett deszenzitizációt, ami a receptor hosszú ideig tartó vagy ismételt aktiválása során lép fel. A deszenzitizáció kalcium függő (Koplas és munkatársai, 1997) és a folyamat hátterében a kalciumot megkötő CaM által aktivált foszfatáz, a calcineurin áll (Docherty és munkatársai, 1996), amely defoszfirilálja a kapszaicin receptort, így csökkentve a kapszaicin receptor
aktiválásával kiváltott válaszok nagyságát (Nagy és munkatársai, 2009b; Nagy és munkatársai, 2014; Sousa-Valente és munkatársai, 2014a; Urban és munkatársai, 2011; White és munkatársai, 2011b; Docherty és munkatársai, 1996; Koplas és munkatársai, 1997). Ezzel ellentétes hatást, szenzitizációt vált ki a kinázok, például a PKA, PKC vagy a CaMKII aktiválása (Nagy és munkatársai, 2009b; Nagy és munkatársai, 2014; Sousa-Valente és munkatársai, 2014a; Urban és munkatársai, 2011; White és munkatársai, 2011b; Bhave és munkatársai, 2002; Bhave és munkatársai, 2003; Bonnington és McNaughton, 2003). Míg a PKA és PKC aktiválás a gyulladásos mediátorok hatására jöhet létre a szenzoros neuronokban, addig a CaMKII aktiválását a kapszaicin receptoron beáramló kalciummal hozzák kapcsolatba. Azonban itt megjegyzendő az a fontos különbség, hogy míg a PKA és PKC aktiválás szinte azonnali szenzitizációt okoz, addig a CaMKII aktiválása utáni szenzitizáció csak néhányszor 10 perc után mutatkozik (Nagy és munkatársai, 2009b; Nagy és munkatársai, 2014; Sousa-Valente és munkatársai, 2014a; Urban és munkatársai, 2011; White és munkatársai, 2011b; Bhave és munkatársai, 2002; Bhave és munkatársai, 2003; Bonnington és McNaughton, 2003).

3.2. AZ ENDOKANNABINOID RENDSZER

Az endokannabinoid rendszer egyike a leggyakrabban kifejeződő jelzőrendszereknek az idegrendszerben. A jelen értekezés az endokannabinoid rendszerhez tartozó molekulák közül a CB1-es receptor és az anandamid szabályozó hatását vizsgálja a hátsó gyöki neuron érzékenységére és aktivitására, így a <u>BEVEZETÉS</u> is ezeknek a molekuláknak illetve az anandamid bioszintézisében és lebontásában szerepet játszó molekulákra koncentrál.

3.2.1. AZ ENDOKANNABINOID RENDSZER RECEPTORAI

Az endokannabinoid rendszerhez hagyományosan két receptort sorolnak, a CB1-es és CB2-es receptorokat. Az endokannabinoidok illetve az endokannabinoidokkal rokon endogén agonistákra adott válaszaik alapján azonban a GPR55, a TRPV1, gamma-aminóvajsav A (GABA_A), a PPARα és PPARγ receptorokat mint az endokannabinoid rendszerhez kapcsolódó receptorokat szokták említeni (Ligresti és munkatársai, 2016; Iannotti és munkatársai, 2016).

3.2.1.1. A CB1 RECEPTOR

A CB1 receptor, a másik hagyományosan kannabinoid receptornak tartott CB2 receptorhoz hasonlóan a G protein kapcsolt receptorok rodopszin alcsaládjához tartozik (Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Goodfellow és Glass, 2009; Dalton és munkatársai, 2009). Ennek megfelelően, mindkét receptor 7 transzmembrán szegmenssel és az azokat összekötő 3 extracelluláris és 3 intracelluláris szakasszal rendelekzik. Míg az N terminális extracellularisan, a C terminális intracellulárisan található.

A CB1 és CB2 receptorok alapvetően különböznek szöveti kifejeződésükben. Míg a CB1 receptor elsősorban a neuronokban fejeződik ki, és sokan idegrendszeri, központi kannabinoid receptorként hivatkoznak rá, a CB2 receptor elsődleges kifejeződése az immunrendszerben illetve a vérképző rendszerben van, így sokan perifériás kabbaninoid receptorként hivatkoznak rá (Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Goodfellow és Glass, 2009; Dalton és munkatársai, 2009). Ugyan a CB1 receptor leggyakoribb előfordulása valóban a központi idegrendszer egyes területein található, egyes idegrendszeren kívüli szövetekben, mint a gasztrointesztinális rendszer és az ivarszervek egyes sejtjein, a zsírsejteken, és vázizomsejteken is kifejeződik (Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Goodfellow és Glass, 2009; Dalton és munkatársai, 2009). Az idegrendszeren belül, a CB1 receptor leggyakoribb előfordulása a hippocampus, kisagy, bazális ganglionok egyes neuronjain található (Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Goodfellow és Glass, 2009; Dalton és munkatársai, 2009). A szomatoszenzoros ingerületfeldolgozásban résztvevő neuronok közül, a CB1 receptor a gerincvelő egyes gátló sejtjein illetve a fájdalomérző hátsó gyöki idegsejteken található (Ahluwalia és munkatársai, 2000; Ahluwalia és munkatársai, 2002b; Pernia-Andrade és munkatársai, 2009). A CB1 receptor, a széleskörű kifejeződésének megfelelően, egy sor idegrendszeri és nem idegrendszeri funkcióban vesz részt. Az idegrendszeri funkciók közül megemlítednő, a tanulás, a hangulat szabályozás, étvágy szabályozás, mozgás és a fájdalom érzés kialakulásának szabályozása (Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Goodfellow és Glass, 2009; Dalton és munkatársai, 2009).

A CB1 receptorra hagyományosan mint a gátló G_{i/o} proteinekhez kapcsolt receptorra hivatkoznak. Ezeken a G proteineken keresztül a CB1 receptor aktiválása

dc_1608_18

az adenílcikláz aktivitást gátolja, illetve egyes mitogén aktivált protein kinázokat (MAPK) aktiválja (Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Goodfellow és Glass, 2009; Dalton és munkatársai, 2009). A Go proteinen keresztül a CB1 receptor aktiválása csökkenti a feszültségfüggő, elsősorban az N- és P/Q típusú kalcium csatornák aktivitását, és ezek kereszül az idegsejtekből történő transzmitter felszabadulást (Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Goodfellow és Glass, 2009; Dalton és munkatársai, 2009). Ezen kívül, a CB1 receptor aktiválása a Gi/o proteinen keresztül növeli a befelé rektifikáló kálium csatornák aktivitását (Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Goodfellow és Glass, 2009; Dalton és munkatársai, 2009). Ezek a közvetlen hatások összességükben csökkentik a idegsejtek aktivitását és válaszadó képességét (Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Goodfellow és Glass, 2009; Dalton és munkatársai, 2009). A CB1 receptor aktiválása útján kiváltott Gi/o protein aktivitás ezen azonban túlmegy, hiszen a cAMP szint csökkenése csökkenti a PKA aktivitást, így csökkent egy sor foszforilációs folyamatot. A cAMP szint csökkenése továbbá csökkenti a cAMP válasz elem kötő faktor (CREB) aktivitását ami transzkripciós változásokkal jár. Egyes MAPK-ok aktiválása szintén egy sor intracelluláris jelzőrendszer működését illetve transzkripciós folyamatokat befolyásolja. Így a CB1 receptor aktiválása a neuronokban a transzmitter felszabadulás szabályozása mellett befolyásolja az idegsejtek úgynevezett szenzitizációját, amely egy aktivitás függő neuronális aktivitás és válszadási képesség növekedés, amely az ingerületátadásban szerepet játszó receptorok, ion csatornák és egyéb molekulák poszt-transzlációs módosulásától valamit a transzkripciós változásoktól függ (Elman és Borsook, 2016; Ganguly és Poo, 2013; Edelmayer és munkatársai, 2014; Todd, 2010; Sandkuhler, 2009).

dc_1608_18

A $G_{i/o}$ proteinen kívül, a CB1 receptor azonban kapcsolódhat más G proteinekhez is, így a G_s -hez és G_q -hoz (Ligresti és munkatársai, 2016; Iannotti és munkatársai, 2016; Goodfellow és Glass, 2009; Dalton és munkatársai, 2009; Di Marzo és munkatársai, 2015; Glass és Felder, 1997; Lauckner és munkatársai, 2005). Figyelemre méltó, hogy a $G_{0/o}$ -n és s/ G_q -n keresztüli jelátadás az aktivátor koncentációjától függően dinamikusan változhat. Míg alacsony koncentráció mellett a $G_{0/o}$ hatás addig magas koncentráció mellett a s/ G_q hatás dominál (Ligresti és munkatársai, 2016; Khajehali és munkatársai, 2015).

A G proteinek mellett a CB1 receptor aktivitás más fehérjék aktivitását is megváltoztathatja közvetlen módon hiszen a CB1 receptor egy sor más fehérjéhez is kapcsolódik. Így, a CB1 receptor homodimérek mellett heterodiméreket is alkothat. A heterodimérekben résztvevő másik molekula többek között lehet az endokannabinoid rendszerhez kapcsolódó GPR55, vagy az adenosine A2a, vagy dopamine D2 receptor (Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Di Marzo és munkatársai, 2015; Dalton és munkatársai, 2009).

A CB1 receptor fontos jellemzője, hogy ligand kötődés nélkül is mutat aktivitást (Iannotti és munkatársai, 2016; Di Marzo és munkatársai, 2015; Abadji és munkatársai, 1999; Dalton és munkatársai, 2009). Egy sor CB1 antagonista egyes biológiai hatását ennek az alapaktivitásnak a gátlása magyarázza (Abadji és munkatársai, 1999; Dalton és munkatársai, 2009; Di Marzo és munkatársai, 2015; Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016). Az alapaktivitás molekuláris háttere nem ismert.

3.2.2. A CB1 RECEPTOR AKTIVÁTORAI

Hasonlóan a TRPV1-hoz, a CB1 receptort is mind exogén, mind endogén molekulák képesek aktiválni. Az exogén aktivátorok nagy része természetes eredetű, míg kisebb hányaduk szintetikus.

3.2.2.1. A CB1 RECEPTOR TERMÉSZETES EXOGÉN AKTIVÁTORAI

A CB1 receptor természetes exogén aktivátorait elsősorban a *cannabis sativa* egyes részeiben található vegyületek alkotják. A több mint száz vegyület közül a legismertebb és egyben a leghatékonyabb a Δ9-hidrokannabinol (Δ9-THC, 3.7. ábra).



kannabinoid receptort aktiválja (Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016). A Δ 9-THC az egyedüli természetes CB1 receptor aktivátor amely hatékonyan képes kiváltani a klasszikus kannabinoid tetrád összes tünetét: a katalepsziát, a hipokinéziát, hipotermiát és a csökkent érzékenységet a fájdalmat kiváltó ingerekre (Little és munkatársai, 1988; Ligresti és munkatársai, 2016). Hasonlóan más kannabinoid receptor agonistákhoz, a Δ 9-THC is képes a CB1 és CB2 receptorok mellett más, a kannabinoid molekulákra adott válaszaik alapján az endokannabinoid rendszerhez kapcsolódó molekulán is kifejteni hatását (Ligresti és munkatársai, 2016).

A másik részletesen vizsgált *Cannabis sativa* vegyület, a kannabidinol (CBN). A CBN, hasonlóan a Δ 9-THC-hez, szintén egy sor fiziológiás hatást vált ki, de a Δ 9-THC-vel szemben nem tudja létrehozni a tetrád egyetlen komponensét sem, ami megfelel a CB1 receptorhoz mutatott alacsony affinitásának (Long és munkatársai, 2010). A CBN a hatását feltehetően a CB1 receptor gyenge gátlásával, az anandamid hidrolízis gátlásával illetve ismét az endokannabinoid rendszerhez kapcsolódó más molekulákon kifejtett hatásán keresztül válthatja ki (Ligresti és munkatársai, 2016).

Egyéb *Cannabis sativa* származékok amelyeknek a CB1 receptoron kifejtett hatását vizsgálták többek között a Δ9-tetrahidrokannabivarin, a kannabivarin, a Δ9kannabinolik sav és a kannabinolik sav (Ligresti és munkatársai, 2016). Ezen származékok közül néhány agonista, mások antagonista (Δ9-tetrahidrokannabivarin) hatást fejtenek ki a CB1 receptoron (Ligresti és munkatársai, 2016), míg más receptorokon ellenkező hatást válthatnak ki.

3.2.2.2. A CB1 RECEPTOR ENDOGÉN AKTIVÁTORAI

Az endokannabinoid rendszer klasszikus endogén aktivátorai az anandamid és a 2-arachidonil-glicerin (2-AG) (Devane és munkatársai, 1992; Di Marzo és munkatársai, 2015; Mechoulam és munkatársai, 1995). A 20 szénatomos arachidonsav mellett azonban rövidebb zsírsavak, mint az olajsav vagy pálmasav is kapcsolódhatnak mind az etílaminhoz mind a glicerinhez. Míg ezek a molekulák is mutatnak bioaktivitást, hatásukat nem a kannabinoid receptorokon keresztül fejtik ki (Dalle Carbonare és munkatársai, 2008; Schmid és munkatársai, 2002). Ugyanakkor, a bioszintézisük és hidrolízisük az anandamiddal és 2-AG-al azonos enzimeket útján történik, így képesek az anandamid illetve a 2-AG hatását módosítani (Schmid és munkatársai, 2002; Re és munkatársai, 2007; Rodriguez de Fonseca és munkatársai, 2001; Ligresti és munkatársai, 2016). A CB1 receptor endogén aktivátorainak tárgyalása során másik három rokon vegyületet is meg kell említeni, a O-arachidonetanolamin-t (virodhamin), az N-arachidon-dopamin-t (NADA) és a 2-arachidonilglicerinéter-t (noladin éter) (Hanus és munkatársai, 2001; Bisogno és munkatársai, 2000; Porter és munkatársai, 2002).

3.3. AZ ENDOVANILLOID ÉS ENDOKANNABINOID RENDSZEREK KÖZÖS ENDOGÉN AKTIVÁTORAI

Az endogén aktivátorok közül több, mint az anandamid, noladin éter, NADA és a 2-AG is képes aktiválni mind a CB1 receptort mind a TRPV1-t (Devane és munkatársai, 1992; Zygmunt és munkatársai, 1999; Duncan és munkatársai, 2004; Fezza és munkatársai, 2002; Chu és munkatársai, 2003; Di Marzo és munkatársai, 2004; Bisogno és munkatársai, 2000; Toth és munkatársai, 2003; Mechoulam és munkatársai, 1995; Golech és munkatársai, 2004). Ezek közül munkám során az anandamidot vizsgáltam, ezért a közös aktivátorok közül a <u>BEVEZETÉS</u> további része az anandamidra korlátozódik.

3.3.1. AZ ANANDAMID

Az arachidonsav származék anandamidot a CB1 receptor endogén aktivátoraként ismerték fel (3.8. ábra) (Devane és munkatársai, 1992). A kapszaicin



3.8. áb szerkezet	ora. te.	Az	ananda	amid	kéi	mia	i
receptor	klón	ozása	után	néhá	ny	évv	el
Zygmunt	és	munl	ctársai	(Zyg	mur	nt	és
munkatár	sai.	19	999)	me	ggv	őző	en

bizonyították, hogy az anandamid a TRPV1-t is aktiválja. Jelenlegi ismereteink szerint az anandamid a CB1 receptoron és a TRPV1-on kívül egy sor más fehérjéhez is képes kötődni és azokon keresztül biológiai hatást kiváltani (Goodfellow és Glass, 2009). Biológiai hatás szempontjából, ezek közül a többi kannabinoid receptort, egyes feszültségfüggő kalcium (T, P, L) és nátrium csatornát, a TASK-1 kálium csatornát, egyes nikotin típusú acetikolin receptorokat, a glicin receptort és az N-metíl-D-aszpartát típusú glutamát receptort kell megemlíteni (Goodfellow és Glass, 2009).

Nagyfokú promiszkuitása ellenére, az anandamid legfőbb receptorainak a CB1 receptort és a TRPV1-t tartják. Míg a CB1 receptoron az anandamid kötőhely a receptor extracelluláris felszínén, a TRPV1-on a csatorna intracellularis részén található (Lynch és Reggio, 2005; Padgett és munkatársai, 2008; Jordt és Julius, 2002; Shao és munkatársai, 2016).

3.3.1.1. AZ ANANDAMID BIOSZINTÉZISE



Egyetértés mutatkozik abban, hogy az anandamid, a legtöbb sejtek közötti jelátvivő molekulával ellentétben, nem raktározódik vezikulákban, hanem a szükségleteknek megfelelően szintetizálódik ("*synthesis on*

anandamid 3.9 ábra. Az feltételezett szintézis enzimatikus útvonalai. N-*Rövidítések:* NAPE: arachidon-foszfatidíletanolamin, NAPE-PLD: Narachidon-foszfatidíletanolamin foszfolipáz D, ABHd4: alfa-béta hidroláz 4, sPLA2G1b: lbcsoportú szolubilis fosfolipáz A2, gpanandamid: glicerofoszfoanandamid. GDE1: glicerofoszfodiészter foszfodiészteráz 1, PLC: foszfolipáz C, p-anandamid: foszfo-anandamid, *PTPn22*: csoportú szolubilis 1b fosfolipáz A2, Inpp5: Inozitol foszfatáz. (Varga 5 és munkatársai, 2014).

demand[»]). Az anandamid szintézis képességét egy sor emlős sejtben és szervben kimutatták (Bisogno és Di Marzo, 2007; Maccarrone és Finazzi-Agro, 2002; Sugiura és munkatársai, 1996; Schmid és munkatársai, 1997a; Schmid és munkatársai, 1997b; Di Marzo és munkatársai, 1994; Carrier és munkatársai, 2004; Walter és munkatársai, 2002; Varga és munkatársai, 2014; van der Stelt és munkatársai, 2005; Vellani és munkatársai, 2008). dc_1608_18

Az anandamid szintézis feltételezhetően több enzimatikus útvonalon történik (Di Marzo és munkatársai, 1994; Hussain és munkatársai, 2017) (3.9 ábra). Ezen útvonalak nagy része kalciumra nem érzékeny, míg egy útvonal, a *N*acilfoszfatidiletanolamin foszfolipáz D (NAPE-PLD) által katalizált útvonal, kalcium érzékeny, mégpedig úgy, hogy a NAPE-PLD-t a kalcium szint emelkedése aktiválja (Okamoto és munkatársai, 2004; Okamoto és munkatársai, 2007; Sun és munkatársai, 2004; Liu és munkatársai, 2006; Simon és Cravatt, 2008; Hussain és munkatársai, 2017).

Minden anandamid szintetizáló útvonal kiinduló szubsztrátja a NAPE (20:4), amely kalciumfüggő módon szintetizálódik (3.9 ábra) (Cadas és munkatársai, 1996; Di Marzo és munkatársai, 1994; Hussain és munkatársai, 2017; Liu és munkatársai, 2006; Okamoto és munkatársai, 2004; Okamoto és munkatársai, 2007; Sun és munkatársai, 2004; Simon és Cravatt, 2008). A NAPE szintézise feltehetően több Naciltranszferáz révén történik (Hussain és munkatársai, 2017). McFarland és munkatársai (McFarland és munkatársai, 2006) adatai alapján feltételezzük, hogy az anandamid szintézis a membrán caveolin gazdag területén (CRM domén) megy végbe. A NAPE szintézis is nagy valószínűséggel ezen a területen történik (McFarland és munkatársai, 2004). A jelen értekezés szempontjából fontos, hogy a hátsó gyöki idegsejtek egyes csoportja(i) képes(ek) anandamidot szintetizálni mind kalcium függő mind kalcium független útvonalokon keresztül (Vellani és munkatársai, 2008; van der Stelt és munkatársai, 2005; Varga és munkatársai, 2014).

3.3.1.2. AZ ANANDAMID TRANSZPORTJA

Általánosan elfogadott, hogy az extracelluláris hosszú láncú zsírsavak fehérjék közvetítésével kerülnek a citoplazmába (Abumrad és munkatársai, 1998). Ugyan

vannak olyan eredmények amelyek az anandamid passzív diffúziójára utalnak, az adatok nagy része az aktív transzport lehetőségét támogatja. Így általánosan elfogadott, hogy a többi hosszú láncú zsírsavhoz hasonlóan az anandamid transzportjában is proteinek vesznek részt (Yates és Barker, 2009). A proteinekhez köthető aktív transzport módjára több elképzelés született. Míg az egyik elképzelés szerint a transzportot egy a membránban elhelyezkedő protein molekula végzi, egy alternatív elképzelés szerint egy az anandamid hidrolízisét végző zsirsavamiddehidrogenáztól (FAAH) független citoplasma molekula végzi az anandamid citoplazmába szállítását (Di Marzo és munkatársai, 1994; Hillard és munkatársai, 1997; Fegley és munkatársai, 2004; Ortega-Gutierrez és munkatársai, 2004; Ligresti és munkatársai, 2004; Rakhshan és munkatársai, 2000). Ezekkel az elképzelésekkel ellentétben, illetve inkább ezeket az elképzeléseket kiegészítve, McFarland és munkatársai (McFarland és munkatársai, 2004; McFarland és munkatársai, 2006) adatai a caveolákhoz kötött endocitózis részvételét valószínűsítik az anandamid transzportjában. Újabb vizsgálatok eredményei alapján azonban valószínűsíthető, hogy az anandamid transzportjában a passzív diffúzió és a proteinekhez köthető folyamatok egymást kiegészíve vesznek részt (Fowler, 2012). Így az anandamid egyrészt a koncentráció grádiensnek megfelelőn mozoghat a membránon keresztül. Ezt a diffúziót a koleszterin gyorsíthatja. A koncentráció grádiens fenntartásában az anandamidot kötő citoplazmatikus molekulák illetve az anandamid hidrolizisét elsősorban végző FAAH aktivitás tarthatják fenn. A citoplazma molekulák egyike lehet a Piomelli és munkatársai (Fu és munkatársai, 2011) által megtalált FAAH-szerű anandamid transzporter molekula (FLAT), amely a faah gén egy splice variáns fehérje terméke. A FLAT képes megkötni az anandamidot, de nem rendelkezik hidroláz aktivitással. A passzív diffúzió mellett

azonban az anandamid membránon történő átjutásban a caveolákhoz kötött dynamin 2 is részt vehet, hiszen ezen molekula kifejeződésének gátlása csökkenti az anandamid fluoreszcens festékhez kötött analógjának a sejten belüli felhalmozódását (McFarland és munkatársai, 2008). Másrészt a dynamin 2 kifejeződésének gátlása nem csökkenti a radioaktív anandamide intracellularis felhalmozódását ami arra utal, hogy más fehérjék is részt vehetnek a folyamatban (McFarland és munkatársai, 2008).

3.3.1.3. AZ ANANDAMID LEBONTÁSA

Az anandamid szintéziséhez hasonlóan, az anandamid lebontása is több úton keresztül történhet (Maccarrone, 2017; Piscitelli és Di Marzo, 2012). A fő útvonalnak tartott hidrolízisért a FAAH felelős, amely az anandamidot arahichidonsavvá és etanolaminná bontja (Cravatt és munkatársai, 1996; Giang és Cravatt, 1997; Cravatt és munkatársai, 2001; Cravatt és Lichtman, 2004; Cravatt és munkatársai, 2004). A FAAH-nak jelenleg két variánsát a FAAH1-t és FAAH2-t ismerjük, amelyek azonban nem minden fajban talalhatók meg együtt (Wei és munkatársai, 2006). Az anandamid affinitása a FAAH1-hez nagyobb mint a FAAH2-höz (Wei és munkatársai, 2006). Az N-acíletanolamin sav amidáz (Ueda és munkatársai, 1999) szintén képes az anandamidot arahichidonsavvá és etanolaminná alakítani, azonban ez az útvonalnak kisebb jelentőséggel bírhat mint a FAAH útvonal, legalább is a FAAH útvonal épsége esetén. A hidrolízis mellett az anandamid átalakítása oxidáció útján is végbemehet. Ebben a folyamatban a lizíl oxidáz (LOX) enzimek közül az 5-LOX, a 12-LOX és a 15-LOX, citokróm oxidáz (COX) enzimek közül a COX-2, valamint a citokróm p450 monooxigenáz vesz részt elsősorban (Maccarrone, 2017; Piscitelli és Di Marzo, 2012). Az oxidálás útján hatástalanított anandamid, különösen a COX-2 által oxidált vegyületek (prostamidok) fontosak lehetnek más lipid mediátorok képzésében, így

további biológia folyamat elindításában és fenntartásában (Maccarrone, 2017; Piscitelli és Di Marzo, 2012).

3.4. AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJT

3.4.1. AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJT JELLEMZŐI

3.4.1.1. AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJT MORFOLÓGIAI TULAJDONSÁGAI

A hátsó gyöki idegsejtek a perifériás idegrendszerhez tartozó neuronok, amelyek a mind a szomatikus, mind a zsigeri szöveteket érő hő, mechanikai, és kémiai ingerek felfogására, azoknak elektromos jelekké történő átalakítására és a jeleknek a központi idegrendszerbe juttatására specializálódott idegsejtek. Így, az hátsó gyöki idegsejtek alapvető feladata, a központi idegrendszer értesítése a perifériás szövetekben történő eseményekről. Azonban az hátsó gyöki idegsejtek mintegy fele nem csak a perifériás szövetek és a központi idegrendszer kommunikációjában, így a központi idegrendszeri válaszok kidolgozásának elindításában, hanem a perifériás patológiás folyamatok alakításában is szerepet játszik (*vide infra*) (Nagy, 2004).

A testi és zsigeri szöveteket beidegző hátsó gyöki idegsejtek nagy többségének sejtteste a hátsó gyöki dúcokban található. A többi neuron teste az V., VII., IX. és X. agyidegek érző dúcaiban helyezkednek el. A sejtek egyetlen rövid nyúlványa egy a perifériás szövetek, illetve egy másik, a gerincvelő hátsó szarva felé futó nyúlványra (központi nyúlvány) oszlik. Míg a perifériás nyúlvány a perifériás idegek útján, a központi nyúlvány a hátsó gyökéren keresztül jut a perifériás szövetekhez illetve a gerincvelőbe. A perifériás nyúlványok a sejtek további morfológia tulajdonságaitól illetve funkciójától függően (*vide infra*) vagy érző végkészülékekben vagy látszólag szabadon végződnek a különböző szövetekben. A központi nyúlványok ismét a sejtek további morfológia tulajdonságaitól illetve funkciójától függően a gerincvelő hátsó szarvának különböző lamináiban végződnek (Nagy, 2004).

Az hátsó gyöki idegsejtek sejtjei vagy kis átmérőjűek és erősen bazofilek vagy nagy átmérőjűek és kevésbé bazofílek. A nyúlványok is kétfélék, vagy nagy átmérőjűek és vastag mielinhüvellyel rendelkeznek, vagy kis átmérőjűek és vékony mielinhüvellyel vannak körbevéve, vagy mielinhüvely nélküliek. A nagy átmérőjű és vastag mielinhüvellyel rendelkező rostok a periférián az érző végkészülékekben, míg a gerincvelőben elsősorban a hátsó szarv mélyebb (III-V) lamináiban végződnek. Ezzel ellentétben, a kis átmérőjű és vékony mielinhüvellyel rendelkező rostok a periférián szabadon, míg a gerincvelőben elsősorban a felületes laminákban (I-II) végződnek (Nagy, 2004).

3.4.1.2. AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJT FIZIOLÓGIAI TULAJDONSÁGAI

A nyúlványok átmérőjének és a mielinhüvelyük vastagságának megfelelően az akciós potenciálok különböző sebességgel haladnak mind a perifériás idegben mind a hátsó gyökérben. Így a vezetési sebességek különbözősége miatt Aβ, Aδ és C névvel



3.9. ábra. Összetett akciós potenciál. Az összetett akciós potenciált a patkány nervus ischiadicus ingerlésvel váltottuk ki. Az elvezetés a L5 hátsó gyökérnek szívó elektródába helyezésével történt. Az egyes komponenseket a megfelelő betűk jelölik. (Nagy és Woolf, 1996).

által vezetett összetett akciós potenciálokat lehet a regisztrátumokon látni (3.9. ábra). Ezek alapján A β (vezetési sebesség: 35-75m/sec), A δ (5-35m/sec) és C (0.5-2m/sec) rostokat különböztetünk meg.

dc_1608_18

Kombinált elektrofiziológiai mérések és morfológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a nagy átmérőjű kevésbé bazofil sejtekhez gyors vezetésű (Aβ) nagy átmérőjű és vastag mielinhüvellyel rendelkező nyúlványok tartoznak, míg a kis átmérőjű erősen bazofil sejtekhez lassú vezetésű (Aδ, C) kis átmérőjű és vékony mielinhüvellyel rendelkező vagy mielinhüvellyel nem rendelkező nyúlványok tartoznak (Nagy, 2004). Ezek alapján a sejteket, a nyúlványoknak megfelelően, Aβ, Aδ vagy C sejtnek hívjuk.

További vizsgálatok azt is kimutatták, hogy az Aß típusú nyúlványokat a perifériás szövetek (pl. bőr) gyenge különböző típusú mechanikus ingerlésével (pl. simítás, gyenge nyomás, vibráció), illetve gyenge elektromos ingerléssel lehet ingerületbe hozni (Nagy, 2004). Ezzel ellentétben a C típusú nyúlványokat a szövetek épségét veszélyeztető és fájdalom érzés kiváltására alkalmas mechanikus ingerekkel (pl. erős nyomás, szorítás), magas vagy alacsony hő ingerekkel (>~42°C, <~15°C) illetve kémiai (pl. sav) ingerekkel lehet ingerületbe hozni (Nagy, 2004). A sejtek kémiai érzékenysége természetesen kiterjed az endogén molekulákra mutatott érzékenységére is. Ezen endogén molekulák egy része patológiás körülmények (pl. gyulladás) között termelődik a perifériás szövetekben és a C típusú sejteken történő aktivitásukkal fájdalmat váltanak ki. Ezen fiziológiai tulajdonságok alapján a C típusú sejteket polimodális fájdalomérző sejteknek hívjuk (Nagy, 2004). Az Aδ típusú sejtek nagy része a C típusú sejtekhez hasonlóan viselkedik, azonban vannak olyan Að típusú sejtek amelyek, a C típusú sejtekkel és a legtöbb Að típusú sejttel szemben, fájdalom érzést ki nem váltó gyenge mechanikus vagy hő ingerekre válaszolnak (Nagy, 2004).

A hátsó gyöki idegsejtek ingerlése membrán depolarizációt vált ki, amely ha eléri a küszöbérteket, akciós potenciál generálódását indukálja. Elektrofiziológiai mérések a hátsó gyöki idegsejtek két nagy csoportjában különböző akciós

potenciálokat mutatnak. Míg az Aβ típusú sejtekben az akciós potenciálok gyorsak, addig az Aδ és C típusú sejtekben lassúak, a leszálló fázisban vállat képeznek, illetve lassú utóhiperpolarizációt mutatnak (Nagy, 2004).

3.4.1.3. AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJT NEUROKÉMIAI TULAJDONSÁGAI

A hátsó gyöki idegsejtek fiziológiai különbségei hátterében a sejtek kémiai különbsége húzódik meg. A különböző ingerekre való érzékenységet a sejteken kifejeződő úgynevezett transzdúcer molekulák és receptorok határozzák meg.

A transzdúcer molekulák azok a molekulák, amelyek a mechanikus és hőmérsékleti ingereket elektromos jellé (depolarizációvá) alakítják. Amint azt fentebb említettem, az utóbbi két évtizedben egy sor, elsősorban hőre érzékeny transzdúcer molekulát sikerült izolálni (Caterina és munkatársai, 1997; Smith és munkatársai, 2002; Guler és munkatársai, 2002; McKemy és munkatársai, 2002; Peier és munkatársai, 2002; Xu és munkatársai, 2002; Vriens és munkatársai, 2011; Story és munkatársai, 2003). Ezek egy része fájdalmat kiváltó hőingerekre válaszol, másik részük fájdalmat ki nem váltó hőingerekkel aktiválható. Ezek közül a jelen értekezés szempontjából releváns molekula a TRPV1, amely, mint a BEVEZETÉS előző fejezeteiben kifejtettem, többek között fájdalom érzést kiváltó hőingerrel aktiválható, és a polimodális fájdalomérző sejtek túlnyomó többségén kifejeződik. Néhány mechanikus ingerekre válaszoló transzdúcert is izoláltak már (Strotmann és munkatársai, 2000; Coste és munkatársai, 2012). Azonban míg a hőingerekre érzékeny tanszdúcerek túlnyomó többségét feltehetően ismerjük, а mechanotranszdúcereknek valószínűleg csak egy kis hányadát sikerült eddig izolálni.

dc_1608_18

Az hátsó gyöki idegsejtek kémiai érzékenységét is természetesen az adott idegsejt kémiai tulajdonsága, nevezetesen a sejten kifejeződő receptorok határozzák meg. Így a polimodális fájdalomérző sejtek egy sor olyan receptort fejeznek ki, amelyeket a gyulladások során keletkező úgynevezett gyulladásos mediátorok képesek aktiválni. Ezen közé tartoznak például a bradikinin receptorok, a prostaglanding E2 receptorok, vagy az NGF receptor tirozin kináz A receptor (Nagy, 2004; Rice és munkatársai, 2002).

Az akciós potenciálok különbözőségéért is kémiai különbségek felelősek, mégpedig az akciós potenciálok generálásában résztvevő feszültségkapcsolt nátrium, kálium és kalcium csatornák különbségei (Nagy, 2004). Elsősorban a feszültségkapcsolt nátrium és kalcium csatornák kifejeződésbeli különbségeiről van részletes képünk. Így, a polimodális fájdalomérző sejtek kizárólagosan fejezik ki az úgynevezett tetradotoxinra (TTX) nem érzékeny feszültségkapcsolt nátrium csatornákat, amelyeket az α alegységek alapján különítünk el (Dib-Hajj és munkatársai, 2015; Tibbs és munkatársai, 2016; Cardoso és Lewis, 2018; Han és munkatársai, 2016). A TTX-re nem érzékeny csatornák a Nav1.8 és a Nav1.9 a alegységet tartalmazzák (Han és munkatársai, 2016; Dib-Hajj és munkatársai, 2015). A polimodális fájdalomérző sejtek nagy része ezen kívül kifejezi az Nav1.7 a alegységet tartalmazó feszültségkapcsolt nátrium csatornát (Yang és munkatársai, 2018). Az hátsó gyöki idegsejtek ezeken kívül fiziológiás körülmények között kifejezik az Nav1.1, Nav.1.5 és Nav1.6 α alegységet tartalmazó csatornákat (Tibbs és munkatársai, 2016; Cardoso és munkatársai, 2018). A feszültségkapcsolt kalcium csatornák közül a polimodális fájdalomérző sejtek elsősorban az L típusú csatornákat fejezik ki (Dolphin, 2016; Tibbs és munkatársai, 2016; Roca-Lapirot és munkatársai, 2018). A kálium csatornák kifejeződésében is vannak különbségek a polimodális

fájdalom érző és a fájdalmas ingerekre nem érzékeny sejtek között, azonban ezek a különbségek kevésbe feltérképezettek (Takeda és munkatársai, 2011).

A polimodális fájdalom érző és a fájdalmas ingerekre nem érzékeny hátsó gyöki idegsejtek az általuk termelt és felszabadított neurotranszmitterekben is különböznek. Míg valamennyi sejt termel és használ glutamátot mint neurotranszmittert, addig a polimodális sejteknek mintegy fele termel és használ különböző neuopeptideket. Ezek közül a legismertebbek a tachikininek (P anyag (SP), neurokinin A (NKA)) illetve a kalcitonin gén kapcsolt peptid (CGRP). Ezeken kívül, egyéb fehérjék kifejeződésében is vannak különbségek, amelyek közül a jelen értekezés szempontjából a legjelentősebb a polimodális sejtek mintegy fele által specifikusan kifejezett *Griffonia simplicifolia* isolectin IB4 (IB4) kötőhely (Nagy, 2004).

Összességében, a hátsó gyöki idegsejtek kémiai, fiziológiai és morfológia tulajdonságai, amelyeket a sejtek genetikus programjában lévő különbségek határoznak meg szoros összefüggést mutatnak. Ezek a különbségek a fejlődés során az úgynevezett neurotrofinok hatására jönnek létre. Fontos megjegyezni azonban, hogy ezek a genetikus programok nem állandóak és megváltoztathatalanok. A szöveti sérülésekkel összefüggő fájdalmak kialakulásában résztvevő mechanizmusok alapvető része éppen ezen genetikus programoknak a módosulása. Ennek következtében a sejtek által kifejezett molekulák módosulnak, és ezek a módosulások a sejtek funkciójának a változását vonják maguk után. Ezen epigenetikus programok megváltozásának a feltérképezése és esetlegesen a terápiába való bevonása a következő évek egyik nagy kihívása a fájdalom kutatásban.

3.4.2. A POLIMODÁLIS FÁJDALOMÉRZŐ ELSŐDLEGES IDEGSEJT FUNKCIÓI

Mind a fájdalmas ingerekre nem érzékeny mind a polimodális fájdalomérző sejtek aktivitása a szövetek aktuális állapotáról tájékoztatják a központi idegrendszert. Így, a polimodális sejtek a szöveteket érő potenciálisan a szövetek épségét veszélyeztető hatásokról, illetve a szövetek sérüléséről küldenek információt a központi idegrendszernek. Ezen információk alapján a központi idegrendszer választ generál, amely válasznak a része a fájdalomérzés. A kiváltó októl függően, a polimodális fájdalomérző sejtek vagy néhány másodpercig tartó, vagy hosszan tartó fájdalom elindítását és fenntartását végzik. A polimodális sejtek a vészhelyzeti felhívás mellett azonban a perifériás patológiás folyamatokat is befolyásolják ((Nagy, 2004).

3.4.2.1. A POLIMODÁLIS FÁJDALOMÉRZŐ ELSŐDLEGES IDEGSEJT SZEREPE A FÁJDALOMÉRZÉS KIALAKÍTÁSÁBAN

A polimodális fájdalomérző sejtek aktivitását a szöveti sérülést kiváltó hatás (pl. hő, mechanikus ingerek), a szövetek sérülése során a sejtekből kiszabaduló egyes molekulák (pl. ATP), illetve a szöveti sérülés következtében kialakuló gyulladás során termelődő egyes molekulák (pl. bradikinin, prosztaglandin E2) váltják ki. Ha a szövetek épségét veszélyeztető fájdalmas inger szöveti sérülést nem okoz, akkor a kifejlődő fájdalomérzés néhány másodpercig tart. Ennek az akut úgynevezett nociceptív fájdalomnak a kialakulása a transzdúcerek aktivitásával kezdődik, amelyek depolarizációt okoznak. Ha a depolarizáció eléri a feszültségfüggő nátrium csatornák aktiválási küszöbét, azok, a feszültségfüggő kálium és kalcium csatornákkal együttműködve, akciós potenciálokat generálnak. Az akciós potenciálokat a

dc_1608_18

polimodális fájdalomérző sejtek nyúlványai a gerincvelői végződésekhez továbbítják, ahol transzmitter felszabadulást váltanak ki. A transzmitterek a másodlagos érző neuronokon, amelyek egy része projekciós neuron, aktiváló hatást váltanak ki. Az így keletkező akciós potenciálok a projekciós neuronok axonai által létrehozott felszálló pályákon keresztül a talamuszba onnan pedig a kéregbe jutnak, ahol a fájdalomérzés kialakul. A másodlagos érző neuronokról az akciós potenciálok a motoneuronokhoz is eljutnak létrehozva így a visszahúzódási reflexet (Almeida és munkatársai, 2004; Gangadharan és Kuner, 2013).

Szöveti sérülés esetén, a sejtekből kiszabaduló molekulák, illetve a sérülést követő gyulladás során keletkező úgynevezett gyulladásos mediátorok a saját receptorukon hatva közvetlenül vagy közvetve váltanak ki depolarizációt, amely a feszültségfüggő nátrium csatornák köszöbének elérésekor akciós potenciál keletkezését idézi elő (Nagy, 2004; Nagy és Rice, 2003; Laycock és munkatársai, 2013; Gangadharan és Kuner, 2013). A legtöbb receptor, amely a sejtekből kiszabaduló molekulákra, illetve a gyulladásos mediátorokra válaszol metabotropikus receptor. Így, ezek aktiválása egy sor intracelluláris jelzőrendszeri útvonalat aktivál. Ezeknek az útvonalaknak az aktiválása egyrészt a sejtmembránon kifejeződő ion csatornákon és receptorokon poszt-transzlációs változásokat illetve egyes a sejtmembránon kifejeződő molekulának a citoplazmából a sejtmembránra történő transzlokációját hozza létre. Másrészt, az intracelluláris jelzőrendszeri útvonalak aktiválása egy sor gén transzkripcióját befolyásolja. Ezek a hatások összességükben a sejtek fokozott érzékenységét, aktivitásuk növekedését okozza, amelyek együttesen mint a sejtek szenzitizációja ismert (Nagy, 2004; Nagy és Rice, 2003; Gangadharan és Kuner, 2013; Laycock és munkatársai, 2013). A polimodális fájdalomérző sejtek tartós aktivitása a fájdalom információ feldolgozásában résztvevő központi

idegrendszeri sejtekben vált ki hasonló folyamatokat, így szenzitizációt (centrális szenzitizáció; (Woolf, 1983; Ji és Woolf, 2001; Latremoliere és Woolf, 2009; Woolf, 2014; Todd, 2010; Sandkuhler, 2009). A centrális szenzitizáció a polimodális fájdalomérző sejtek szenzitizációjával (perifériás szenzitizáció) közösen képezik az alapját a szöveti sérüléseket kísérő hosszantartó fájdalmak kialakulásának (Woolf, 1983; Ji és Woolf, 2001; Latremoliere és Woolf, 2009; Woolf, 2010; Sandkuhler, 2009).

3.4.2.2. A POLIMODÁLIS FÁJDALOMÉRZŐ ELSŐDLEGES IDEGSEJTEK SZEREPE A NEUROGÉN GYULLADÁSBAN

A polimodális sejtek perifériás patológiás folyamatokat is befolyásoló funkciójának az alapja, egyrészt, hogy a fájdalmas inger hatására létrejövő neuronális aktivitás a nyúlványok elágazódásainál mindkét irányban képes továbbhaladni. Így a neuonális aktivitás a szöveti sérülést körülvevő területekre, illetve közvetve a szöveti sérülést körülvevő területeket beidegző idegsejtekre is kiterjed (Roosterman és munkatársai, 2006; Geppetti és munkatársai, 2008; Sorkin és munkatársai, 2018). A polimodális fájdalomérző sejtek patológiás folyamatokban való részvételének másik alapja, hogy a neuronális aktivitás a szabad idegvégződésekből átvivő anyagok (glutamát, P, CGRP) felszabadulását váltja ki (Roosterman és munkatársai, 2006; Geppetti és munkatársai, 2008; Sorkin és munkatársai, 2018). Ezen átvivő anyagok egy sor nem neuronális sejten (makrofág, simaizom sejt, kapillárisok endotél sejt) fejtik ki hatásukat, amelyek további gyulladásos mediátorok felszabadulásával illetve a simaizmok esetén relaxációval míg az endoteliális sejtek esetén azok permeabilitásának megnövekedésével válaszolnak (Roosterman és munkatársai, 2006; Geppetti és munkatársai, 2008; Sorkin és munkatársai, 2018). A gyulladásos mediátorok egy része (pl NGF, szerotonin, hisztamin) a polimodális fájdalomérző sejteket aktiválva az átvivő anyagok további felszabadulásához illetve a fájdalomérzés erősítéséhez vezet, mintegy *circulus viciosus*-t hozva létre. Összességében ezek a folyamatok a szöveti sérülés helyén illetve azt körülvéve a gyulladás tipikus tünetegyüttesét (vörösség, melegség, duzzanat, fájdalom, funkció vesztés), hozzák létre. Ennek alapján a folyamat, mint neurogén gyulladás ismert (Roosterman és munkatársai, 2006; Geppetti és munkatársai, 2008; Sorkin és munkatársai, 2018).

A neurogén gyulladás a szervezet természetes reakciója, amely a sérülés fokozott védelmét (pl. a sérült szövetet körbevevő terület fájdalma) és a szöveti sérülés gyógyulásának (pl. vérbőség, védettség) elősegítését szolgálja. Azonban, gyakran a reakció egyes folyamatainak nem megfelelő szabályozása miatt a neurogén gyulladás maga járul hozzá a patológiás folyamatok elindításához illetve fenntartásához. Így a neurogén gyulladás egy sor pathológiás folyamat (pl. psoriasis, asztma, húgyhólyag hiperaktivitás) létrejöttében játszhat fontos szerepet (Roosterman és munkatársai, 2006; Groneberg és munkatársai, 2004; Raychaudhuri és Raychaudhuri, 2004; Butler és Heaney, 2007; Pisi és munkatársai, 2009; Geppetti és munkatársai, 2008; Sorkin és munkatársai, 2018).

3.4.2.3. A POLIMODÁLIS FÁJDALOMÉRZŐ ELSŐDLEGES IDEGSEJT SZEREPE A VISCERÁLIS HIPERAKTIVITÁS KIALAKULÁSÁBAN

Amint azt a 3.4.2.1. fejezetben említettem, az elsődleges érző idegsejtek a szomatikus szövetek mellett a zsigeri szöveteket is beidegzik. Ezeknek a zsigeri érzőrostoknak a sejtteste egyrészt a hátsó gyöki dúcokban, illetve a IX. és X. agyidegek érző dúcaiban helyezkednek el. A hátsó gyöki dúcokból eredő rostok érdekes módon, befolyásoljak az autonóm igerendszer működését, hiszen a rostok

nemcsak, hogy átfutnak a pre- és paravertebrális dúcokon de ezekben a dúcokban ágakat is adnak le, amelyek a dúcokban található sejtekkel szinapszisokat alkotnak (Gebhart és Bielefeldt, 2016). Az autonóm idegrendszerhez tartozó sejteken kívül, a zsigeri érző rostok a zsigerek falában található, a zsigerek saját idegrendszerének tekintett idegi hálózat idegsejteivel is kapcsolatba lépnek (Gebhart és Bielefeldt, 2016).

A zsigeri érző rostok elsősorban Aδ és C típusú rostok amelyek szabad idegvégződésekben végződnek a zsigerek falának különböző rétegeiben. Az idegvégződések elhelyezkedése alapján jelenleg öt végződési típust ismerünk: az *intragnaglionic laminar* (IGLE) végződések, a *mucosa*-ban található végződések (ME), a *muscular-mucosal* végződések (MME), az *intramuscular* végződések (IMA) és a ereket beidegző (*vascular*) végződések (VA).

Ugyan a zsigeri érző rostok egy sor transzdúcer molekulát, mint például a hőérzékeny TRPV1-t, fejeznek ki, jellemző tulajdonságuk mégis a mechanikus és kémiai ingerekre való érzékenységük (Gebhart és Bielefeldt, 2016). A hasonló transzdúcer kifejeződés ellenére, a különböző rétegekben végződő rostok más-más funkcióban vesznek részt, illetve más-más érzés kialakítását indíthatják el. Így, a bélben található IGLE és IMA végződéseket a teltség és felfújódottság érzésével hozzák összefüggésbe (Gebhart és Bielefeldt, 2016). Ezeknek a rostoknak a válaszadási képességét azonban bizonyos kémia ingerekkel, mint például egyes gyulladásos mediátorral szenzitizálni lehet. Ennek ellenére ezek a rostok valószínűleg nem játszanak szerepet a fájdalmak létrejöttében.

Az ME végződések, a felszínhez közeli elhelyezkedésüknek megfelelően, az üreges zsigerek üregében levő tartalom mozgása illetve az üregben levő tartalom kémiai összetétele, valamint a *mucosa*-ból felszabaduló jelző molekulák aktiválhatják.

Fontos megjegyezni, hogy az ME végződéseket a pathológiás körülmények között felszabaduló mediátorok szintén szenzitizálják (Gebhart és Bielefeldt, 2016).

A zsigeri érzőrostok típusa, transzdúcer kifejeződése, valamint a rostok szenzitizálódásra való hajlama alapján nem meglepő, hogy a zsigeri érző rostokat fájdalmas ingerekkel is lehet aktiválni. A zsigeri érző rostok sajátja így, hogy ellentétben a szomatikus rostok nagy részével, mind alacsony intenzitású, mind magas intenzitású mechanikus ingerre válaszolnak szenzitizáció nélkül is (Sengupta és Gebhart, 1994b; Sengupta és Gebhart, 1994a; Xu és Gebhart, 2008). A zsigeri rostokat aktiváló fájdalmas ingerek mechanikus típusúak (feszítés, csavarás illetve nyomás). Azonban ezek az ingerek akkor váltanak ki fájdalmat elsősorban, ha azok a zsigerek falának egy nagyobb darabját érintik, illetve hosszan tartóak.

A fájdalomérző zsigeri érző rostok, az üreges zsigerek hám és simaizom sejtjeivel közösen a zsigerek motoros működésének szabályozásában is részt vesznek (Gonzalez és munkatársai, 2014; Miyazato és munkatársai, 2017). A húgyhólyagban például, fiziológiás körülmények között a hólyag telődésére az ME, MME és IMA Að típusú érzőrostok (egyes fajokban, mint a patkány, C típusú rostok is) egyre több akciós potenciált generálnak. Az akciós potenciálok a gerincvelőbe jutnak, ahol annak a gerincvelői neuronális hálózatnak a működését módosítják, amely a szimpatikus, paraszimpatikus és szomatikus motoros idegsejtek aktivitásán keresztül szabályozza a hólyag falában lévő simaizom, valamint a belső és külső záróizmok izomsejtjeinek a működését. Ennek a gerincvelői hálózatnak a működését a hídi vizeletürítési központból érkező idegi jelek is befolyásoljak. Ezeknek az utóbbi jeleknek köszönhetően, a gerincvelői hálózat működése tudatosan befolyásolható, így a vizeletürítés tudatosan szabályozható (Gonzalez és munkatársai, 2014; Miyazato és munkatársai, 2017).

Mint említettem, a zsigeri rostok hasonlóan a szomatikus rostokhoz, szenzitizálódnak patológiás körülmények között (Gonzalez és munkatársai, 2014). Ennek a szenzitizálódásnak a következménye, hogy a rostok azonos ingerre megnövekedett számú akciós potenciált generálnak, illetve olyan rostok amelyek nem válaszolnak fiziológiás körülmények között mechanikus ingerekre, aktiválhatóakká válnak. A megnövekedett gerincvelői bemenet az üreges zsigerek motoros aktivitásának a megnövekedését okozzák. Ez a húgyhólyag esetében a vizelési inger gyakoribbá válásában nyilvánul meg. Ezzel párhuzamosan, zsigeri fájdalmak is kialakulnak, hiszen a zsigeri érző rostok gerincvelői végződéseinek egy része a hátsó szarvi másodlagos érző idegsejttel létesítenek szinaptikus kapcsolatot.

A zsigeri érzőrostok, így a húgyhólyag érzőrostainak a kapszaicin érzékenysége évtizedek óta jól ismert (Sharkey és munkatársai, 1983; Su és munkatársai, 1986; Santicioli és munkatársai, 1985; Maggi és munkatársai, 1989). Az is jól ismert hosszú idő óta, hogy a húgyhólyag érzőrostainak deszenzitizációja, például kapszaicinnel vagy RTX-el a hólyag hiperaktivitásának és a fájdalomnak a csökkenéséhez vezet (Cruz és munkatársai, 1997; Maggi és munkatársai, 1989; Avelino és Cruz, 2000; Santicioli és munkatársai, 1985; Dinis és munkatársai, 2004c; Silva és munkatársai, 2005). Így feltételezhető, hogy a TRPV1 vagy legalább is a TRPV1-t kifejező zsigeri érzőrostok hozzájárulhatnak a mind a zsigeri így a hólyag hiperaktivitásának valamint a zsigeri, így a húgyhólyag a fájdalmának a kialakulásához.

A kannabisz hatása a zsigerek motoros aktivitására is több mint két évtizede ismert (Consroe és munkatársai, 1997; Rosell és Agurell, 1975). Ennek a hatásnak legalább is részben az az alapja, hogy a zsigeri érzőrostok egy része kifejezi a CB1 receptort (Walczak és Cervero, 2011). Ennek megfelelően, a húgyhólyag érző rostain

kifejeződő CB1 receptor aktiválása képes a húgyhólyag motoros aktivitását szabályozni (Walczak és Cervero, 2011). Ezen adatok alapján valószínűsíthető, hogy a húgyhólyag érzőrostai illetve a hólyag működésének a vizsgálata alkalmas az endovanilloid és endokannabinoid rendszereknek az elsődleges érző idegsejtek működésére kifejtett hatásainak a vizsgálatára.

4. HIPOTÉZIS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

4.1. HIPOTÉZIS

A bevezetésben ismertetett adatok alapján feltételeztem, hogy az endokannabinoid és endovanilloid rendszerek jelentős szerepet játszanak a fájdalomérző hátsó gyöki idegsejtek aktivitásának szabályozásában és ezen a szabályozáson keresztül a patológiás folyamatokhoz kapcsolódó fájdalmak és az üreges szervek, például a húgyhólyag fokozott motoros aktivitásának a kialakulásában.

4.2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám célja összességében az endovanilloid és endokannabinoid rendszerek részvételének a vizsgálata volt a fájdalomérző elsődleges érző idegsejtek aktivitásának a szabályozásában, így a fájdalmak kialakulásában, különös tekinettel a TRPV1, CB1 receptor és az anandamid szerepére. Specifikus célkitűzéseim a következők voltak:

 Az endovanilloid es endokannabinoid rendszerek elemeinek kifejeződési mintázatának meghatározása intakt hátsó gyöki dúcban és tápfolyadékban növesztett hátsó gyöki dúc idegsejtekben és a megismert kifejeződési mintázatok összehasonlítása.

2. A kontrol tápfolyadékban növesztett hátsó gyöki dúc idegsejtek kapszaicinnel kiváltható válaszainak elemzése.

3. A kontrol tápfolyadékban növesztett hátsó gyöki dúc idegsejtek anandamiddal kiváltható válaszainak elemzése.

4. A gyulladásos mediátorokat tartalmazó tápfolyadékban növesztett hátsó gyöki dúc idegsejtek anandamiddal kiváltható válaszainak elemzése.

5. Az anandamide szintézis vizsgálata tápfolyadékban növesztett hátsó gyöki dúc idegsejtekben.

6. Az endovanilloid és endokannabinoid rendszerek egyes elemei közötti molekuláris kommunikáció jellemezése tápfolyadékban növesztett hátsó gyöki dúc idegsejtekben.

7. Az TRPV1 – CB1 receptor – anandamid jelzőrendszer szerepének vizsgálata a húgyhólyag gyulladását kísérő fokozott húgyhólyag összehúzódás és fájdalom kialakulásában.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A TRPV1 KIFEJEZŐDÉSE HÁTSÓ GYÖKI IDEGSEJTEKEN

5.1.1. A TRPV1 KIFEJEZŐDÉSE PATÁNY HÁTSÓ GYÖKI DÚCBAN ÉS TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN

A TRPV1 kifejeződésének részletes elemzését a hátsó gyöki dúcban a TRPV1 klónozása után több laboratórium elvégezte (Caterina és munkatársai, 1997; Tominaga és munkatársai, 1998; Guo és munkatársai, 1999; Michael és Priestley, 1999). Ezekben a kísérletekben így célunk elsősorban a TRPV1 hátsó gyöki dúc és tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben történő kifejeződésének összehasonlítása volt azért, hogy megbizonyosodjunk, hogy a tápfolyadékban történő növesztés az ion csatorna kifejeződését nem befolyásolja lényegesen. Ezeket a kísérleteket immunhisztokémiai módszerrel végeztük.



5.1. ábra. TRPV1 immunopozitív és immunonegatív sejtek patkány lumbális 4 hátsó gyöki dúcában. A skála 25µm-t jelől. (Sousa-Valente és munkatársai, 2017).

Patkány hátsó gyöki dúcában az idegsejtek 42.14±0.69%-a (569 sejt a 1359 vizsgált sejtből, n=4) mutatott festődést egy TRPV1 ellenes antitesttel

történő inkubáció után (5.1. ábra). A TRPV1 immunpozitív sejtek átlagos felülete $512\pm19\mu\text{m}^2$ volt. Ez az érték statisztikailag jelentősen kisebb volt mint az immunnegatív sejtek átlagos felülete ($826\pm107\mu\text{m}^2$).



5.2. ábra. TRPV1 kifejeződése patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. A skála 50µm-t jelől. (Ahluwalia és munkatársai, 2000).

A 2 napig idegnövekedési faktort (NGF, 50ng/ml) tartalmazó tápfolyadékban növesztett hátsó

gyöki dúc idegsejtjeinek $42\pm6\%$ -a (n=3) volt TRPV1 immunpozitív. A tápfolyadékban növesztett TRPV1 immunpozitiv sejtek átlagos felülete $376\pm6\mu m^2$ (n=3) volt. Ez az érték statisztikailag jelentősen kisebb volt mint a tápfolyadékban növesztett TRPV1 immunonegatív sejtek átlagos felülete ($778\pm161\mu m^2$, n=3). Míg az intakt ganglionban és a tápfolyadékban növesztett TRPV1 immunopozitív sejtek aránya nem különböznek, a sejt kultúrában talált TRPV1 immunpozitív sejtek átlagos felülete kisebb, mint a hátsó gyöki dúcában találat TRPV1 immunpozitív sejtek átlagos felülete.

5.1.2. A TRPV1 KIFEJEZŐDÉSE AZ PATKÁNY HÚGYHÓLYAGOT BEIDEGZŐ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN PERIFÉRIÁS NYÚLVÁNYAIN

Általánosan elfogadott, hogy az hátsó gyöki idegsejtek sejt testének membránján kifejeződő receptorok és ion csatornák a sejtek nyúlványainak a membránján is kifejeződnek. Ezek az ion csatornák és receptorok jelentős szerepet játszanak mind a transzdukciós mind az axon reflex mechanizmusokban mind a szomatikus, mind a zsigeri szövetekben (Nagy, 2004). Például, a kapszaicin, az SPnek a húgyhólyagot beidegző idegrostokból történő felszabadításán keresztül nagymértéken fokozza a húgyhólyag összehúzódásainak a gyakoriságát (Maggi és munkatársai, 1985; Maggi és munkatársai, 1986; Maggi és munkatársai, 1987). Továbbá, a kapszaicinre érzékeny, húgyhólyagot beidegző velőshüvely nélküli hátsó gyöki rostok fokozott aktivitása jelentős szerepet játszik a húgyhólyag egyik gyakori megbetegedése a *cystitis interstitialis*, kialakulásában (Homma és munkatársai, 2013; Liu és munkatársai, 2014; Cruz és munkatársai, 1997; Maggi és munkatársai, 1989;



5.3. TRPV1 ábra. kifejeződése patkány húgyhólyagban. (A) A hólyag falának két rétegében mutat а TRPV1 jelentős kifejeződést: azizomrétegben és а mucosa-ban közvetlenül a hám alatt. (B) A TRPV1-t kifejező rostok a hámsejtek közé is behatolnak. (C és D) A TRPV1-t kifejező rostok simaizm kötegeket vesznek körbe. (E)Az intravesicalis RTX kezelés 24 óra alatt jelentősen csökkenti a TRPV1-t kifejeződést. Valamennyi skála 100µm-t jelől. (Avelino és munkatársai, 2002).

Avelino és Cruz, 2000; Santicioli és munkatársai, 1985;

Dinis és munkatársai, 2004c; Silva és munkatársai, 2005). Ezen adatok alapján valószínűsíteni lehetett, hogy a TRPV1 kifejeződik a húgyhólyagot beidegző hátsó gyöki idegrostok egy részén, így ha a rostok a TRPV1 mellett a CB1 receptort is kifejezik, a húgyhólyag alkalmas lehet az endovanilloid és endokannabinoid rendszerek elsődleges érző neuronon kifejtett szabályozásának a vizsgálatára *in vivo*. Ezért, a TRPV1-nak az hátsó gyöki idegsejtek perifériás nyúlványain történő kifejeződését felnőtt patkány húgyhólyagján vizsgáltuk.

dc_1608_18

A TRPV1 immunpozitív rostok a húgyhólyag falában két jól elkülöníthető, jellegzetes megvastagodásokat mutató rostkötegbe szerveződtek (5.3.A. ábra). A nyálkahártyában a TRPV1 immunpozitív idegrostok laza hálózatot alkottak. A legtöbb idegrost ebben a rétegben nagyon közel futott az átmeneti hám bazális rétegéhez (5.3.A. és B. ábra). Néhány rost a hámsejtek között volt látható (5.3.B. ábra).

A *lamina propria*-ban kevés TRPV1 immunpozitív rost volt látható. Ezen rostok többsége erek körül volt megtalálható.

Az izomrétegben a TRPV1 immunpozitív rostok sűrű kötegeket alkottak amelyek a simaizom sejtek közelében futottak (5.3.A., C. és D. ábra). Gyakran úgy tűnt, hogy a rostok megvastagodásai kapcsolatban lehetnek a simaizomsejtekkel (5.3.C.és D. ábra). A hámsejtek, valamint a simaizomsejtek nem mutattak TRPV1 immunpozitivitást.

A húgyhólyag falában, szinte valamennyi TRPV1 immunpozitiv rost egyben immunpozitivitást mutatott SP-re (98±1%) és CGRP-re (93±5%, 5.4.A.-H. ábra). Az SP és CGRP immunpozitív rostok nagy része TRPV1 immunpozitivitást mutatott (SP: 95±2%, CGRP: 81±4%). Ugyanakkor, a bőrön végzett kontrol festések eredménye azt mutatta, hogy a bőr csak nagyon kevés TRPV1/SP vagy TRPV1/CGRP immunpozitív rostot tartalmaz (5.4.I. ábra). A TRPV1 és neuropeptidek nagymértékű közös kifejeződésével összhangban, a hólyag falában nem találtunk IB4 lektint kötő TRPV1 immunpozitív idegrostokat. IB4 lektin kötődést csak az átmeneti hám-, izom- és az erek *endothelium* hámsejtjein volt megfigyelhető (5.4.J. és K. ábra). Ugyanakkor, a bőrben IB4 lektint kötő idegrostokat mind az *epidermis*, mind a *dermis* tartalmazott (5.4.L. ábra). A dermis IB4 lektint kötő rostok egy részében TRPV1 immunpozitivitás volt megfigyelhető (5.4.L. ábra). Ezen eredményeink megerősítették azt a feltételezést, hogy a TRPV1 a hátsó gyöki idegsejt testén kívül, azok perifériás nyúlványain is kifejeződik. Ezen eredményeink továbbá azt is mutatták, hogy a húgyhólyagba juttatott kapszaicin vagy más TRPV1-t aktiváló anyag a hólyagot beidegző hátsó gyöki idegsejtek perifériás nyúlványain kifejeződő TRPV1-on keresztül fejti ki hatását. Ezen adatok alapján feltételeztük, hogy a húgyhólyag alkalmas a szöveteket beidegző hátsó gyöki idegsejtek működésének a vizsgálatára.



5.4. ábra. A TRPV1 együttes kifejeződése az elsődleges érző idegseteket megkülönböztető molekulákkal patkány húgyhólyagban. (A-D) TRPV1 (VR1) és SP együttes kifejeződése a mucosa-ban (A és B) és az izomrétegben (C és D). (E-H) TRPV1 (VR1) és CGRP együttes kifejeződése a mucosa-ban (E és F) és az izomrétegben (G és H). (I) Az CGRP és a TRPV1 (VR1) együttes kifejeződést mutat a bőrben. IB4 kötőhely sem a mucosa-ban (J), sem az izomrétegben (K) nem fejeződik ki idegrostokon. A bőrben azonban idegrostok is kifejezik a IB4 kötőhelyet (L). Valamennyi skála 100µm-t jelől. (Avelino és munkatársai, 2002).

5.1.3. A TRPV1 KIFEJEZŐDÉSE A HUMÁN HÚGYHÓLYAG ERNYŐ SEJTEIN

Míg az **5.1.2.** fejezetben ismertetett eredmények azt mutatták, hogy az húgyhólyag átmeneti hámja nem fejezi ki a TRPV1-t, más szerzők adatai azt mutatták, hogy a rágcsálók húgyhólyag hámsejtei funkcionális TRPV1-t fejeznek ki (Birder és munkatársai, 2001; Kullmann és munkatársai, 2009). A humán húgyhólyag



5.5. ábra. A TRPV1 kifejeződése humán sejteken. Tápfolyadékban urothélium (A)növesztett humán urothélium sejtek TRPV1 kifejeződésének demostraálása immunofluorescent festés segítségével. A skála 10µm-t jelől. (B) Az urothél sejtekből kivont fehérje immunoblotja humán TRPV1 antitesttel történő reakció után. (Charrua és munkatársai, 2009b).

hámsejtjein is találtak TRPV1 kifejeződést, azonban az nem volt ismert, hogy az a humán TRPV1 az átmeneti hámban funkcionális-e (Lazzeri és munkatársai, 2004). Egy esetleges funkcionalitás nyilvánvalóan befolyásolja a hólyagba juttatott TRPV1 aktivátorokkal kiváltott hólyag válaszokat. Ezért következő vizsgálatunkban a TRPV1

humán húgyhólyag hámsejtjein történő kifejeződését, a későbbiekben pedig funkcionalitását vizsgáltuk.

A humán TRPV1 ellen termelt antitesttel végzett immunfestés a tápfolyadékban növesztett humán húgyhólyag hámsejtek pozitív festődést mutattak (5.5.A ábra). Az immunoblot eredménye megerősítette a TRPV1 kifejeződését (5.5.B ábra). Mind a friss, mind a tápfolyadékban növesztett humán húgyhólyag hámsejtek kifejezték a TRPV1 mRNA-t is (5.6.A és B ábra). A hátsó gyöki dúc idegsejtekkel ellentétben azonban a tápfolyadékban növesztett humán húgyhólyag hámsejtek

kifejeződő TRPV1 nem volt érzékeny idegnövekedési faktorra (5.6.A és B ábra). Ugyanakkor a gyulladásos mediátor koktél (bradikinin 50nM, prostaglandin E_2 5µM, hisztamin 5µM, szerotonin 5µM) hatására a TRPV1 mRNA kifejeződése szignifikánsan megnövekedett (5.6.C ábra).



5.6. ábra. TRPV1 mRNA kifejeződése a humán urothélium sejteken. (A) TRPV1 kifejeződése frissen disszociált sejteken. (B) A TRPV1 kifejeződését a tápfolyadékban növesztett sejteken az NGF nem befolyásolja. (C) Míg az NGF nem befolyásolja, az gyulladásos mediátorok megnövelik a TRPV1 kifejeződését. (Charrua és munkatársai, 2009b).
5.2. A TRPV1 ÁLTAL KÖZVETÍTETT AKTIVITÁS AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

5.2.1. A KAPSZAICINNEL KIVÁLTOTT VALAMINT AZ ALACSONY ÉS MAGAS HŐKÜSZÖBŰ VÁLASZOK ÖSSZEFÜGGÉSE A PATKÁNY TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

A TRPV1 molekula 1997-ban történt klónozása és a heterológ rendszerben történt jellemzése azt mutatta, hogy a TRPV1 molekulákból felépülő ion csatorna



5.7. ábra. Hővel (>42°C) és kapszaicinnel kiváltható $(2\mu M)$ válaszok patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben. Hőingerrel hőre nem érzékeny (insensitive) alacsony küszöbű (low threshold) és magas küszöbű sejteket lehet elkülöníteni. (a) A hőinger hő-idő görbéje. A hőinger 37°C-ról indul. Kapszaicinin adagolásra (c) valamennyi alacsony küszöbű sejt válaszol. A hőingerre nem érzékeny és a magas küszöbű sejtek egyike sem válaszol kapszaicin adagolásra. A mérések egész sejtes feszültség zár technikával, fiziológiás ion koncentráciok mellet 37°C fokon és -60mV membrán potenciál mellet készültek. (Nagy és Rang, 1999a).

mind fájdalomérzést kiváltó hő ingerrel, mind kapszaicinnel aktiválható (Caterina és 1997). Ha munkatársai, а TRPV1 molekulákból felépülő natív csatorna hasonló tulajdonsággal bír. akkor valamennyi kapszaicinre érzékeny hátsó gyöki idegsejtnek fájdalomérzést hőingerre kiváltó is érzékenynek kell lennie, illetve vice versa valamennyi fájdalomérzést kiváltó hőingerre érzékeny hátsó gyöki idegsejtnek kapszaicinre is

érzékenynek kell lennie. Kirschstein és munkatársai 1997-ben valóban arra a következtetésre jutottak, hogy a hőérzékenység és a kapszaicin érzékenység, ha nem

is 100% ban, de összefüggést mutat (Kirschstein és munkatársai, 1997). Az alacsony sejtszám azonban ezen következtés helyességét erősen megkérdőjelezte. Ezért, munkánk során először azt a feltevést kívántuk tovább vizsgálni egész sejtes feszültség zár technika segítségével, hogy a kapszaicinre és a fájdalomérzést kiváltó hőingerre történő érzékenység 100%-os összefüggést mutat-e az hátsó gyöki dúc idegsejtjeiben. A sejteket 37°C és 53°C közötti, időben lineálisan növekvő hőingerrel (1.75°C/másodperc), valamint a hőingerre adott válasz megszűnését követő 2µM kapszaicin adagolással (1.5 másodperc) aktiváltuk. A membrán potenciált -60mV on tartottuk.

Hatvanöt tápfolyadékban növesztett hátsógyöki dúcsejtből történő elvezetés eredményei alapján háromféle idegsejt típust tudtunk megkülönböztetni: hőingerre nem válaszoló sejteket, hőingerre alacsony hőküszöbnél válaszoló sejteket és hőingerre magas hőküszöbnél válaszoló sejteket (5.7. ábra). A hőingerre nem válaszoló sejtek (28/65), a hőingerre alacsony amplitúdójú, a hőmérséklet függvényében lineárisan növekvő, reverzibilis, befelé folyó árammal válaszoltak. Ezen áramoknak nem volt egyértelműen meghatározható ingerküszöbük (5.7. ábra "insensitive" b panel). A válaszok átlagos amplitúdója 53°C-nal -0.1±0.02nA (n=28) volt. Szimpatikus dúcsejtek, amelyek nyúlványai nem aktiválhatóak fájdalomérzést kiváltó hőingerrel, egy másik kísérletünkben hasonló áramokkal válaszoltak a hőingerlésre (Nagy és Rang, 1999b) (vide infra). Korábbi vizsgálatok a feszültségfüggő ioncsatornák esetében hasonló, a hőmérséklet függvényében lineálisan növekvő aktivitás változást írtak le (Milburn és munkatársai, 1995). Ezért a hőingerrel kiváltott alacsony amplitúdójú, a hőmérséklet függvényében lineálisan növekvő, reverzibilis, befelé folyó áramokat, amelyek egyértelműen meghatározható ingerküszöbbel nem rendelkeztek, hőingerrel kiváltható nem specifikus válaszoknak

tartottuk. A hőingerrel kiváltható nem specifikus válaszokat generáló sejtek közül egyik sem válaszolt kapszaicin adagolásra (5.7. ábra "insensitive" C panel).

A hatvanöt idegsejt közül 37, az időben lineálisan növekvő hőingerre olyan reverzibilis, befelé folyó árammal válaszolt, amelyik 41°C es 53°C között, egy jól meghatározható hőmérsékletnél, hírtelen felgyorsult kinetikát mutatott (5.7. ábra "low threshold" és "high threshold"). Ezen sejtek közül 21-ben a kapszaicin adagolás is befelé folyó, reverzibilis áramot indukált (5.7. ábra "low threshold" c panel). A kapszaicinnel kiváltott áram átlagos amplitudója ezekben a sejtekben -0.67±0.04nA (n=21) volt. A maradék 16 sejtben a kapszaicin adagolás nem indukált semmilyen áramot (5.7. ábra, "high threshold" c panel).

A kapszaicinre érzékeny sejtekben a hőingerrel kiváltott válaszok kinetikája 45.3±0.2°C-nál (n=21) gyorsult fel. Ez az érték szignifikánsan alacsonyabb volt (p=0.01), mint a kapszaicinre nem válaszoló sejtekben az a hőmérséklet, amelyiknél a hőingerrel kiváltott válaszok kinetikája felgyorsult (51.0±0.3°C, n=16). Azt a hőmérsékleti értéket, ahol a hőingerrel kiváltott válaszok kinetikája felgyorsult, az inger küszöbértékének tartottuk. Ennek megfelelően, alacsony hőküszöbű (5.7. ábra, "low threshold") és magas hőküszöbű (5.7. ábra, "high threshold") sejteket tudtunk elkülöníteni.

A hőingerrel kiváltott válaszok legnagyobb amplitúdója az alacsony hőküszöbű sejtekben (-1.74±0.08nA) szignifikánsan nagyobb volt, mint a magas hőküszöbű sejtekben (-1.1±0.02, n, p<0.0.1). Az alacsony hőküszöbű sejtek átlagos átmérője szignifikánsan kisebb volt, mint a magas hőküszöbű sejtek átlagos átmérője (18.5±0.4µm versus 25.6±0.2µm, p<0.01). Mintánkban nem találtunk olyan sejtet, amely kapszaicinre igen, azonban hőre nem válaszolt volna. Továbbá, mintánkban

valamennyi kapszaicin adagolásra válaszoló sejtben a hőingerléssel kiváltott válasz alacsony hőküszöbű volt.

Ezen eredményeink a kapszaicin és alacsony hőküszöbű válaszok 100%-os összetartozását mutatták. A TRPV1 molekulákból felépülő csatornák heterológ szisztémában mért hőküszöbe és kapszaicin érzékenysége azt valószínűsítette, hogy ezeket a válaszokat a TRPV1 molekulákból felépülő csatornák aktivitása hozza létre. Ezen eredményeink azt is egyértelműen megmutatták, hogy a kapszaicin és alacsony hőküszöbű válaszok a hátsógyöki dúc idegsejtjei közül elsősorban a kis átmérőjű sejtekben indukálhatók. Továbbá, ezen eredményeink azt is egyértelműen megmutatták hogy a hátsógyöki dúc érző idegsejtek egy csoportjában a hőinger olyan sejtekben is képes magas hőküszöbű áramot indukálni amelyek nem érzékenyek kapszaicinre. Ez az eredmény azt sugallta, hogy a hátsógyöki érző dúc idegsejtek egy csoportja a TRPV1 molekulákból felépülő csatornáktól függetlenül képes hőingerrel kiváltható áramot generálni.

5.2.2. ALACSONY HŐKÜSZÖBŰ ÉS KAPSZAICINNEL KIVÁLTOTT VÁLASZOK JELLEMZŐI PATKÁNY TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

A hátsó gyöki dúc idegsejteknek alacsony hőküszöbű és kapszaicin adagolással kiváltott válaszainak további vizsgálatát felnőtt patkány tápfolyadékban növesztett hátsó gyöki dúc és szimpatikus dúc (*ganglion cervicale superior*) idegsejteket használtunk. Az utóbbi sejtek válaszait negatív kontrol válaszokként kezeltük, mivel a szimpatikus idegeket, jelen ismereteink szerint, sem kapszaicin adagolással sem fájdalmat kiváltó hőingerrel nem lehet aktiválni. Munkánk során először teljes sejtes feszültség zár technikát alkalmaztunk. Előző eredményeinket felhasználva, az alacsony hőküszöbű hátsó gyöki dúc

A



5.8. ábra. Hőingerléssel (>42oC) és kapszaicin $(2\mu M)$ adagolással patkány kiváltott válaszok tápfolvadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben. (A) Hőingerlésre érzékeny (négyzet) és nem érzékeny (háromszög) tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtek és tápfolyadékban növesztett szimpatikus dúcsejtek áramhőmérséklet függvényei és egy hőingerlésre érzékeny sejt válasza (alsó regisztrátum) és a hőinger időbeli lefutása (felső regisztrátum). (B és C) Hőingerrel (B) és kapszaicin adagolassal (C) kiváltott válaszok egy hőingerre érzékeny sejtből. A felső regisztrátum a (B) ábrán a hőingerlés időbeli lefutását mutatja. (D)A hőingerrel és kapszaicin adagolással kiváltott amplitúdóinak válaszok összefüggése. Valamennyi mérés fiziológiás ion koncentrációk mellett, -60mV membrán potenciálon és 37°C alaphőmérsékleten készült. (Nagy és Rang, 1999b).

idegsejtjeit a kapszaicin adagolásra adott válaszuk alapján ismertük fel (Nagy és Rang, 1999a). A kapszaicin adagolás a véletlen módon kiválasztott 355 sejtes

mintánkban 109-ben váltott ki befelé folyó áramot -60mV membrán potenciál mellett (5.8. C ábra). A válaszok átlagos amplitúdója -1.39±0.11nA (n=109) volt. Előző eredményeinkkel összhangban (Nagy és Rang, 1999a) (*vide supra*) valamennyi





5.9. ábra. Patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben hőingerléssel (>42°C) és kapszaicin (2µM) adagolással kiváltható válaszok feszültség-áram függvényei különböző ion összetétel mellett. (A) A feszültségáram függvénv (net) = a konstans $37^{\circ}C$ mért kontrol mellet (control) fok függvény – a hőingerlésel kiváltott válasz során (test) függvény. mert *(B)* Hőingerrel kiváltott válaszok átlagolt feszültség-áram függvényei az ábrán jelzett ion koncentraciók (mM) mellett. (C) Kapszaicin adagolással kiváltott válaszok átlagolt feszültség-áram függvényei az ábrán jelzett ion koncentraciók (mM) mellett. (Nagy és Rang, 1999b).

hőmérséklet értéknél (45±0.2°C n=109, 5.8. A ábra) felgyorsult kinetikájú válaszokat váltott ki. A hőingerléssel kiváltott válaszok legnagyobb amplitudója -2.22±0.14nA (n=109) volt

(5.8. A és B ábra). Előző eredményeinkkel szintén összhangban (Nagy és Rang, 1999a) (*vide supra*), az alacsony küszöbű hőingerrel kiváltott választ csak a kapszaicin érzékeny sejtek generáltak. A kapszaicin érzékeny-alacsony hőküszöbű sejtek átlagos átmérője ezen kísérletünkben 22.8±0.5µm (n=109) volt.

A 355 sejtes mintánkból 246 sejt kapszaicin adagolásra nem válaszolt. Ezen sejtek közül 83 sejtben a hőingerlés, az előző munkánk során talált válaszokhoz hasonló, reverzibilis, 50°C feletti, jól meghatározható hőmérséklet értéknél felgyorsuló kinetikájú, úgynevezett magas hőküszöbű válaszokat indukált. A mintánk további 163 sejtében a hőingerlés, a hőmérséklettel lineálisan növekvő (felgyorsult kinetikát nem mutató), befelé folyó áramot indukált. Szimpatikus dúcból preparált

sejtek hasonló hőingerrel kiváltott válaszokat generáltak. További munkánk során ezeket a válaszokat nem vizsgáltuk.

A kapszaicin érzékenység és az alacsony küszöbű hőérzékenység együttes megjelenése teljes sejt szinten azt sugallta, hogy a két választ feltehetően ugyanaz az ioncsatorna, a TRPV1 molekulákból felépülő csatorna, közvetíti. Így elvárható, hogy a két válasz amplitúdója korrelációt mutasson a hátsó gyöki sejtekben. Valóban, az analízisünk azt mutatta, hogy a kapszaicin adagolással és a hőingerléssel kiváltható válaszok gyenge, de szignifikáns korrelációt mutattak (5.8. D ábra).

A kapszaicin adagolással és a hőingerléssel kiváltható válaszok ion összetételét idővel lineálisan változó +40mV és -100mV közötti (500msec) feszültség paranccsal vizsgáltuk. Ezeket a méréseket az intracelluláris folyadék 130mM-os CsCl tartalma mellett végeztük, hogy csökkentsük a kifelé folyó K⁺ áramokat. A kapszaicin adagolással és a hőingerléssel kiváltható válaszokra jellemző specifikus áramfeszültség függvényt a sejtek aktiválása alatt meghatározott áram-feszültség függvényből a sejtek aktiválása előtt meghatározott áram-feszültség függvény kivonásával határoztuk meg (5.9. A. ábra). Mind a kapszaicin adagolással és a hőingerléssel kiváltott válaszok áram-feszültség függvénye negatív membránpotenciál értékeknél kifelé mutató rektifikációt mutattak a hátsó gyöki dúc idegsejteiben. A két válasz feszültség-áram görbéit valamint az áramok fordulási feszültségét különböző ion összetétel mellett a 5.9. B és C. ábra mutatja. A fordulási feszültségek felhasználásával a következő relatív ion permeabilitási értékeket kaptuk: hőingerléssel PCs⁻/PNa⁺/PNMDG⁺/PCa²⁺=1.0/1.08/0.14/1.29; kiváltott áram: kapszaicinnel kiváltott áram: PCs⁻/PNa⁺/PNMDG⁺/PCa²⁺=1.0/0.94/0.11/2.25. Az ion permeabilitási adatok azt mutatták, hogy mind a hőingerléssel kiváltott, mind kapszaicinnel kiváltott csatorna aktiválás során a csatorna ionszelektivitása gyenge. Ezek az adatok azt is

mutatják, hogy a két aktivátorral történő csatorna aktiválás során az áramok ion összetétele különböző. Kapszaicinnel kiváltott csatorna aktivitás során a Ca²⁺ permeabilitása majdnem kétszerese a hőingerléssel kiváltott csatorna aktivitás során mért Ca²⁺ permeabilitásnak.

Ha a kapszaicinnel és hőingerléssel kiváltott áramokat valóban a TRPV1 molekulákból felépülő csatornák közvetítik, akkor ezeket az áramokat a TRPV1 molekulákból felépülő csatornák antagonistáknak gátolniuk kell. Ezért, következő kísérletünkben a TRPV1 molekulákból felépülő csatornák jól ismert antagonistái, a kapszazepin és a ruténium vörös hatását vizsgáltuk a kapszaicinnel és hőingerléssel kiváltott áramokon a hátsó gyöki dúc idegsejtekben. Míg a ruténium vörös gátolta a kapszaicinnel kiváltott áramokat (IC_{50} =~1 μ M), a hőingerléssel kiváltott áramokon kettős hatást fejtett ki (5.10. A és B ábra). Egy μ M alatti koncentrációban növelte, míg 1 μ M feletti koncentrációban gátolta a hőingerléssel kiváltott áramokat (IC_{50} <0.5 μ M), azonban a hőingerléssel kiváltott áramokat csak kis mértékben csökkentette 10 μ M koncentrációban. Mivel a kapszazepin kompetitív TRPV1 antagonista, gyenge gátló hatása a hőingerléssel kiváltott áramokon nem volt meglepő.

A teljes sejtes feszültség zár technikával végzett kísérleteinkkel kapott eredmények azt valószínűsítették, hogy mind a kapszaicinnel mind az alacsony hőküszöbű, hőingerléssel kiváltott áramokat a TRPV1 molekulákból felépülő csatornák közvetítik. Ezen kísérletek eredményei továbbá azt is mutatták, hogy a TRPV1 molekulákból felépülő csatornák kapszaicinnel és hőingerléssel kiváltott aktivitásának biofizikai és farmakológiai jellemzői bizonyos fokig eltérnek egymástól.

A kapszaicinnel és hőingerléssel kiváltott csatorna aktivitás további jellemzését egyedi csatorna elvezetési technika alkalmazásával végeztük.

Kilencvenhét hátsó gyöki dúc idegsejtből származó sejthez tapadt membrán folt közül



a hőingerlés 19-ben váltott ki csatorna aktivitást (5.11. A, B, D, E és F ábra). A 161, hátsó gyöki idegsejtből származó, a belső felszínnel az extracelluláris folyadék felé tekintő kiszakított membrán folt közül a hőingerlés 25-ben váltott ki csatorna aktivitást (5.11. F és 5.12. A ábra). A

5.10. ábra. Ruténium vörös és kapszazepin hatása patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben hőingerléssel (>42oC) és kapszaicin (2μM) adagolással kiváltható válaszokra. (A) Rutenium vörös (RR) hatása hőingerléssel (heat) és kapszaicin (caps) adagolással kiváltható válaszokra. (B) A ruténium vörös koncentráció-válasz görbéi hőingerléssel (fekete négyszög) és kapszaicin (üres kör) adagolással kiváltható válaszokra. (C) Kapszazepin (CPZ) hatása hőingerléssel (heat) és kapszaicin (caps) adagolással kiváltható válaszokra. (B) A kapszezepin koncentráció-válasz görbéi hőingerléssel (fekete négyszög) és kapszaicin (üres kör) adagolással kiváltható válaszokra. A felső regitrátumok az (A) és (C) ábrán a kapszaicin adagolást (egyenes vonal) és a hőingerlés időbeli lefutását mutatják. A kontrol (control) regisztrátumok antagonista nélkül, a teszt (test) regisztrátumok antagonista jelenlétében, a visszatérési (recovery) regisztrátumok 2 perccel az antagonista kimosás után készültek. Valamennyi mérés fiziológiás ion koncentrációk mellett, -60mV membrán potenciálon és 37°C alaphőmérsékleten készült. (Nagy és Rang, 1999b).

membrán foltok egyikében sem láttunk csatorna aktivitást 37°C-n, és a hőingerléssel kiváltott csatorna aktivitás a hőmérséklet 37°C-ra történő csökkentése a csatorna aktivitást azonnal megszüntette (5.11. A és B ábra). A szimpatikus dúcsejtekből származó membrán foltok egyike sem mutatott hőingerléssel kiváltott csatorna aktivitást (5.11. C ábra). Kapszaicinnel kiváltott csatorna aktivitást a 100 sejthez tapadt membrán folt közül 10 mutatott. A kapszaicin a 161 belső felszínnel az

extracelluláris folyadék felé tekintő kiszakított membrán folt közül 18-ban váltott ki csatorna aktivitást (5.13. C ábra).



Az egyedi csatorna aktivitást a 5.11. E ábrán mint átlagos egyedi csatorna áramot fejeztük ki a hőmérséklet függvényében. Ez a függvény nem tér el szignifikánsan a teljes sejt mérések során nyert áramhőmérsélet függvénytől. Az egyedi csatorna áram-feszültség függvény és a teljes sejtes áram-feszültség függvény sem mutattak szignifikáns különbséget (5.12. B és D ábra).

Annak eldöntésére, hogy a kapszaicin adagolás és a hőingerlés

5.11. ábra. Hőingerléssel (>42°C) és kapszaicin (2µM) adagolással kiváltható egyedi csatorna áramok patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző illetve szimpatikus dúc idegsejtekben. A regisztrátumok vagy "cell-attached" vagy "inside-out" konfigurációban készültek -60mV elektród feszültség mellett, 130mM KCl jelenlétében az extracelluláris oldatban és 130mM NaCl jelenlétében az elektródában. (A) Hőingerlés hatása az egyedi csatorna áramokra "cell-attached" konfigurációban elsődleges érző idegsejtekben. (B) Hőingerléssel kiváltott egyedi csatorna áramok "cell-attached" konfigurációban elsődleges érző idegsejtekben a hőingerlés előtt (középső regisztrátum), a hőingerlés alatt (felső regisztrátum) és a hőingerlés után (alsó regisztrátum). (C) Szimpatikus dúc idegsejtből elvezetett egyedi csatorna áramok "cell-attached" konfigurációban hőingerlés alatt. (D) Egyedi csatorna áramok "cell-attached" konfigurációban elsődleges érző idegsejtekben különböző hőmérsékletek mellett. (E) Egyedi csatorna (fekete négyzet) és teljes sejt (üres kör) áramok hőmérséklet-áram görbéi. (F) "Cellattached" és "inside-out" konfigurációban mért egyei csatorna áramok elsődleges érző idegsejtekben hőingerlés alatt. (Nagy és Rang, 1999b).

valóban azonos csatornákat aktivál-e, belső felszínnel az extracelluláris folyadék felé

tekintő kiszakított membrán foltokat aktiváltunk a két ingerrel egymás után. A 161 membrán foltból 18 válaszolt kapszaicin adagolásra, míg 25 válaszolt a hőmérséklet emelésére (5.13. ábra). A membrán foltok közül csak 8 válaszolt mind a két ingerre (5.13. ábra). A kontrol kísérletekben két egymás után alkalmazott kapszaicin adagolás vagy hőingerlés nem változtatta meg a csatornák aktivitási jellemzőt. Így, a membrán foltok kettős érzékenységének a hiánya nem indokolható deszenzitizációval. Ugyanakkor, a kettős érzékenységű membrán foltok száma szignifikánsan meghaladta a véletlen előfordulás lehetséges gyakoriságát.



Ezek az adatok azt sugallták, hogy a TRPV1 molekulákból felépülő csatornák egy része a hátsó gyöki dúc idegsejtekben valóban érzékeny mind kapszaicin adagolásra, mind hőingerlésre, azonban ezen csatornák aránya alacsony, 10% alatti. A kapszaicin- és hőérzékenység szétválása egyedi csatorna szinten feltételezte, hogy a

5.12. ábra. Hőingerléssel (>42°C) és kapszaicin (2μM) adagolással kiváltható egyedi csatorna áramok feszültség-áram függvényei patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben. A regisztrátumok "inside-out" konfigurációban készültek, 130mM KCl jelenlétében az extracelluláris oldatban és 130mM NaCl jelenlétében az elektródában. (A) Hőingerléssel aktivált egyedi csatorna áramok különböző membrán feszültség mellett. (B) Átlagolt hőingerléssel aktivált egyedi csatorna (fekete négyzet) és teljes sejtes hőaktivált áramok feszültség-áram függvényei. (C) Kapszaicin adagolással kiváltott egyedi csatorna áramok különböző membrán feszültség mellett. (D) Átlagolt kapszaicinnel kiváltott egyedi csatorna áramok feszültség-áram függvénye. (Nagy és Rang, 1999b).

TRPV1 molekulákból felépülő csatornák érzékenysége vagy az egyedi molekulák

posz-transzlációs módosulásától vagy és a csatornák molekuláris összetételétől függ.

A kapszaicin- és hőérzékenység egyedi csatorna szintű szétválásának ellenére, a

kapszaicin érzékenység és hőérzékenység sejtes szinten 100%-os átfedést mutatott. Ez

az eredmény arra engedett következtetni, hogy a sejtek egyidejűleg többféle TRPV1 molekulát tartalmazó csatornát fejeznek ki.



5.13. ábra. Hőingerléssel (>42°C) és kapszaicin (2μM) adagolással kiváltható egyedi csatorna áramok közös kifejeződésének hianya patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben. A regisztrátumok "inside-out" konfigurációban készültek, 130mM KCl jelenlétében az extracelluláris oldatban és 130mM NaCl jelenlétében az elektródában. (A) Hőingerléssel és kapszaicin adagolássl aktivált egyedi csatorna áramok egy membrán foltban, amely csak hőérzékenységet mutat. Különböző membrán feszültség mellett. (B) Hőingerléssel és kapszaicin adagolássl aktivált egyedi csatorna áramok egy membrán foltban, amely mind hőérzékenységet és kapszaicin érzékenységet is mutat. (C) Hőingerléssel és kapszaicin adagolássl aktivált egyedi csatorna áramok egy membrán foltban, amely csak kapszaicin érzékenységet mutat. (D) A csak hőérzékeny (heat responsive), csak kapszaicin érzékeny (capsaicin responsive), kettősen érzékeny és egyik ingerlésre sem érzékeny membrán foltok aránya. (Nagy és Rang, 1999b).

5.2.3. KAPSZAICINNEL KIVÁLTOTT KOBALT BEÁRAMLÁS PATKÁNY TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

További munkánk nagy részében tápfolyadékban növesztett hátsó gyöki dúc idegsejteken kifejeződő TRPV1 molekulákból felépülő csatornák különböző körülmények közötti aktiválhatóságát kívántuk vizsgálni. Ehhez olyan módszereket kerestünk, amelyikkel nagyszámú, tápfolyadékban növesztett TRPV1 molekulákból

felépülő csatornákat kifejező hátsó gyöki dúc idegsejt aktivitását egy időben vizsgálhatjuk. Erre az egyik lehetőség a Hogan által korábban kidolgozott kapszaicin indukált kobalt felvétel alkalmazása (Hogan, 1983). Ezért ezekben a kísérletekben ennek a módszernek a mi kísérletes környezetünkhöz történő adaptálását végeztük el.

A kontrol kísérletekben, amelyekben a kobaltot tartalmazó pufferhez nem adtunk kapszaicint, a sejtek 6.5 ±0.6%-a (n 9) mutatott kobalt felvételt (5.14. A, B, és G ábra). Kapszaicin (50nM, 100nM, 500nM) adagolása a kobaltot tartalmazó pufferhez koncentráció függő módon jelentősen megnövelte a kobaltot tartalmazó sejtek számát: 500nM kapszaicin adagolása után a sejtek 31.1±1.1%-a (n 9) mutatott kobalt felvételt. A kobalttal jelölt sejtek átlagos felülete 273±15µm2 (n=9), volt. Ez



5.14. *ábra. A kapszaicin adagolás kobalt beáramlást indukál a patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben.* (A) Kobalt jelőlt sejtek kapszaicin mentes pufferben történt inkubálás után. (B) A jelőlt (labelled) és nem jelőlt (non-labelled) sejtek denzitometriás kiértékelése és szétválasztása. (C) Kobalt jelőlt sejtek kapszaicint tartalmazó pufferben történt inkubálás után. (D) A jelőlt (labelled) és nem jelőlt (non-labelled) sejtek denzitometriás kiértékelése és szétválasztása. (C) Kobalt jelőlt sejtek kapszaicint tartalmazó pufferben történt inkubálás után. (D) A jelőlt (labelled) és nem jelőlt (non-labelled) sejtek denzitometriás kiértékelése és szétválasztása. (Sathianathan és munkatársai, 2003).

talált kobalttal jelölt sejtek mérete szintén jelentősen különbözött a kontrol kísérletekben talált jelölt $(353\pm27\mu m^2)$ és jelöletlen $(391\pm34\mu m^2)$ sejtek azonos jellemzőjétől. A nem szelektív ligand kapcsolt kalcium csatorna blokkoló, ruténium vörös és a szelektív és specifikus kompetitív TRPV1 molekulákból felépülő csatornákat gátló, kapszazepin jelentősen csökkentették az 500nM kapszaicin

adagolással kiváltott kobalttal jelölt sejtek számát (ruténium vörös: 81±5.1-%-os csökkenés, kapszazepin: 60.8±5.4%-os csökkenés). Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a kapszaicin adagolással kiváltott kobalt felvétel mérése alkalmas lehet a TRPV1 aktivitás jellemzésére különböző körülmények között.

5.2.4. KAPSZAICINNEL KIVÁLTOTT KALCIUM BEÁRAMLÁS PATKÁNY TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Az egyszerre nagyszámú tápfolyadékban növesztett TRPV1 molekulákból felépülő csatornákat kifejező hátsó gyöki dúc idegsejt aktivitásának mérésére alkalmas másik módszer az intracellularis kalcium koncentráció ([Ca²⁺]_i) mérése. Mivel ezt a módszert számos laboratóriumban rutinszerűen és sikerrel alkalmazzák, kontrol kísérleteinkben csak az 500nM kapszaicinnel kiváltható válaszokat vizsgáltuk szobahőmérséleten vagy 37°C on.

Szobahőmérsékleten, a 305 KCl (50mM) adagolásra [Ca2+]i növekedéssel



5.15. ábra. Kapszaicin (500nM) adagolás megnöveli az intracelluláris calcium koncentráció szintet a patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben. CAP: kapszaicin. (Chen és munkatársai, 2016).

válaszoló sejt közül 213 válaszolt kapszaicin adagolásra is (69.8%, (5.15. ábra)). A kapszaicinnel kiváltott növekedés az $[Ca^{2+}]_i$ ban a KCl adagolással kiváltottnak a 61±25%-a volt. Amikor a sejteket 37°C on vizsgáltuk, a kapszaicinre válaszoló sejtek aránya nem változott jelentősen. A válaszok amplitudója azonban jelentős növekedést mutatott (ábrával nem dokumentált).

5.2.5. KAPSZAICINNEL KIVÁLTOTT CGRP FELSZABADULÁS PATKÁNY TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBŐL

Az egyszerre nagyszámú tápfolyadékban növesztett TRPV1 molekulákból felépülő csatornákat kifejező hátsó gyöki dúc idegsejt aktivitásának mérésére alkalmas harmadik módszer, amelyet a munkánk során használtunk, a transzmitter



5.16. ábra. Kapszaicin adagolás CGRP felszabadulást indukál a patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben. (Ahluwalia és munkatársai, 2003a).

felszabadulás mérése. Ezekben a kísérletekben a CGRP koncentrációját mértük az extracelluláris folyadékban konvencionális enzim kapcsolt

immundetektálással.

A tápfolyadékban növesztett hátsó gyöki dúc idegsejtekből három perces kapszaicin (3nM – 1μM) kezelés koncentráció függő CGRP felszabadulást váltott ki. A legalacsonyabb kapszaicin koncentráció, ami szignifikánsan megnövelte a CGRP felszabadulást 30nM volt (5.16. ábra). A CGRP felszabadulás 100nM-ál elérte a maximumát.

Ezekkel a TRPV1 működését vizsgáló kísérletekkel egyrészt a csatorna válaszadási jellegzetességeit határoztuk meg, másrészt megbizonyosodtunk, hogy ezek a módszerek alkalmasak a TRPV1 által közvetített válaszok, illetve TRPV1 közvetített válaszoknak a CB1 receptor aktiválásával kiváltott esetleges változásainak a vizsgálatára.

5.3. A KANNABINOID 1 RECEPTOR KIFEJEZŐDÉSE ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

5.3.1. A KANNABINOID 1 RECEPTOR KIFEJEZŐDÉSE PATKÁNY HÁTSÓ GYÖKI DÚC ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Korábbi kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a hátsó gyöki dúc idegsejteknek egy része kifejezi a kannabinoid 1 (CB1) receptor mRNS-t, és hogy a CB1 receptor mRNS-t kifejező sejtek egy része a fájdalom érző hátsó gyöki dúc idegsejtekre jellemző neuropeptideket tartalmaznak (Hohmann és Herkenham, 1999). További korábbi kísérletek eredményei azt is mutatták, hogy a tricált CB1 receptor ligand, H3CP55,940 a fájdalomérzést közvetítő hátsó gyöki dúc idegsejteknek gerincvelői végződési területén kötődik (Herkenham és munkatársai, 1991; Glass és munkatársai, 1997; Mailleux és Vanderhaeghen, 1992). Ezek az adatok azt sugallták, hogy a kannabinoidokkal kiváltható és a perifériás szövetekben közvetítő hátsó gyöki dúc idegsejtekben történő kifejeződése lehet. Ezért, ezen kísérleteinkben a CB1 receptor kifejeződését vizsgáltuk hátsó gyöki dúc idegsejteken RT-PCR, Western-blotting valamint egyes és kombinált immunhisztokémiai festés segítségével.

A RT-PCR, hasonlóan a bizonyítottan CB1 receptort kifejező hipokampuszhoz (Breivogel és Childers, 1998), CB1 receptor mRNA kifejeződést mutatott a hátsó gyöki dúcban. A PCR termék mérete megkülönböztethetetlen volt a PCR termék elméleti várható értékétől (5.17. ábra). Hasonlóan a RT-PCR eredményeihez, a Western-blotting is jelezte a CB1 receptor kifejeződését mind a hipokampuszban, mind a hátsó gyöki dúcban. Egy, a CB1 receptor ellen termelt specifikus és szelektív antitest a Western-blottokon két különböző méretű fehérje jelenlétét mutatta (5.17. ábra): egy 50-55 kDa és egy 65 kDa molekulasúlyúét. (A CB1 receptor ellen termelt antitest specifikus és szelektív voltát egy sor kontrol kísérlet segítségével mutattuk ki (Veress és munkatársai, 2013). Míg az 50-55 kDa súlyú fehérje megfelel a nem glikozilált CB1 receptor molekulasúlyának, a 65 kDa

~65kDa ~55kDa spinal spinal hippoc urinary skin dorsal cord

root

cord

dorsal ventral ganglion súlyú fehérje a glikozilált CB1 receptor molekulasúlyának felel meg (Song és Howlett, 1995).

A CB1 receptor hátsó gyöki dúcban kifejeződését történő

5.17. ábra. CB1 receptor kifejeződése patkany hátsó gyöki dúcában es más idegrendszeri szöveteiben. A felső gél a kifejeződést CB1 receptor mRNA mutatja RT-PCR módszerrel, míg az alsó gél Western blot után mutatja a CB1 receptor fehérje kifejeződését a gerincvelő hátsó szarvában (spinal dorsal horn), a gerincvelő elülső szarvában (spinal ventral horn), a hippocampusban (hippoc), a hátsó gyöki dúcban (dorsal root ganglion), húgyhólyagban (urinary bladder) és a bőrben (skin). (Veress és munkatársai, 2013).

immunhisztokémiai festésekkel vizsgáltuk tovább. A specifikus és szelektív CB1





5.18. ábra. CB1 receptor kifejeződése patkány elsődleges érző idegsejtekben. (a) CB1 receptort kifejező elsődleges érző idegsejtekegy specifikus és szelektív CB1 receptor ellenes antitesttel végzett reakció után. Optikai vastagság 4µm. A skála 50µm-nek felel meg. (b) A CB1 receptor kifejező (szürke oszlopok) és a CB1 receptor immunonegatí (fehér oszlopok) méret eloszlása. (Veress és munkatársai, 2013).

receptor ellenes antitest tisztán felismerhető jelölődést okozott mind a citoplazmában, mind а citoplazma membránban (5.18. A ábra). A jelölődés pontszerűen jelent meg mind а citoplazmában, mind a citoplazma

membránban (5.18. A ábra). Egyszerű mikroszkópos megfigyelés alapján úgy tűnt,

hogy a sejtek kb 30%-a fejezheti ki a CB1 receptort. A képelemzés eredménye megerősítette ezt a feltevést, mert az elemzésbe bevont, véletlenszerűen kiválasztott 377 sejtből 124 (33.22±1.8%, n=3) bizonyult CB1 receptor immunpozitívnak. A CB1 receptor immunpozitív sejtek átlagos átmérője 31.47±0.64µm (n=124) volt. Ez az átmérő szignifikánsan kisebb volt mint a CB1 receptor immunpozitív sejtek átlagos átmérője (36.03±1.91µm, n=253). A CB1 receptor immunpozitív és immunnegatív sejtek méreteloszlása (5.18. B ábra) azt mutatta, hogy a kisméretű sejtek több mint a fele, míg a közepes méretű sejteknek mintegy a fele fejezi ki a CB1 receptort. A sejtek méreteloszlása azt is mutatta, hogy a nagy méretű sejtek közül csak kevés fejezi ki a CB1 receptort (5.18. B. ábra). Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a CB1 receptort elsősorban a kisméretű, tehát a fájdalomérzést közvetítő sejtek fejezi ki.





5.19. ábra. A CB1 receptor és az elsődleges érző idegsejtek csoportjaira jellemző molekulák együttes kifejeződése a patkány hátsó gyöki dúcában. (a)CGRP kifejeződése. (b) CB1 receptor kifejeződése. (c) IB4 kötőhely kifejeződése. (d)A három molekula eggyüttes kifejeződése. (e) A három molekulát kifejező sejtek megoszlása. (Veress és munkatársai, 2013).

A	mint	em	lítetten	n az
előzőekbe	en,	a f	ăjdaloı	mérzést
közvetítő	hát	tsó	gyöki	dúc
idegsejtek	knek			fele

neuropeptideket, másik fele az IB4

izolektin kötőhelyét fejezi ki (Plenderleith és Snow, 1993; Price, 1985; Silverman és Kruger, 1988; Averill és munkatársai, 1995; Molliver és munkatársai, 1995) és a két

sejtcsoport eltérő élet- és gyógyszertani tulajdonságokkal, valamint funkcióval rendelkezik (Bennett és munkatársai, 1996a; Bennett és munkatársai, 1996b; Perry és Lawson, 1998; Breese és munkatársai, 2005; Todd, 2010; Cavanaugh és munkatársai, 2009; Vilceanu és munkatársai, 2010; Stucky és Lewin, 1999; Petruska és munkatársai, 2000; Dirajlal és munkatársai, 2003; Liu és munkatársai, 2004; Zylka, 2005). Ezért, a következő kísérletben a CB1 receptor és a CGRP valamint IB4 izolektin kötőhely kifejeződése közötti összefüggést vizsgáltuk (5.19. ábra). Ezek a kombinált immunhisztokémiai festések azt mutatták, hogy a CGRP immunpozitív sejtek 61.14±5.2%-a (n=3 állat) immunpozitív a CB1 receptorra, míg a CB1 receptor immunpozitív sejtek 62.99±5.3%-a (n=3 állat) immunpozitív CGRP-re. Ugyanakkor, az IB4 izolektin kötőhelyét kifejező sejtek 34.48±9.4%-a (n=3 állat) mutatott immunpozitivitást CB1 receptorra, míg a CB1 receptort kifejező sejtek 34±8.8%-a (n=3 állat) mutatott immunpozitivitást a CB1 receptorra. Mind a CGRP immunpozitív, mind az IB4 izolektin kötőhelyét kifejező sejtek a teljes sejtállomány kb 33%-t tették ki (CGRP: 32.17±0.75%, n=3 állat, IB4 izolektin kötőhely: 33.78±255%, n=3 állat). Ezért eredményeink azt sugallták, hogy a CB1 receptor aktiválása elsősorban a neuropeptideket tartalmazó hátsó gyöki dúc idegsejtekben, amelyek mind zsigeri mind szomatikus beidegzésben résztvesznek és elsősorban hőingerlésre érzékenyek, idézhet elő gátló hatást (Cavanaugh és munkatársai, 2009; Perry és Lawson, 1998; Plenderleith és Snow, 1993; Bennett és munkatársai, 1996a; Bennett és munkatársai, 1996b).

5.3.2. A KANNABINOID 1 RECEPTOR KIFEJEZŐDÉSE PATKÁNY TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Hasonlóan a TRPV1 kifejeződéshez, a CB1 receptor kifejeződésének esetleges tápfolyadékban történő növesztés által okozott változását is megvizsgáltuk patkány hátsó gyöki idegsejtein. Ebben a kísérletben a tápfolyadékban növesztett patkány hátsó gyöki dúc idegsejteken végeztünk immunfestést. Az CB1 receptor immunreakció könnyen felismerhető jelölést eredményezett az idegsejtek



5.20. **CB1** ábra. receptor kifejeződése patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejten. A nyíl egy CB1 receptort kifejező sejtet mutat. A skála 25µm-nek felel (Ahluwalia és munkatársai, meg. 2000).

citoplazmájában (5.20. ábra). A CB1

immunpozitív sejtek a sejtkultúrákban egyenletesen oszlottak meg. A CB1 immunreakció a sejtek 57±2%-ban eredményezett jelölést (n=3), amely szignifikánsabb magasabb érték, mint a hátsó gyöki dúcban talált CB1 receptort



5.21. ábra. CB1 immunpozití és immunnegatív sejtek méret eloszlása. (Ahluwalia és munkatársai, 2000).

kifejező sejtek aránya. A jelölt sejtek nagy részének felülete $200\mu m^2$ és $800\mu m^2$ között volt (átlagos felület: $527\pm68\mu m^2$, ami $25\mu m$ sejtátmérőnek

felel meg). A jelöletlen sejtek átlagos mérete (871±60µm², ami 33µm sejtátmérőnek felel meg) jelentősen nagyobb volt a jelölt sejtek méreténél. A jelölt sejtek méret megoszlása normál megoszlást mutatott, ami egy jól definiált sejtcsoport jelenlétére utalt (5.21. ábra).

Hasonlóan a hátsó gyöki dúc sejtjeihez, a tápfolyadékban növesztett sejteken is megvizsgáltuk a CGRP és a IB4 izolektin kötőhely kifejeződését. Ezeket a kísérleteket hármas immunfestés alkalmazásával végeztük, amelyben anti-CB1



5.22. ábra. CB1 receptor együttes kifejeződése a fájdalomérző elsődleges érző idegsejtek két nagy csoportját elkülönítő molekulákkal patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. (A) A CB1 receptor, CGRP és IB4 kötőhely együttes kifejeződése. (B) CGRP kifejeződése. (C) CB1 receptor kifejeződése. IB4 kötőhely kifejeződése. A skáka 100µm-(Ahluwalia nek felel meg. és munkatársai, 2000).

receptor- és anti-CGRP-antitesteket,

valamint biotinhoz kötött IB4 izolektint

használtunk. A hármas festések eredménye azt mutatta, hogy a CB1 immupozitív sejtek aránya a teljes sejtpopulációban 47±3.2% (n=5) volt. A CGRP immunpozitív valamint az IB4 lektin kötő sejtek aránya 21.8±3.3% (n=5), valamint 32.7±5.6% (n=5) volt (5.22. és 5.23. ábra). Az összes sejt 1.4±0.2%-a mutatott pozitivitást mind CGRP-re, mint IB4 lektin kötő helyre.

A három protein kifejeződési mintázatát az 5.23. ábra mutatja. A CB1 receptor immunpozitív sejtek egy része (31.7±5%, n=5) immunpozitivitást mutatott CGRP-re. A CB1 receptor immunpozitív sejtek egy másik része (48.2±7.5%, n=5) IB4 izolektin kötőhelyet fejezett ki. A CB1 immunpozitív sejtek 19.1±3.3%-ban (n=5) sem CGRP



5.23. ábra. A CB1 receptor-t kifejező patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtek két fő csoportjában. (Ahluwalia és munkatársai, 2000).

immunpozitivitást sem IB4 kötőhelyet nem találtunk. Ugyanakkor, a CB1 receptor immupozitív sejtek 1±0.5%-a tartalmazott mind CGRP-t mint IB4 izolektin kötőhelyet. A CGRP immunpozitív sejtek 74±16.1% (n=5), míg az IB4 izolektint kötő sejtek 70.9±5.7%-a (n=5) fejezett ki CB1 receptort.

Ezen eredmények összevetése a hátsó gyöki dúcból készült metszeteken talált adatokkal eltérést mutatott a CB1 receptort kifejező sejtek arányában, és a CB1 receptor kifejeződésében a peptid tartalmú és az IB4 izolektin kötőhelyet kifejező sejtek között. Ennek a különbségnek az oka lehet a tápfolyadékban történő növesztés, vagy ismét a különböző antitestek és analizáló módszerek használata. Szintén lehetséges, hogy a különböző dúcokban eltérő a CB1 receptor kifejeződésének az aránya a peptid tartalmú és IB4 izolekin kötőhelyet kifejező sejtek között. Továbbá, míg a sejt kultúrák készítéséhez valamennyi hátsó gyöki dúcot felhasználtunk, addig az *in situ* kifejeződést csak az L4 és L5 hátsó gyöki dúcokban vizsgáltuk.

Mivel a neuropeptideket tartalmazó sejtekben az idegnövekedési faktor (NGF), míg az IB4 izolektin kötőhelyet kifejező sejtekben a glia eredetű növekedési faktor (GDNF) szabályozza egy sor gén kifejeződését (Snider és McMahon, 1998; Bennett és munkatársai, 1998), a következő kísérletben ennek a két növekedési faktornak a hatását vizsgáltuk a CB1 receptor kifejeződésére. A növekedési faktorok hatásának ellenőrzésére a TRPV1 kifejeződés vizsgálatát használtuk, mivel a *trpv1* gén kifejeződését az NGF is és a GDNF is szabályozza (Michael és Priestley, 1999; Ogun-Muyiwa és munkatársai, 1999; Bevan és Winter, 1995; Winter és munkatársai, 1988).

Azokban a kultúrákban amelyek NGF és GDNF jelenléte nélkül növekedtek a TRPV1 immupozitív sejtek aránya 42.4±1.2%-ról 13.4±2.7%-ra csökkent (n=4). Ez a csökkenés az NGF-t és GDNF-t tartalmazó médiumban talált adatokhoz képest kb 70%-os volt, és statisztikailag jelentős. A legtöbb TRPV1 immunpozitív sejt ezen

körülmények között nagyon kis méretű volt és nagyon erős immunpozitivitást mutatott.

A TRPV1 immunpozitivitással ellentétben a CB1 receptor immunpozitivitása az NGF és GDNF hiányában nem mutatott változást (51±2.6% n=4 az NGF és GDNF jelenlétében, és 50.6±1.1, n=4 az NGF és GDNF hiányában). Az ezen körülmények között a CB1 receptor immunpozitív sejtek átlagos átmérője 21±0.4µm volt, ami jelentősen különbözött az NGF és GDNF jelenlétében növekedett CB1 receptor immunpozitív sejtek átmérőjétől (19.1±0.3µm). Mindkét esetben a 19-22µm tartományban volt a legtöbb a CB1 receptor immunpozitív sejtek aránya. Azonban, míg az NGF és GDNF jelenlétében növekedő CB1 receptor immunpozitív sejteknek csak 10%-a tartozott a 25-28µm tartományba, addig az NGF és GDNF nélkül növekedő CB1 receptor immunpozitív sejteknek kb 20%-a tartozott ebbe a tartományba. Ugyanakkor, mindkét esetben nagyon kevés volt a 28µm-nél nagyobb CB1 receptor immunpozitív sejtek aránya.

Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a CB1 receptor a fájdalom érző hátsó gyöki idegsejteknek mind a két nagy csoportja kifejezi. Ezek az eredmények továbbá azt is mutatták, hogy a CB1 receptor kifejeződését sem az NGF, sem a GDNF nem befolyásolja lényegesen, legalább is a tápfolyadékban való növekedés 7. napjáig.

Összességében ezen kísérlet eredménye azt sugallta, hogy hasonlóan a TRPV1 kifejeződéséhez, a CB1 receptor kifejeződése is, legalábbis az első két nap alatt, megnövekszik a tápfolyadékban történő növesztés hatására. Ahogy már említettem, ennek a növekedésnek az egyik oka lehet, hogy a (CB1 receptort és a TRPV1-t nem kifejező) nagy méretű sejtek egy részét elveszítjük a sejtkultúra készítése közben. A CB1 receptor esetében a másik ok lehet, hogy a hátsó gyöki dúcból készített metszeteken és a tápfolyadékban növesztett sejteken különböző CB1 receptor ellenes

antitesteket és más analízis módszert használtunk. Ezen különbségek ellenére mind a hátsó gyöki dúcból készített metszeteken, mind a tápfolyadékban növesztett sejtekből készített készítményeken a kis méretű, tehát fájdalom érzést közvetítő, sejtek jelölődtek a CB1 receptor ellenes antitesttel. Érdekességképpen megemlítendő, hogy a tápfolyadékban növesztett akár TRPV1-t vagy CB1 receptor kifejező vagy nem kifejező sejtek átlagos átmérője kisebb mint a hasonló tulajdonságú sejtek átlagos mérete a hátsó gyöki dúcban.

5.3.3. A KANNABINOID 1 RECEPTOR KIFEJEZŐDÉSE PATKÁNY HÚGYHÓLYAGBAN

A húgyhólyag CB1 receptor ellenes antitesttel történő immunfestése után a nyálkahártyában találtunk CB1 receptor immunpozitivitást mutató varikózus idegrostokat (5.24 ábra). Néhány CB1 receptor immunpozitív idegrost az



5.24. ábra. A CB1 receptor és CGRP együttes kifejeződése a patkány húgyhólyagban. (a) CB1 receptor kifejeződése idegrostokban. (b) CGPR kifejeződés idegrostokban. (c) A CB1 receptor és a CGRP együttes kifejeződése. A skála 50µm-nek felel meg. A nyilak a két molekulát együttesen kifejező idegrostokat jelől. A nyílhegyek a csak CB1 receptort kifejező idegrostokat jelöli. A szaggatott vonal az hám és a submucosa határát jelöli. (Veress és munkatársai, 2013).

izomrétegben is látható volt. A *trigonum vesica urinalis* több CB1 receptor immunpozitív idegrostot tartalmazott mint más részek, például a hólyag nyaka vagy teste. A CB1 receptor immunpozitív rostoknak egy része mutatott CGRP immunpozitivitást (5.24. ábra). Az előző adatainkhoz hasonlóan nem találtunk IB4 izolektin kötőhelyet kifejező idegrostokat a húgyhólyagban (Avelino és munkatársai, 2002).

5.4. A KANNABINOID 1 RECEPTOR ÉS A TRPV1 EGYÜTTES KIFEJEZŐDÉSE HÁTSÓ GYÖKI DÚC ÉS TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT PATKÁNY ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Mint fentebb említettem, eddigi eredményeink azt valószínűsítették, hogy a



5.25. ábra. A CB1 receptor és TRPV1 együttes kifejeződése patkány hátsó győki dúc idegsejteken. (A) A TRPV1 kifejeződése. (B) A CB1 receptor kifejeződése. (C) A magfestő DAPI megjelenése. (D) A TRPV1 és CB1 receptor együttes kifejeződése DAPI-val festett metszeten. A skála 50µm-nek felel meg. (Chen és munkatársai, 2016). CB1 receptor és а TRPV1 a sejtek egy részében együtt fejeződik ki. Ennek a lehetőségnek а vizsgálatára kettős immunfestést végeztünk mind hátsó gyöki dúcból készített metszeteken, mind a tápfolyadékban patkány növesztett hátsó gyöki dúc idegsejteken.

A hátsó gyöki

dúcból készült metszeteken (5.25. ábra) a TRPV1-t kifejező sejteknek a 88.3±3.8%-a mutatott immunpozitivitást a CB1 receptor antitesttel.

A sejtkultúrán végzett első kísérletünk eredménye azt mutatta, hogy míg a sejtek 55±2%-a (n=3) volt CB1 receptor immunpozitív, 47±1%-a (n=3) volt immunpozitív TRPV1-ra (5.26. ábra). Ez a festés azt is mutatta, hogy a CB1 receptort kifejező sejtek 82±3% (n=3) volt TRPV1 immunpozitív. Ugyanakkor, szinte

valamennyi TRPV1 immupozitív sejt immunpozitivitást mutatott a CB1 receptorra (98±2, n=3).



5.26. *ábra. A CB1 receptor és TRPV1 együttes kifejeződése patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben.* (*A*) *A CB1 receptor kifejeződése.* (*B*) a *TRPV1 kifejeződése.* (*C*) a *CB1 receptor és TRPV1 együttes kfejeződése. A skála* 25*mm-nek felel meg.* (*Ahluwalia és munkatársai,* 2000).

Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a TRPV1 és a CB1 receptor valóban nagymértékű közös kifejeződést mutat mind az intakt hátsó gyöki dúc idegsejtjein, mind a tápfolyadékban növesztett hátsó gyöki idegsejteken. Ez az eredmény különösen érdekes annak fényében, hogy, ahogy a bevezetésben ismertettem, egy sor endogén aktivátor (pl. anandamid, noladin éter, N-arachidon-dopamin, N-oleoiletanol-amid, N-palmitoil-etanol-amid, N-arachidon-glicin), képes mind a két receptort aktiválni, és a két receptor aktiválásán keresztül ellentétes választ indukálni. Ezen eredmények alapján feltételeztük, hogy a TRPV1 és CB1 receptor közös aktivátorai szabályozzák a fájdalom érző elsődleges érző idegsejtek egy jelentős hányadának az aktivitását és ezek keresztül a fájdalom kialakulását és fenntartását. A közös aktivátorok közül a munkám során az anandamid hatását vizsgáltam. 5.5. AZ ANANDAMID METABOLIKUS ENZIMEINEK KIFEJEZŐDÉSE ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

5.5.1. AZ ANANDAMIDOT HIDROLIZÁLÓ FAAH KIFEJEZŐDÉSE PATKÁNY ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN



5.27. *ábra. A FAAH kifejeződése patkány hátsó gyöki dúc idegsejteken.* (*A*) *FAAH mRNA kifejeződés L4 hátsó gyöki dúc idegsejtekben (első és második termék), hippocampusban (harmadik termék es a gerincvelőben (negyedik termék).* (*B*) *FAAH fehérje kifejeződés vad típusú (FAAH+/+) és FAAH génhiányos (FAAH-/-) egér L4 hátsó gyöki dúc idegsejtekben. (C-F, N) Antitest kontrolok: (C) kimerített antites patkány hátsó gyöki dúc, (D) nem kimerített antitest patkány hátsó gyöki dúc, nem kimerített antites FAAH+/+ egér hátsó gyöki dúc, nem kimerített antites FAAH+/+ egér hátsó gyöki dúc idegsejtekben. (G) FAAH kifejeződés patkány hátsó gyöki dúc idegsejtekben, kisnagyítás. (H-J) FAAH és NeuN (idegsejti magfehérje) együttes kifejeződése patkány hátsó gyöki dúc idegsejtekben. FAAH zöld (H), NeuN piros (I), közös kifejeződés (J).*

5.27. *ábra. (folyt.)* (K-M) FAAH és NeuN közös kifejeződése nagy nagyítású felvétel. FAAH zöld (K), NeuN piros (L), közös kifejeződés (M). A nyilak két FAAH-t kifejező sejtre mutatnak. (N) Alternatív FAAH antitest általi reakcio patkány hátsó gyöki dúc idegsejtekben. (Lever és munkatársai, 2009).

Az TRPV1 és CB1 receptor kifejeződését vizsgáló kísérleteink eredménye azt mutatta, hogy a sejtek egy jelentős hányada lehet képes anandamidra válaszolni. Ezért feltételeztük, hogy vagy maguk az elsődleges érző idegsejtek vagy a velük közvetlen kapcsolatban lévő sejtek rendelkeznek anandamid lebontó képességgel. Ahogy azt az előzőkben ismertettem, a FAAH az elsődleges anandamid hidrolizáló enzim. Ezeknek megfelelően, a FAAH kifejeződését vizsgáltuk az elsődleges érző neuronokban 5.27. ábra (Lever és munkatársai, 2009).

Az RT-PCR és immunblot eredmények azt mutatták, hogy a hipokampuszhoz hasonlóan a hátsó gyöki ganglionokban is kifejeződik a FAAH (5.27. A és B ábra). Az immunfestés eredménye megerősítette a FAAH kifejeződését a hátsó gyöki ganglionban (5.27. C-N ábra). Ezek a festések azt is feltárták, hogy a FAAH-t az elsődleges érző idegsejtek egy csoportja fejezi ki (5.27. C-N ábra). Az immunfestés analízise alapján a sejtek mintegy 1/3-a mutatott FAAH immunpozitivitást (32.7±0.8%). A FAAH immunpozitivitást mutató sejtek méreteloszlása azt mutatta, hogy a FAAH-t kifejező sejtek kis méretűek. Ennek megfelelően az átlagos átmérőjük 396±5.6µm² volt, ami szignifikánsan kisebb, mint a FAAH-t nem kifejező sejtek mérete (511.9±8.4µm², 5.27. C-N ábra).

A FAAH kifejeződés sejt típusra vonatkozó megoszlását kombinált immunfestéssel vizsgáltuk (5.28. ábra). A FAAH-t kifejező sejtek 85.6±7.2%-a mutatott immunpozitivitást az anti-periferin antitest használatával, ami elsősorban a kis méretű fájdalomérző sejteket mutatja ki. A periferin immunpozitív sejtek 48.6±5.7%-a fejezte ki a FAAH-t. Ezeknek az adatoknak megfelelően a nagy méretű, fájdalomérzést kiváltó ingerekre nem válaszoló sejteket kimutató 200kDa-os neurofilamentet kifejező sejtek kevesebb mint 2%-a fejezte ki a FAAH-t.



5.28. ábra. A FAAH együttes kifejeződése az elsődleges érző idegsejt csoportokat megkülönböztető molekulákkal patkány hátsó gyöki dúc idegsejtekben. (A) A FAAH-t kifejező sejtek méreteloszlása. (B) A FAAH (piros) és periferin (zöld) együttes kifejeződése és a sejtek méreteloszlása. (C) A FAAH (piros) és NF200 (zöld) együttes kifejeződése és a sejtek méreteloszlása. (D) A FAAH (zöld) és TRPV1 (piros) együttes kifejeződése és a sejtek méreteloszlása. (E) A FAAH (zöld) és TRPV1 (piros) együttes kifejeződése és a sejtek méreteloszlása. (F) A FAAH (piros) és CGRP (zöld) együttes kifejeződése és a sejtek méreteloszlása. (F) A FAAH (piros) és CGRP (zöld) együttes kifejeződése és a sejtek méreteloszlása. A nyílhegyek kettősen jelőlt sejtekre mutatnak. (Lever és munkatársai, 2009).

A periferint kifejező sejtek vagy peptideket tartalmaznak, vagy IB4 kötőhelyet

fejeznek ki. A FAAH-t kifejező sejtek 72±4.2%-a fejezte ki az IB4 kötőhelyet míg 39.4±13.1%-a CGRP-t (5.28. ábra). Amint azt feltételeztük, a FAAH-t kifejező sejtek nagy hányada fejezte ki a TRPV1-t (64.5±3.2%, 5.28. ábra).



sejtet, míg a csillag egy immunnegatí sejtet jelől. (B) A FAAH-t és NF200-t kifejező sejtek méreteloszlása. (Lever és munkatársai, 2009). FAAH immunopozitivitást (5.29. ábra). Az intakt dúcban talált adatoknak megfelelően, a FAAH-t kifejező sejtek csak 1.5±1.2%-a mutatott immunpozitivitást

az anti-NF200 antitesttel (5.29. ábra). A FAAH immunpositív sejtek átlagos mérete $302.1\pm16.9 \ \mu\text{m}^2$ volt, amely szignifikánsan kevesebb mint a FAAH immunnegatív sejtek átlagos átmérője (650.9±87.6 μm^2).

Ezek az adatok megerősítették a feltevésünket, hogy a fájdalom érző elsődleges érző idegsejtek egy jelentős hányadában lehetséges az autokrin endovanilloid és endokannabinoid jelzőrendszerrel jelenléte. Következő lépésként az anandamidot szintetizáló enzimek jelenlétét vizsgáltuk az elsődleges érző neuronokban.

5.5.2. AZ ANANDAMIDOT SZINTETIZÁLÓ ENZIMEK KIFEJEZŐDÉSE ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

5.5.2.1. KALCIUM ÉRZÉKENY ANANDAMIDOT SZINTETIZÁLÓ ENZIMEK KIFEJEZŐDÉSE ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Általánosan elfogadott, hogy lipofil jellege miatt, az anandamid a keletkezési helyének közvetlen közelében fejti ki a hatását. Így feltételezhető, hogy hasonlóan a FAAH kifejeződéséhez, az elsődleges érző idegsejtekkel közvetlenül kapcsolatba kerülő sejtek (pl. epidermisz bazális membránhoz közel fekvő sejtjei, szatellita sejtek, másodlagos érző idegsejtek) illetve maguk az elsődleges érző idegsejtek szintetizálják azt az anandamidot amely az elsődleges érző idegsejteken található TRPV1 és CB1 receptorokat aktiválják. A ma ismert anandamidot szintetizáló enzimatikus útvonalak közül elsőnek a kalciumra érzékeny NAPE-PLD enzim által katalizált útvonal kifejeződését vizsgáltuk.

Először, RT-PCR-t használtunk egér tápfolyadékban növesztett hátsó gyöki dúcsejtkeből izolált RNS-hez szintetizált DNS felhasználásával. Kontrolként szívizomból és agyból izolált RNS-hez szintetizált cDNS-t használtunk, mivel irodalmi adatok alapján e két szövetben nagy mennyiségű NAPE-PLD mRNS kifejeződése volt várható (Okamoto és munkatársai, 2004; Morishita és munkatársai, 2005; Leung és munkatársai, 2006). A reakció kontroljaként a gliceraldehide-3foszfát dehidrogenáz (GAPDH) mRNS kifejeződését vizsgáltuk.

Ahogy várható volt, az RT-PCR két mRNS jelenlétét mutatta a mintákban (5.30. ábra). Az egyik RT-PCR termék 350 és 400 bázispár, míg a másik 200-250 bázispár nagyságú volt (5.30. ábra). Míg a nagyobbik termék a GAPDH termék várható méretének, a kisebbik termék a NAPE-PLD termék várható méretének felelt

meg. Ezek az adatok azt mutatták, hogy a tápfolyadékban növesztett hátsó gyöki dúcsejtek kifejezik a NAPE PLD mRNS-t.

Jól ismert, hogy a kapszaicin a tápfolyadékban növesztett hátsó gyöki dúcsejtek kapszaicinre érzékeny populációjának nagy részében degenerációt okoz (Porszasz és Jancso, 1959; Jancso és munkatársai, 1977; Carpenter és Lynn, 1981; Heyman és Rang, 1985; Wood és munkatársai, 1988). Ezért annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy a NAPE-PLD kapszaicin érzékeny idegsejtekben fejeződik-



e ki, a kultúrákat egy éjszakára 10 μM kapszaicinnel kezeltük és az RNS mintákat mind RT-PCR mind quantitatív valós idejű PCR-ban használtuk.

5.30. ábra. NAPE-PLD mRNA kifejeződése egér kultúrnédiumban elsődleges növesztett érző idegsejtekben. A minták (A)-n és (B)-n agyból (1), szívből (2), hátsó dúcból gyöki (3) és kultúrnédiumban növesztett elsődleges érző idegsejtekből (4) származnak. DNS méret jelző (5). (A) GAPDH mRNA kifejeződés a különböző mintákban. (B) NAPE-PLD mRNA kifejeződés különböző mintákban. (C) NAPE-PLD (1) és GAPDH (4) kifejeződés kapszaicin mentes kultúrnédiumban növesztett elsődleges érző idegsejtekből. NAPE-PLD kifejeződés kapszicint tartalmazó kultúrnédiumban növesztett elsődleges érző idegsejtekből (3) és agyból (4). DNS méret jelző (5). (Nagy és munkatársai, 2009a).

A kontrol kultúrákból származó mintákban, a fent leírtakhoz hasonlóan a NAPE-PLD mRNS kifejeződése volt látható (5.30. és 5.31. ábrák). Amint az várható volt, a mintákban a TRPV1 mRNS is nagy mennyiségben volt jelen (5.30. és 5.31. ábrák). A kapszaicinnel kezelt kultúrákban azonban mind a NAPE-PLD mind a TRPV1 mRNS kifejeződése jelentősen lecsökkent (5.30. és 5.31. ábrák). Ezen eredmények azt mutatták, hogy a NAPE-PLD mRNS t kifejező sejtek nagy része kapszaicinre érzékeny, tehát TRPV1-t is kifejez.





5.31. ábra. Relative NAPE-PLD és TRPV1 mRNA kifejeződése kapszaicint tartalmazó vagy kontrol tápfolyadékban növesztett egér elsődleges érző idegsjteken. (Nagy és munkatársai, 2009a).

gyöki

megvizsgáltuk a NAPE-PLD kifejeződését.

ganglionban

is

A NAPE-PLD mRNS kifejeződését mint RT-PCR mind *in situ* hibridizációs módszerrel kimutattuk (5.32. ábra). Az *in situ* hibridizációval készült metszeteken csak a neuronok egy csoportja mutatta a komplementer RNS kötődését (5.32. ábra). A pozitív sejtek elsősorban kis átmérőjűek voltak, de néhány nagy átmérőjű sejt is mutatta a komplementer RNS kötődését (5.32. ábra).

intakt

hátsó

A NAPE-PLD fehérje kifejeződést is két módszerrel, immunblottal és immunfetéssel, vizsgáltuk (5.33. ábra). Mindkét módszer azt mutatta hogy a NAPE-PLD fehérje kifejeződik az intakt hátsó gyöki dúc idegsejtjein (5.33. A ábra). Hasonlóan a NAPE-PLD komplementer RNS kötődését mutató sejtekhez, a NAPE-PLD fehérjét kifejező sejtek is elsősorban kis átmérőjűek voltak, de néhány nagy méretű sejt is mutatott immunpozitivitást (5.33. B ábra). Ennek megfelelően, a NAPE-PLD immunpozitiv sejtek méretbeli megoszlása is azt mutatta, hogy a kis átmérőjű sejtek egy jelentős hányada mutat NAPE-PLD kifejeződését, míg a nagy átmérőjű sejteknek csak egy kis része (5.34. ábra). Összességében, a sejtek 38.3±0.3%-a mutatott NAPE-PLD immunpozitivitást.







5.32. ábra. NAPE-PLD kifejeződése patkány hátsó gyöki dúcában. (a) NAPE-PLD mRNA kifejeződése patkány hátsó gyöki dúcában. N: NAPE-PLD, G: GAPDH, L: DNS méret jelző. (b) NAPE-PLD mRNA kifejeződés fluorescent in hibridizációval kimutatva. situ A a NAPE-PLD nvílhegyek mRNS-t kifejező sejteket mutatják. (c) A (b) ábrán látható metszettel együtt inkubált metszet, amelynek az inkubációs puffere nem tartalmazta jelőlt oligonucleotidákat. A skála 20µm-t jelől. (Sousa-Valente és munkatársai, 2017).



5.33. ábra. NAPE-PLD fehérje kifejeződés hátsó gyöki dúcban. (a) kifejeződése különböző NAPE-PLD patkány és egér szövetben Western blottal kimuattava. R DRG, patkány hátsó gyöki dűc, KO BR, NAPE-PLD hiányos egér agy, WT BR, vad típusú egér egy. Felső panel NAPE-PLD kifejeződés, also panel β aktin (b) NAPE-PLD fehérje kifejeződés. kifejeződése immunfestés segítségével. A nvílhegvek NAPE-PLD immunpozitív elsődleges érző idegsejtekre mutatnak. A nvilak NAPE-PLD immunpozitív szatellita sejtekre mutatnak. A skála 30µm-nek felel meg. (Sousa-Valente és munkatársai, 2017).



5.35. ábra. A NAPE-PLD közös kifejeződése patkány elsődleges érző idegsejtek csoportjait elkülönítő molekulakkal hásó gyöki dúcban. (a-c) NAPE-PD és NF200 közös kifejeződése. (d-f) NAPE-PLD és az IB4 kötőhely közös kifejeződése. A nyílhegyek a közös kifejeződést mutató sejteket jelölik. (g-i) NAPE-PLD és CGRP közös kifejeződése. A nyílhegyek a közös kifejeződést mutató sejteket jelölik. A skála 50µm-t jelől. (Sousa-Valente és munkatársai, 2017).

Kombinált immunfestést használtunk a NAPE-PLD kifejező sejtek típusának

meghatározásához. A fájdalom érzést kiváltó ingerekre nem válaszoló sejteket
felismerő anti-NF200 antitest a NAPE-PLD-t kifejező sejteknek mintegy 1/3-t ismerte fel (31.28±3.89%, 5.35. ábra). Ezzel szemben, a NAPE-PLD immunpozitiív sejtek 52.05±2.02%-a fejezte ki az IB4 kötőhelyet (5.35. ábra). Hasonlóan a NAPE-PLD és



5.36. ábra. A NAPE-PLD közös kifejeződése az endokannabinoid és endovanilloid rendszerhez tartozó főbb molekulákkal patány hásó gyöki dúc idegsejteken. (a-c) NAPE-PD és CB1 receptor közös kifejeződése. (d-f) NAPE-PLD és TRPV1 közös kifejeződése. (g-i) NAPE-PLD és FAAH közös kifejeződése. A nyílhegyek valamennyi ábran a közös kifejeződést mutató sejteket jelölik. A skála 50µm-t jelől. (Sousa-Valente és munkatársai, 2017).

NF200 közös kifejeződéséhez, a NAPE-PLD-t kifejező sejtek 34.58±2.67%-a mutatott immunpozitivitást CGRP-re (5.35. ábra).

Annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy a NAPE-PLD milyen erősségű közös kifejeződést mutat a TRPV1-el, a CB1 receptorral illetve a FAAH-al, ismét kombinált immunfestést használtunk. Általánosságban elmondható, hogy a NAPE-PLD mind a három molekulával erős közös kifejeződést mutatott (5.36. ábra). Míg CB1 receptort a NAPE-PLD immunpozitív sejtek 72.71±1.75% fejezte ki, addig a sejteknek 59.89±1.33% mutatott immunpozitivitást TRPV1-re is (5.36. ábra). A FAAH-t a NAPE-PLD immunpozitív sejtek 62±2.8% fejezte ki (5.36. ábra). Ezek az adatok összességében megerősítették, hogy a NAPE-PLD- kifejező sejtek egy jelentős hányada kifejezi az anandamid mindkét fontos receptorát valamint az anandamid hidrolízisét végző FAAH-t.

5.5.2.2. KALCIUMRA NEM ÉRZÉKENY ANANDAMIDOT SZINTETIZÁLÓ ENZIMEK KIFEJEZŐDÉSE PATKÁNY TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN



5.37. ábra. Kalciumra nem érzékeny anandamid szintézisben feltehetően résztvevő jelenleg ismert enzimek kifejeződése patkány tápfolvadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. Azenzimek (A)mRNA kifejeződése. (B)Négy enzim protein kifejeződése. Az enzimeket piros szín jelöli. Az zöld szín az idegsejtjelölő NeuN kifejeződését mutatja, míg a kék a magfestő DAPI jelenlétét mutatja. A nyílhegy GDE1-t kifejező szatellita sejtre mutat. A skálák 25 um-nek felelnek meg. (Varga és munkatársai, 2014).

A kalciumra érzékeny NAPE-PLD kifejeződésének vizsgálata után, a kalciumra nem érzékeny enzimek kifejeződését vizsgáltuk. A számos lehetséges kalciumra nem érzékeny útvonal (3.9. ábra) enzimei közül ma ötnek ismerjük a molekuláris azonosságát (Cadas és munkatársai, 1996; Di Marzo és munkatársai, 1994; Hussain és munkatársai, 2017; Liu és munkatársai, 2006; Okamoto és munkatársai, 2004; Okamoto és munkatársai, 2007; Sun és munkatársai, 2004; Simon és Cravatt, 2008). RT-PCR segítségével mind az öt enzim kifejeződése látható volt (5.37. A ábra). A sejtes kifejeződést immunfestés segítségével vizsgáltuk. Az mRNS szintjén kifejeződő enzimek közül az ABHd4, GDE, Inpp5 és a PTPn22 kifejeződése volt egyértelműen kimutatható (5.37. B ábra). A sejtek mindegy fele mutatta a PTPn22 (48.53±10.04%), Inpp5 (44.1±1.9%) illetve GDE1 (40.27±9.94%) kifejeződést, míg a sejteknek csak kb 1/3-a mutatta az ABHd4 kifejeződését (29.8±1.9%).

Mivel az elsődleges érző idegsejtek egy jelentős része mind a NAPE-PLD-t és TRPV1-t is kifejezi, a következő kísérletben a kalciumra nem érzékeny enzimek és a TRPV1 közös kifejeződését vizsgáltuk (5.38. ábra). A kettős immunfestés eredménye azt mutatta, hogy a TRPV1-t kifejező sejtek mintegy két harmada fejezi ki az Inpp5



enzimet. A másik három enzim a TRPV1-t kifejező sejtek mindegy 1/4-

5.38. ábra. Kalciumra nem érzékeny anandamid szintézisben feltehetően résztvevő jelenleg ismert enzimek közös kifejeződése TRPV1-el patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. A zöld szín a TRPV1, míg a piros szín az enzimek kifejeződését mutatja. A csillagok olyan sejteket jelőlnek, amelyek mind a TRPV1-t, mind valamelyik enzimet kifejezik. A skálák 25µm-nek felelnek meg. (Varga és munkatársai, 2014).

1/5-ben fejeződött ki. Ennek megfelelően, míg az Inpp5-t kifejező sejtek fele mutatott immunpozitivitást TRPV1-ra, a többi enzimet kifejező sejteknek csak kb 15%-a.

Összességében ezek az eredmények azt mutatták, hogy a TRPV1-t kifejező elsődleges érző idegsejtek nagy hányada rendelkezik az anandamid szintézisét mind kalcium függő, mind kalcium független módon lehetővé tevő enzimekkel. A TRPV1 és a CB1 receptor nagymértékű közös kifejeződésével együtt ezek az eredmények megerősítették azt a feltételezésűnket, hogy a fájdalomérző elsődleges érző idegsejtek autokrin módon működő endokannabinoid endovanilloid és rendszerrel rendelkezhetnek, amely a sejtek aktivitásának nagyon finom szabályozását teszi lehetővé. Kísérleteink következő részében arra kerestük a választ, hogy az exogén és endogén anandamid hogyan befolyásolja a fájdalomérző elsődleges érző idegsejtek aktivitását.

5.6. AZ ANANDAMID SZINTÉZISE PATKÁNY TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN
5.6.1. AZ ANANDAMID SZINTÉZISE KALCIUMRA NEM ÉRZÉKENY ÚTVONALAKON KERESZTÜL PATKÁNY TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Általánosan elfogadott, hogy valamennyi anandamid szintetizáló útvonalban a kiinduló közös szubsztrát az N-arachidon-foszfatidil-etanolamin (NAPE, (Cadas és



5.39. *ábra. Anandamid szintézis patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben kalciumra nem érzékeny útvonalakon keresztül.* (A) 100μM NAPE indukált anandamid szintézis 37oC-on. (B) 100μM NAPE indukált anandamid szintézis szobahőmérsékleten. (C) A NAPE indukált anandamid szintézis konctréció függése. (D) A NAPE indukált anandamid szintézis kalcium függetlensége. (Varga és munkatársai, 2014).

munkatársai, 1996; Di Marzo és munkatársai, 1994; Hussain és munkatársai, 2017; Liu és munkatársai, 2006; Okamoto és munkatársai, 2004; Okamoto és munkatársai, 2007; Sun és munkatársai, 2004; Simon és Cravatt, 2008) (3.9. ábra). Ezért, hogy az elsődleges érző idegsejtekben felismert enzimek az anandamid szintézisében betöltött funkcióját vizsgáljuk, a sejteket NAPE jelenlétében inkubáltuk (5.39. ábra). A sejtek 100µM NAPE-ben történt 5 perces inkubálása mind 37°C mind szobahőmérsékleten szignifikánsan megnövelte az extracelluláris puffer anandamide tartalmát (5.39. A és dc_1608_18

B ábra). Azonban a szobahőmérsékleten történt inkubáció szignifikánsan több anandamid szintézist okozott (5.39. A és B ábra). A sejteknek különböző NAPE koncentrációk melletti inkubálása azt mutatta, hogy az anandamid szintézis a NAPE koncentrációjától függ (5.39. C ábra). A NAPE által indukált anandamid szintézis kalcium érzékenységét az extracelluláris puffer kalcium szint szabályozásával vizsgáltuk (5.39. D ábra). Az anandamid szint nem különbözött jelentősen a kalcium tartalmú illetve kalcium mentes extracelluláris oldatban (5.39. D ábra).

5.6.2. AZ ANANDAMID SZINTÉZISE KALCIUMRA ÉRZÉKENY ÚTVONALAKON KERESZTÜL PATKÁNY TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Ugyan kísérleteink eredményei egyértelműen bizonyították a kalcium érzékeny NAPE-PLD kifejeződését az elsődleges érző idegsejtek egy jelentős csoportjában (Sousa-Valente és munkatársai, 2017; Nagy és munkatársai, 2009a), a kalciumnak az extracelluláris folyadékból történő megvonása nem vezetett a NAPE indukált anandamid szintézis megváltozásához. Ezen eredmények alapján úgy gondoltuk, hogy a NAPE-PLD aktivitását csak a fiziológiás kalcium szint feletti koncentrációk befolyásolják. Előző kísérletünk eredménye azt is mutatta, hogy a NAPE-PLD és a TRPV1 jelentős közös kifejeződést mutat (Nagy és munkatársai, 2009a; Sousa-Valente és munkatársai, 2017). Ezért, következő kísérletünkben a fiziológiás kalcium szintet a TRPV1 aktiválásával növeltük. A kapszaicin (100nM) adagolása 5 percre a kimutathatóság alatti szintről jelentősen megemelte az extracelluláris puffer anandamid tartalmát (0.13ng/mg fehérje).

Összességében ezek az eredmények azt mutatták, hogy az elsődleges érző idegsejtek egy jelentős csoportjában a feltételezett anandamid szintetizáló enzimek

104

funcionálisak, és különböző hatásokra (NAPE vagy intracelluláris kalcium koncentráció fiziológiás szint fölé emelkedése) a sejtek anandamid szintézissel válaszolnak. Mivel a feltételezett anandamid szintetizáló enzimek valamint a CB1 receptor és TRPV1 jelentős közös kifejeződést mutat, a következőkben az endogén és exogén anandamid hatásait vizsgáltuk.

dc_1608_18

5.7. AZ ANANDAMID HATÁSA A TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN

5.7.1. AZ EXOGÉN ANANDAMID HATÁSA A KALCITONIN GÉN KAPCSOLT PEPTID FELSZABADULÁSÁRA PATKÁNY TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Az anandamid hatását először a sejtekből történő CGRP felszabadulással vizsgáltuk mivel feltételeztük, hogy az anandamid mind CB1 receptor közvetített gátló, mind TRPV1 által közvetített excitatórikus hatást is kivált. Ennek a feltételezésnek az alapja a CB1 receptor és a TRPV1 nagymértékű együttes kifejeződése (*vide supra*), illetve a két receptor anandamid érzékenysége valamint a két receptor aktiválásának a sejt aktivitására gyakorolt hatása (Ahluwalia és munkatársai, 2000; Chen és munkatársai, 2016; Dalton és munkatársai, 2009; Devane és munkatársai, 1992; Di Marzo és munkatársai, 2015; Goodfellow és Glass, 2009; Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Zygmunt és munkatársai, 1999).

Várakozásainknak megfelelően, az anandamid valóban kettős hatást fejtett ki (5.40. A ábra). Egy μM alatt az extracelluláris folyadék CGRP tartalma csökkent, míg 1 μM felett koncentráció függően emelkedett (5.40. A ábra). Várakozásainknak szintén megfelelően, a CB1 receptor blokkolása (SR141716A, 200nM) meggátolta az anandamid gátló hatását (5.40. B ábra). Ugyancsak ahogy várható volt, a TRPV1 antagonista kapszazepin (10 μM) meggátolta az anandamid excitatórikus hatását (bazális felszabadulás: 84.8±12.9pg/ml; 10 μM anandamide+200nM SR141716A: 202.2±6.3pg/ml, 10 μM anandamid+200nM SR141716A+10μM kapszazepin: 105.9±6.2pg/ml).



5.40. ábra. Az exogén anandamid hatása a CGRP felszabadulásra patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekből. (A) Az anandamid koncentráció függő hatása CGRP felszabadulásra control extracelluláris folyadékban. (B) Az anandamid koncentráció függő hatása CGRP felszabadulásra a CB1 receptor rimonabant (200nM) jelenlétében. (Ahluwalia és munkatársai, 2003a).

koncentrációjától függően a fájdalomérző elsődleges érző idegsejteken kettős hatást fejt ki mind a bazális mind stimulálással kiváltott transzmitter felszabadulásra. Míg alacsony (néhányszor 10 nM-os) koncentrációban CB1 receptoron keresztül gátló hatást, addig néhányszor 100 nM-os koncentráció felett TRPV1 által közvetített excitatórikus hatást fejt ki. Ezek az adatok azt mutatták, hogy az anandamid szabályozni képes az fájdalomérző elsődleges érző idegsejtek egy jelentős csoportjának az aktivitását. Ezért, következő kísérleteinkben az anandamid excitatórikus és gátló hatását vizsgáltuk részletesebben.

5.7.1.1 AZ EXOGÉN ANANDAMID EXCITATÓRIKUS HATÁSA PATKÁNY TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN

5.7.1.1.1. AZ EXOGÉN ANANDAMID EXCITATÓRIKUS HATÁSA A KOBALT BEÁRAMLÁSRA PATKÁNY TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN

A TRPV1, mint nem szelektív ligand kapcsolt kationcsatorna a Na⁺, K⁺ és Ca²⁺-on kívül egy sor más kation számára is átjárható (Jancso és munkatársai, 1978; Hogan, 1983; Wood és munkatársai, 1988; Winter, 1987; Nagy és munkatársai, 1993; Kulik és munkatársai, 1996; Sathianathan és munkatársai, 2003; Singh Tahim és munkatársai, 2005; Charrua és munkatársai, 2009b; Lever és munkatársai, 2009; Mahmud és munkatársai, 2009; Soneji és munkatársai, 2010; White és munkatársai, 2011a). Ezek közül, kísérletes szempontból a TRPV1 Co²⁺ permeabilitása különösen érdekes, hiszen a CoSO₄ precipitátum, amely egy egyszerű hisztokémiai reakcióval létrehozható, a sejtek jól felismerhető szürkés elszíneződését okozza (Hogan, 1983; Wood és munkatársai, 1988; Winter, 1987; Nagy és munkatársai, 1993; Kulik és munkatársai, 1996; Sathianathan és munkatársai, 2003; Singh Tahim és munkatársai, 2005; Charrua és munkatársai, 2009b; Lever és munkatársai, 2009; Mahmud és munkatársai, 2009; Soneji és munkatársai, 2010; White és munkatársai, 2011a). A ligand kapcsolt kationcsatornákkal ellentétben a feszültségfüggő Ca²⁺ csatornák nem átjárhatóak Co²⁺ számára (Nagy és munkatársai, 1993). Ugyanakkor, a kapszaicin specifikus és szelektív aktivátora a TRPV1-nak (Caterina és munkatársai, 1997). Így kapszaicin adagolásra a Co²⁺ csak a TRPV1-on keresztül jut a sejtbe. Számtalan vizsgálat igazolta, hogy a kapszaicin valóban koncentráció függő módon specifikusan és szelekíven kobalt felhalmozódást okoz az elsődleges érző idegsejtek egy csoportjában (Hogan, 1983; Wood és munkatársai, 1988; Winter, 1987; Nagy és munkatársai, 1993; Kulik és munkatársai, 1996; Sathianathan és munkatársai, 2003; Singh Tahim és munkatársai, 2005; Charrua és munkatársai, 2009b; Lever és

munkatársai, 2009; Mahmud és munkatársai, 2009; Soneji és munkatársai, 2010; White és munkatársai, 2011a). Az anandamid TRPV1 függő hatása a CGRP felszabadulásra (*vide supra*) valószínűsítette, hogy az anandamid, a kapszaicinhez hasonlóan, koncentráció és TRPV1 függő módon indukálja a kobalt beáramlást a tápfolyadékban növesztett elsődleges érző neuronokban. Ennek a feltevésnek az igazolására, a tápfolyadékban növesztett elsődleges érző neuronokat 5 percre CoCl₂-t és anandamidot ($30nM - 100\mu M$) tartalmazó pufferben inkubáltuk (5.41. ábra).



5.41. ábra. Anandamid indukált kobalt beáramlás patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtken. (A) Anandamid indukált kobalt beáramlás patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtken kontrol körülmények között. A nyíl egy kobalttal jelőlt sejtre mutat. A skála 20µm-nek felel meg. (B) Az anandamid okozta kobalt beáramlás koncentráció függése. (Singh Tahim és munkatársai, 2005).

 $^q = 10 - 10^{q} - 10^{q}$

előidézni a tápfolyadékban növesztett elsődleges érző neuronokban amennyiben a

CB1 receptor aktivitása nem gátolt.

5.7.1.1.2. AZ EXOGÉN ANANDAMID HATÁSA A MEMBRÁN ÁRAMOKRA A TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT PATKÁNY ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN

Az anandamid koncentráció függő excitatórikus hatásának további vizsgálatát teljes sejtes feszültség zár technikával végeztük (5.42. ábra). Előző adatainknak megfelelően, a legalacsonyabb alkalmazott koncentráció 1 µM volt (5.42. ábra). Az



5.42. ábra. Anandamid indukált áramok patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. (A) Anandamid (30μM) indukált áram egy patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtben -60mV membránpotenciál és fiziológiás sókoncentrációk mellett. (B) Az anandamid koncentráció-válasz görbéje. (Chen és munkatársai, 2016).

anandamid, amint azt várni lehetett, valóban koncentráció függő módón indukált befelé folyó áramokat -60 mV membránpotenciál mellett (5.42. ábra). Az anandamid EC₅₀ értéke 2.2 μM volt (5.42. ábra). Az anandamid 30 μM-nál elérte a maximális hatását (5.42. ábra). Az anandamiddal kiváltott áramok az anandamid kimosása után néhányszor 10 másodperc után 100%-ig inaktiválódnak a legtöbb sejtben (5.42. ábra). Összességében ezek az adatok további bizonyítékot szolgáltattak, hogy az anandamide néhányszor 1μM felett, ha a CB1 receptor nem gátolt, aktiválja a TRPV1-t az elsődleges érző idegsejteken. **5.7.1.1.3.** AZ EXOGÉN ANANDAMID HATÁSA AZ INTRACELLULÁRIS KALCIUM KONCENTRÁCIÓRA A TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT PATKÁNY ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN

A TRPV1 kizárólagos szerepét az anandamiddal kiváltott excitatórikus hatásban intracelluláris kalcium



5.43. ábra. Anandamid és kapszaicin indukált intracelluláris calcium koncentráció növekedés patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. Az anandamid hatását TRPV1 а antagonsita capszazepin teljesen gátolja. (Chen és munkatársai, 2016).

tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken 30 μM anandamid (amely az elektrofiziológiai mérések alapján képes kiváltani a maximális excitatórikus hatást, *vide supra*) a 98 vizsgált idegsejtből 57-ben váltott ki mérhető intracelluláris kalcium koncentráció növekedést (5.43. ábra). Minden anandamidra válaszoló sejt válaszolt kapszaicin adagolásra is (5.43. ábra). Az anandamiddal és kapszaicinnel kiváltott válaszokat a TRPV1 antagonista kapszazepin (10 μM) teljes mértékben gátolta (5.43. ábra).

A TRPV1 kizárólagos szerepének további bizonyítására az intracelluláris kalcium koncentráció mérést vad típusú és TRPV1 génhiányos egér hátsó gyöki dúcából izolált sejteken végeztük (5.44. ábra). A vad típusú egerekből izolált 136 vizsgált sejtből 37 válaszolt anandamid adagolásra. Ugyanakkor, a TRPV1 génhiányos egerekből izolált sejtek közül egy sem válaszolt anandamidra (5.44. ábra, 0/126 sejt). Azonban, a 126 sejtből 36 válaszolt mustárolaj adagolására (5.44. ábra). Ez az eredmény azt mutatja, hogy míg a TRPV1 génhiányos egerekből izolált sejtek kemoszenzitivitása nem-TRPV1 agonistákra érintetlen, az anandamid nem képes

ezeket a sejteket, legalább is 30µM koncentrációig, aktiválni. Tehát az anandamid minden kétséget kizáróan a csak a TRPV1 közvetítésével aktiválja az elsődleges érző idegsejteket.



5.44. ábra. Anandamid (10μM) és kapszaicin (500nM) indukált intracelluláris calcium koncentráció növekedés vad típusú egér (bal oldali ábra) és TRPV1 génhiányos egér (job oldali ábra) tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. MO: mustár olaj, ION: ionomycin. Az x tengely az időt mutatja másodpercekben. (Chen és munkatársai, 2016).

5.7.1.2. AZ EXOGÉN ANANDAMID GÁTLÓ HATÁSA A TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT PATKÁNY ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN
5.7.1.2.1. AZ EXOGÉN ANANDAMID GÁTLÓ HATÁSA A KAPSZAICINNEL KIVÁLTOTT TRANSZMITTER FELSZABADULÁSRA TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT PATKÁNY ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN

Az anandamidnak a CB1 receptoron keresztül kifejtett gátló hatása (5.40. ábra) a bazális CGRP felszabadulásra nagy valószínűséggel a feszültségfüggő kalcium csatornák spontán aktivitásának gátlása útján jön létre. Hogy a sejtek aktiválásával kiváltott transzmitter felszabadulást is képes-e az anandamid gátolni, azt az anandamidnak a kapszaicinnel kiváltott CGRP felszabadulásra kifejtett hatásának mérésével vizsgáltuk. A kapszaicin (100nM) jelentősen megemelte az extracelluláris puffer CGRP tartalmát (5.45. ábra). Ezt a CGRP felszabadulást az anandamid koncentráció függő módon csökkentette (5.45. A ábra). A legnagyobb csökkenést 10nM anandamide váltotta ki (5.45. A ábra). Ezen koncentráció felett az anandamid ismét excitatórikus hatást váltott ki, amely koncentráció függő volt (5.45. A ábra). A 10nM anandamiddal kiváltott gátló hatást a CB1 receptort gátló SR141716A-al (rimonabanttal, 200nM) teljes mértékben gátolni tudtuk (5.45. B ábra). Ezek az adatok megmutatták, hogy az anandamid a CB1 receptor közvetítésével képes gátolni az elsődleges érző idegsejtek aktiválásával kiváltott transzmitter felszabadulást.



IDEGSEJTEKEN

Míg előző kísérletünk kétséget kizáróan megmutatta, hogy az anandamid a CB1 receptoron keresztül képes gátolni a TRPV1 aktiválásával kiváltott transzmitter felszabadulást az elsődleges érző idegsejtekből, addig a gátló hatás mechanizmusa nem volt világos. A CB1 receptor aktiválása egyrészt csökkenti az adenilát cikláz aktivitását, amin keresztül csökkenti a cAMP függő protein kinaz A aktivitását (Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Dalton és munkatársai, 2009; Di Marzo és munkatársai, 2015; Goodfellow és Glass, 2009). A protein kináz A általi TRPV1 foszforiláció egy bizonyos szintje viszont elengedhetetlen a TRPV1 válaszadó képességének a fenntartásához (Singh Tahim és munkatársai, 2005). Így az anandamide a CB1 receptoron keresztül kifejtett transzmitter felszabadulást gátló hatása létrejöhet a TRPV1 csökkent protein kináz A általi foszforilációja által is. Azonban a CB1 receptor aktiválása csökkenti a N- és P/Q típusú feszültség kapcsolt kalcium csatornák aktivitását, amely a transzmitter felszabaduláshoz elengedhetetlen



5.46. ábra. Kapszaicin indukált deszenzitizáció patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben. (A) Az analízisben használt 9 sejt 3 egymást követő kapszicinnel adagolással kiváltott normalizált maximális amplitúdója. (B) Egy tipikus sejt válasza 3 egymást követő kapszicinnel adagolásra $37^{\circ}C$ -on fiziológiás koncentrációk mellett -60mV só membránpotenciálnál. A számok a kapszaicin applikáció sorrendjét jelzik. (C) Kilenc sejt átlagolt maximális amplitúdója 3 egymást követő kapszicinnel adagolásra. A számok a kapszaicin applikáció sorrendjét jelzik. A csillag az amplitúdó szignifikáns különbségét jelöli az első válasz amplitúdójától, míg a kereszt az amplitúdó szignifikáns különbségét jelöli a második válasz amplitúdójától. (Santha és munkatársai, 2010a).

(Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Dalton és munkatársai, 2009; Di Marzo és munkatársai, 2015; Goodfellow és Glass, 2009). Ezért következő kísérletünkben teljes sejtes feszültség zárral elektrofiziológiai méréseket végeztünk annak eldöntésére, hogy a két lehetséges mechanizmus közül melyik csökkenti az anandamid általi transzmitter felszabadulás gátlását.

dc_1608_18

A kapszaicin a TRPV1 gyors deszenzitizációját váltja ki (Koplas és munkatársai, 1997; Docherty és munkatársai, 1996; Nagy és munkatársai, 2004; Nagy és munkatársai, 2009b; Nagy és munkatársai, 2014; Urban és munkatársai, 2011; White és munkatársai, 2011b; Sousa-Valente és munkatársai, 2014a). Ezért először ennek a deszenzitizációnak a mértékét határoztuk meg a kapszaicin (500nM, 15 másodpercig) 2 percenkénti ismételt adagolásával (5.46. ábra). A második és harmadik adagolással kiváltott áramok az első válasz 65.7±5.9% (n=9) és 36.6±6.1% (n=9) volt, amelyek szignifikáns csökkenést jeleztek (5.46. ábra).

A kapszaicinnel kiváltott CGRP felszabadulást 10 nM anandamid hatásosan csökkentette előző kísérletünkben. Így ebben a kísérletben is először 10nM anandamidot adagoltunk a sejtekhez az első kapszaicin adagolás után. Három sejt mutatott 5%-ál nagyobb választ a harmadik kapszaicin adagolás után mint a 10nM anandamid és 500nM kapszaicin adagolás után. Ezért az analízisbe csak ezt a három sejtet vontuk be. Ezeknek az 10nM anandamid és 500nM kapszaicin adagolás után adagolással kiváltott válaszai az első válasz 37.0±14.5%-a volt, ami szignifikánsan alacsonyabb volt mint a kontrol kísérletekben a második kapszaicin adagolással kiváltott válaszok amplitúdói (5.47. ábra).

Hasonló feltételek mellett (a harmadik válasz 5%-al nagyobb mint a második) négy sejt válaszát tudtuk analizálni 30nM anandamid adagolás mellett. Ezeknek a sejteknek az anandamide jelenlétében kapszaicinnel kiváltott válaszai az első kapszaicin adagolással kiváltott válaszoknak a 48.9±8.3%-a volt átlagosan (5.47. ábra). Ez az érték nem különbözött a kontrol kísérletekben mért értéktől.

115



Ezek az adatok azt mutatták hogy 10nM anandamid a CB1 receptor

5.47. ábra. Az anandamid gátló hatása a kapszaicinnel kiváltott áramokra patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. (A-C) A második kapszaicin adagolás 10nM anandamid előkezelés után történt. (A) Négy sejt 3 egymást követő kapszicinnel adagolással kiváltott normalizált maximális amplitúdója. (B) Egy tipikus sejt (feketével jelólve az (A)-n) válasza 3 egymást követő kapszicinnel adagolásra 37°C-on fiziológiás só koncentrációk mellett -60mV membránpotenciálnál. A számok a kapszaicin applikáció sorrendjét jelzik. (C) Három sejt (lásd szöveges rész) átlagolt maximális amplitúdója 3 egymást követő kapszicinnel adagolásra. A számok a kapszaicin applikáció sorrendjét jelzik. A szaggatott vonal és szürke csík a kontrol kisérlet (5.44. ábra) második amplitúdójának átlagát és annak hibáját mutatja. A plusz jel az amplitúdó szignifikáns különbségét jelöli a kontrol kísérlet második amplitúdójától. (D-F) A második kapszaicin adagolás 30nM anandamid előkezelés után történt. (D) Hat sejt 3 egymást követő kapszicinnel adagolással kiváltott normalizált maximális amplitúdója. (E) Egy tipikus sejt (feketével jelólve a (D)-n) válasza 3 egymást követő kapszicinnel adagolásra 37°C-on fiziológiás só koncentrációk mellett -60mV membránpotenciálnál. A számok a kapszaicin applikáció sorrendjét jelzik. (F) Öt sejt (lásd szöveges rész) átlagolt maximális amplitúdója 3 egymást követő kapszicinnel adagolásra. A számok a kapszaicin applikáció sorrendjét jelzik. A szaggatott vonal és szürke csík a kontrol kisérlet (5.44. ábra) második amplitúdójának átlagát és annak hibáját mutatja. A § az amplitúdó szignifikáns különbségét jelöli a kontrol kísérlet harmadik amplitúdójától. (Santha és munkatársai, 2010a).

közvetítésével képes a TRPV1 aktivitást gátolni. Ezek az adatok azonban azt is

mutatták, hogy az anandamid gátló hatást kiváltó koncentrációja nagyon szűk határok között található, hiszen 30nM anandamid már nem tudta kiváltani a gátló hatást. Ennek oka feltehetően a TRPV1 aktiválás kompenzáló hatása.

5.7.1.2.3. AZ EXOGÉN ANANDAMID GÁTLÓ HATÁSA A CAPSAICINNEL KIVÁLTOTT KOBALT BEÁRAMLÁSRA A TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT PATKÁNY ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN

Mint az előzőekben ismertettem a kapszaicin adagolása CoCl₂ jelenlétében az elsődleges érző idegsejtek egy részében specifikusan és szelektíven kobalt felhalmozódást vált ki (Hogan, 1983; Wood és munkatársai, 1988; Winter, 1987; Nagy és munkatársai, 1993; Kulik és munkatársai, 1996; Sathianathan és munkatársai, 2003; Singh Tahim és munkatársai, 2005; Charrua és munkatársai, 2009b; Lever és munkatársai, 2009; Mahmud és munkatársai, 2009; Soneji és munkatársai, 2010; White és munkatársai, 2011a). Tehát, ha az anandamiddal kiváltott CB1 receptor aktivitás valóban csökkenti a TRPV1 aktivitását, az anandamidnak CB1 receptor



függő módon csökkentenie kell a kapszaicin indukált kobalt felhalmozódást. Így a CB1 receptor

5.48. ábra. Exogén anandamid hatása a kapszaicin indukált kobalt felhalmozódásra patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. (A) A kapszaicin TRPV1 közvetített koncentráció függő hatása a kobalt felhalmozódásra. A csillagok a szignikáns különbséget jelölik a kontrolhoz képest. (B) Az anandamide CB1 receptor közvetített gátló hatása az 50nM kapszaicinnel kiváltott kobalt felhalmozódásra. A csillagok a szignikáns különbséget jelölik az 50nM kapszaicinnel kiváltott hatáshoz hasonlítva. (Mahmud és munkatársai, 2009). szerepét az anandamiddal kiváltott TRPV1 gátlásban a kapszaicin indukált kobalt felhalmozódás mérésével vizsgáltuk.

Amint azt az előző kísérletek eredményéből várni lehetett, a kapszaicin (10nM – 50nM) koncentráció és TRPV1 függő módon okozott kobalt felhalmozódást az elsődleges érző neuronok egy csoportjában (5.48. A ábra). Az 50nM kapszaicin indukált kobalt felhalmozódást az anandamid (3nM – 30nM) koncentráció függő módon gátolta (5.48. B ábra). Ezt a gátló hatást a CB1 receptor antagonista rimonabant (200nM) kivédte (5.48. B ábra).

Ezek az eredmények összességükben azt mutatták, hogy az anandamid koncentrációjától függő módon képes szabályozni az elsődleges érző idegsejtek egy csoportjának a aktivitását. Míg néhány nanomol koncentrációnál CB1 receptor közvetített gátló hatást, addig magasabb koncentrációban TRPV1 közvetített excitatórikus hatást vált ki. Ezek az eredmények továbbá azt is mutatták, hogy az anandamide CB1 receptor által közvetített módon képes csökkenteni a TRPV1 aktivitását.

5.7.2. AZ EXOGÉN ANANDAMID HATÁSA AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN GYULLADÁSOS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

Az eddig ismertetett eredményeink azt mutatták, hogy az anandamid a CB1 receptoron keresztül gátolja a TRPV1 aktivitását. Előző adatok azt mutatták, hogy a TRPV1 nélkülözhetetlen a gyulladásos hő hiperérzékenység kialakulásához (Caterina és munkatársai, 2000; Davis és munkatársai, 2000). Tehát eredményeink valószínűsítették, hogy az anandamid alkalmas lehet a gyulladásos hő hiperérzékenység csökkentésére.

118

dc_1608_18

A TRPV1 részvétele a gyulladásos hő hiperérzékenység kialakulásában ugyanakkor a TRPV1 szenzitizációjától függ (Nagy és munkatársai, 2004; Nagy és munkatársai, 2014; Nagy és munkatársai, 2009b; Sousa-Valente és munkatársai, 2014a; White és munkatársai, 2011b; Urban és munkatársai, 2011). A TRPV1 aktivátorok hatásossága és potenciálja azonban jelentősen megnő a szenzitizáció hatására (Bhave és munkatársai, 2002; Bhave és munkatársai, 2003; Bonnington és McNaughton, 2003; Nagy és munkatársai, 2004; Nagy és munkatársai, 2014; Nagy és munkatársai, 2009b; Sousa-Valente és munkatársai, 2014a; White és munkatársai, 2009b; Sousa-Valente és munkatársai, 2014a; White és munkatársai, 2011b; Urban és munkatársai, 2011). Tehát elképzelhető, hogy az anandamid gyulladásos körülmények között már alacsony koncentrációban is aktiválja a TRPV1-t ami kompenzálhatja a CB1 receptorokon keresztül kifejtett gátló hatását. Annak eldöntésére, hogy az anandamid milyen hatást vált ki az elsődleges érző idegsejteken gyulladásos körülmények között, a sejteket gyulladásos mediátorok jelenlétében vizsgáltuk.

5.7.2.1. AZ EXOGÉN ANANDAMID EXCITATÓRIKUS HATÁSA GYULLADÁSOS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

5.7.2.1.1. AZ EXOGÉN ANANDAMID EXCITATÓRIKUS HATÁSA A KALCITONIN GÉN KAPCSOLT PEPTID FELSZABADULÁSÁRA GYULLADÁSOS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

A TRPV1 által közvetített válaszok nagymértékben függenek a TRPV1 poszttranszlációs állapotától, amely az elsődleges érző idegsejteken ható gyulladásos mediátoroktól függ (Bhave és munkatársai, 2002; Bhave és munkatársai, 2003; Bonnington és McNaughton, 2003; Nagy és munkatársai, 2004; Nagy és munkatársai, 2014; Nagy és munkatársai, 2009b; Sousa-Valente és munkatársai, 2014a; White és

119

munkatársai, 2011b; Urban és munkatársai, 2011). A gyulladásos mediátorok elsősorban a PKA és PKC, illetve az NGF receptor tirozin kináz A (trkA) által közvetített poszt-transzlációs módosulásokon keresztül növelik meg a TRPV1 válaszadási képességét (Bhave és munkatársai, 2002; Bhave és munkatársai, 2003; Bonnington és McNaughton, 2003; Nagy és munkatársai, 2004; Nagy és munkatársai,



5.49. ábra. TRPV1 szenzitizáció hatása az anandamiddal kiváltott CGRP felszabadulásra patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. (A) Az NGF tápfolyadékban történő jelenlétének hatása az anandamiddal kiváltott CGRP felszabadulásra rimonabant jelenlétében. (B) PKA, PKC vagy és trkA aktiválásának hatása az anandamiddal kiváltot CGRP felszabadulásra rimonabant jelenlétében. (C) PKA, PKC és trkA aktiválásának hatása az anandamiddal kiváltot CGRP felszabadulásra rimonabant hiányában. (Ahluwalia és munkatársai, 2003a).

2014; Nagy és munkatársai, 2009b; Sousa-Valente és munkatársai, 2014a; White és munkatársai, 2011b; Urban és munkatársai, 2011). Ezért következő kísérletinkben a PKA-t, PKC-t és trkA-t aktivaló vegyületek (forskolinnal, forbol-12-miristát-13acetáttal és NGF-el) vagy gyulladásos mediátorok (prosztaglandin E2, bradikinin és NGF) jelenlétében inkubáltuk a tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteket mielőtt a TRPV1 aktivátorok hatását

vizsgáltuk. Ezekben a kísérletekben a sejteket NGF jelenléte nélkül növesztettük, hogy elkerüljük a TRPV1 közvetített válaszok NGF általi esetleges növekedését. Az NGF-el és NGF nélkül növesztett sejtek anandamiddal kiváltott válaszában 3nM és 300nM anandamide koncentráció között, 200nM SR141716A jelenlétében, nem volt különbség (5.49. A ábra). Egy μM-al azonban több CGRP szabadult fel az NGF jelenlétében növesztett, mint az NGF nélkül növesztett kultúrákból. (5.49. A ábra).

Amikor az anandamid adagolása előtt az NGF nélkül növesztett sejteket forskolin-al (1µM), forbol-12-miristát-13-acetáttal (TPA, 500nM) vagy NGF-el (50ng-ml) előkezeltük 10 percig az anandamide serkentő hatása jelentősen megemelkedett 200nM SR141716A jelenlétében valamennyi aktivátor hatására, bár a három aktivátor hatása az emelkedés mértéke némileg különböző volt (5.49. B ábra). Azonban, a foskolin, TPA és NGF együttes hatása az anandamid kiváltott CGRP felszabadulásra nem volt nagyobb mint ezeknek az anyagoknak a hatása egyenként (5.49. B ábra). A rimonabant elhagyása az anandamiddal kiváltott CGRP felszabadulás jelentős csökkenéséhez vezetett (5.49. C ábra). Míg rimonabant jelenlétében az excitatórikus hatás már 30nM-tól látható volt, addig rimonabant nélkül az excitáció csak 300nM és 1µM-nál volt megfigyelhető. Mind 300nM és 1µM-nál a CGRP felszabadulása alacsonyabb szintű volt a rimonabant hiányában mint annak jelenlétében (5.49. B és C ábra).

Ezek az eredmények azt valószínűsítették, hogy a gyulladásos mediátorok általi PKA, PKC és trkA aktiválás nagymértékben képes megnövelni az anandamid TRPV1 által közvetített excitatórikus potenciálját és hatásosságát az elsődleges érző idegsejteken. Ezek az eredmények ugyanakkor azt is valószínűsítették, hogy a CB1 receptor gátló hatását a PKA, PKC és trkA aktiválása jelentős mértékben nem befolyásolhatja. Az első feltevés bizonyítására a következő kísérletben a tápfolyadékban növesztett patkány elsődleges érző idegsejteket olyan gyulladásos mediátorokkal, prosztaglandin E2-vel és (10µM), bradikininnel (10µM) kezeltük, amelyek a PKA-t, PKC-t képesek aktiválni. A sejtek anandamidra adott válaszait a

121

kobalt felvétel segítségével vizsgáltuk a gyulladásos mediátorokkal történt előkezelés után.

5.7.2.1.2. AZ EXOGÉN ANANDAMID EXCITATÓRIKUS HATÁSA A KOBALT FELVÉTELRE PATKÁNY KULTÚMÉDIUMBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN GYULLADÁSOS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

A kontrol kísérletekben, amint azt várni lehetett, a 30nM és 500nM kapszaicin megnövelte a kobaltot felhalmozó sejtek aranyát (3.6±0.5%-ról (n=15) 12.2±3.9%-ra (n=4) és 31.3±2.8%-ra (n=15), ugyan a 30nM kapszaicinnel kiváltott kobalt felhalmozódás nem érte el a szignifikancia szintjét (5.50. ábra). A sejtek 10µM bradikinben és 10µM prosztaglandin E2-ben 10 percig történő inkubálása megemelte a kapszicinnel kiváltott kobaltot felhalmozódást mutató sejtek számát (30nM



5.50. ábra. A bradykinin és prostrglandin E2 hatása a kapszaicinnel kiváltott kobalt felhalmozódásra patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. (Singh Tahim és munkatársai, 2005).

24.7±5.7, n=4 500nM 38.2, n=2, 5.50. ábra). A növekedés 30nM kapszaicin

mellett szignifikáns volt.

A kontrol körülmények közöt anandamiddal kiváltott kobalt felhalmozódást az 5.6.1.1.1. fejezetben és az 5.41. ábrán már bemutattam. A gyulladásos mediátorokkal történő inkubálás a kontrol körülményekkel összehasonlítva szignifikánsan megemelte az anandamiddal kiváltott kobalt felhalmozódást mutató sejtek számát valamennyi anandamid koncentráció mellett (5.51. ábra). Mind a bradikinin mind a prosztaglandin E2 magában is szignifikánsan megemelte az anandamiddal kiváltott

kobalt felhalmozódást. Ennek az emelkedésnek a mértéke azonban nem különbözött a bradikinin és prosztaglandin E2 közös alkalmazásával kiváltott növekedéstől.

Annak bizonyítására, hogy az anandamid által kiváltott kobalt felhalmozódás valóban a TRPV1 aktiválásán keresztül jön létre, a sejteket 5µM kapszazepinnel kezeltük az anandamid adagolása előtt. A kapszazepin az anandamiddal kiváltott kobalt felhalmozódást mind a gyulladásos mediátorokkal nem kezelt, mind a gyulladásos mediátorokkal kezelt sejteken szignifikánsan csökkentette (5.52. ábra).



5.51. ábra. Gyulladásos mediátorok hatása az anandamid indukált kobalt beáramlásra patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtken. A üres négyzet a kontrol, míg fekete kör a gyulladásos mediátorok jelenletében mutatja a kobalttal jelőlt sejtek számát az anandamid koncentráció függvényében. (Singh Tahim és munkatársai, 2005).

A prostaglandin E2, és A bradikinin a PKA-n, PKC-n és PLC-n keresztül szenzitizálja a TRPV1-t (Ferreira és munkatársai, 2004; Ferreira és munkatársai, 2005; Moriyama és munkatársai, 2005; Bhave és munkatársai, 2003; Bonnington és McNaughton, 2003; Nagy és munkatársai, 2004; Nagy és munkatársai, 2014; Nagy és munkatársai, 2009b; Sousa-Valente és munkatársai, 2014a; White és munkatársai, 2011b; Urban és munkatársai, 2011). Ezért a három intracelluláris jelzőrendszer szerepének a bizonyításához a sejteket 5µM chelerythrine és 10µM H89 keverékével illetve 10µM neomicinnel kezeltük a gyulladásos mediátorokkal történő kezelés előtt és közben. Mind a három gátlószer szignifikánsan csökkentet az anandamid excitatórikus hatását mind a gyulladásos mediátorokkal nem kezelt, mind a gyulladásos mediátorokkal kezelt sejteken (5.52. ábra).

Ezek az eredmények azt mutatták, hogy az anandamid TRPV1-on kifejtett excitatórikus hatása jelentősen megnő a gyulladásos körülmények között. Ennek a növekedésnek az az eredménye, hogy a korábbi kísérleteinkben kontrol körülmények között gátló hatást kiváltó 10nM anandamid a gyulladásos mediátorok hatására TRPV1 közvetített excitatórikus hatást vált ki. Ez egyrészt azt jelenti, hogy az anandamid gyulladásos körülmények között hozzájárulhat az elsődleges érző idegsejtek aktivitásának a növeléséhez, így a fájdalom kialakulásához. Másrészt ezek az eredmények együttesen azt is sugallják, hogy ha az anandamid gátló hatása nem növekszik párhuzamosan az excitatórikus hatás növekedésével, akkor az anandamid gyulladásos körülmények között nem használható a TRPV1 aktivitás csökkentésére. A következő kísérletünkben az anandamid gátló hatását vizsgáltuk gyulladásos körülmények között.



5.7.2.2. AZ EXOGÉN ANANDAMID GÁTLÓ HATÁSA GYULLADÁSOS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

w	w	pre-incubation 1: sensitisation	pre-incubation 2: activation of CB1	test TRPV1	w	H₂S	fixation	ζ			
5.53. ábra. A kísérlet lefolyása. W: puffer. (Soneji és munkatársai, 2010).											

Mivel a gyulladásos mediátorok megemelik a mind a kapszaicin mind az anandamid TRPV1-on kifejtett potenciálját és hatásosságát, ezért ezekben a dc 1608 18

kísérletekben mind a kapszaicin mind az anandamid koncentrációját lecsökkentettük. A különböző aktivátorok alkalmazásának sorrendjével biztosítottuk, hogy az in vitro kísérlet az in vivo körülményekhez hasonló állapotot teremtsen (5.53. ábra).

Mind az 1nM és 10nM anandamid szignifikánsan csökkentette a 10nM

kapszaicinnel kiváltott kobalt felhalmozódást a gyulladásos körülmények között (5.54.A ábra). Ezzel a gátló hatással ellentétben, a 100nM kapszaicinnel kiváltott Relative number of responding cells 5.54. ábra. A CB1 receptor 40 aktiválás hatása a kapszicinnel kiváltott 30 kobalt beáramlásra 20 gyulladásos mediátorokat 10 tartalmazó tápfolyadékban 0 növesztett patkány capsaicin 10nM + anandamide 1nM anandamide 10nM + --elsődleges + érző -+ -+ + HU210 1µM idegsejtekben. (A)Α HU210 10µM rimonabant 200nM 8Br-cAMP100µM + csillagok és a \$ a 10nM kapszaicinnel kiváltott



kobalt felhalmozódást sem az 1nM, sem a 10nM, sem a 30nM anandamide nem tudta csökkenteni (5.54. B ábra). A CB1 receptor szerepét az anandamid gátló hatásában a CB1 receptor rimonabant (200nM) adagolással vizsgáltuk. Váratlan módon, a rimonabant nem tudta kivédeni az anandamid gátló hatását (5.53. A ábra). Ezzel összhangban, a 8Br-cAMP (100µM) sem volt hatással az anandamiddal kiváltott gátló hatásra. A CB1 receptor látszólagos aktiválhatóságának a hiányát a CB1 aktivátor HU210 (1µM és 10µM) adagolásával vizsgáltuk tovább. Ugyan az HU210 mindkét koncentrációban csökkentette a 10nM kapszaicin okozta kobalt felhalmozódást, a csökkenés egyik koncentrációban sem érte el a szignifikancia szintjét (5.54. A ábra).

szignifikánsan

kapszaicinnel

hatásokat

hatástól

különboző

Az HU210 ugyanakkor ezt a statisztikailag nem szignifikáns gátló hatást nagy valószínűség szerint a CB1 receptoron keresztül hozta létre, hiszen mind a rimonabant mind a 8Br-cAMP kivédte a gátló hatást (5.54. A ábra). Hasonlóan az anandamidhoz, az HU210 sem gátolta a 100nM kapszaicinnel kiváltott kobalt felszabadulást (5.54. B ábra).

Ezek az eredmények összességükben azt mutatták, hogy a gyulladás során a CB1 receptor válaszadó képessége jelentősen lecsökkenhet. Ez a csökkenés összhangban van a korábban kimutatott PKA és PKC által foszforilált CB1 receptor csökkent válaszadási képességével (Garcia és munkatársai, 1998; Huang és munkatársai, 2002). Ugyanakkor, a fentebb ismertetett eredmények azt is mutatják, hogy az anandamid néhány nanomolos koncentrációban képes a TRPV1 alacsony szintű aktivitását csökkenteni. Ez a gátló hatás azonban nem a CB1 receptoron keresztül jön létre.

5.7.3. AZ ENDOGÉN ANANDAMID HATÁSA AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN

Amint azt az 5.5.2. és 5.6. fejezetekben bemutattam, az elsődleges érző idegsejtek egy jelentős csoportja funkcionális anandamid szintetizáló enzimatikus útvonalakat fejeznek ki, és az anandamid szintézis exogén szubsztrátjából illetve az intracelluláris kalcium koncentráció fiziológiás szint fölé emelkedése után anandamidot szintetizálnak. Ezen adatok alapján feltételeztük, hogy a 20:4-NAPE adagolás endogén anandamid szintézis útján válaszokat fog kiváltani az elsődleges érző idegsejteken. Ezeknek a válaszoknak a jellemzésére a tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekhez 20:4-NAPE-t adagoltunk és a 20:4-NAPE által kifejtett sejt aktivitást három egymást kiegészítő módszerrel vizsgáltuk.

126

5.7.3.1. A FAAH GÁTLÁS HATÁSA A KOBALT FELHALMZÓDÁSRA A TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Az endogén anandamid hatását először a FAAH antagonistának a TRPV1



5.55. ábra. A FAAH inhibitor hatása a TRPV1 közvetített kobalt felhalmozódásra patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. A felső sorban lévő mikroszkópos felvételek a koballtal jelőlt (fekete) és jelöletlen (szürke) sejteket mutatják a felvételekn szereplő inkubációk utan. Az oszlopdiagram a kobalttal jelőlt sejtek arányát mutatja az oszlopdiagram alatt lévő táblázatban szereplő előinkibációk és inkubációk hatására. A csillagok a control értéhez képest létrjött szignifikáns változásokat mutatják. (Lever és munkatársai, 2009).

közvetített kobalt felhalmozódás módszerével vizsgáltuk tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken (Lever és munkatársai, 2009). Egy μ M kapszaicin a sejtek 32.1±5.4%-ban okozott kobalt felhalmozódást, ami szignifikáns növekedés volt a kontrol kísérletekben talált kobalttal jelölt sejtekhez (1.3±0.4%) képest (5.55. ábra). A sejteknek 1 μ M anandamidban illetve 1 μ M FAAH gátlóban (URB597) előinkubáció után történő inkubálása szintén a kobaltot felhalmozó sejtek számának a növekedését okozta (8.3±3.8 az anandamid, míg 8.6±2.2 a URB597 után 5.55. ábra). Ezek az értékek azonban nem érték el a szignifikancia szintet. A FAAH inhibitor (1μM) és anandamid (1μM) közös alkalmazása URB597 előinkubáció utáni alkalmazása azonban szignifikánsan megemelte a kobalttal jelölt sejtek arányát (5.55. ábra). Amikor az anandamidot vagy a URB597-t a CB1 receptor antagonista előkezekés után alkalmaztuk, a kobalttal jelölt sejtek aránya ismét szignifikánsan megnőtt (5.55. ábra). Az anandamiddal illetve URB597-el kiváltott kobalt felhalmozódást a TRPV1 antagonista kapszazepin meggátolta (5.55. ábra). Ez az eredmény azt mutatta, hogy az elsődleges érző idegsejtekben szintetizálódó anandamid a TRPV1 közvetítésével a sejteken excitatórikus hatást fejt ki.

5.7.3.2. A 20:4-NAPE ADAGOLÁS HATÁSA A KOBALT FELHALMZÓDÁSRA A TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Az anandamidot szintetizáló enzimatikus útvonalak közös szubsztrátjának, a 20:4-NAPE-nek az alkalmazása koncentráció függő módon megnövelte a kobaltot felhalmozó sejtek számát (5.56. A-C. ábra). A 20:4-NAPE legalacsonyabb koncentrációja, amely szignifikánsan megemelte a kobaltot felhalmozó sejtek számát 0.1μM volt (5.56. C ábra) . A 20:4-NAPE EC₅₀ értéke 7.41±1.4μM volt (5.56. C ábra). A 20:4-NAPE EC₅₀ értéke 7.41±1.4μM volt (5.56. C ábra). A kobaltot felhalmozó sejtek elsősorban kis átmérőjű sejtek voltak (5.56. D ábra). A kis sejtekben történő kobalt felhalmozódás megerősítette, hogy az elsődleges érző idegsejtekben szintetizálódó anandamid excitációs hatást képes kiváltani.



5.56. ábra. NAPE adagolással kiváltott kobalt felhalmozódás patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben. (A) Tipikus látótér a sejtek kobaltot tartalmazó, de NAPE-t nem tartalmazó pufferben történt inkubálása után. Invertált felvétel. (B) Tipikus látótér a sejtek kobaltot és NAPE-t tartalmazó pufferben történt inkubálása után. A nyilak jelőlt sejtekre mutatnak. Invertált felvétel. (C) A NAPE által kiváltott kobalt felhalmozódás koncentrációválasz kapcsolata. A csillagok kontrol értékhez viszonyított különbségek szignifikanciáját mutatják. (D) A kobalttal jelőlt és jelöletlen sejtek méret eloszlása. (Varga és munkatársai, 2014).

5.7.3.3. A 20:4-NAPE ADAGOLÁS HATÁSA A MEMBRÁN ÁRAMOKRA A TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Az endogén anandamid excitatórikus hatásának további megerősítésére teljes sejtes feszültségzár technikával elektrofiziológiai méréseket végeztünk. Huszonkét 50 μM 20:4-NAPE-re válaszoló sejtet találtunk (5.57. A ábra). Ezeknek a sejteknek a 20:4-NAPE-el kiváltott válaszai átlagban -0.41±0.06 nA voltak. Mind a kilenc 20:4-NAPE-re válaszoló sejt aminek a kapszaicin érzékenységét vizsgáltuk befelé irányuló áramok generálásával válaszolt a 500nM kapszaicin adagolásra (5.57. B ábra). Ezekben a sejtekben a 20:4-NAPE-el és kapszaicinnel kiváltott áramok azonban szignifikánsan különbözőek voltak (5.57. C ábra). Ugyanakkor nagyszámú olyan kapszaicinre válaszoló sejtet is találtunk (n=27), amely



5.57. ábra. NAPE adagolással kiváltott áramok patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben. (A) NAPE adagolással kiváltott áram fiziológiás só koncentrációk és -60mV membránpotenciál mellett. A regisztrátum feletti vizszintes csík a NAPE adagolását jelzi. (B) Kapszicin adagolással kiváltott áram az (A)-n NAPE-el kiváltott választ mutató sejtben. A regisztrátum feletti vizszintes csík a kapszaicin adagolását jelzi. (C) A NAPE-el és kapszaicinnel kiáltott áramok átlagos maximális amplitúdója. N: NAPE, C: kapszaicin. A csillag a két érték szignifikáns különbségét jelöli. (Varga és munkatársai, 2014).

nem válaszolt 20:4-NAPE adagolásra. Ez az eredmény, a TRPV1 és az anandamidot szintetizáló enzimatikus útvonalak részleges együttes kifejeződésével (5.5. fejezet) együtt azt mutatja, hogy a kapszaicin érzékeny sejteknek feltehetően csak

★ egy része képes anandamidot szintetizálni. Egy alternatív magyarázat lehet, hogy az elsődleges érző idegsejtekben szintetizálódó anandamid csak a sejtek egy részében képes TRPV1 aktivitás kiváltására. Ez a magyarázat annak a lehetőségét is felveti, hogy a míg egyes anandamidot szintetizáló enzimatikus útvonalak a TRPV1-hoz, mások a CB1 receptorhoz kapcsoltak. Ezen lehetőségek mellett az itt bemutatott adatok megerősítették a 20:4-NAPE, tehát feltehetően az elsődleges érző idegsejtekben szintetizálódó anandamid, valóban képes excitatórikus hatást kiváltani az elsődleges érző idegsejtek egy kapszaicinre érzékeny csoportjában.

5.7.3.4. A 20:4-NAPE ADAGOLÁS HATÁSA AZ INTRACELLULÁRIS KALCIUM KONCENTRÁCIÓRA A TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN



5.58. ábra. NAPE indukált intracelluláris kalcium koncentráció emelkedés patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtben. (A) NAPE adagolásra válaszoló (lila) és nem válaszló (piros) sejtből mért valaszok. i: NAPE, ii: kapszaicin, iii: KCl. A regisztrátumok feletti vízszintes vonalak az adagolások idejét jelölik. (B) A különböző válaszmintákat mutate sejtek megoszlása kontrol pufferben illetve kapszazepin vagy rimonabant jelenlétében. (Varga és munkatársai, 2014).

Az excitatórikus hatás további megerősítésére illetve a hatás farmakológiai jellemzésére a következő kísérletben a 20:4intracelluláris NAPE-el kiváltott kalcium koncentráció változását vizsgáltuk. Ötven µM 20:4-NAPE a vizsgált 546 idegsejtből 189-ben növelte intracelluláris kalcium meg az

koncentrációját (5.58. A és B ábra). Valamennyi 20:4-NAPE-re érzékeny sejt érzékeny volt 500nM kapszaicinre is (5.58. A és B ábra). Ugyanakkor az 546 idegsejtből 273 csak 500 nM kapszaicinre válaszolt (5.58. A és B ábra). A 20:4-NAPE-el kiváltott válaszok lassan aktiválódtak, és az amplitúdójuk szignifikánsan alacsonyabbak volt mint a kapszaicinnel kiváltott válaszok amplitúdói (20:4-NAPE KCl: 0.15±0.01 n=189, kapszaicin, KCl: 0.78±0.02, n=462, 5.58. A ábra). A legtöbb 20:4-NAPE-el kiváltott válasz lassan inaktiválódott (5.58. A ábra). A TRPV1 antagonista kapszazepin (5μM) jelenlétében a 403 vizsgált idegsejtből csak 26 válaszolt 20:4-NAPE és kapszaicin adagolásra (5.58. B ábra). Ezeken a sejteken kívül 16 válaszolt csak 20:4-NAPE és 21 csak kapszaicin adagolásra (5.58. A ábra). Így a kapszazepin jelenlétében 20:4-NAPE-re vagy és kapszaicinre válaszoló sejtek száma szignifikánsan kevesebb volt mint a hasonló sejtek száma kapszazepin nélkül (5.58. B ábra).



5.59. ábra. NAPE adagolással kalcium kiváltott intracelluláris koncentráció emelkedés egér tápfolyadékban növesztett elsődleges érző iegsejtekben. (A) Vad típusú egérből izolált sejtek válaszai. A lila regisztrátum NAPE-re válaszoló, míg a piros regisztrátum NAPE-re nem válaszló sejtből származnak. i: NAPE, ii: kapszaicin, iii: mustár olja, iv: KCl, v: ionomycin. A regisztrátumok feletti vízszintes vonalak az adagolások idejét jelölik. (B) Egy TRPV1 génhiányos egérből izolált sejt válaszai. i: NAPE, ii: kapszaicin, iii: mustár olja, iv: KCl, v: ionomycin. A regisztrátumok feletti vízszintes vonalak az adagolások idejét jelölik. (Varga és munkatársai, 2014).

A CB1 receptor gátló rimonabant (200nM) szignifikánsan csökkentette a 20:4-

NAPE adagolásra válaszoló sejtek számát (105/498, 5.58. B ábra). Ugyanakkor a rimonabant nem volt hatással a kapszaicinre válaszoló sejtek számára (5.57. B ábra). A rimonabant ezzel szemben szignifikánsan csökkentette mind a 20:4-NAPE-el mind a kapszaicinnel kiváltott válaszok amplitúdóját (20:4-NAPE /KCl 0.12±0.009, kapszaicin/KCl 0.61/0.018). Ezek az adatok azt mutatták, hogy a 20:4-NAPE adagolással kiváltott excitatórikus hatás a TRPV1 aktiválása által jön létre és a CB1 receptor TRPV1 szenzitizáló hatást fejthet ki.

dc_1608_18

A TRPV1 szerepének további megerősítésére vad típusú és TRPV1 génhiányos egerekből izolált elsődleges érző idegsejteken is elvégeztük a 20:4-NAPE-el és kapszaicinnel kiváltott válaszok analízisét. A vad típusú egerekből származó 68 analizált sejtből 10 válaszolt 20:4-NAPE adagolásra (5.59. A ábra). Hasonlóan a patkány sejtekhez, valamennyi 20:4-NAPE-re válaszoló sejt válaszolt kapszaicin adagolásra is (5.59. A ábra), de nagy számban fordultak elő olyan sejtek amelyek csak kapszaicinre válaszoltak (5.59. A ábra). Ezzel szemben, a TRPV1 génhiányos egér sejtek közül egy sem válaszolt sem 20:4-NAPE sem kapszaicin adagolásra (0/59, 5.59. B ábra). Ugyanakkor a sejtek jelentős hányada válaszolt mustár olaj adagolásra (5.59. B ábra).

Ezek az eredmények megerősítették a TRPV1 szerepét a 20:4-NAPE által kiváltott excitatórikus hatás létrejöttében. Továbbá, a fent ismertetett eredmények összességükben azt is mutatták, hogy a 20:4-NAPE adagolás után CB1 receptor által közvetített gátló hatás nem jön létre. Végül ezek az eredmények egyetértésben a korábban közölt adatokkal (Liu és munkatársai, 2006; Ligresti és munkatársai, 2009) azt is sugallták, hogy a CB1 receptor nem csak gátló, hanem excitatórikus hatást is kifejthet a TRPV1-on.

5.8. A CB1 RECEPTOR TRPV1 SZENZITIZÁLÓ HATÁSA A TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Előző vizsgálatok kimutatták, hogy a CB1 receptor a $G_{0/0}$ G proteinek mellett s és $G_{q/11}$ proteinekhez is tud kapcsolódni (Goodfellow és Glass, 2009; Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Dalton és munkatársai, 2009; Di Marzo és munkatársai, 2015; Lauckner és munkatársai, 2005; Glass és Felder, 1997). Ezen utóbbi G proteineken keresztül a CB1 receptor aktivitása excitatórikus hatást

133

képes kiváltani, többek között a CB1 receptort és TRPV1-t közösen kifejező humán embrionális vese hámsejtekben a TRPV1-t (Goodfellow és Glass, 2009; Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Dalton és munkatársai, 2009; Di Marzo és munkatársai, 2015; Lauckner és munkatársai, 2005; Glass és Felder, 1997; Hermann és munkatársai, 2003). Ezen kívül, a CB1 receptor ligand kötődés nélkül is aktivitást mutat. Ez az alap vagy konstitutív aktivitás is képes a TRPV1 szenzitizálására (Fioravanti és munkatársai, 2008). Ezen eredmények alapján a rimonabant előző kísérletben kimutatott TRPV1 aktivitást gátló hatását vizsgáltuk meg részletesebben.

5.8.1. AZ ANANDAMID ÉS KAPSZAICIN VÁLASZOK EGYÜTTES ELŐFORDULÁSA A TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

5.8.1.1. AZ ANANDAMID ÉS KAPSZAICIN VÁLASZOK ÁLTAL MEGHATÁROZOTT SEJTTÍPUSOK A TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Az anandamidnak a TRPV1-t aktiváló koncentráció-válasz összefüggés meghatározása teljes sejtes feszültségzár technika alkalmazásával a tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken azt mutatta, hogy a maximális választ 30μMal ki lehet váltani (5.60. ábra). Ezért a további kísérletekben az anandamidot 30μM koncentrációban használtuk.

Az összes anandamidra válaszoló sejt válaszolt 500 nM kapszaicinre (5.60. ábra). Ugyanakkor, a sejtek egy kisebb csoportja, csak kapszaicinre generált válaszokat (5.60. ábra). Így anandamidra és kapszaicinre érzékeny (ACR) valamint csak kapszaicinre érzékeny (COR) sejteket különböztettünk meg (5.60. ábra). A COR
sejtek az összes sejt kb 25%-át tették ki. Az ACR sejtek a COR sejteknél szignifikánsan nagyobb válaszokat generáltak kapszaicin adagolásra (ACR - 3.19±0.31nA, n=29, COR 0.96±0.27 nA, n=10).



5.60. ábra. Az anandamid és kapszicin adagolások által kiváltott válszok közös kifejeződése patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. (A) Anandamid adagolással kiváltott áram fiziológiás sókoncentráció és -60mV membránpotenciál mellett. (B) Az anandamid koncentráció-válasz kapcsolata. (C) Anandamid adagolással kiváltott válasz egy "anandamidra és kapszaicinre érzékeny" (ACR) sejtből (lásd szöveges rész). (D) A (C)-n bemutatott sejt kapszaicin adagolással kiváltott válasza. (E) Anandamid adagolással kiváltott válasza. (F) Az (E)-n bemutatott sejt kapszaicinre adagolással kiváltott sejt kapszaicinre adagolással kiváltott válasza. A regisztrátumok feletti vízszintes vonal az anandamid (A), (C) és (E) vagy a kapszaicin (D) és (F) adagolását jelzik. (Chen és munkatársai, 2016).

40 válaszolt anandamidra (5.61. ábra). Az ACR/COR sejtek aránya hasonló volt az elektrofiziológiai mérésekkel megfigyelt arányhoz. Továbbá, az ACR sejtek nagyobb amplitúdójú válaszokat generáltak kapszaicin adagolásra mint a COR sejtek (ACR: 1.01±0.12, n=40, COR: 0.49±0.13, n=17). Amint azt említettem, a sejteknek a TRPV1 antagonista kapszazepinnel történő előkezelése (10µM) meggátolta mind a kapszaicinnel mind az anandamiddal kiváltott kalcium tranziensek keletkezését (5.43. ábra), ami azt mutatta, hogy mind a két TRPV1 agonista valóban csak a TRPV1

dc_1608_18

aktiválása útján keresztül fejti ki excitatórikus hatását a tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken.

Annak vizsgálatára, hogy az ACR és COR sejtek más fajban is



5.62. ábra. ACR és COR típusú elsődleges érző idegsejtek anandamid és kapszaicin adagolással kiváltott válaszai egér tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. Bal oldali regisztrátum: vad típusú egérből iolált ACR típusú sejt válaszai. Középső regisztrátum: vad típusú egérből iolált COR típusú sejt válaszai. Jonn oldali regisztrátum: TRPV1 génhiányos egérből iolált sejt válaszai. ANA: anandamid, CAP: kapszaicin, MO: mustár olja, ION: ionomycin. A regisztrátumok feletti vízszintes vonalak az adagolások idejét jelzik (Chen és munkatársai, 2016).

készített tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteket használtunk és

mértük az intracelluláris kalcium koncentráció változását anandamid és kapszaicin alkalmazás alatt. Ezek a kísérletek arra is alkalmasak voltak, hogy megerősítsük a TRPV1 szerepét az anandamiddal és kapszaicinnel kiváltott válaszok létrejöttében.

A vad típusú sejtek közül 136 válaszolt KCl-re (5.62. ábra). Ezek közül 54 sejt válaszolt kapszaicinre. Az ACR/COR sejt arány 37/17 volt, ami nem különbözött a patkány sejteken mért aránytól. Hasonlóan a patkány sejtekhez, az egér ACR sejtek is nagyobb amplitúdójú válaszokat generáltak kapszaicin alkalmazása során (ACR: 2.09±0.13, n=37, COR: 0.81±0.17, n=17). Sem a kapszaicin, sem az anandamid nem váltott ki változást az intracelluláris kalcium koncentrációban a TRPV1 génhiányos



5.63. *ábra. A rimonabant hatása az ACR és COR sejtek arányára és a sejtek anandamid és kapszaicin adagolással kiváltható válaszaira.* (A) Az ACR és COR sejtek aránya rimonabant hiányában és jelenlétében. (B) Az anandamid adagolással kiváltott válaszok maximális amplitúdója rimonabant hiányában és jelenlétében. (C) A rimonabant hatása a kapszaicin adagolással kiváltott válszokra ACR és COR típusú elsődleges érző idegsejtekben. (Chen és munkatársai, 2016).

egerekből származó sejtekben (5.62. ábra). Ezek az eredmények összességükben azt mutatták, hogy mind a kapszaicin mind az anandamid excitatórikus hatása a TRPV1 aktiválásán keresztül jön létre, de a sejtek válaszadó képessége alapján a sejtek két nagy csoportot alkotnak, a kapszaicinre és anandamidra válaszoló sejtek (ACR) és a csak kapszaicinre válaszoló sejtek (COR) csoportjára. Ezek az adatok azt is mutatták, hogy a csak kapszaicinre érzékeny sejtekben a kapszaicinnel kiváltott válaszok kisebbek mint a kapszaicinre és anandamidra is érzékeny sejtek kapszaicinnel kiváltott válaszai. Mivel a CB1 receptor képes a TRPV1 válaszadó képességét befolyásolni, következő kísérleteinkben a CB1 receptor szerepét vizsgáltuk a kétféle sejt válaszaira.

5.8.1.2. A CB1 RECEPTOR SZEREPE ANANDAMID ÉS KAPSZAICIN VÁLASZOKRA A TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Első kísérletünkben ismét teljes sejtes feszültségzár technikát alkalmaztunk. A sejtekből történő elvezetés közben a sejtekhez jutatott valamennyi puffer tartalmazta a CB1 receptor antagonista rimonabantot (200nM). A rimonabant nem változtatta meg az ACR/COR sejtek arányát (5.63. ábra). Ugyanakkor, a rimonabant szignifikánsan csökkentette az anandamiddal kiváltott áramok amplitúdóját (5.63. ábra). A rimonabnat szintén szignifikánsan csökkentette a kapszaicinnel kiváltott áramok amplitúdóját az ACR sejtekben (5.63. ábra). A COR sejtek által generált kapszaicinnel kiváltott áramokra a rimonabant azonban nem volt hatással (5.63. ábra). Ezek az eredmények azt sugallták, hogy a CB1 receptor szenzitizáló hatást fejt ki a TRPV1 által közvetített válaszokra az ACR sejtekben.

Annak megerősítésére, hogy a CB1 receptor valóban szenzitizáló hatást fejt ki a TRPV1 által közvetített válaszokra az ACR sejtekben, a következő kísérletben Biozzi ABH vad típusú és Biozzi ABH CB1 receptor génhiányos egerekből izolált elsődleges érző idegsejteken végeztünk intracelluláris kalcium koncentráció mérést (5.64. ábra). Korábbi kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a vad típusú Bizozzi ABH egerek endokannabinoid rendszere jelentősen eltér a C57BL6 egerek endokannabinoid rendszerétől, ezért már a vad típusú egér sejtek válaszainak az dc_1608_18



összehasonlításából is jelentős különbségeket vártunk. Valóban, az ACR COR sejtek



aránya (113/11) jelentősen különbözött a C57BL6 egér sejteken talált aránytól (37/17). Ahogy azt várni lehetett, a CB1 génhiányos egerekben jentősen megnőtt a COR típusú sejtek, míg jelentősen lecsökkent az ACR típusú sejtek száma, anélkül, hogy a kapszaicinre válaszoló sejtek aránya az összes KCl-re válaszoló sejtek között megváltozott volna (5.64. ábra). A CB1 receptor kifejeződésének a hiánya szintén jelentősen csökkentette mind az anandamiddal kiváltott, mind a kapszaicinnel kiváltott válaszok amplitudóját az ACR sejtekben (5.64. ábra). A kapszaicinnel kiváltott válaszok amplitudója a COR sejtekben azonban nem változott. Ezek az eredmények megerősítették, hogy a CB1 receptor szenzitizáló hatást fejt ki a TRPV1-ra az ACR sejtekben. Ezek az eredmények azt is sugallták, hogy legalább részben, a CB1 receptor hozzájárul az ACR és COR fenotípus kialakulásához.

dc_1608_18

A CB1 receptor szerepének további vizsgálatához patkány elsődleges érző idegsejteken végeztünk intracelluláris kalcium mérést és vizsgáltuk a CB1 antagonista rimonabant hatását az anandamid és kapszicin által kiváltott kalcium tranziensekre.



5.65. ábra. A rimonabant hatása a kapszaicin adagolással kiváltott kalcium tranziensekre patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben. (A) Kapszaicin adagolással kiváltott deszenzitizáció egy ACR típusú sejtben. (B) Rimonabant hatása a kapszaicinel kiváltott válaszra egy ACR típusú sejtben. A nyíl a rimonabant gátló hatására mutat. (C) ACR típusú sejtek kapszaicin adagolással kiváltott átlagolt válaszai rimonabant hiánvában (fekete oszlopok) és rimonabant jelenlétében (piros oszlopok). A csillagok és a \$ jel az előző válaszhoz viszonyított szignifikáns különbséget jelöli. (D) Kapszaicin adagolással kiváltott deszenzitizáció egy COR típusú sejtben. (E) Rimonabant hatása a kapszaicinel kiváltott válaszra egy COR típusú sejtben. (F) COR típusú sejtek kapszaicin adagolással kiváltott átlagolt válaszai rimonabant hiányában (fekete oszlopok) és rimonabant jelenlétében (piros oszlopok). A csillagok az előző válaszhoz viszonyított szignifikáns különbséget jelöli. CAP: kapszaicin, A: anandamid, RIMO: rimonabant. A regisztrátumok feletti vízszintes vonalak az adagolások idejét jelölik. A (C)-n és (F)-en a számok a kapszaicin adagolások sorszámát jelölik. (Chen és munkatársai, 2016).

Mivel a kapszaicin deszenzitizációt vált ki, a kontrol kísérletben ennek a deszenzitizációnak a mértéket vizsgáltuk (5.65. ábra). A harmadik kapszaicin adagolás után anandamid adagolással vizsgáltuk a sejtek fenotípusát (5.65. ábra). A

deszenzitizáció mértékét vizsgálva, azt találtuk, hogy a COR neuronok nagyobb deszenzitizációt mutatnak mint az ACR sejtek (5.65. ábra). A rimonabant, amint előző adatainkból várható volt, megnövelte a deszenzitizáció mértékét (5.65. ábra). Azonban ez a hatást csak az ACR sejtekben volt jelen (5.65. ábra). Összességében ezek az eredmények azt mutatták, hogy a CB1 receptor csak az ACR neuronokban van hatással a TRPV1 által közvetített válaszokra. Ennek a szelektivitásnak az egyik lehetséges oka, hogy a CB1 receptor csak az ACR sejtekben fejeződik ki. Ennek vizsgálatára a tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtek, a fenotípusuk egyedi sejtes feszültségzár technikával történő meghatározása után, CB1 receptor kifejeződését vizsgáltuk egyes sejtes PCR-al.

5.8.1.3. A CB1 RECEPTOR KIFEJEZŐDÉSE AZ ACR ÉS COR FENOTÍPUSÚ TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Összesen 25 COR, 31 ACR és 20 anandamidra és kapszaicinre sem válaszló sejtet (NR) gyüjtöttünk. Ezek közül 10 COR, 11 ACR és 8 NR sejt PCR reakciója mutatta a kontrolként használt GAPDH mRNS kifejeződését (5.66. ábra). Ezeknek a sejtek a CB1 mRNS kifejeződésének a vizsgálata azt mutatta, hogy a valamennyi ACR, 8 COR és 4 NR sejt fejezte ki a CB1 receptort. Ezek az eredmények megerősítették korábbi adatainkat, hogy a TRPV1-t kifejező elsődleges érző idegsejtek legnagyobb része kifejezi a CB1 receptort (Ahluwalia és munkatársai, 2000).



5.66. *ábra.* **CB1** *receptor mRNA kifejeződése ACR és COR típusú patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken.* (*A*) CB1 receptor *és* GAPDH kifejeződése ACR, COR *és* sem anandamidra, sem kapszaicinra nem válaszoló (NR) sejtekben. (B) A COR, ACR *és* NR sejtek CB1 receptor mRNA kifejeződése (zöld körcikkelyek). (Chen *és* munkatársai, 2016).

5.8.1.4. A CB1 RECEPTOR ÉS TRPV1 TÉRBELI ELRENDEZŐDÉSE AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

A fenotípusosan jellemzett elsődleges érző idegsejtekből készített PCR eredményei megcáfolták azt a feltételezést, hogy az ACR és COR fenotípusokat a CB1 receptor ACR sejteken történő szelektív kifejeződése hozza létre. Alternatív lehetőségként a TRPV1 és a CB1 receptor térbeli elrendeződésének a különbözősége állhat a két fenotípus létezése mögött. Ennek a lehetőségnek a vizsgálata mai technikai lehetőségekkel direkt módon nem lehetséges. Azonban a CB1 receptor és TRPV1 térbeli elrendeződésének vizsgálata és az esetlegesen fellelhető különböző sejt típusok gyakoriságának statisztikai analízise, illetve ennek a gyakoriságnak az ACR/COR sejtek arányával való összehasonlítása közvetett bizonyítékul szolgálhat annak megerősítésére, hogy a ACR és COR fenotípusok létézését valóban a TRPV1



és CB1 receptor különböző térbeli elrendeződése okozhatja. Ezért következő

5.67. ábra. A CB1 receptor és TRPV1 molekula kifejeződése patkány hátsó gyöki dúc sejt membrán protoplazmatikus felszínén. (A) Elszórtan elhelyezkedő molekulák egy sejt mebrán protoplazmatikus (P-face) felszínén. (B) Csoportokba rendeződött molekulák egy másik sejt membrán protoplasmatikus felszínén. Eface: extracelluláris felszín. A nyilak TRPV1 molekulákra mutatnak. A kettős nyilak csoportokba rendeződött TRPV1 moelkulákra mutatnak. A nyílhegyek CB1 receptor molekulákra mutatnak. A nyíl és nyílhegy együttes a TRPV1 és CB1 receptort tartalmazó csoportokra mutatnak. (Chen és munkatársai, 2016).

dc_1608_18

 A_3 A₁ A_2 5.68. ábra. TRPV1 és CB1 receptor kifejeződése patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. (A1-3) A CB1 receptort alacsony denzitásban kifejező sejt. B_2 B_3 TRPV1/CB B₁ CB (B1-3) A CB1 receptort denzitásban magas kifejező sejt. (Chen és munkatársai, 2016).

kísérletünkben az SDS-emésztett fagyasztva tört replica módszer segítségével

vizsgáltuk a TRPV1 és CB1 receptorok térbeli elrendeződését a hátsó gyöki dúcból készített metszeteken. Ezekben a kísérletekben csak azokat a membrán darabokat analizáltuk amelyek TRPV1 kifejeződést mutattak.

Minden TRPV1 immunreaktivitást mutató membrán darab mutatott CB1 receptor immunreaktivitást is (5.67. ábra). Ahogy az várható volt az antitestek jellemzői alapján mind a két immunreaktivitás csak a membrán darabok



5.69. ábra. TRPV1 és CB1 receptor kifejeződése patkány hátsó gyöki dúc idegsejteken. (A) TRPV1 kifejeződés. (B) CB1 kifejeződés. receptor (C)Magfestő DAPI. (D) Kombinált kép. (Chen és munkatársai, 2016).

protoplazmikus felszínén mutatkoztak (5.67. ábra). A membrán foltok exoplazmás felszínén immunreaktivitás egyik

antitesttel sem volt megfigyelhető (5.67. ábra). A membrán darabokon a CB1 receptor és a TRPV1 elrendeződése, eloszlása feltünő különbségeket mutatott (5.67. ábra). Míg egyes membrán darabokon csak néhány izolált molekula fejeződött ki,

másokon a molekulák magas denzitásban fejeződtek ki. Ez a membrán darabok közötti különbség nem a receptoroknak a régionális eloszlási különbsége miatt van, hiszen ilyen különbségeket az immunfluoreszcens vizsgálatokkal nem találtunk (5.68. és 5.69. ábra).

A TRPV1 molekulák a membránon gyakran kettesével, hármasával esetleg





5.70. ábra. Molekuláris távolságok becslése. (A) A TRPV1 (kék) és CB1 receptor (lila) fehérje komplexben két а molekula és a molekulák jelenlétét jelző aranyszemcsék (sárga) lehtséges távolságai. *(B)* A TRPV1 (kék) komplexben (csatornában) a négy TRPV1 molekula és a molekulák jelenlétét aranyszemcsék jelző (sárga) távolságai. Az IgG lehtséges molekulákat a zöld szín jelőli. (Chen és munkatársai, 2016).

négyesével helyezkedtek el. Az aranyszemcsék közötti távolság 10 és 55 nm között volt. Ez a távolság megfelel az antigén-antitestaranyszemcse komplexek közötti távolságnak (5.70. ábra) . Így a TRPV1 molekulák csoportokon belüli elrendeződése megfelel a

TRPV1 molekulák homo- és heterotetramerekbe történő rendeződésének. Ugyan a legtöbb CB1 receptor a többi CB1 receptortól illetve TRPV1-től látszólag függetlenül helyezkedett el a membránban, néhány nagyon közel volt TRPV1 molekulához vagy TRPV1 molekula csoporthoz (5.67. ábra).

No of membrane patch	Number of CB1 receptors	Number of TRPV1	Area of membrane patch (μm²)	TRPV1- CB1 average distance (nm)	CB1- TRPV1 average distance (nm)	TRPV1- TRPV1 average distance (nm)	Number of TRPV1- CB1 critical distances	Number of CB1- TRPV1 critical distances	Number of TRPV1- TRPV1 critical distances
1	10	14	1.8	202.9	152.7	199.9	0	0	5
2	5	8	1.3	305.5	215	276	1	1	1
3	152	97	6.2	95.7	127.4	85.7	24	29	32
4	121	83	4	83.8	125.1	80.9	25	25	21
5	27	28	4.8	222.8	231.8	247.2	1	0	5
6	96	27	5.6	130.2	169.6	174.9	7	26	5
7	35	21	4.6	189.5	259.8	179.8	2	14	7
8	62	83	4.5	164	109.7	116	6	14	28
9	16	16	5.9	317.6	399.4	308.4	0	0	3
10	40	38	3	160.7	141.4	93.1	8	10	16
11	116	109	6.9	126.3	142.5	95.5	16	17	33
12	74	64	5.6	146	172.5	126.9	10	8	11
13	357	104	6.4	57.1	93.6	126.8	57	108	19
14	85	52	5	138.5	230	177.5	15	10	7
15	79	21	4.5	82.6	159.6	340.1	8	16	0
16	67	47	7.8	162.6	185.2	135.3	15	15	11
17	85	41	7.5	172.4	192.9	243.7	5	13	4
18	95	52	7.9	152.1	206.9	176.4	16	18	9
19	75	21	3.9	105	238.2	273.2	8	16	3
20	77	33	5.3	154.1	220.4	235.7	10	12	6
21	119	36	1.8	87	228.6	204	10	11	6

5.1. táblázat. 21 membránfolt morfmetriai jellemzője. (Chen és munkatársai, 2016).

Huszonegy membrán darab morfometria analízisét végeztük el, amely során megmértük az egyes membrán darabok felületét, megszámoltuk ez egyes membrán darabokon kifejeződő CB1 receptorokat és TRPV1 molekulákat, valamint megmértük minden molekulának a többi molekulától való távolságát. Az analízissel szintén meghatároztuk a CB1 receptor és TRPV1 közötti kritikus távolságok számát. A kritikus távolságot 54.5 nm-ben határoztuk meg. Azt feltételeztük, hogy figyelembe véve a CB1 receptor, a TRPV1, az IgG és az aranyszemcsék méretét ez a távolság lehet a legnagyobb, amely megengedi, hogy a CB1 receptor és TRPV1 közvetlen fehérje-fehérje kapcsolatot hozzon létre. Ezzel analóg módon, meghatároztuk a TRPV1 – TRPV1 kritikus távolságok számát is, amelyet 56 nm-ben határoztunk meg. Azt feltételeztük, hogy ez lehet a legnagyobb távolság két TRPV1 között, amelyek egy csatorna létrehozásában vesznek részt. Az adatokat a 5.1. táblázat foglalja össze.

megállapítására, hogy a membrán darabok valóban különböznek-e egymástól, és ha igen akkor a morfometriai adatok melyike fontos a csoportok elkülönítésében. Erre feladatra a főkomponens elemzés (PCA) tűnt a legalkalmasabb statisztikai Módszernek.



Az első PCA a 21 membrán darabot 2 csoportra és három a csoportoktól különálló (9, 13, 15 membrán darab) membrán darabra osztotta. A három csoportba nem osztható membrán darabok valamint a nem szignifikánsnak talált változó (CB1 receptor és TRPV1 közötti kritikus távolságok száma) eltávolítása után a PCA újabb futtatása 3 vezető összetevőt talált, amelyek csoportok а meghatározásához több mint 80%/ban vettek részt (5.71. ábra). A feltételezhető csoportosulás további



vizsgálatához a parciális legkisebb négyzetek diszkriminatív elemzést (PLSDA) használtuk, amely ismételten 3 fő összetevő és 3 csoport jelenlétét mutatta (5.72. A és B ábra). Ha a 3 csoport jellemzőit vizsgáljuk és hasonlítjuk össze, akkor az 5.72. B ábrán sárga színnel jelölt membrán darabok 6 paramétere különbözik szignifikánsan a pirossal jelölt membrán darabok, illetve 3-al a lilával jelölt membrán darabok paramétereitől. Ezen paraméterek között vannak a TRPV1 és CB1 receptorok közötti távolságok, illetve a TRPV1 és CB1 receptorok közötti kritikus távolságok száma. Míg a sárgával jelölt membrán darabokon a TRPV1 és a CB1 receptor közötti távolságok nagyok és a kritikus távolságok száma alacsony, a pirossal és lilával jelölt membrán darabokon lévő TRPV1 és CB1 receptorok egymáshoz közel helyezkednek el és a TRPV1 és CB1 receptorok közötti kritikus távolságok száma magas. A pirossal és lilával jelölt membrán darabok 4 jellemzőben különböznek (5.72. E és F ábra), a TRPV1 denzitásban, a CB1 – TRPV1 távolságban, a TRPV1 – TRPV1 távolságban, valamint a TRPV1 - TRPV1 kritikus távolságok számában. Az első PCA eredményeinek megfelelően, a CB1 receptor – TRPV1 kritikus távolságok száma nem különbözött szignifikánsan a membrán darab csoportok között. Ezen adatok azt mutatták, hogy a míg a sárga színnel jelölt membrán darabok a TRPV1 és CB1 receptor térbeli elrendeződésében, a pirossal és lilával jelölt membrán darabok a TRPV1 molekulák térbeli elrendeződésében különböznek egymástól. Mivel a farmakológiai kísérleteink eredménye azt mutatta, hogy a CB1 receptor jelentősen hozzájárul az ACR és COR fenotípus létrejöttéhez, így a TRPV1 térbeli elrendeződésében különböző membrán darabokat egy csoportba soroltuk. Az így kapott két csoportban található membrán darabok száma nem volt szignifikánsan különböző a ACR és COR sejtek arányától. Összességében ezek az eredmények azt dc_1608_18



sugallták, hogy a sárga színnel jelölt membrán darabok COR, míg a pirossal és lilával jelölt membrán darabok ACR sejtekből származhattak.

5.72. ábra. A morfometriai adatok parciális diskriminatív analízise. (A) és (B) Három főkomponens három csoportot különít el. változóknak (C)A elkülönítéséhez csoportok történő hozzájárulása. (D) A fontossága változók а csoportok elkülönítésében. (E) és (F) A három csoport változóinak átlagolt összehasonlítása. TR-CB dist: TRPV1-CB1 átlagos távolság. TR-TR dist: TRPV1-TRPV1 átlagos távolság, CB-TR dist: CB1-TRPV1 átlagos távolság, TR-TR TRPV1-TRPV1 crit: kritikus távolság, TR-CB1 crit: TRPV1-CB1 kritikus távolság, TR dens: TRPV1 denzitás. CBdens: CB1 densitás. CB-TR crit: CB1-TRPV1 kritikus távolság. A kritikus távolság azt а maximális távolságot jelöli, emely mellet a molekulák feltételezhetően komplexet képeznek. (Chen és munkatársai, 2016).

5.8.1.5. A CB1 RECEPTOR ÉS TRPV1 KÖZVETLEN FEHÉRJE – FEHÉRJE KAPCSOLATA AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Az eredmény, hogy az elsődleges érző idegsejtekből származó membrán darabokon a CB1 receptor és a TRPV1 a kritikus távolságon belül helyezkedik el, arra engedett következtetni, hogy a sejtek egy jelentős részében a CB1 receptor és a TRPV1 közvetlen fehérje – fehérje kapcsolatba kerül. Ennek a lehetőségnek a vizsgálatát immunprecipitációt követő immunbloting módszerével vizsgáltuk (5.73. ábra). Az immunprecipitációt két különböző mintán végeztük, az egyikben anti-TRPV1, a másikban anti-CB1 receptor antitesttel. Az immunprecipitació után végzett immunblotok azt mutatták, hogy a sejtek legalább egy részében a TRPV1 és a CB1 receptor valóban közvetlen fehérje – fehérje kapcsolatot hoz létre (5.73. ábra).



5.73. ábra. A TRPV1 és a CB1 receptor kifejeződése egy molekuláris komplexen belül. (A) CB1 receptor antitestet használó immunprecipitációt (IP)követő TRPV1 antitestet használó immunblot *(IB)*. *(B)* TRPV1 antitestet használó IP követő CB1 antitestet használó IB. (Chen és munkatársai, 2016).

5.9. AZ ANANDAMID TRPV1 ÉS CB1 RECEPTOR KÖZVETÍTETT HATÁSOK SZEREPE A PATKÁNY HÚGYHÓLYAG ÖSZZEHÚZÓDÁSÁRA

Amint azt BEVEZETÉSBEN részletesen bemutattam, a fájdalomérző elsődleges idegsejtek a testi és zsigeri fájdalmak elindítása és fenntartása mellett fontos szerepet játszanak az üreges zsigerek összehúzódásának szabályozásában is, különösen patológiás körülmények között. Ezért a CB1 receptor – TRPV1 – anandamid funkcionális kapcsolatait *in vivo* körülmények között a húgyhólyag összehúzódásának vizsgálatával végeztük.

5.9.1. ANANDAMIDDAL KIVÁLTOTT HÓLYAG AKTIVITÁS FIZIOLÓGIÁS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

Jól ismert, hogy a TRPV1 aktiválása a hólyag falában futó elsődleges érző idegsejtek nyúlványain a reflex kontrakciók számát szignifikánsan megemeli



5.74. ábra. Exogén anandamid patkány hatása a húgyhólyag összehúzódására. (A) Az anandamid hatása a hólyag összehúzódására cisztometriás méréssel. *(B)* Az anandamid koncentráció-hatás kapcsolata a hólyag összehúzódására rimonabant hiányában (rombusz) és rimonabant jelenlétében (négyzet). (Dinis és munkatársai, 2004b).

(Ishizuka és munkatársai, 1994).

Anandamidnak $(1 - 100\mu M)$ a

húgyhólyag peritóneális felszínére történő adagolása megemelte a hólyag reflex kontrakció ferquenciáját (5.74. A ábra). Az anandamid excitatórikus hatása koncentráció függő volt (5.74. B ábra). Az anandamid legalacsonyabb koncentrációja ami szignifikánsan megemelte az összehúzódások számát 50µM volt (5.74. ábra). Az anandamid azonban 100 µM mellett sem érte el a maximális hatást (5.74. ábra). Annak vizsgálatára, hogy az anandamid excitatórikus hatása valóban a TRPV1 aktiválása útján jön létre, kétféle módón vizsgáltuk. Először, az első anandamid adagolás után a hólyagra a TRPV1 antagonista kapszazepint adagoltuk és vizsgáltuk, hogy a második anandamid adagolás képes-e a kapszazepin jelenlétében frequencia növekedést kiváltani. Amint várható volt, a kapszazepin meggátolta az anandamid frequencia növelő hatását (5.75. A ábra). A második kísérletben, a hólyagokat RTX-el előkezeltük 24 órával az anandamid adagolás előtt. Ez az előkezelés ismert módon a TRPV1 deszenzitizálása és/vagy a TRPV1-t kifejező idegrostok degenerációja révén meggátolja a TRPV1 aktivátorok frequencia növelő hatását (Craft és munkatársai, 1995; Dinis és munkatársai, 2004a). Ahogy azt a anandamid *in vitro* kísérletekben megfigyelt TRPV1 aktiváló hatása, illetve a kapszazepinnek az anandamid freqvencia növelésre gyakorolt gátló hatása alapján várni lehetett, az RTX-al előkezelt hólyagokon az anandamid nem okozott freqvencia növekedést (5.75. B ábra.).



5.75. ábra. Az anandamid indukált patkány hólyag aktivitás növekedés farmakológiája. (A) Kapszazepin hatása az anandamid által kiváltott hólyag összehúzódás növekedésére. (B) RTX előkezelés hatása az anandamid által kiváltott hólyag összehúzódás növekedésére. (Dinis és munkatársai, 2004b). Ezek az adatok azt mutatták, hogy egyetértésben az *in vitro* kísérletek adataival, az anandamid a TRPV1 aktiválása útján excitatórikus hatást vált ki a

A Intrvesical pressure (cm H₂O) 100 50nM RTX Saline 50nM RTX saline -10 50 60 10 20 30 Time (minutes) 40 B Intrvesical pressure (cm H₂O) Saline 50µM ANA saline 50µM ANA MAMM 10 20 30 Time (minutes) 50 40 60 C 1.00 0.75 0.50 0.25 Bladder 50µM ANA Saline 50µM ANA

5.76. ábra. Az RTX és anandamid hatása a TRPV1 deszenzitizációjára a patkány húgyhólyagban. (A) RTX hatása TRPV1 deszenzitizációjára. (B)Anandamid hatása TRPV1 а deszenzitizációjára. (C) Első (bal fekete oszlop) és második (jobb fekete oszlop) anandamide adagolás átalgolt hatása a hólvag összehúzódás frekvenciájára. (Dinis és munkatársai, 2004b).

húgyhólyagban, ami a reflex összehúzódások freqvenciájának a növekedésében nyilvánul meg. Ezzel összhangban, 50nM RTX adagolás a patkány húgyhólyag peritóneális felszínére

megemelte reflex kontrakció freqvenciáját (5.76. A. ábra). Ugyanakkor, amíg a RTX 30 perccel később megismételt adagolása, a TRPV1 deszenzitizációja miatt, nem okozott freqvencia növekedést, az anandamid hasonló applikációja az első adagoláshoz hasonló freqvencia növekedést váltott ki (5.76. B és C ábra).

A TRPV1 aktiválása akár kapszaicinnel vagy anandamiddal fájdalomérzés kialakulásához vezet (Simone és munkatársai, 1987; Simone és munkatársai, 1989; Potenzieri és munkatársai, 2009). Ennek a fájdalomérzés kialakulásának egyik első komponense a gerincvelői sejtek nociceptív ingerület feldolgozásának a növekedése, amely a sejtekben egy sor biokémiai változással jár. Ezen változások egyike egy proto-onkogén, a cFos kifejeződésének a megemelkedése (Hunt és munkatársai, 1987; Birder és munkatársai, 1991; Birder és de Groat, 1992b; Birder és de Groat, 1992a; Birder és de Groat, 1993; Cruz és munkatársai, 1994). Ezért a következő kísérletünkben, az anandamid hatását vizsgáltuk a gerincvelői cFos kifejeződésére.

Fiziológiás sóoldat hólyagba juttatása a gerincvelőben 51.5±7.8 sejt/metszet (n=4) cFos immupozitivitást eredményezett (5.77. A és C ábra). A cFos-t kifejező sejtek elsősorban a lamina I-ben, az intermediolaterális szürke állományban illetve a *commissura dorsalis*-ban voltak (5.77. A ábra). Anandamidnak (50µM) a hólyagba juttatása jelentősen megemelte a cFos-t kifejező sejtek számát (79.5±4.7 sejt metszet



5.77. ábra. Intravesicalis anandamid hatása gerincvelő patkány *cFos* kifejeződésre. (A)Intravesicalis fiziológiás só hatása a gerincvelői cFos kifejeződésére. *(B)* Intravesicalis anandamid hatása a gerincvelői cFos kifejeződésre. (C)Gerincveői cFos kifejeződés különböző kezelések hatására. (Dinis és munkatársai, 2004b).



(n=4), 5.77. B és C ábra). A cFos-t kifejező sejtek térbeli megoszlása hasonló volt a sóoldattal kiváltott cFos-t kifejező sejtek elhelyezkedéséhez (5.77. B ábra). Kapszazepin adagolás illetve RTX előkezelés teljes mértékben meggátolta az anandamid cFos kifejeződést okozó hatását



(5.77. C ábra).

5.9.2. AZ ANANDAMID SZEREPE A HÓLYAG AKTIVITÁS SZABÁLYOZÁSÁBAN GYULLADÁSOS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

A TRPV1 szerepe a hólyag gyulladás két fő tünetének, a hólyag fokozott összehúzódásának, illetve a hólyag fájdalmának a kialakulásában jól dokumentált (Avelino és Cruz, 2006; Cruz és Dinis, 2007; Holzer és Izzo, 2014; Charrua és munkatársai, 2007; Charrua és munkatársai, 2009a; Kitagawa és munkatársai, 2013). De mi aktiválhatja a TRPV1-t cystitisban? Amint azt a bevezetésben bemutattam, a



5.78. ábra. A ciklofoszfamid indukált húgyhólyag gyulladás hatása a patkány húgyhólyag anandamid tartalmára. (A) Exogén anandamidot tartalmazó (spiked) naive hólyagból származó minta folyadék kromatográfiástömegspektrométerrel kapott kromatogramja. A nyíl az anandamid okozta (rt: 6.173 perc, M: 348.3) csúcsra mutat. (B) N aive hólyagból származó folyadék kromatográfiásminta tömegspektrométerrel kapott kromatogramja. A nyíl az anandamid okozta csúcsra mutat. (C) Gyulladt hólvagból származó minta folyadék kromatográfiás-tömegspektrométerrel kromatogramja. kapott A nvíl azanandamid okozta csúcsra mutat. (D) Naive és ciklofoszfamid injectált patkány húgyhólyagok anandamid tartalma. (Dinis és munkatársai, 2004b).

gyulladásos mediátorok nagy része, a saját receptorán keresztül olyan intracelluláris jelzőrendszerek aktivitását indítja el, amelyek a TRPV1 hőküszöbét a testhőmérséklet alá csökkentik. Azonban,

Hours míg a TRPV1 antagonsiták jelentősen csökkentik a hólyag gyulladásos hiperaktivitását, illetve a gerincvelőbe jutó fájdalominformáció mennyiségét (Kitagawa és munkatársai, 2013; Charrua és munkatársai, 2007; Charrua és munkatársai, 2009a), kevésbé hatékonyak a TRPV1 fájdalmas hőingerrel történő

aktivitásának a csökkentésére (Nagy és Rang, 1999b; Kitagawa és munkatársai, 2012). Így felevtődik annak alehetősége, hogy a TRPV1 aktiválásához egy endogén ligand is hozzájárul. Előző kísérletünk eredménye egyértelműen bizonyította, hogy az anandamid a TRPV1 aktiválásán keresztül megemeli mind a hólyag motoros aktivitását, mind a gerincvelői nociceptív bemenet mértékét. Így adotott a feltevés, hogy a TRPV1-t aktiváló endogén ligand az anandamid lehet. Ezért következő kísérletünkben összehasonlítottuk a naiv és gyulladt húgyhólyag anandamid tartalmát.



ciklofoszfamid injekcióval váltottuk ki (Cox, 1979). A ciklofoszfamid injekció jelentősen megemelte a hólyag anandamide tartalmát (5.78. ábra). Ez a növekedés legalább 8 napig tartott (5.78. ábra).

A ciklofoszfamid injekció, amint azt várni lehetett, jelentősen megemelte a

motoros



5.80. ábra. A	rimonabant h	atása a gyu	lladt
húgyhólyag	összehúzódás	frekvenciáj	jára.
SR141716A:	rimonabant.	(Dinis	és
munkatársai, 2	004b).		

aktivitását

is,

amit

а

cisztometrogramokon a összehúzódások frekvenciájának a megnövekedése is mutatott (5.79. ábra). Míg a kapszazepin ezt a hiperaktivitást jelentősen csökkentette, a naiv hólyag aktivitására nem volt hatással (5.79. ábra). Ez az eredmény megerősítette,

hólyag

hogy egy ligand, pl az anandamid TRPV1-hoz történő kötődése jelentősen hozzájárulhat a gyulladt hólyag hiperaktivitásának a kialakulásához.

A CB1 receptor szerepének a vizsgálatához rimonabanttal kezeltük a gyulladt hólyagot (5.80. ábra). A rimonabant kezelés nem változtatta meg a hólyagösszehúzódások frekvenciáját, ami arra utal, hogy a gyulladás során keletkezett



5.81. ábra. A palmitoylisopropylamide (PIA) hatása a patkány húgyhólyag motors aktivitására. (A) és (B) A PIA hatása a naive patkány húgyhólyag motors aktivitására. (C) A kapszazepin hatésa PIA által okozott а hólyagössehúzódás frekvencia növekedésére. (D) A PIA hatása a injektált ciklofoszfamid patkány húgyhólyag motors aktivitására. CPZ: kapszazepin. (Dinis és munkatársai, 2004b).

anandamid nem aktiválta a húgyhólyag érző Intrvesical pressure (cmH₂O) 01-0 rostokon kifejeződő CB1 receptort, vagy a CB1 receptoron keresztül létrejött, többek között TRPV1 gátló hatást az ugyancsak a 30 Time (minutes) 60 10 20 40 CB1 receptoron keresztül létrejött TRPV1 szenzitizáló hatás teljes mértékben kompenzálta. Egy alternativ lehetőség, hogy a gyulladás során keletkezett anandamid nem elegendő, pl a CB1 receptor lehetséges poszt-transzlációs változása miatti anandamid affinitás csökkenés miatt, a CB1 receptor aktiválására. Ezért utolsó kísérletünkben, az endogén anandamid szint további emelésének a hatását vizsgáltuk (5.81. ábra).

A FAAH gátló *palmitoylisopropylamide* (PIA) adagolása a hólyaghoz, a hólyagösszehúzódások frekvenciáját fokozatosan és jelentős mértékben megemelte (5.81. A és B ábra). Ezt a növekedést a TRPV1 aktiválása közvetítette, hiszen a növekedést a kapszazepin teljes mértékben gátolni tudta (5.81. C ábra). A PIA hatása

a naiv hólyagon összhangban van a FAAH anandamid hidrolízisben betöltött szerepével, illetve az anandamidnak a hólyag motoros aktivitására kifejtett hatásával. A PIA adagolás a gyulladt hólyagon is excitációs hatást váltott ki, a gyulladt hólyagok a PIA adagolásra tetanuszos összehúzódással válaszoltak (5.81. D ábra). Ez az eredmény azt sugallja, hogy az anandamid, akár exogén akár endogén, nem alkalmas a gyulladt hólyag összehúzódás frekvenciájának a csökkentésére.

6. AZ ERDMÉNYEK ÉS AZOK JELENTŐSÉGÉNEK MEGBESZÉLÉSE

6.1. AZ ÉRTEKEZÉSBEN BEMUTATOTT EREDMÉNYEK ÁLTALÁNOS JELENTŐSÉGE

A jelen értekezés tudományos munkám azon részét foglalja össze, amelyben munkatársaimmal arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az endovanilloid és endokannabinoid rendszerek hogyan szabályozzák a fájdalomérző elsődleges érző idegsejtek aktivitását és érzékenységét. Ennek a kérdésnek a megválaszolása, az idegsejtek jelző mechanizmusainak jobb megértése mellett, azért is fontos, mert (i) a fájdalomérző elsődleges érző idegsejtek kulcsszerepet játszanak a perifériás szövetek patológiás folyamatait kísérő fájdalmak létrejöttében (Almeida és munkatársai, 2004; Gangadharan és Kuner, 2013; Nagy, 2004; Nagy, 2003; Laycock és munkatársai, 2013; Woolf és Costigan, 1999; Woolf és Salter, 2000; Ji és Woolf, 2001; Muir és Woolf, 2001; Scholz és Woolf, 2002; Woolf, 2004; Wang és munkatársai, 2006; Woolf és Ma, 2007; Woolf, 2010), (ii) az endovanilloid és az endokannabinoid rendszerek is fontos szerepet játszanak a perifériás szövetek patológiás folyamatait kísérő fájdalmak létrejöttében (Caterina és munkatársai, 2000; Davis és munkatársai, 2000; Calignano és munkatársai, 1998; Kress és Kuner, 2009; Clapper és munkatársai, 2010), illetve (iii) a fájdalomérző elsődleges érző idegsejtek kiemelt helyzetben vannak mint a fájdalomcsillaptók célmolekuláit kifejező sejtek, hiszen ezen idegsejtek a vér-agy gáton kívül helyezkednek el, így a gyógyszer molekulák vér-agy gáton történő átjutásának a megakadályozásával az idegrendszeri eredetű nem kívánatos mellékhatások elkerülhetőek. Ezen meggondolások alapján, munkánkkal arra a kérdésre is kerestük a választ, hogy az endovanilloid és/vagy az endokannabinoid rendszereknek a fájdalomérző elsődleges érző idegsejteken dc_1608_18

kifejeződő egyes molekulái használhatók-e új típusú fájdalomcsökkentők hatóanyagának a célmolekuláiként.

Új típusú fájdalomcsillapítók kifejlesztése, amelyek képesek hatásosan csökkenteni a perifériás szövetek patológiás folyamataihoz kapcsolódó fájdalmakat, egyike a legfontosabb gyógyszerfejlesztési tevékenységnek. A perifériás szövetek patológiás folyamataihoz kapcsolódó fájdalmak a patológiás folyamatokat végigkísérik, így akár éveken, évtizedeken keresztül jelentősen csökkentik a betegek életminőségét. A különböző számítások alapján úgy vélik, hogy a lakosság 20%-a élhet hosszantartó krónikus fájdalmakkal (Breivik és munkatársai, 2006; Price és Gold, 2017). A betegek nehezen csillapítható hosszantartó/krónikus fájdalmai a betegek felesleges szenvedése mellett jelentős anyagi terhet jelentenek az egészségügyi és szociális ellátó rendszereknek, az egyes országok gazdaságainak és végső soron az egész társadalomnak (Breivik és munkatársai, 2006).

A munkánk során az endovanilloid és endokannabinoid rendszerek szerepét a fájdalomérző elsődleges érző idegsejtek aktivitása szabályozásában együttesen vizsgáltuk. Ezt az együttes vizsgálatot a két rendszer egyes komponenseinek nagymértékű átfedése teszi szükségessé (Sousa-Valente és munkatársai, 2014a; Nagy és munkatársai, 2009b; Nagy és munkatársai, 2014; Di Marzo és munkatársai, 2001; Di Marzo és munkatársai, 2002; Van Der Stelt és Di Marzo, 2004; Starowicz és munkatársai, 2007; Starowicz és munkatársai, 2008; Szoke és munkatársai, 2010; Starowicz és Przewlocka, 2012). Ezek az átfedések oly mértékűek, hogy egyes szerzők az átfedések alapján a TRPV1 valamint CB1 és CB2 receptorokat ugyannak a rendszernek az ionotróp és metebotróp receptorainak tekintik (Di Marzo és De Petrocellis, 2012; Caterina, 2014; De Petrocellis és munkatársai, 2017). Ezek az átfedések nem csak az elsődleges érző idegsejtekben, hanem számos más

sejtben/szövetekben is kimutathatóak (Golech és munkatársai, 2004; Cristino és munkatársai, 2006; Avraham és munkatársai, 2010; Mohammadi-Farani és munkatársai, 2010; Pan és munkatársai, 2011; Casarotto és munkatársai, 2012; Fogaca és munkatársai, 2012; Uliana és munkatársai, 2016; Cui és munkatársai, 2018). Ezen meggondolás alapján az endovanilloid és endokannabinoid rendszereket elválaszthathatatlanoknak tartom, és úgy gondolom, hogy az endovanilloid és endokannabinoid rendszerek szerepét valamennyi fiziológiás és patológiás folyamatban együtt kell(ene) vizsgálni.

6.2. AZ ENDOVANILLOID ÉS ENDOKANNABINOID REDSZEREK SZÁMOS ELEME KIFEJEZŐDIK A FÁJDALOMÉRZŐ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEK EGY JELENTŐS RÉSZÉBEN

Munkánk során megvizsgáltuk az endovanilloid és endokannabinoid rendszerek egyes elemeinek a kifejeződését mind intakt hátsó gyöki dúc idegsejteken, mind tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. Ezeknek a vizsgálatoknak az eredményei azt mutatták, hogy az elsődleges érző idegsejtek egy nagy csoportja, mind a két esetben, az endovanilloid és endokannabinoid rendszerek számos elemét kifejezi. Eredményeink azt is megmutatták, hogy az intakt hátsó gyöki dúc idegsejtekben és a tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben az endovanilloid és endokannabinoid rendszerekhez tartozó molekulák kifejeződésének jellemzői hasonlóak de nem azonosak. Így, ugyan az intakt ganglionban és a tápfolyadékban növesztett TRPV1 immunopozitív sejtek aránya nem különbözik lényegesen, a sejt kultúrában talált TRPV1 immunpozitív sejtek átlagos felülete kisebb, mint a hátsó gyöki dúcában talált TRPV1 immunpozitív sejtek átlagos felülete. Ugyanakkor, a CB1 receptort kifejező sejtek a sejtkultúrákban magasabb arányban találhatók meg (~60%) mint az intakt hátsó gyöki dúcban (~35%). Ezzel párhuzamosan, a CB1 receptor immunpozitív hátsó gyöki dúc idegsejtek átlagos felülete mintegy 50%-al nagyobb mint a sejtkultúrában talált CB1 receptort kifejező sejtek átlagos felülete. Hasonlóan a TRPV1 kifejeződéséhez, a tápfolyadékban történő növesztés nem okoz lényeges változást a FAAH-t kifejező sejtek arányában. Azonban, hasonlóan a CB1 receptort és a TRPV1-t kifejező sejtekhez, a FAAH-t kifejező sejtek is kisebbek a tápfolyadékban történő növesztés után mint az intakt hátsó gyöki dúcban.

6.1. táblázat. Az anandamid szintetizáló enzimek kifejeződése intakt hátsó gyöki dúc idegsejtekben illetve tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben.

	Kultúra	Intakt
	arány	arány
NAPE-PLD	Nem vizsgált	24.8 1.3
GDE1	40.27 9.94	24.3 2.6
Inpp5	44.1 1.9	30.5 1.6
ABHd4	29.8 1.9	Nem
		kimutatható
PTPn22	58.43 10.04	22.7. 1.8
sPLA2G1b	Nem	Nem
	kimutatható	kimutatható

A anandamidot szintetizáló enzimek vizsgálatakor, míg az összes ma ismert enzim RNS kifejeződését kimutattuk, immunfetéssel csak a négy kalciumra nem érzékeny enzim kifejeződését tudtuk vizsgálni a tápfolyadékban növesztett sejteken. Ezen kívül adatokat nyertünk a NAPE-PLD kifejeződéséről a hátsó gyöki dúcban. Az értekezés EREDMÉNYEK fejezetében nem került leírásra a kalciumra nem érzékeny szintetizáló enzimek hátsó gyöki dúcban talált kifejeződése, mivel ezek az adatok az értekezés megírásának idejében még nem kerültek közlésre. Azonban a nem közölt és közölt adatok összehasonlítása (6.1. táblázat) azt mutatja, hogy a sejtkultúra készítése jelentősen megemelheti az enzimek kifejeződését (6.1 táblázat).

A munkánk során vizsgált endokannabinoid és endovanilloid rendszerek elemei közül a TRPV1, CB1 receptor, FAAH és NAPE-PLD kifejeződését vizsgálták más laboratóriumokban. A TRPV1 kifejeződést mutató sejtek arányára vonatkozóan egyetértés mutatkozik a különböző laboratóriumból származó eredményekben, a legtöbb vizsgálat a sejtek 40%-ban mutatta ki a receptor kifejeződését (Michael és Priestley, 1999; Tominaga és munkatársai, 1998; Guo és munkatársai, 1999).

A CB1 receptort kifejező sejtek arányában az előző kísérletek eredményei már kevesebb egyetértést mutatnak, hiszen a CB1 receptort kifejező sejtek arányát az összes sejt 1/4-e és 90%-a között találták (Hohmann és Herkenham, 1999; Khasabova és munkatársai, 2002; Bridges és munkatársai, 2003; Price és munkatársai, 2003; Binzen és munkatársai, 2006; Agarwal és munkatársai, 2007; Zhang és munkatársai, 2007; Mitrirattanakul és munkatársai, 2006). Ilyen jelentős különbséget egyrészt az immunpozitív és immunnegatív sejtek elválasztásának módszere, de legfőképpen az CB1 receptor ellenes antitestek specificitása magyarázhat, hiszen a receptor különböző részei ellen termelt antitestek nagy valószínűséggel a különböző molekuláris formátumban (monomérek, homomultimérek vagy heteromultimérek) kifejeződő receptorokat ismerik fel. Így feltételezzük, hogy az általunk leírt CB1 receptor kifejeződés kevesebb, mint a azoknak a sejteknek az összes száma, amelyek valamilyen formában kifejezik ezt a molekulát. Ennek a meggondolásnak az alapján, az intakt hátsó gyöki dúcban és a tápfolyadékban növesztett elsődleges érző

idegsejtekben talált kifejeződés mértéke közötti különbség interpretációja is mérsékletet követel, hiszen a kétféle preparátumban nem ugyanazt az antitestet használtuk. Ennek ellenére, mivel a sejtkultúra készítése közben a sejtek elveszítik nyúlványukat valamint a sejtek környezete jelentősen megváltozik, a kifejeződés mértéke illetve a kifejeződő receptorok molekuláris megjelenése is jelentősen változhat. Ha léteznek ilyen változások, azokat azonban az NGF illetve GDNF nagy valószínűséggel nem befolyásolja, hiszen a sejtkultúrában ennek a két növekedési faktornak a jelenléte nem változtatta meg a CB1 receptort kifejező sejtek arányát.

FAAH immunpozitivitást mind az intakt hátsó gyöki dúcban mint a sejtkultúrában az összes sejtnek kb 1/3 mutatott. A FAAH kifejeződés részletes leírását más laboratóriumokban nem végezték el, így jelenleg eredményeinket nem tudjuk mások munkájával összehasonlítani. A szintetizáló enzimek kifejeződését sem vizsgálták részletesen a mi laboratóriumunkon kívül. Ezért, a FAAH-hoz hasonlóan, a szintetizáló enzimek kifejeződését sem tudjuk mások adataival összevetni. A TRPV1-t és a CB1 receptort kifejeződését labóraróriumokban is a kis sejtekben írták le (Michael és Priestley, 1999; Tominaga és munkatársai, 1998; Guo és munkatársai, 1999; Khasabova és munkatársai, 2002; Hohmann és Herkenham, 1999; Price és munkatársai, 2003; Binzen és munkatársai, 2006; Agarwal és munkatársai, 2007; Zhang és munkatársai, 2007; Mitrirattanakul és munkatársai, 2006).

Fontos megjegyezni, hogy az elsődleges érző idegsejtek testén kifejeződő, az endovanilloid és endokannabinoid rendszerekhez tartozó molekulák a sejtek perifériás és gerincvelői nyúlványain is kifejeződnek. Az endovanilloid és endokannabinoid rendszerek egyes molekuláinak esetleges fájdalomcsillapító célmolekulaként való felhasználására vonatkozóan szintén fontos megjegyezni, hogy az idegsejteken kívül,

a két rendszer egyes molekulái más sejtek is kifejeződhetnek (pl. a TRPV1 az urotélium sejteken).

6.3. A FÁJDALOMÉRZŐ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEK KIFEJEZŐDŐ ENDOVANILLOID ÉS ENDOKANNABINOID MOLEKULÁK MŰKÖDŐKÉPESEK

A munkánk során gyűjtött adatok egyértelműen mutatják, hogy az endovanilloid és endokannabinoid rendszerek egyes, a hátsó gyöki idegsejteken kifejeződő elemei, funkcionálisak. Így, a TRPV1 szelektív és specifikus agonista kapszaicin a vizsgált sejteknek kb 1/3 ban – 40%-ban indukált membrán áramokat vagy indukált kobalt felhalmozódást, míg a sejtek mintegy felében – 2/3-ban emelte meg az intracelluláris kalcium koncentrációját (Kulik és munkatársai, 1996; Nagy és Rang, 1999a; Nagy és Rang, 1999b; Ahluwalia és munkatársai, 2000; Sathianathan és munkatársai, 2003; Singh Tahim és munkatársai, 2005; Mahmud és munkatársai, 2009; Soneji és munkatársai, 2010; White és munkatársai, 2011a; Nagy és munkatársai, 1993). Ezek a válaszok koncentráció függőek és a TRPV1 antagonsitával gátolhatók. Továbbá, a kapszaicin a TRPV1 génhiányos egerekből származó elsődleges érző idegsejtekben nem okoz semmilyen hatást (Varga és munkatársai, 2014; Chen és munkatársai, 2016). Ezek az adatok hasonlóak nagyszámú más laboratóriumból származó adatokkal.

Azonban, míg a kapszaicin által kiváltott áramokat mutató illetve a kobaltot felhalmozó sejtek aránya alacsonyabb, a megemelkedett kalcium koncentrációval válaszoló sejtek aránya magasabb, mint a TRPV1 immunpozitív tápfolyadékban növesztett sejtek aránya (Ahluwalia és munkatársai, 2002a; Sathianathan és munkatársai, 2003; Lever és munkatársai, 2009; Ahluwalia és munkatársai, 2000;

Ahluwalia és munkatársai, 2002b; Baiou és munkatársai, 2007; Sousa-Valente és munkatársai, 2017). Ezeknek a különbségnek a hátterében részben a módszerek eltérő érzékenysége is meghúzódhat. Azonban azt a lehetőséget is számításba kell vennünk, hogy a kapszaicin indirekt módon is aktiválhatja a sejteket, ugyanis a TRPV1 aktiválása a sejtekből transzmitter felszabadulást vált ki (pl. (Ahluwalia és munkatársai, 2003a)). Ezeknek a transzmittereknek egy része, mint a glutamát, CGRP vagy SP egyes sejteken képesek depolarizációt kiváltani, így a feszültségfüggő csatornákat aktiválni (Roosterman és munkatársai, 2006; Geppetti és munkatársai, 2008; Sorkin és munkatársai, 2018; Nagy, 2004; Nagy és Rice, 2003; Laycock és munkatársai, 2013; Gangadharan és Kuner, 2013). Mivel a feszültségfüggő kalcium csatornák nem átjárhatóak a kobalt számára, illetve a teljes sejtes feszültség kapcsolt mérések során a membrán potenciál nem változik, ez az indirekt aktiválás rejtve maradhat az ezekkel a módszerekkel végzett mérésekkel során, míg a kalcium beáramlás mérésekor a választ mutató sejtek egy részében hozzájárulhat a válaszok létrejöttéhez. Ezt a lehetőséget az is növeli, hogy míg a teljes sejtes feszültség kapcsolt illetve a kobalt beáramlás mérések során a tárgylemezen a sejtek között jelentős távolságok vannak (100 µm-es nagyságrend), a kalcium mérések során használt tárgylemezeken a sejtek közötti távolságok ennél szignifikánsan rövidebbek (0-20 µm). Így, míg a teljes sejtes feszültség kapcsolt illetve kobalt beáramlás mérések során a felszabaduló transzmitterek alacsony koncentrációban érik el szomszédos sejteket, a kalcium mérések során a transzmitterek koncentrációja elég magas lehet az indirekt hatások létrejöttéhez. Ezeknek a lehetőségnek az ellenére úgy gondoljuk, hogy az indirekt módón aktivált TRPV1-t nem kifejező sejtek alacsony számban fordulhatnak elő, így lényegesen nem befolyásolhatják a kísérletek

eredményét, illetve az így nyert eredmények interpretációja nem vezethet megalapozatlan következtetések levonására.

A kapszaicin mellett, amint az várható volt, az anandamid adagolása is TRPV1 közvetített (koncentráció függő, TRPV1 antagonistával gátolható és TRPV1 génhiányos egerekből származó elsődleges érző idegsejteken hiányzó) kation áramokat generált az elsődleges érző idegsejtek egy csoportjában (Singh Tahim és munkatársai, 2005; Lever és munkatársai, 2009; Mahmud és munkatársai, 2009; Santha és munkatársai, 2010a; Soneji és munkatársai, 2010; Varga és munkatársai, 2014; Chen és munkatársai, 2016). Érdekes módon azonban, míg valamennyi anandamidra válaszoló sejt mutat kapszaicinnel kiváltott válaszokat, a kapszaicinre válaszoló sejteknek csak kb 3/4-e válaszol anandamidra (Chen és munkatársai, 2016). Ennek lehetséges okát a MEGBESZÉLÉS egy másik fejezetében fogom tárgyalni.

Amint az a TRPV1 felismerése utáni részletes vizsgálatok kimutatták, a TRPV1 a kapszaicin mellett a hőmérséklet emelkedésére is érzékeny (Caterina és munkatársai, 1997). Ezzel egyetértésben a mi kísérleteink is megerősítették, hogy valamennyi kapszaicinre válaszoló elsődleges érző idegsejt a hőmérséklet megemelésére membrán áramokat generál (Nagy és Rang, 1999a; Nagy és Rang, 1999b). Ezeknek a hőmérséklet emelésével kiváltott válaszoknak a biofizikai és farmakológia jellemzői azonban részben eltérnek a kapszaicinnel kiváltott válaszok hasonló jellemzőitől. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a TRPV1 különböző aktivátorai különböző változásokat idéznek elő a csatorna struktúrájában (Nilius és Voets, 2005; Latorre és munkatársai, 2007; Chung és munkatársai, 2008). Ezen kísérleteink közben másik két fontos felfedezést is tettünk. Eredményeink alapján valószínűsítettünk egy, a TRPV1 mellett létező, másik hőre érzékeny csatorna jelenlétét az elsődleges érző idegsejteken (Nagy és Rang, 1999a; Ahluwalia és

munkatársai, 2002a). Ez a csatorna ma mint a magas hőküszöbű TRPV2 ismert (Caterina és munkatársai, 1999). A másik jelentős felfedezésünk, hogy egyedi csatorna szinten a kapszaicin érzékenység és alacsony küszöbű hőérzékenység elválnak egymástól (Nagy és Rang, 1999b). Feltételeztük, hogy a csatornák poszttranszlációs módosulása vagy a csatornák más módosulásai (pl. a csatornák összetételében lévő különbségek) lehetnek a szegregáció hátterében. Kísérleteink után néhány évvel valóban kimutatták, hogy a TRPV1 molekula más TRP molekulákkal is képes tetramer alkotására, így a TRPV1-t tartalmazó csatorna mind hetero- mind homotetramer formában előfordulhat (Smith és munkatársai, 2002; Fischer és munkatársai, 2014). A homo- és heterotetramer csatornák azonban eltérő farmakológiai tulajdonságokkal bírnak (Smith és munkatársai, 2002; Fischer és munkatársai, 2014). A TRP molekulák mellett a TRPV1 G protein kapcsolt receptorokkal is képes complexet alkotni, és a G protein kapcsolt receptorhoz kapcsolódó TRPV1 válaszai különbözhetnek a tisztán TRPV1 molekulákból felépülő kapszaicin receptortól mint azt munkánk során mi is kimutattuk (Chen és munkatársai, 2016). Végül a TRPV1 egyéb molekulákkal alkotott komplexeinek (3.1.1. fejezet) válaszai is különbözőek lehetnek.

A TRPV1-hoz hasonlóan, a CB1 receptor is funkcionális a fájdalomérző elsődleges érző idegsejteken: azokban a kísérletekben, ahol az anandamidot alacsony koncentrációban használtuk CB1 receptor közvetített gátló hatást mértünk (Ahluwalia és munkatársai, 2003a; Santha és munkatársai, 2010a; Mahmud és munkatársai, 2009). Ez a hatás mind a spontán vagy a kapszaicinnel kiváltott CGRP felszabadulást illetve a kapszaicinnel kiváltott áramokat is gátolta.

A két receptor mellett mind az anandamidot szintetizáló enzimek, mind az anandamidot hidrolizáló legjelentősebbnek tartott enzim (FAAH) is funkcionális az

elsődleges érző idegsejtekben. A szintetizáló enzimek közül a kalciumra nem érzékeny enzimek működését a tápfolyadékban növekedett elsődleges érző idegsejtekhez adagolt 20:4 NAPE, amely az összes anandamid szintetizáló útvonal közös szubsztrátja, segítségével mutattuk ki (Varga és munkatársai, 2014). Ezt a módszert csoportunk használta először sejtes körülmények között. A kísérleteink során kimutattuk, hogy ez a módszer a sejtekben koncentráció függő módon anandamid szintézist indukál. Azonban, az egyes útvonalak jelenlétére, illetve funkciójára nem sikerült adatokat szereznünk, mivel a kísérleteink időpontjában nem léteztek olyan génhiányos egerek, amelyek az egyes enzimek génjeit nem fejezték ki. Az enzimek kifejeződésének siRNA-al történő csökkentése nem járt sikerrel, annak ellenére, hogy minden egyes enzim kifejeződését 5 különböző siRNA-vel próbáltuk gátolni (az adatokat az EREDMÉNYEK fejezet nem tartalmazza). Így jelenleg nem tudjuk, hogy valamennyi, az általunk kimutatott anandamid szintetizáló útvonal, működőképes-e az elsődleges érző idegsejtekben.

A kalcium függő anandamid szintetizáló enzim, a NAPE-PLD működésére az intracelluláris kalcium szint kapszaicinnel és 50mM KCl-el történő emelésével szereztünk bizonyítékot (Ahluwalia és munkatársai, 2003b). A kísérletek során kimutattuk, hogy mind a kapszaicin mind a KCl adagolás jelentősen megemeli az extracelluláris folyadék anandamid koncentrációját. Ezen eredményeink azonban nem került be a jelen értekezésbe, mivel közleményünket számítási hibák miatt visszavontuk (Nagy és munkatársai, 2011). A megismételt kísérleteink azonban bizonyították, hogy a sejtek intracelluláris kalcium szint emelése, feltehetően a NAPE-PLD útján, anandamid szintézist indukál (Varga és munkatársai, 2014). Ezen eredményeinket Di Marzo és munkatársai is megerősítették (van der Stelt és munkatársai, 2005; Vellani és munkatársai, 2008). A NAPE-PLD szerepét eredeti

kísérletünk időpontjában az intracelluláris kalcium szint emelésével kiváltott anandamid szintézisben nem tudtuk vizsgálni, mivel a NAPE-PLD-t és annak szerepét az anandamid szintézisében csak évekkel később azonosították (Okamoto és munkatársai, 2004).

A FAAH elsődleges érző idegsejtekben történő funkcionális kifejeződését is bizonyítottuk. Ezekben a funkcionális kísérleteinkben az anandamid TRPV1-t aktiváló hatását használtuk és kimutattuk, hogy a FAAH gátlása a tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtekben TRPV1 által közvetített kobalt beáramlást eredményez (Lever és munkatársai, 2009). Ugyan a FAAH blokkoló hatása önmagában nem érte el a p=0.05 szignifikancia szintet, a hatás egyértelmű volt mivel 1µM anandamid, ami magában nem okoz szignifikáns kobalt beáramlást, vagy a CB1 receptor egyidejű gátlása, a FAAH gátló TRPV1-t aktiváló hatását potencionálta.

Összességében ezekkel a kísérletekkel kimutattuk, hogy az elsődleges érző idegsejtek egy jelentős csoportja(i) az endovanilloid és endokannabinoid rendszerekhez tartozó molekulákat funkcionális formában fejezi ki. Ezek az adatok azt is mutatják, hogy az endovanilloid és endokannabinoid rendszereknek az elsődleges érző idegsejtek aktivitására kifejtett hatását megbízható módon vizsgálhatjuk tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken, és az így nyert adatok nagy valószínűséggel jósolják meg az *in vivo* körülmények közötti hatásokat. Az *in vivo* vizsgálatok így, a jelentős idő és költségmegtakarítás mellett, a felhasznált laboratóriumi állatok számának és azoknak a kísérletekkel esetleg együttjáró szenvedéseit nagy mértékben képesek csökkenteni. Így adataink hozzájárulnak a gyógyszerfejlesztések anyagi és egyéb költségeinek a csökkentéséhez.
6.4. AZ ENDOVANILLOID ÉS ENDOKANNABINOID REDSZEREK A FÁJDALOMÉRZŐ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEK EGY JELENTŐS RÉSZÉBEN AUTOKRIN JELZŐRENDSZERT ALKOTNAK

Az értekezésemben szereplő adataink egyik legfontosabbika, hogy az endovanilloid és endokannabinoid rendszerekhez tartozó funkcionálisan aktív molekulák az elsődleges érző idegsejtekben nagy mértékű közös kifejeződést mutatnak. Így, vizsgálataink eredményeként először írtuk le a TRPV1-nak a CB1 receptorral (Ahluwalia és munkatársai, 2000; Chen és munkatársai, 2016), FAHH-al (Lever és munkatársai, 2009), NAPE-PLD-el (Nagy és munkatársai, 2009a; Sousa-Valente és munkatársai, 2017) valamint az Inpp5-al (Varga és munkatársai, 2014) mutatott jelentős közös kifejeződését a hátsó gyöki dúc illetve a tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken. Ugyancsak a mi eredményeink az elsők amelyek leírják a NAPE-PLD-nek és a CB1 receptorral, valamint a FAAH-al mutatott jelentős közös kifejeződését a hátsó gyöki dúc elsődleges érző idegsejteken (Sousa-Valente és munkatársai, 2017).

Az adatok számszerűsítése azt mutatja, hogy szinte valamennyi TRPV1-t kifejező sejt kifejezi a CB1 receptor (Ahluwalia és munkatársai, 2000; Chen és munkatársai, 2016). Más laboratóriumokban is kimutatták a TRPV1 és CB1 receptor közös kifejeződését az elsődleges érző idegsejteken mind immunfestés mind funkcionális mérések segítségével (Sagar és munkatársai, 2004; Amaya és munkatársai, 2006; Binzen és munkatársai, 2006; Mitrirattanakul és munkatársai, 2006; Fischbach és munkatársai, 2007; Zhang és munkatársai, 2007; Hong és munkatársai, 2009; Wang és munkatársai, 2014; Agarwal és munkatársai, 2007). Azonban fontos megjegyezni, hogy a trigeminus érző idegsejtekből történő mérés

során nem sikerült a CB1 receptor TRPV1-t gátló hatását kimutatni (Price és munkatársai, 2004a; Price és munkatársai, 2004b).

A TRPV1-t kifejező sejtek fele FAAH és NAPE-PLD kifejeződést is mutat, míg a NAPE-PLD-t kifejező sejtek 1/3-a fejezi ki a FAAH-t illetve a TRPV1-t (Sousa-Valente és munkatársai, 2017). A TRPV1-t kifejező sejtek 1/5-e – 2/3-a fejezi ki valamelyik kalciumra nem érzékeny anandamid szintetizáló enzimet (Varga és munkatársai, 2014). Jelenleg nem rendelkezünk arra vonatkozó adattal, hogy a kalciumra NAPE-PLD és а nem érzékeny anandamid szintetizáló enzimek/enzimatikus utak milyen közös kifejeződési mintázatot mutatnak. Jelenleg az sem ismert, hogy a FAAH és a kalciumra nem érzékeny anandamid szintetizáló enzimek/enzimatikus utak milyen közös kifejeződési mintázatot mutatnak. Ezen hiányosságok ellenére eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy az elsődleges érző idegsejtek egy jelentős csoportjában az endokannabinoid és endovanilloid rendszerek egy autokrin jelzőrendszert alakítanak ki. Ez a csoport a kapszaicin érzékeny, tehát fájdalomérző elsődleges érző idegsejteknek legalább harmadában jelen lehet. Amennyiben a TRPV1-t és Inpp5-t illetve a TRPV1-t és NAPE-PLD-t kifejező sejtek külön csoportot alkotnak és a TRPV1-t és Inpp5-t kifejező sejtek a TRPV1-t és FAAH-t kifejező sejtek csoportjába tartoznak, akkor az endovanilloid és endokannabinoid autokrin jelzőrendszer a teljes fájdalomérző elsődleges érző idegsejteknek akár a 2/3-ban is jelen lehet. Mivel hagyományosan a CB1 receptor aktiválását gátló mechanizmusok létrejöttével, míg a TRPV1 aktiválást neuronális excitációval hozzák kapcsolatba, az anandamidnak a CB1 receptor keresztül gátló, míg a TRPV1-on keresztül izgató hatást tulajdonítanak. Így, ez az autokrin jelzőrendszer, a rendszert képező molekulák aktivitásától függően, nagyon dc_1608_18

hatékonyan szabályozhatja a sejtek aktivitását, tehát ez a jelzőrendszer fontos szerepet tőlthet be a fájdalom kialakulásában.

6.5. AZ ENDOVANILLOID ÉS ENDOKANNABINOID AUTOKRIN JELZŐRENDSZER SZEREPE A FÁJDALOMÉRZŐ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEK AKTIVITÁSÁBAN

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a 20:4 NAPE adagolása anandamid szintézist vált ki az elsődleges érző idegsejtek egy részében (Varga és munkatársai, 2014; Nerandzic és munkatársai, 2018). Így 20:4 NAPE adagolás mellett vizsgáltuk a tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejtek aktivitását (Varga és munkatársai, 2014). Meglepő módon, míg 0.1µM 20:4 NAPE nem okozott szignifikáns anandamid koncentráció növekedést az extracelluláris folyadékban, ez a 20:4 NAPE koncentráció már szignifikánsan megnövelte a kobalttal jelölt sejtek arányát. A 20:4 NAPE nem csak a kobalttal jelölt sejtek számát emelte meg jelentősen, hanem áramokat generált és megnövelte az intracelluláris kalcium koncentrációt a sejtekben. Ezeket a 20:4 NAPE által kiváltott hatásokat mind a TRPV1 közvetítette. Ugyancsak meglepő módon, a CB1 receptor gátlása nem emelte meg a 20:4 NAPE adagolásra válaszoló sejtek arányát. Ezzel ellentétesen, a CB1 receptor gátlása csökkentette a 20:4 NAPE adagolásra válaszoló sejtek arányát. Ez az eredmény egyrészt azt mutatja, hogy, ha feltételezzük, hogy az anandamid kiváltott CB1 receptor aktivitás minden esetben gátló hatást vált ki a TRPV1-en, az intracellulárisan szintetizálódó anandamid a CB1 receptort nem aktiválja. Másrészt, ha az intracellulárisan szintetizálódó anandamid nem aktiválja a CB1 receptort, ez az adat azt is mutatja, hogy a CB1 receptor, legalább is a sejtek egy részében, a TRPV1

irányába mutató alap vagy konstitutív excitatórikus hatással bír. Ennek a lehetőségnek a megtárgyalása a MEGBESZÉLÉS egy másik fejezetében kerítek sort.

Az az eredmény, hogy az intracellulárisan szintetizálódó anandamid csak a TRPV1-t aktiválja, első látásra meglepő lehet. Azonban ez az eredmény megfelel az anandamid hidrofób jellemének, a TRPV1 feltételezett, a molekula intracelluláris oldalán, a részben a membránban található anandamid kötő helyének (Jordt és Julius, 2002), a CB1 recepor extracellulárisan található anandamid kötőhelyének (Padgett és munkatársai, 2008; Lynch és Reggio, 2005; Shao és munkatársai, 2016), az anandamid szintézis feltételezett membrán kötődéséhez (Placzek és munkatársai, 2008), illetve az anandamidnak a TRPV1-on és CB1 receptoron mutatott különböző potenciáljának (Ross, 2003; Pertwee, 2005; van der Stelt és Di Marzo, 2005; Di Marzo és De Petrocellis, 2012; Sousa-Valente és munkatársai, 2014b; De Petrocellis és munkatársai, 2017; Storozhuk és Zholos, 2018; Ahluwalia és munkatársai, 2003a; Devane és munkatársai, 1992; Goodfellow és Glass, 2009; Sousa-Valente és munkatársai, 2014b; Zygmunt és munkatársai, 1999). Ez utóbbi, az elsődleges érző idegsejteken azt jelenti, hogy, naiv sejtek esetén, az extracellulárisan adagolt anandamid hatása kb 100-300nM koncentrációig CB1 receptor közvetített gátlás, míg 1µM fölött TRPV1 közvetített excitáció (Ahluwalia és munkatársai, 2003a). A 20:4 NAPE által kiváltott szintézis során létrejött anandamid intracelluláris koncrációját nem ismerjük. Továbbá nem ismerjük az anandamid szintézisében résztvevő enzimek intracelluláris elhelyezkedését illetve ezeknek az enzimeknek a két cél receptorhoz, a TRPV1-hoz és a CB1 receptorhoz visznyított elhelyezkedését. Ennek ellenére reális azt feltételezni, hogy az intracellulárisan szintetizált anandamid, a membránban történő laterális diffúziója útján (Makriyannis és munkatársai, 2005; Tian és munkatársai, 2005) még akkor is hamarabb és könnyebben jut el a TRPV1 anandamid

intracelluláris kötőhelyére mint a CB1 receptor extracelluláris anandamid kötőhelyére, ha az enzimek nem a TRPV1 közvetlen közelében találhatóak. Ezzel ellentétben, az extracellulárisan adagolt anandamid először a CB1 receptor anandamid kötőhelyével kerül kapcsolatba, és csak a membránban történő aktív felvétele és transzportja után, ami magába foglalhatja a laterális diffúziót is, juthat el a TRPV1 kötőhelyre. Így érthető, hogy míg az intracellulárisan szintetizálódó anandamid hatásának vizsgálata során nem találtunk bizonyítékot a CB1 receptor aktiválására, addig az extracelluláris anandamid hatásának vizsgálatakor a CB1 receptor aktiválának hatásai is megfigyelhetőek. Ezen meggondolások alapján azt is jogos feltételezni, hogy a CB1 receptor és TRPV1 anandamid kötőhelyének a membrán különböző oldalán történő elhelyezkedése hozzájárulhat az extracellulárisan adagolt anandamid potenciáljának a CB1 receptoron és TRPV1-on mutatott különbségéhez (Ross, 2003; Pertwee, 2005; van der Stelt és Di Marzo, 2005; Di Marzo és De Petrocellis, 2012; Sousa-Valente és munkatársai, 2014b; De Petrocellis és munkatársai, 2017; Storozhuk és Zholos, 2018; Ahluwalia és munkatársai, 2003a; Devane és munkatársai, 1992; Goodfellow és Glass, 2009; Sousa-Valente és munkatársai, 2014b; Zygmunt és munkatársai, 1999).

Mivel a 20:4 NAPE adagolással kiváltott anandamid szintézis nem kalcium érzékeny, így feltételezzük, hogy az általunk leírt, az intracelluláris anandamiddal kiváltott TRPV1 közvetített excitatórikus hatást, a kalciumra nem érzékeny enzimek által szintetizált anandamid váltotta ki. Azonban, Di Marzo és munkatársainak az eredménye azt mutatja, hogy a kalcium szint emelése által kiváltott anandamid szintézis, ami feltehetően a NAPE-PLD által jön létre, is excitatórikus hatást vált ki (van der Stelt és munkatársai, 2005). Így összességében eredményeink azt mutatják, hogy az endokannabinoid és endovanilloid autokrin jelzőrendszer a fájdalomérző

elsődleges érző idegsejtekben elsősorban a sejtek excitációjának a növelésében játszhat szerepet. Ezt a feltételezést erősíti az az adatunk, hogy a FAAH gátlása az elsődleges érző idegsejtekben szintén TRPV1 közvetített excitációt (kobalt beáramlást) indukál.

6.6. A CB1 RECEPTOR KONSTITUTÍV EXCITATÓRIKUS HATÁST FEJT KI A TRPV1-ON

Az endokannabinoid és endovanilloid jelzőrendszerek elsődleges érző idegsejtekbeli autokrin volta mellett munkánk másik legjelentősebb felfedezése, hogy az általánosan elfogadott nézettel szemben, miszerint a CB1 receptor aktiválása kizárólag gátló hatást fejt ki például a TRPV1-on, kimutattuk, hogy a CB1 receptor szenzitizálni is képes a TRPV1-t (Chen és munkatársai, 2016). Kimutattuk továbbá, hogy ez a CB1 receptor közvetített TRPV1 szenzitizáció legalább három folyamaton keresztül mehet végbe (Chen és munkatársai, 2016).

Kimutattuk, hogy a 20:4 NAPE adagolás során a CB1 receptor blokkolása csökkenti az endogén anandamid excitatórikus hatását (Chen és munkatársai, 2016). Ennek az eredménynek a legvalószínőbb magyarázata, hogy a CB1 receptor konstitutív excitatórikus hatást fejt ki a TRPV1-on. Ennek a konstitutív excitatórikus hatásnak a lehetőségét először Di Marzo és munkatársai tárták fel CB1 receptort és TRPV1-t közösen kifejező humán embrionális vesesejteken (Hermann és munkatársai, 2003). Néhány évvel később, Fioreventi és munkatársai (Fioravanti és munkatársai, 2008) *in vivo* körülmények között mutatták ki a CB1 receptor TRPV1-on kifejtett konstitutív excitatórikus hatását. Az CB1 receptor konstitutív aktivitása az elsődleges érző idegsejteken nem meglepő, hiszen évek óta ismert, hogy egy sor CB1 receptor antagonista, köztük az általunk is használt rimonabant, inverz agonistaként

viselkedik egy sor más idegsejten (Xie és munkatársai, 2007; Bergman és munkatársai, 2008; Fong és Heymsfield, 2009; Ward és Raffa, 2011; Russo és De Azevedo, 2018). A CB1 receptor excitatórikus hatása sem meglepő, hiszen a $G_{0/0}$ proteinek mellett a CB1 receptor G_s -hez és G_q -hoz is kapcsolódhat (Goodfellow és Glass, 2009; Iannotti és munkatársai, 2016; Ligresti és munkatársai, 2016; Di Marzo és munkatársai, 2015; Dalton és munkatársai, 2009; Glass és Felder, 1997; Lauckner és munkatársai, 2005).

Eredményeink azt mutatják, hogy a CB1 receptor, a konstitutív aktivitással közvetített szenzitizáló hatása mellett, valamilyen módon a TRPV1 ligand érzékenységét is alapvetően befolyásolhatja. Kimutattuk, hogy amíg minden sejt ami válaszol 1µM feletti exogén anandamid adagolásra szintén válaszol kapszaicin adagolásra (ACR típusú idegsejtek), addig a kapszaicinre válaszoló sejtek egy része nem válaszol anandamidra (COR típusú idegsejtek). Kimutattuk továbbá, hogy a CB1 receptor gátlása vagy a *cb1* gén törlése csak az ACR típusú idegsejtekben okozza a válaszok csökkenését. A válaszok csökkenése mellett azonban az ACR/COR sejtek aránya is megváltozik a CB1 receptor blokkolása illetve a cb1 gén törlésének következtében: míg az ACR sejtek száma csökken, a COR sejtek száma megnő anélkül, hogy az összes kapszaicinre érzékeny sejtek száma megváltozna. Ezen eredmények azt mutatják, hogy míg a kapszaicin érzékenység a TRPV1 alapvető tulajdonsága, az anandamid érzékenység a CB1 receptor hatásának köszönhető, legalább is részben. A CB1 receptor hatása azonban nem csak az anandamid érzékenységért felelős, hanem a bizonyos fokig a kapszaicin érzékenységért is, hiszen a CB1 receptor blokkolása vagy a *cb1* gén törlése a kapszaicinnel kiváltott válaszokat is csökkenti.

A fenti eredmények alapján úgy véltük, hogy csak az ACR sejtek fejezik ki a CB1 receptort. Ezen elképzelésünket azonban az egyedi sejtes PCR kísérletek eredménye megcáfolta, hiszen a COR sejtek egy jelentős részében is találtunk CB1 receptor mRNA kifejeződést. Természetesen a CB1 receptor mRNA kifejeződése nem feltétlenül jelenti funkcionális CB1 receptor fehérje jelenlétét az ACR sejtekben. Azonban elektonmikroszkópos, morfometriai és statisztikai vizsgálataink eredménye azt valószínűsíti, hogy nem a funkcionális CB1 receptor jelenléte vagy hiánya befolyásolja a TRPV1 válaszadási képességét, hanem a CB1 receptor és TRPV1 fizikai közelsége, hiszen a sejtek egy részében, amely sejtek aránya megegyezik az ACR/COR sejtek arányával, a CB1 receptor és TRPV1 térbeli megoszlása arra utal, hogy a két molekula fizikai kapcsolatba kerülhet egymással. Immunprecipitációs vizsgálattal ki is mutattuk, hogy az elsődleges érző idegsejtekben a CB1 receptor és TRPV1 protein-protein kapcsolatot hoznak létre. Ezen eredmények alapján feltételezzük, hogy a CB1 receptor-TRPV1 protein-protein kapcsolat során a TRPV1 molekulákban olyan konformáció változások történnek, amelyek felnyitják az anandamide kötőhelyeket a TRPV1-on, megemelik a kapszaicin affinitását, megváltoztatják a csatorna nyitási-zárási jellemzőit és/vagy megnövelik a csatorna ion áteresztő képességét.

Vizsgálataink kiderítették azonban, hogy CB1 receptor-TRPV1 proteinprotein kapcsolat valamint a konstitutív CB1 receptor aktivitás mellett egy harmadik mechanizmus is jelen van az elsődleges érző idegsejtekben, amelyen keresztül a CB1 receptor a TRPV1-t szenzitizálni képes. Munkánk során ugyanis kimutattuk, hogy 1µM feletti exogén anandamid adagoláskor az elsődleges érző idegsejtek egy részében a CB1 receptor blokkolása a válaszok csökkenését okozza (Chen és munkatársai, 2016). Ez a hatás ellentéte annak amit a CB1 receptor blokkolásakor

tapasztalunk 100-300nM exogén anandamid adagolása során (Ahluwalia és munkatársai, 2003a). A CB1 receptor ezen potenciáló hatásának a hátterében feltehetően a CB1 receptor már említett plasztikus jelátadási képessége húzódik meg, amely lehetővé teszi, hogy alacsony agonista koncentráció mellett a CB1 receptor elsősorban a $G_{0/0}$ -n, míg magas koncentráció mellett elsősorban a s/ $G_{q/11}$ -n keresztül indítsa el az intracelluláris folyamatokat (Khajehali és munkatársai, 2015; Ligresti és munkatársai, 2016).

6.7. A GYULLADÁS JELENTŐSEN BEFOLYÁSOLJA AZ ANANDAMIDDAL KIVÁLTOTT, TRPV1 ÉS CB1 RECEPTOR ÁLTAL KÖZVETÍTETT FOLYMATOKAT A FÁJDALOMÉRZŐ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKBEN

Az endovanilloid és endokannabinoid rendszerek egyes elemeinek kifejeződése valamint a TRPV1 - anandamid - CB1 receptorok által közvetített elsődleges érző idegsejtekben a vizsgálataink szerint, más hatások az laboratóriumokból származó adatokkal egyetértésben, nem statikusak, azokat a perifériás szövetek mindenkori állapota nagymértékben befolyásolja (Chen és munkatársai, 2016; Nerandzic és munkatársai, 2018; Singh Tahim és munkatársai, 2005; Sousa-Valente és munkatársai, 2017; Ahluwalia és munkatársai, 2003a; Soneji és munkatársai, 2010; Dinis és munkatársai, 2004b; Charrua és munkatársai, 2008; Mistry és munkatársai, 2014; Lever és munkatársai, 2009; Mahmud és munkatársai, 2009). Az ilyen típusú plaszticitás nem meglepő, hiszen az élőlények csak így képesek a környezeti hatásokra a megfelelő válaszokat kialakítani. Ezen plasztikus változások során, a TRPV1 – anandamid – CB1 receptorok által közvetített hatásokat, vizsgálataink szerint, a gyulladásos folyamatok, amelyek a szöveti sérülések után törvényszerűen kifejlődnek, az excitáció irányába tolják el. Így a vizsgálataink során

bizonyítékokat szereztünk, hogy fontos gyulladásos mediátorok (NGF, BK, PGE2) illetve a gyulladásos mediátorok által aktivált másodlagos hírvivő molekulák (PKA, PKC) az anandamid TRPV1-t aktiváló hatását nagy mértékben megnövelik. Ennek következtében, az az exogén anandamid koncentráció, ami naiv körülmények között CB1 receptor közvetített gátló hatást fejt ki, TRPV1-t aktiváló excitatórikus anandamid koncentrációvá válik. Ezzel párhuzamosan, az anandamid (és más CB1 receptor agonista) inhibitórikus hatása lényegesen lecsökken. Ezek a hatások megfelelnek a gyulladásos mediátorok által aktivált másodlagos hírvivő molekulák TRPV1-on és CB1 receptoron kifejtett hatásának (Rathee és munkatársai, 2002; Bhave és munkatársai, 2003; Bhave és munkatársai, 2002; Cesare és McNaughton, 1996; Huang és munkatársai, 2006b; Cesare és munkatársai, 1999; Jung és munkatársai, 2004; Moriyama és munkatársai, 2003; Lopshire és Nicol, 1998; Mahmud és munkatársai, 2009; Numazaki és munkatársai, 2002; Studer és McNaughton, 2010; Nagy és munkatársai, 2009b; Nagy és munkatársai, 2014; Sousa-Valente és munkatársai, 2014a; Urban és munkatársai, 2011; White és munkatársai, 2011b; Garcia és munkatársai, 1998; Huang és munkatársai, 2002).

Fontos megjegyeznünk, hogy a PKA és PKC aktiválás valamint a neuronális excitáció során bekövetkező kalcium beáramlás anandamid szintézist vált ki az elsődleges érző idegsejtekben, illetve feltehetően valamennyi olyan sejtben amelyek kifejezik az anandamidot szintetizáló enzimatikus utakat (Ahluwalia és munkatársai, 2003b; van der Stelt és Di Marzo, 2005; Vellani és munkatársai, 2008; Varga és munkatársai, 2014). Így a gyulladt szövetek anandamid koncentrációja jelentősen megnő (Dinis és munkatársai, 2004b; Liu és munkatársai, 2003; Liu és munkatársai, 2006; Merriam és munkatársai, 2011; McVey és munkatársai, 2003). Ennek fontos gyakorlati terápiás jelentősége van, hiszen az endogén anandamid koncentrációjának dc_1608_18

az emelése fontos stratégia a patológiás folyamatokat kísérő fájdalmak csökkentésére (Petrosino és Di Marzo, 2010; Fowler, 2015; Scarpelli és munkatársai, 2016). Számtalan gyógyszergyár fejlesztett és továbbra is fejleszt FAAH blokkolót, amelyek az állatkísérletekben, a jelen értekezésben ismertetett adatoknak ellentmondva, valóban csökkentette a patológiás folyamatokat kísérő fájdalom reakciókat (Lodola és munkatársai, 2015; Fowler, 2012; Boger és munkatársai, 2005; Chang és munkatársai, 2006; Jayamanne és munkatársai, 2006; Jhaveri és munkatársai, 2006; Maione és munkatársai, 2007; Russo és munkatársai, 2007; Hasanein és munkatársai, 2008; Khasabova és munkatársai, 2008; Ahn és munkatársai, 2009; Clapper és munkatársai, 2009; Kinsey és munkatársai, 2009; Costa és munkatársai, 2010; Naidu és munkatársai, 2010; Ahn és munkatársai, 2011; Kinsey és munkatársai, 2011; Merriam és munkatársai, 2011; Meyers és munkatársai, 2011; Min és munkatársai, 2011; Booker és munkatársai, 2012; Caprioli és munkatársai, 2012; Favia és munkatársai, 2012; Sasso és munkatársai, 2012; Guindon és munkatársai, 2013; Starowicz és munkatársai, 2013; Anderson és munkatársai, 2014; Chobanian és munkatársai, 2014; Fichna és munkatársai, 2014; Grim és munkatársai, 2014; Hama és munkatársai, 2014; Greco és munkatársai, 2015; Keith és munkatársai, 2015; Malek és munkatársai, 2015; Sakin és munkatársai, 2015; Sasso és munkatársai, 2015; Uhelski és munkatársai, 2015; Adamson Barnes és munkatársai, 2016). Az adatbázisok szerint eddig egyetlen kísérletben mutatták ki egy FAAH gátló fájdalomcsökkentő hatásának az elmaradását, amikor az ismételt FAAH gátló adagolása már nem volt hatásos (Okine és munkatársai, 2012). A klinikai vizsgálatok eredménye azonban a jelen értekezésben ismertetett adatokból előrevetíthető módon, és az egyetlen negatív eredményt leíró közleménnyel egyetértésben a FAAH gátlók hatásának a hiányát mutatták ki a gyulladásos folyamatokban (Huggins és munkatársai, 2012). A FAAH

gátlók azonban nem kívánt mellékhatást is kiválthatnak, mint azt a BIA 10-2474 kódjelű vegyület egészséges önként vállalkozókban okozott súlyos neurológia elváltozásai mutatják (Kerbrat és munkatársai, 2016). Ezen problémák ellenére a klinikai vizsgálatok tovább folytatódnak (Pawsey és munkatársai, 2016; Wagenlehner és munkatársai, 2017; Postnov és munkatársai, 2018).

6.8. AZ ANANDAMID ÁLTAL KIVÁLTOTT TRPV1 AKTIVITÁS ALAPVETŐEN HOZZÁJÁRUL A GYULLADT HÚGYHÓLYAG AKTIVITÁSÁNAK NÖVEKEDÉSÉHEZ, ILLETVE A GYULLADÁSHOZ KAPCSOLODÓ FÁJDALOM KIALAKULÁSÁHOZ

Az in vitro kísérletek eredményének megfelelően az in vivo vizsgálatok során az anandamid TRPV1 közvetített excitatórikus hatására találtunk bizonyítékokat (Dinis és munkatársai, 2004b). Így az anandamid koncentráció függő módon, a TRPV1 aktiválásán keresztül, emelte meg a húgyhólyag összehúzódási frekvenciáját. Ezt a hatást, a CB1 receptor TRPV1-t szenzitizáló hatásának megfelelően, a rimonabant jelentősen csökkentette. Bizonyítékot találtunk, hogy az exogén TRPV1 agonistákkal szemben (kapszaicin, RTX), az anandamid nem deszenzitizálja a TRPV1-t. Ez jelentős felfedezés, hiszen annak az endogén agonistának, amely TRPV1 deszenzitizációt vált ki, nem lehet szerepe a TRPV1 aktiválásában patológiás körülmények között. A hólyag összehúzódásának fokozása mellett, az anandamid a fájdalom információ gerincvelői feldolgozását is megnövelte, hiszen cFos kifejeződés erősödését okozta.

A húgyhólyag gyulladása, amint az az irodalmi adatokból várható, megemelte a hólyag összehúzódások frekvenciáját valamint a hólyag anandamid tartalmát (Charrua és munkatársai, 2007; Merriam és munkatársai, 2011; Dinis és munkatársai,

2004a; Cruz és Dinis, 2007; Charrua és munkatársai, 2009a; Dinis és munkatársai, 2004b; Liu és munkatársai, 2003; Liu és munkatársai, 2006; Merriam és munkatársai, 2011; McVey és munkatársai, 2003). A TRPV1 antagonista kapszazepinnek az összehúzódások frekvenciáját csökkentő hatása az előző bekezdésben összefoglalt eredményekkel összességében azt sugallja, hogy a gyulladás során szintetizálódó anandamid a TRPV1-t aktiválva jelentősen hozzájárul mind az összehúzódások frekvenciáját növekedéséhez, mind a fájdalom kialakulásához. Valóban, a FAAH gátlással tovább emelt anandamid szint a gyulladt hólyagok összehúzódási frekvenciáját tovább növelte, illetve a hólyagok egy részében tetanuszos összehúzódási frekvenciájára összhangban van az *in vitro* kísérletekben gyűjtött adatainkkal amelyek szerint a gyulladás jelentősen lecsökkenti a CB1 receptor jelentőségét a sejtek aktivitásának a szabályozásában.

6.9. A CB1 RECEPTOR – ANANDAMID – TRPV1 ÁLTAL KÖZVETÍTETT HATÁSOK AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEKEN MINT A KÖVETKEZŐ GENERÁCIÓS FÁJDALOMCSÖKKENTŐK POTENCIÁLIS CÉLPONTJAI

A kannabinoidok fájdalomcsökkentő hatása évezredek óta ismert. Azonban új, a kabbaninoid rendszerhez tartozó molekulák aktivitását befolyásoló fájdalomcsillapítók kifejlesztéséhez a CB1 receptor közvetített kannabinoid tetrád, amelynek szerves része az analgézia, felismerése adta a kiinduló pontot (Ligresti és munkatársai, 2016; Little és munkatársai, 1988). A CB1 recepor közvetített analgézia részben perifériás volta (Calignano és munkatársai, 1998) illetve a CB1 receptor kifejeződése a fájdalomérző elsődleges érző idegsejteken (Hohmann és Herkenham, 1999; Ahluwalia és munkatársai, 2000) újabb lendületet adott a kannabinoid rendszeren ható fájdalomcsillapítók kidolgozásának, hiszen egyrészt ezek a sejtek alapvető fontosságúak a patológiás folyamatokat kísérő fájdalmak kialakulásában és fenntartásában (Almeida és munkatársai, 2004; Gangadharan és Kuner, 2013; Nagy, 2004; Nagy és Rice, 2003; Laycock és munkatársai, 2013; Woolf és Costigan, 1999; Woolf és Salter, 2000; Ji és Woolf, 2001; Muir és Woolf, 2001; Scholz és Woolf, 2002; Woolf, 2004; Wang és munkatársai, 2006; Woolf és Ma, 2007; Woolf, 2010), másrészt a fájdalomérző elsődleges érző idegsejteken kifejeződő endokannabinoid molekulák aktivitásának befolyásolása lehetővé tenné az agyi endokannabinoid molekulák befolyásolása által létrejövő, sokszor nem kívánatos, hatások elkerülését. Az endogén CB1 receptor agonista anandamid alkalmazását, a molekula koncentrációjának emelése útján, szintén a nem kívánt mellékhatások csökkentésének a lehetősége támogatta. A felismerés, hogy a CB1 receptor aktiválása csökkenti egy sor olyan molekula aktivitását, amelyek a fájdalmak kialakulásában fontosak további érveket szolgáltatott az endokannabinoid rendszeren ható fájdalomcsillapítók kifejlesztéséhez. Ebből a szempontból különösen fontos, hogy a CB1 receptor aktiválása, legalább is bizonyos körülmények között, gátolni képes a TRPV1 aktivitását, amely szinte minden fájdalomérző elsődleges érző idegsejten kifejeződik (Ahluwalia és munkatársai, 2000; Chen és munkatársai, 2016; Sagar és munkatársai, 2004; Amaya és munkatársai, 2006; Binzen és munkatársai, 2006; Mitrirattanakul és munkatársai, 2006; Fischbach és munkatársai, 2007; Zhang és munkatársai, 2007; Hong és munkatársai, 2009; Wang és munkatársai, 2014; Agarwal és munkatársai, 2007; Richardson és munkatársai, 1998; Morisset és munkatársai, 2001; Ellington és munkatársai, 2002; Ahluwalia és munkatársai, 2003a; Helyes és munkatársai, 2003; Hermann és munkatársai, 2003; Nemeth és munkatársai, 2003; Mahmud és munkatársai, 2009; Santha és munkatársai, 2010a; Soneji és munkatársai, 2010; Engel és munkatársai, 2011) és alapvetőnek tűnik az gyulladásos folyamatokat kísérő fájdalmak, különösen az égő fájdalmak kialakulásában (Davis és munkatársai, 2000; Charrua és munkatársai, 2007; Caterina és munkatársai, 2000; Charrua és munkatársai, 2009a). Ezen gondolatok mentén ésszerűnek tűnő stratégia a fájdalmak csillapítására az anandamid szint emelésével történő CB1 receptor aktiválás az elsődleges érző idegsejtekben (Petrosino és Di Marzo, 2010; Fowler, 2015; Scarpelli és munkatársai, 2016; Boger és munkatársai, 2000; Cravatt és munkatársai, 2001; Cravatt és Lichtman, 2004; Cravatt és munkatársai, 2004; Lichtman és munkatársai, 2004). Amint említettem, a klinikai kipróbálások során az ennek a stratégiának a mentén ható új típusú fájdalomcsillapítók azonban nem váltották be az ígéretüket (Huggins és munkatársai, 2012; Wagenlehner és munkatársai, 2017). Ennek okait a jelen értekezésben bemutatott eredmények legalább részben megmagyarázzák, hiszen az anandamid a CB1 receptor mellett a TRPV1-t is aktiválja, ami az idegsejtek excitációját okozza, a gyulladások megemelik az anandamide potenciálját és hatásosságát a TRPV1-on, míg csökkentik a CB1 receptor aktiválásának hatásait, a CB1 receptor szenzitizálni is képes a TRPV1-t, és a gyulladt szövetek anandamidot termelnek, amely fontosnak tűnnek a TRPV1 aktiválásában, tehát a fájdalom létrejöttében. Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy az anandamid szint emelése nem tudja kiváltani a kívánt hatást. Ezt a következtetést, az értekezés írásának időpontjában még nem publikált, így az értekezésben nem szereplő adatok (Charrua és munkatársai, 2018) is alátámasztják, mivel a FAAH inhibitor kettős hatást fejt ki mind a gyulladt húgyhólyag összehúzódására mind a szövet anandamid tartalmára. A várakozásokkal nagyrészt ellentétesen, míg alacsony FAAH gátló dózisok csökkentik a húgyhólyag összehúzódások frekvenciáját és a hólyag anandamid tartalmát, magas FAAH gátló dózisok megemelik mind a húgyhólyag összehúzódások frekvenciáját

dc_1608_18

mind a hólyag anandamid tartalmát. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az anandamid metabolizmusa sokkal komplexebb mechanizmusok útján mehet végbe mint ahogy eddig gondoltuk, vagy/és a FAAH gátlók a FAAH-on kívül más az anandamid metabolizmusában résztvevő enzimeken is hatnak. Ha az utóbbi mechanizmus a felelős, a FAAH gátlók esetleges mellékhatásai közül a szintetizáló enzimeken létrehozott gátlás lehet a legfontosabbak, hiszen úgy tűnik, hogy az anandamid szint csökkentése jár együtt az elsődleges érző idegsejtek aktivitásának a csökkenésével. Ezen adatok összessége alapján úgy gondoljuk, hogy anandamidot szintetizáló enzimek gátlása lehet az egyik lehetséges új út a CB1 receptor – anandamid – TRPV1 által közvetített hatások analgetikus célokra történő kihasználásának.

A CB1 receptor aktiválása, akár endogén akár exogén agonistával, úgy tűnik nem vezethet a fájdalomérző elsődleges érző idegsejtek aktivitásának, így a fájdalom csökkenéséhez, hiszen egyrészt a CB1 receptor szenzitzálja a TRPV1-t, másrészt, legalább is gyulladások esetén, a CB1 receptor közvetített gátló hatások jelentősen lecsökkennek. Ezen megfontolások alapján úgy véljük, hogy a CB1 receptor közvetített TRPV1 szenzitizáció meggátlása, együtt a gyulladásos mediátorok által előidézett TRPV1 szenzitizáció meggátlásával lehet egy alternatív vagy kiegészítő stratégia amelyen keresztül a CB1 receptor – anandamid – TRPV1 által közvetített hatásokat az elsődleges érző idegsejtekben kihasználhatjuk analgetikus célokra.

7. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

7.1. ÁLLATOK

Kísérleteink során Sprague-Dawley és Wistar patkányokat (80-250g) valamint vad típusú C57BL6 és Biozzi ABH valamint C57BL6 és Biozzi ABH hátterű génhiányos (*trpv1* és *cb1*) egereket használtunk. Az állatokat légkondicionált helyiségekben tartottuk, 12 órás fény-sötétség ciklusban, szabad vízhez és élelemhez való hozzájutással. Valamennyi kísérletben betartottuk az állatkísérletekre vonatkozó etikai és jogi szabályozásokat (UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986, National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes, Guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of IASP). Valamennyi kísérletünkben követtük a Good Laboratory Practice-ben and ARRIVE Guidelines-ban foglalt elvárásokat. Valamennyi kísérletünket a helyi etikai bizottságok jóváhagyásával végeztük. A biológia replikák szükséges számat a statisztikai erő becslésével állapítottuk meg (p>0.8).

7.2. AZ *IN VIVO* KÍSÉRLETEKBEN HASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDESZEREK Az *in vivo* kísérletekben cisztometriai méréseket végeztünk a húgyhólyag különböző körülmények közötti összehúzódásainak a vizsgálatára.

7.2.1. CISZTOMETRIA

A cisztometriai módszer részletes leírása a megtalálható a Dinis és munkatársai (Dinis és munkatársai, 2004b) közleményében. Röviden, az állatok uretánnal történt altatása után, a húgyhólyag peritóneális felszinét feltártuk és a hólyag csúcsába tűt helyeztünk.

A tűt egy perfúziós rendszerhez kötöttük, amelyen keresztül a hólyagban fellépő nyomást is tudtuk mérni. A perfúziós ráta 0.5ml/perc volt. A különböző anyagokat a hólyag peritóneális felszínére jutattuk. A vizelet szabadon távozhatott a hólyagból.

7.2.2. EGYÉB IN VIVO BEAVAKTOZÁSOK

A húgyhólyag gyulladását cyclophosphamide injectióval (egyszeri 200mg-kg vagy 3-szor 75mg-kg naponta) indukáltuk. A húgyhólyag deszenzitizálását az altatott (isofluorane) állatok uretrán keresztüli katéterezése után a hólyagba juttatott 10nm RTX-el végeztük. Ezen beavatozások részletes leírása is a Dinis és munkatársai (Dinis és munkatársai, 2004b) közleményében találhatóak.

7.3. MINTAVÉTELI MÓDSZEREK ÉS A MINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSE

Az állatokból immunhisztokémiai festére, immunblot készítésére, PCR-hoz és elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz gyűjtöttünk szövetmintákat.

7.3.1. MINTAVÉTEL ÉS A MINTÁK ELÖKÉSZÍTÉSE IMMUNHISZTOKÉMIAI FESTÉSHEZ ÉS ELEKTRONMIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATOKHOZ

A beavatkozást az általánosan bevált módszer szerint végeztük. Az állatok pentoparbitállal történt altatása után, a szív bal kamrájába helyezett tűn kesztül az állatokat először fiziológiás sóoldattal, majd 4%-os paraformaldehid oldattal (immunhisztokémiai festés) vagy 2%-os paraformaldehid és 15% telített pikrinsav keverékével (elektronmikroszkópos vizsgálat) perfundáltuk. A perfúzió után a kívánt szöveteket eltávolítottuk és további fixálás céljából a megfelelő fixáló oldatba helyeztük, az adott antitest által megkövetelt ideig. A szöveteket ezután vagy 20% majd 40% szukróz oldatba helyeztük, majd kriosztát segítségével metszeteket

készítettünk (immunhisztokémiai festéshez) amelyeket tárgylemezre helyeztünk, vagy a szövetekből az elektronmikroszkópos vizsgálathoz először vibratómos metszeteket készítettünk.

7.3.2. MINTAVÉTEL ÉS A MINTÁK ELÖKÉSZÍTÉSE IMMUNBLOT KÉSZÍTÉSÉHEZ

A beavatkozást az általánosan alkalmazott módszer szerint végeztük. Az állatok pentoparbitállal történt altatása után a kívánt szöveteket gyorsan eltávolítottuk, felaprítottuk és 4°C NP40 pufferben, amely proteáz gátlókat is tartalmazott, homogenizáltuk. A homogenizátumokat -80°C-n tároltuk a felhasználásig.

7.3.3. MINTAVÉTEL ÉS A MINTÁK ELÖKÉSZÍTÉSE PCR KÉSZÍTÉSÉHEZ

A beavatkozást az általánosan alkalmazott módszer szerint végeztük. Az állatok pentoparbitállal történt altatása után a kívánt szöveteket gyorsan eltávolítottuk, felaprítottuk és RNAlater oldatba helyeztük. Az RNS izolálását az RNeasy egység segítségével, a gyártó utasításai szerint végeztük. Az RNS-t -80°C-n tároltuk a felhasználásig.

7.4. *IN VITRO* KISÉRLETEKBEN HASZNÁLT ANYAGOK ES MÓDSZEREK

Az *in vitro* kísérletekben tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken a sejtek funkcióját és a különböző molekulák kifejeződését vizsgáltuk különböző módszerekkel.

7.4.1. ELSŐDELEGES ÉRZŐ IDEGSEJT KULTÚRA KÉSZÍTÉSE

Az elsődleges érző idegsejt kultúra elkészítésének módszerét egy sor, a jelen értekezésben felhasznált közleményem részletesen tartalmazza (pl. Nagy és Rang, 1999a). Röviden, az állatok elaltatása után, a gerincoszlopot eltávolítottuk és a csigolya ívek eltávolításával megnyitottuk. A hátsó gyöki ganglionokat a nyaki 1 és keresztcsonti 1-2 szegmentumokból mind két oldalon eltávolítottuk és F12 táptalajba helyeztük. A kötőszövetet kollagenáz segítségével 3 órán keresztül emésztettük, majd a dúcok mosása után pipetta segítségével sejtszuszpenziót készítettünk. A sejteket poly-ornitinnel kezelt üveg fedőlemezre vagy műanyag sejtkultúra edénybe helyeztük, és 1-5 napig inkubátorban 37°C-on tároltuk. A médiumhoz szükség szerint NGF-t vagy GDNF-t adagoltunk. Egyes fedőlemezeket 10 percre 4%-os paraformaldehidbe helyeztük és immunhisztokémiai festésre használtuk. Más sejteket immunblotra és PCR-a használtunk a megfelelő fejezetekben leírtak szerint.

7.4.2. ELEKTROFIZIOLÓGIA MÉRÉSEK

Az elektrofiziológiai mérések részletes leírása egy sor, a jelen értekezésben felhasznált közleményem részletesen tartalmazza (pl. Nagy és Rang, 1999a). Röviden, a fedőlemezeket, amelyekre a sejteket helyeztük, a mérő kádba helyeztük és a megfelelő pufferrel perfundáltuk. A elektródákat boroszilikát kapillárisokból keszítettük és a megfelelő oldattal töltöttük. A méréseket Axopatch 200B erősítővel és pClamp 8 programcsomaggal végeztük 36°C-37°C-on. A különböző anyagokat egy a mért sejttől kb 100µm-re helyezett csövön keresztül jutattuk a sejthez. A sejthez juttatott puffer hőmérsékletét egy Peltier félvezetőre helyezett hőcserélővel, amelyen a sejtekhez juttatott folyadékok áthaladtak, illetve a Peltier félveztőt szabályzó berendezéssel tartottuk a megfelelő szinten. Ez a berendezés szolgált a sejtek hőingerlésére is. A méréseket vagy teljes sejtes feszültség kapcsolt módban vagy egyedi csatorna szinten végeztük különböző konfigurációkban. Az adatokat a mérések után a pClamp programcsomaggal analizáltuk.

7.4.3. KOBALT FELVÉTEL MÉRÉSE

A kobalt felvétel meghatározás részletes leírása egy sor, a jelen értekezésben felhasznált közleményem részletesen tartalmazza (pl. Varga és munkatársai, 2014)). Röviden, a sejteket a medium eltávolítása után kobalt mentes kobalt felvételi pufferben mostuk, majd kobaltot tartalmazó kobalt felvételi pufferbe helyeztük 5 percre. Rövid mosás után a sejteket H₂S-t tartalmazó pufferbe helyeztük, majd a sejteket vagy 70%-os alkohollal vagy 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A sejteken ezután denzitometriás méréseket végeztünk és meghatároztuk a jelőlt és jelöletlen sejtek arányát.

7.4.4. TRANSZMITTER FELSZABADULÁS MÉRÉSE

A transzmitter felszabadulás mérésének részletes leírása az Ahluwalia és munkatársai (Ahluwalia és munkatársai, 2003a) közleményem részletesen tartalmazza. A sejteket rövid mosás után a megfelelő agonista jelenlétében inkubáltuk. A puffer eltávolítása után a puffer CGRP koncentrációját hagyományos ELISA segítségével határoztuk meg a gyártó utasításai alapján. A kultúrák fehérje mennyiségét a Bio-Rad DC fehérje meghatározó egységgel a gyártó utasításai alapján végeztük.

7.4.5. INTRACELLULÁRIS KALCIUM SZINT MEGHATÁROZÁS

Az intracelluláris kalcium szint meghatátozás részletes leírása egy sor, a jelen értekezésben felhasznált közleményem részletesen tartalmazza (pl. (Chen és

munkatársai, 2016). Röviden, a fedőlemezen lévő sejteket fura-2 oldatba helyeztük legalább 45 percre. Ezután a sejteket a mérőkádba tettük, ahol extracelluláris pufferrel perfundáltuk egy, az elektrofiziológiai mérésnél leírt perfuziós berendezés segítségével. A különböző anyagokat a perfuziós berendezésen keresztül jutattuk a sejtekhez. A méreseket 36°C-37°C-on végeztük.

A fluoreszcens jelet vagy halogén izzó és monokromátor segítségével vagy LED fényforrások segítségével gerjesztettük 340 vagy 355 és 380nm-es fénnyel. Az emisszós szűrő 510nm-s volt. A felvételeket vagy a WinFlour vagy az ImageMaster programcsomagokkal rögzítettük és analizáltuk.

7.5. A SZÖVETMINTÁK ÉS TÁPFOLYADÉKBAN NÖVESZTETT ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJTEK EGYÉB FELDOLGOZÁSA

7.5.1. IMMUNHISZOKÉMIAI FESTÉS

A metszeteken vagy a fedőlemezen található fixált sejteken az immunhisztokémia festést a hagyományos módon végeztük, amelynek részletes leírását egy sor, a jelen értekezésben felhasznált közleményem tartalmazza (pl. Chen és munkatársai, 2016). Röviden, a metszeteket vagy sejteket triton x-es feltárás után mostuk majd megfelelő normal szérummal blokkoltuk. Az elsődleges antitestekkel történő inkubáció után mostuk a metszeteket vagy sejteket és fluoreszcens festékhez kötött másodlagos atitestben inkubáltuk. A metszeteket, fedés után vagy hagyományos epifluoreszcens mikroszkóppal vagy konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

7.5.2. IMMUNBLOT ÉS IMMUNPRECIPITÁCIÓ KÉSZÍTÉSE

dc_1608_18

Az immunoblotokat és immunoprecipitációt hagyományos módon készitettük, amelyek részletes leírását egy sor, a jelen értekezésben felhasznált közleményem tartalmazza (pl. Chen és munkatársai, 2016). A fehérje mintákban megmértük a fehérje mennyiségét (pl. BCA fehérje meghatározó egységgel), majd az immunoblothoz 95°C-on denaturáltuk NuPAGE LDS pufferben. A fehérjék szétválasztását a fehérjék méretének megfelelő sűrűségű gélen elektrforézissel végeztük, majd a fehérjéket PVDF membránra vittük át. A membránokat ezután blokoltuk, megfelelő antitestekkel inkubáltuk, majd a célfehérjéket láthatóvá tettük (pl. luminol reagenssel).

Az immunpreciptációhoz a mintákat a megfelelő elsődleges antitesttel inkubáltuk, majd az antitest-antigén komplexet protein A/G PLUS Agaróssal kicsapattuk. Az antigént dithiothreitol-t tartalmazó pufferrel 50°C-on eltávolítottuk.

7.5.3. PCR KÉSZÍTÉS

A PCR-t is hagyományos módon készitettük, amelynek részletes leírását egy sor, a jelen értekezésben felhasznált közleményem tartalmazza (pl. Sousa-Valente és munkatársai, 2017). Röviden, a cDNS mintákat 25-30 ciklusban a megfelelő primerek jelenétében erősítettük. Az RNS minták quantifikálása után RT reakciót végeztünk dNTP és Go-Taq polimeráse segítségével. A PCR terméket elektroforésisük és láthatóvá tételük után vizsgáltuk.

Az egyedi sejtes PCR-hoz a sejteket a pipettába türténő szívás után PCR csőben lévő első szál pufferbe helyeztük, és szonikáltuk. Az első szál puffer, dDNTP keveréket, random primereket tartalmazott. A pufferkeverékhez DTT-t, superscriptet II és RNase gátlót adtunk, majd a mintáknól cDNS-t készítéttünk. A cDNS mintában azonnal 30 ciklus alatt GoTaq DNS polimeráz és megfelelő primerek segítségével a

cb1 receptor és a *gapdh* cDNA-t felerősítettük. A primerek szekvenciáját, ciklusok lefolyását és hőmérsékletét, valamint a pufferek pontos összetételét a Chen és munkatársai (2016) közleménye tartalmazza.

7.5.4. ELEKTRONMIKROSZKÓPIA

Az elektronmikroszkópos preparatumokat is hagyományos módon készítettük, és a módszer részletes leírását a Chen és munkatársai (Chen és munkatársai, 2016) közleményem tartalmazza. Röviden a vibrotómos metszeteket 30%-os glicerinben inkubáltuk, majd fagyasztottuk a magasnyomású fagyasztó készülékben. A mintákat dupla replika készülékbe helyeztük és -130°C-on replikákat készítettünk, amelyeket Na-dodecilsulfát oldattal emésztettünk. A replikákon ezután immunreakciót végeztünk, amelyekben arany partikulumhoz kötött másodlagos antiteket használtunk.

7.5.5. FLUORESZCENS IN SITU HIBRIDIZÁCIÓ

Az fluoreszcens *in situ* hibridizációt is a hagyományos módon készítettük, amelynek részletes leírását a Sousa-Valente és munkatársai (Sousa-Valente és munkatársai, 2017) közleményem tartalmazza. Röviden, a metszeteket 70%-os etanolban inkubáltuk, majd mosó puferrel, ami 20% formamidot, NaCl-t, és Na3citrátot tartalmazott mostuk. A metszeteket ezután a Stelláristól vásárolt 48 rövid fluoreszcens cRNS-el reagáltattuk. A metszetek egy részén, az *in situ* hibridizációt követően immunhisztokémiai reakciót végeztünk.

7.6. EGYÉB ELJÁRÁSOK

7.6.1. FOLYADÉK KROMATOGRÁFIA ÉS TÖMEG SPEKTROMETRIA

dc_1608_18

Három kissé eltérő módszert használtunk amelyek részletes leírása a Varga és munkatársai (Varga és munkatársai, 2014) közleményemben található. Rőviden, a lipideket különböző eljárásokkal elválasztottuk, szárítottuk, majd oldottuk. A mintákat kromatográfia után tömegspektrometria segítségével analizáltuk, amely során a mintákhoz deutériummal jelőlt anandamidot adtunk.

7.7. AZ ADATOK STATISZTIKAI ELEMZÉSE

Az értekezésben található adatok részletes statisztikai elemzésének módját az értekezéshez használt közleményeim részletesen tartalmazzák. Röviden, az adatok normál eloszlásának vizsgálata után a megfelelő parametrikus vagy nem parametrikus statisztikai próbákat használtuk. A szignifikancia szint p<0.05 volt valamennyi kísérletünkben. Az értekezédban szereplő összes adatot átlag±standard hiba formában található.

8. IRODALOMJEGYZÉK

8.1. AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT EREDETI ÉS ÖSSZEFOGLALÓ

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEIM JEGYZÉKE

Ahluwalia J, Rang H és Nagy I (2002a). The putative role of vanilloid receptor-like protein-1 in mediating high threshold noxious heat-sensitivity in rat cultured primary sensory neurons. The European journal of neuroscience 16: 1483-1489.

Ahluwalia J, Urban L, Bevan S, Capogna M és Nagy I (2002b). Cannabinoid 1 receptors are expressed by nerve growth factor- and glial cell-derived neurotrophic factor-responsive primary sensory neurones. Neuroscience 110: 747-753.

Ahluwalia J, Urban L, Bevan S és Nagy I (2003a). Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the vanilloid receptor 1 in vitro. The European journal of neuroscience 17: 2611-2618.

Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S és Nagy I (2000). Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. Neuroscience 100: 685-688.

Ahluwalia J, Yaqoob M, Urban L, Bevan S és Nagy I (2003b). Activation of capsaicin-sensitive primary sensory neurones induces anandamide production and release. Journal of neurochemistry 84: 585-591.

Avelino A, Cruz C, Nagy I és Cruz F (2002). Vanilloid receptor 1 expression in the rat urinary tract. Neuroscience 109: 787-798.

Baiou D, Santha P, Avelino A, Charrua A, Bacskai T, Matesz K, Cruz F és Nagy I (2007). Neurochemical characterization of insulin receptor-expressing primary sensory neurons in wild-type and vanilloid type 1 transient receptor potential receptor knockout mice. The Journal of comparative neurology 503: 334-347.

Charrua A, Reguenga C, Cordeiro JM, Correiade-Sa P, Paule C, Nagy I, Cruz F és Avelino A (2009b). Functional transient receptor potential vanilloid 1 is expressed in human urothelial cells. The Journal of urology 182: 2944-2950.

Charrua A, Reguenga C, Paule CC, Nagy I, Cruz F és Avelino A (2008). Cystitis is associated with TRPV1b-downregulation in rat dorsal root ganglia. Neuroreport 19: 1469-1472.

Charrua AM, R; Oliveira, R; Marczylo, T; Nagy, I: Cruz F (2018). Fatty acid amide hydrolase inhibition normalises bladder function and reduces pain through normalising the anandamide/palmitoylethanolamine ratio in the inflamed bladder. British Journal of Pharmacology. Under revision.

Chen J, Varga A, Selvarajah S, Jenes A, Dienes B, Sousa-Valente J, Kulik A, Veress G, Brain SD, Baker D, Urban L, Mackie K és Nagy I (2016). Spatial Distribution of

the Cannabinoid Type 1 and Capsaicin Receptors May Contribute to the Complexity of Their Crosstalk. Scientific reports 6: 33307.

Dinis P, Charrua A, Avelino A, Yaqoob M, Bevan S, Nagy I és Cruz F (2004b). Anandamide-evoked activation of vanilloid receptor 1 contributes to the development of bladder hyperreflexia and nociceptive transmission to spinal dorsal horn neurons in cystitis. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 24: 11253-11263.

Kulik A, Polgar E, Matesz C, Szucs P, Kothalawala S és Nagy I (1996). Subpopulation of capsaicin sensitive primary afferent neurons in thoracic, lumbar and sacral dorsal root ganglion in young rats revealed by stimulated cobalt uptake. Acta biologica Hungarica 47: 251-259.

Laycock H, Valente J, Bantel C és Nagy I (2013). Peripheral mechanisms of burn injury-associated pain. European journal of pharmacology 716: 169-178.

Lever IJ, Robinson M, Cibelli M, Paule C, Santha P, Yee L, Hunt SP, Cravatt BF, Elphick MR, Nagy I és Rice AS (2009). Localization of the endocannabinoiddegrading enzyme fatty acid amide hydrolase in rat dorsal root ganglion cells and its regulation after peripheral nerve injury. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 29: 3766-3780.

Mahmud A, Santha P, Paule CC és Nagy I (2009). Cannabinoid 1 receptor activation inhibits transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-mediated cationic influx into rat cultured primary sensory neurons. Neuroscience 162: 1202-1211.

Mistry S, Paule CC, Varga A, Photiou A, Jenes A, Avelino A, Buluwela L és Nagy I (2014). Prolonged exposure to bradykinin and prostaglandin E2 increases TRPV1 mRNA but does not alter TRPV1 and TRPV1b protein expression in cultured rat primary sensory neurons. Neuroscience letters 564: 89-93.

Nagy B, Fedonidis C, Photiou A, Wahba J, Paule CC, Ma D, Buluwela L és Nagy I (2009a). Capsaicin-sensitive primary sensory neurons in the mouse express N-Acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D. Neuroscience 161: 572-577.

Nagy I (2004). Sensory processing: primary afferent neurons/DRG. Anesthetic Pharmacology: Physiologic Principles and Clinical Practice, eds: Evers and Maze: 187-197.

Nagy I, Friston D, Valente JS, Torres Perez JV és Andreou AP (2014). Pharmacology of the capsaicin receptor, transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel. Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung Progres des recherches pharmaceutiques 68: 39-76.

Nagy I, Pabla R, Matesz C, Dray A, Woolf CJ és Urban L (1993). Cobalt uptake enables identification of capsaicin- and bradykinin-sensitive subpopulations of rat dorsal root ganglion cells in vitro. Neuroscience 56: 241-246.

Nagy I, Paule CC és White JP (2009b). Molecular mechanisms of TRPV1-mediated pain. Neuroimmune biology 8: 75-99.

Nagy I és Rang H (1999a). Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. Neuroscience 88: 995-997.

Nagy I és Rang HP (1999b). Similarities and differences between the responses of rat sensory neurons to noxious heat and capsaicin. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 19: 10647-10655.

Nagy I, Santha P, Jancso G és Urban L (2004). The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. European journal of pharmacology 500: 351-369.

Nagy I, White JP, Paule CC, Maze M és Urban L (2008). Functional Molecular Biology of the TRPV 1 Ion Channel. In Cannabinoids and the Brain. Springer, pp 101-130.

Nagy I és Woolf CJ (1996). Lignocaine selectively reduces C fibre-evoked neuronal activity in rat spinal cord in vitro by decreasing N-methyl-D-aspartate and neurokinin receptor-mediated post-synaptic depolarizations; implications for the development of novel centrally acting analgesics. Pain 64: 59-70.

Nagy I; Bevan, S; Urban, L és Yacoob, M (2011). Retraction. Activation of capsaicinsensitive primary sensory neurones induces anandamide production and release. Journal of neurochemistry 119: 890.

Nagy I és Rice A (2003) Applied physiology of inflammatory pain. In: *Acute Pain, Clinical Pain Management*, eds: Rowbotham and Macintyre, Arnold, London, pp. 17-41.

Nerandzic V, Mrozkova P, Adamek P, Spicarova D, Nagy I és Palecek J (2018). Peripheral inflammation affects modulation of nociceptive synaptic transmission in the spinal cord induced by N-arachidonoylphosphatidylethanolamine. Br J Pharmacol 175: 2322-2336.

Rice AS, Farquhar-Smith WP és Nagy I (2002). Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 66: 243-256.

Santha P, Jenes A, Somogyi C és Nagy I (2010a). The endogenous cannabinoid anandamide inhibits transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-mediated currents in rat cultured primary sensory neurons. Acta physiologica Hungarica 97: 149-158.

Sathianathan V, Avelino A, Charrua A, Santha P, Matesz K, Cruz F és Nagy I (2003). Insulin induces cobalt uptake in a subpopulation of rat cultured primary sensory neurons. The European journal of neuroscience 18: 2477-2486.

Singh Tahim A, Santha P és Nagy I (2005). Inflammatory mediators convert anandamide into a potent activator of the vanilloid type 1 transient receptor potential receptor in nociceptive primary sensory neurons. Neuroscience 136: 539-548.

Soneji ND, Paule CC, Mlynarczyk M és Nagy I (2010). Effects of cannabinoids on capsaicin receptor activity following exposure of primary sensory neurons to inflammatory mediators. Life Sci 87: 162-168.

Sousa-Valente J, Andreou AP, Urban L és Nagy I (2014a). Transient receptor potential ion channels in primary sensory neurons as targets for novel analgesics. Br J Pharmacol 171: 2508-2527.

Sousa-Valente J, Varga A, Ananthan K, Khajuria A és Nagy I (2014b). Anandamide in primary sensory neurons: too much of a good thing? The European journal of neuroscience 39: 409-418.

Sousa-Valente J, Varga A, Torres-Perez JV, Jenes A, Wahba J, Mackie K, Cravatt B, Ueda N, Tsuboi K, Santha P, Jancso G, Tailor H, Avelino A és Nagy I (2017). Inflammation of peripheral tissues and injury to peripheral nerves induce differing effects in the expression of the calcium-sensitive N-arachydonoylethanolamine-synthesizing enzyme and related molecules in rat primary sensory neurons. The Journal of comparative neurology 525: 1778-1796.

Urban L, White JP és Nagy I (2011). Molecular structure of transient receptor potential vanilloid type 1 ion channel (TRPV1). Current pharmaceutical biotechnology 12: 115-121.

Varga A, Jenes A, Marczylo TH, Sousa-Valente J, Chen J, Austin J, Selvarajah S, Piscitelli F, Andreou AP, Taylor AH, Kyle F, Yaqoob M, Brain S, White JP, Csernoch L, Di Marzo V, Buluwela L és Nagy I (2014). Anandamide produced by Ca(2+)-insensitive enzymes induces excitation in primary sensory neurons. Pflugers Archiv : European journal of physiology 466: 1421-1435.

Veress G, Meszar Z, Muszil D, Avelino A, Matesz K, Mackie K és Nagy I (2013). Characterisation of cannabinoid 1 receptor expression in the perikarya, and peripheral and spinal processes of primary sensory neurons. Brain Struct Funct 218: 733-750.

White JP, Calcott G, Jenes A, Hossein M, Paule CC, Santha P, Davis JB, Ma D, Rice AS és Nagy I (2011a). Xenon reduces activation of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) in rat dorsal root ganglion cells and in human TRPV1-expressing HEK293 cells. Life Sci 88: 141-149.

White JP, Urban L és Nagy I (2011b). TRPV1 function in health and disease. Current pharmaceutical biotechnology 12: 130-144.

8.2. AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

JEGYZÉKE

Abadji V, Lucas-Lenard JM, Chin C és Kendall DA (1999). Involvement of the carboxyl terminus of the third intracellular loop of the cannabinoid CB1 receptor in constitutive activation of Gs. Journal of neurochemistry 72: 2032-2038.

Abumrad N, Harmon C és Ibrahimi A (1998). Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. Journal of lipid research 39: 2309-2318.

Adamson Barnes NS, Mitchell VA, Kazantzis NP és Vaughan CW (2016). Actions of the dual FAAH/MAGL inhibitor JZL195 in a murine neuropathic pain model. Br J Pharmacol 173: 77-87.

Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, Amaya F, Constantin CE, Brenner GJ, Rubino T, Michalski CW, Marsicano G, Monory K, Mackie K, Marian C, Batkai S, Parolaro D, Fischer MJ, Reeh P, Kunos G, Kress M, Lutz B, Woolf CJ és Kuner R (2007). Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. Nature neuroscience 10: 870-879.

Ahern GP (2003). Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. J Biol Chem 278: 30429-30434.

Ahluwalia J, Rang H és Nagy I (2002a). The putative role of vanilloid receptor-like protein-1 in mediating high threshold noxious heat-sensitivity in rat cultured primary sensory neurons. The European journal of neuroscience 16: 1483-1489.

Ahluwalia J, Urban L, Bevan S, Capogna M és Nagy I (2002b). Cannabinoid 1 receptors are expressed by nerve growth factor- and glial cell-derived neurotrophic factor-responsive primary sensory neurones. Neuroscience 110: 747-753.

Ahluwalia J, Urban L, Bevan S és Nagy I (2003a). Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the vanilloid receptor 1 in vitro. The European journal of neuroscience 17: 2611-2618.

Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S és Nagy I (2000). Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. Neuroscience 100: 685-688.

Ahluwalia J, Yaqoob M, Urban L, Bevan S és Nagy I (2003b). Activation of capsaicin-sensitive primary sensory neurones induces anandamide production and release. Journal of neurochemistry 84: 585-591.

Ahn K, Johnson DS, Mileni M, Beidler D, Long JZ, McKinney MK, Weerapana E, Sadagopan N, Liimatta M, Smith SE, Lazerwith S, Stiff C, Kamtekar S, Bhattacharya K, Zhang Y, Swaney S, Van Becelaere K, Stevens RC és Cravatt BF (2009). Discovery and characterization of a highly selective FAAH inhibitor that reduces inflammatory pain. Chemistry & biology 16: 411-420.

Ahn K, Smith SE, Liimatta MB, Beidler D, Sadagopan N, Dudley DT, Young T, Wren P, Zhang Y, Swaney S, Van Becelaere K, Blankman JL, Nomura DK, Bhattachar SN, Stiff C, Nomanbhoy TK, Weerapana E, Johnson DS és Cravatt BF (2011). Mechanistic and pharmacological characterization of PF-04457845: a highly potent and selective fatty acid amide hydrolase inhibitor that reduces inflammatory and noninflammatory pain. J Pharmacol Exp Ther 338: 114-124.

Almeida TF, Roizenblatt S és Tufik S (2004). Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. Brain research 1000: 40-56.

Amaya F, Shimosato G, Kawasaki Y, Hashimoto S, Tanaka Y, Ji RR és Tanaka M (2006). Induction of CB1 cannabinoid receptor by inflammation in primary afferent neurons facilitates antihyperalgesic effect of peripheral CB1 agonist. Pain 124: 175-183.

Anderson WB, Gould MJ, Torres RD, Mitchell VA és Vaughan CW (2014). Actions of the dual FAAH/MAGL inhibitor JZL195 in a murine inflammatory pain model. Neuropharmacology 81: 224-230.

Arniges M, Fernandez-Fernandez JM, Albrecht N, Schaefer M és Valverde MA (2006). Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. J Biol Chem 281: 1580-1586.

Avelino A, Cruz C, Nagy I és Cruz F (2002). Vanilloid receptor 1 expression in the rat urinary tract. Neuroscience 109: 787-798.

Avelino A és Cruz F (2000). Peptide immunoreactivity and ultrastructure of rat urinary bladder nerve fibers after topical desensitization by capsaicin or resiniferatoxin. Autonomic neuroscience : basic & clinical 86: 37-46.

Avelino A és Cruz F (2006). TRPV1 (vanilloid receptor) in the urinary tract: expression, function and clinical applications. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology 373: 287-299.

Averill S, McMahon SB, Clary DO, Reichardt LF és Priestley JV (1995). Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. The European journal of neuroscience 7: 1484-1494.

Avraham Y, Davidi N, Porat M, Chernoguz D, Magen I, Vorobeiv L, Berry EM és Leker RR (2010). Leptin reduces infarct size in association with enhanced expression of CB2, TRPV1, SIRT-1 and leptin receptor. Current neurovascular research 7: 136-143.

Baiou D, Santha P, Avelino A, Charrua A, Bacskai T, Matesz K, Cruz F és Nagy I (2007). Neurochemical characterization of insulin receptor-expressing primary sensory neurons in wild-type and vanilloid type 1 transient receptor potential receptor knockout mice. The Journal of comparative neurology 503: 334-347.

Bennett DL, Averill S, Clary DO, Priestley JV és McMahon SB (1996a). Postnatal changes in the expression of the trkA high-affinity NGF receptor in primary sensory neurons. The European journal of neuroscience 8: 2204-2208.

Bennett DL, Dmietrieva N, Priestley JV, Clary D és McMahon SB (1996b). trkA, CGRP and IB4 expression in retrogradely labelled cutaneous and visceral primary sensory neurones in the rat. Neuroscience letters 206: 33-36.

Bennett DL, Michael GJ, Ramachandran N, Munson JB, Averill S, Yan Q, McMahon SB és Priestley JV (1998). A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 18: 3059-3072.

Bergman J, Delatte MS, Paronis CA, Vemuri K, Thakur GA és Makriyannis A (2008). Some effects of CB1 antagonists with inverse agonist and neutral biochemical properties. Physiology & behavior 93: 666-670.

Bevan S és Winter J (1995). Nerve growth factor (NGF) differentially regulates the chemosensitivity of adult rat cultured sensory neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 15: 4918-4926.

Bhave G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS és Gereau RWt (2003). Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 12480-12485.

Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS és Gereau RWt (2002). cAMPdependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. Neuron 35: 721-731.

Binzen U, Greffrath W, Hennessy S, Bausen M, Saaler-Reinhardt S és Treede RD (2006). Co-expression of the voltage-gated potassium channel Kv1.4 with transient receptor potential channels (TRPV1 and TRPV2) and the cannabinoid receptor CB1 in rat dorsal root ganglion neurons. Neuroscience 142: 527-539.

Birder LA és de Groat WC (1992a). The effect of glutamate antagonists on c-fos expression induced in spinal neurons by irritation of the lower urinary tract. Brain research 580: 115-120.

Birder LA és de Groat WC (1992b). Increased c-fos expression in spinal neurons after irritation of the lower urinary tract in the rat. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 12: 4878-4889.

Birder LA és de Groat WC (1993). Induction of c-fos expression in spinal neurons by nociceptive and nonnociceptive stimulation of LUT. The American journal of physiology 265: R326-333.

Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ és Caterina MJ (2001). Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 13396-13401.

Birder LA, Roppolo JR, Iadarola MJ és de Groat WC (1991). Electrical stimulation of visceral afferent pathways in the pelvic nerve increases c-fos in the rat lumbosacral spinal cord. Neuroscience letters 129: 193-196.

Bisogno T és Di Marzo V (2007). Short- and long-term plasticity of the endocannabinoid system in neuropsychiatric and neurological disorders. Pharmacol Res 56: 428-442.

Bisogno T, Melck D, Bobrov M, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L és Di Marzo V (2000). N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. The Biochemical journal 351 Pt 3: 817-824.

Boger DL, Miyauchi H, Du W, Hardouin C, Fecik RA, Cheng H, Hwang I, Hedrick MP, Leung D, Acevedo O, Guimaraes CR, Jorgensen WL és Cravatt BF (2005). Discovery of a potent, selective, and efficacious class of reversible alphaketoheterocycle inhibitors of fatty acid amide hydrolase effective as analgesics. J Med Chem 48: 1849-1856.

Boger DL, Sato H, Lerner AE, Hedrick MP, Fecik RA, Miyauchi H, Wilkie GD, Austin BJ, Patricelli MP és Cravatt BF (2000). Exceptionally potent inhibitors of fatty acid amide hydrolase: the enzyme responsible for degradation of endogenous oleamide and anandamide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 5044-5049.

Bonnington JK és McNaughton PA (2003). Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. The Journal of physiology 551: 433-446.

Booker L, Kinsey SG, Abdullah RA, Blankman JL, Long JZ, Ezzili C, Boger DL, Cravatt BF és Lichtman AH (2012). The fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor PF-3845 acts in the nervous system to reverse LPS-induced tactile allodynia in mice. Br J Pharmacol 165: 2485-2496.

Brauchi S, Orta G, Mascayano C, Salazar M, Raddatz N, Urbina H, Rosenmann E, Gonzalez-Nilo F és Latorre R (2007). Dissection of the components for PIP2 activation and thermosensation in TRP channels. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 10246-10251.

Breese NM, George AC, Pauers LE és Stucky CL (2005). Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse. Pain 115: 37-49.

Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R és Gallacher D (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. European journal of pain (London, England) 10: 287-333.

Breivogel CS és Childers SR (1998). The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. Neurobiology of disease 5: 417-431.

Bridges D, Rice AS, Egertova M, Elphick MR, Winter J és Michael GJ (2003). Localisation of cannabinoid receptor 1 in rat dorsal root ganglion using in situ hybridisation and immunohistochemistry. Neuroscience 119: 803-812.

Burnstock G (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. Nat Rev Drug Discov 7: 575-590.

Burnstock G (2009). Purinergic receptors and pain. Current pharmaceutical design 15: 1717-1735.

Burnstock G és Kennedy C (2011). P2X receptors in health and disease. Advances in pharmacology (San Diego, Calif) 61: 333-372.

Butler CA és Heaney LG (2007). Neurogenic inflammation and asthma. Inflammation & allergy drug targets 6: 127-132.

Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L és Piomelli D (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 16: 3934-3942.

Calignano A, La Rana G, Giuffrida A és Piomelli D (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. Nature 394: 277-281.

Caprioli A, Coccurello R, Rapino C, Di Serio S, Di Tommaso M, Vertechy M, Vacca V, Battista N, Pavone F, Maccarrone M és Borsini F (2012). The novel reversible fatty acid amide hydrolase inhibitor ST4070 increases endocannabinoid brain levels and counteracts neuropathic pain in different animal models. J Pharmacol Exp Ther 342: 188-195.

Cardoso FC és Lewis RJ (2018). Sodium channels and pain: from toxins to therapies. Br J Pharmacol 175: 2138-2157.

Carpenter SE és Lynn B (1981). Vascular and sensory responses of human skin to mild injury after topical treatment with capsaicin. Br J Pharmacol 73: 755-758.

Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB és Hillard CJ (2004). Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. Mol Pharmacol 65: 999-1007.

Casarotto PC, Terzian AL, Aguiar DC, Zangrossi H, Guimaraes FS, Wotjak CT és Moreira FA (2012). Opposing roles for cannabinoid receptor type-1 (CB(1)) and

transient receptor potential vanilloid type-1 channel (TRPV1) on the modulation of panic-like responses in rats. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 37: 478-486.

Caterina MJ (2014). TRP channel cannabinoid receptors in skin sensation, homeostasis, and inflammation. ACS chemical neuroscience 5: 1107-1116.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI és Julius D (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. Science (New York, NY) 288: 306-313.

Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ és Julius D (1999). A capsaicinreceptor homologue with a high threshold for noxious heat. Nature 398: 436-441.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD és Julius D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature 389: 816-824.

Cavanaugh DJ, Lee H, Lo L, Shields SD, Zylka MJ, Basbaum AI és Anderson DJ (2009). Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106: 9075-9080.

Cesare P, Dekker LV, Sardini A, Parker PJ és McNaughton PA (1999). Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. Neuron 23: 617-624.

Cesare P és McNaughton P (1996). A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93: 15435-15439.

Chang L, Luo L, Palmer JA, Sutton S, Wilson SJ, Barbier AJ, Breitenbucher JG, Chaplan SR és Webb M (2006). Inhibition of fatty acid amide hydrolase produces analgesia by multiple mechanisms. Br J Pharmacol 148: 102-113.

Charrua A, Cruz CD, Cruz F és Avelino A (2007). Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 is essential for the generation of noxious bladder input and bladder overactivity in cystitis. The Journal of urology 177: 1537-1541.

Charrua A, Cruz CD, Narayanan S, Gharat L, Gullapalli S, Cruz F és Avelino A (2009a). GRC-6211, a new oral specific TRPV1 antagonist, decreases bladder overactivity and noxious bladder input in cystitis animal models. The Journal of urology 181: 379-386.

Charrua A, Reguenga C, Cordeiro JM, Correiade-Sa P, Paule C, Nagy I, Cruz F és Avelino A (2009b). Functional transient receptor potential vanilloid 1 is expressed in human urothelial cells. The Journal of urology 182: 2944-2950.

Charrua A, Reguenga C, Paule CC, Nagy I, Cruz F és Avelino A (2008). Cystitis is associated with TRPV1b-downregulation in rat dorsal root ganglia. Neuroreport 19: 1469-1472.

Charrua AM, R; Oliveira, R; Marczylo, T; Nagy, I: Cruz F (2018). Fatty acid amide hydrolase inhibition normalises bladder function and reduces pain through normalising the anandamide/palmitoylethanolamine ratio in the inflamed bladder. British Journal of Pharmacology. Under revision.

Chen J, Varga A, Selvarajah S, Jenes A, Dienes B, Sousa-Valente J, Kulik A, Veress G, Brain SD, Baker D, Urban L, Mackie K és Nagy I (2016). Spatial Distribution of the Cannabinoid Type 1 and Capsaicin Receptors May Contribute to the Complexity of Their Crosstalk. Scientific reports 6: 33307.

Cho W és Stahelin RV (2005). Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. Annu Rev Biophys Biomol Struct 34: 119-151.

Chobanian HR, Guo Y, Liu P, Chioda MD, Fung S, Lanza TJ, Chang L, Bakshi RK, Dellureficio JP, Hong Q, McLaughlin M, Belyk KM, Krska SW, Makarewicz AK, Martel EJ, Leone JF, Frey L, Karanam B, Madeira M, Alvaro R, Shuman J, Salituro G, Terebetski JL, Jochnowitz N, Mistry S, McGowan E, Hajdu R, Rosenbach M, Abbadie C, Alexander JP, Shiao LL, Sullivan KM, Nargund RP, Wyvratt MJ, Lin LS és DeVita RJ (2014). Discovery of MK-4409, a Novel Oxazole FAAH Inhibitor for the Treatment of Inflammatory and Neuropathic Pain. ACS medicinal chemistry letters 5: 717-721.

Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V és Walker JM (2003). N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. J Biol Chem 278: 13633-13639.

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV és Julius D (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. Nature 411: 957-962.

Chung MK, Guler AD és Caterina MJ (2008). TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. Nature neuroscience 11: 555-564.

Clapper JR, Moreno-Sanz G, Russo R, Guijarro A, Vacondio F, Duranti A, Tontini A, Sanchini S, Sciolino NR, Spradley JM, Hohmann AG, Calignano A, Mor M, Tarzia G és Piomelli D (2010). Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. Nature neuroscience 13: 1265-1270.

Clapper JR, Vacondio F, King AR, Duranti A, Tontini A, Silva C, Sanchini S, Tarzia G, Mor M és Piomelli D (2009). A second generation of carbamate-based fatty acid amide hydrolase inhibitors with improved activity in vivo. ChemMedChem 4: 1505-1513.

Consroe P, Musty R, Rein J, Tillery W és Pertwee R (1997). The perceived effects of smoked cannabis on patients with multiple sclerosis. European neurology 38: 44-48.
Costa B, Bettoni I, Petrosino S, Comelli F, Giagnoni G és Di Marzo V (2010). The dual fatty acid amide hydrolase/TRPV1 blocker, N-arachidonoyl-serotonin, relieves carrageenan-induced inflammation and hyperalgesia in mice. Pharmacol Res 61: 537-546.

Coste B, Xiao B, Santos JS, Syeda R, Grandl J, Spencer KS, Kim SE, Schmidt M, Mathur J, Dubin AE, Montal M és Patapoutian A (2012). Piezo proteins are poreforming subunits of mechanically activated channels. Nature 483: 176-181.

Craft RM, Cohen SM és Porreca F (1995). Long-lasting desensitization of bladder afferents following intravesical resiniferatoxin and capsaicin in the rat. Pain 61: 317-323.

Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR és Lichtman AH (2001). Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 9371-9376.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA és Gilula NB (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. Nature 384: 83-87.

Cravatt BF és Lichtman AH (2004). The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. Journal of neurobiology 61: 149-160.

Cravatt BF, Saghatelian A, Hawkins EG, Clement AB, Bracey MH és Lichtman AH (2004). Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 10821-10826.

Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V és Di Marzo V (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. Neuroscience 139: 1405-1415.

Cristino L, Starowicz K, De Petrocellis L, Morishita J, Ueda N, Guglielmotti V és Di Marzo V (2008). Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. Neuroscience 151: 955-968.

Cruz F, Avelino A, Lima D és Coimbra A (1994). Activation of the c-fos protooncogene in the spinal cord following noxious stimulation of the urinary bladder. Somatosensory & motor research 11: 319-325.

Cruz F és Dinis P (2007). Resiniferatoxin and botulinum toxin type A for treatment of lower urinary tract symptoms. Neurourology and urodynamics 26: 920-927.

Cruz F, Guimaraes M, Silva C, Rio ME, Coimbra A és Reis M (1997). Desensitization of bladder sensory fibers by intravesical capsaicin has long lasting

clinical and urodynamic effects in patients with hyperactive or hypersensitive bladder dysfunction. The Journal of urology 157: 585-589.

Cui Y, Perez S és Venance L (2018). Endocannabinoid-LTP Mediated by CB1 and TRPV1 Receptors Encodes for Limited Occurrences of Coincident Activity in Neocortex. Frontiers in cellular neuroscience 12: 182.

Culotta E és Koshland DE, Jr. (1992). NO news is good news. Science (New York, NY) 258: 1862-1865.

Dalle Carbonare M, Del Giudice E, Stecca A, Colavito D, Fabris M, D'Arrigo A, Bernardini D, Dam M és Leon A (2008). A saturated N-acylethanolamine other than N-palmitoyl ethanolamine with anti-inflammatory properties: a neglected story. J Neuroendocrinol 20 Suppl 1: 26-34.

Dalton GD, Bass CE, Van Horn CG és Howlett AC (2009). Signal transduction via cannabinoid receptors. CNS Neurol Disord Drug Targets 8: 422-431.

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 és Sheardown SA (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. Nature 405: 183-187.

De Petrocellis L, Nabissi M, Santoni G és Ligresti A (2017). Actions and Regulation of Ionotropic Cannabinoid Receptors. Advances in pharmacology (San Diego, Calif) 80: 249-289.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A és Mechoulam R (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science (New York, NY) 258: 1946-1949.

Dhaka A, Uzzell V, Dubin AE, Mathur J, Petrus M, Bandell M és Patapoutian A (2009). TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 29: 153-158.

Di Marzo V, Bifulco M és De Petrocellis L (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. Nat Rev Drug Discov 3: 771-784.

Di Marzo V, Bisogno T és De Petrocellis L (2001). Anandamide: some like it hot. Trends in pharmacological sciences 22: 346-349.

Di Marzo V, Blumberg PM és Szallasi A (2002). Endovanilloid signaling in pain. Current opinion in neurobiology 12: 372-379.

Di Marzo V és De Petrocellis L (2012). Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences 367: 3216-3228.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC és Piomelli D (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. Nature 372: 686-691.

Di Marzo V, Stella N és Zimmer A (2015). Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. Nature reviews Neuroscience 16: 30-42.

Dib-Hajj SD, Black JA és Waxman SG (2015). NaV1.9: a sodium channel linked to human pain. Nature reviews Neuroscience 16: 511-519.

Dietrich A, Kalwa H, Rost BR és Gudermann T (2005). The diacylgylcerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance. Pflugers Archiv : European journal of physiology 451: 72-80.

Dinis P, Charrua A, Avelino A és Cruz F (2004a). Intravesical resiniferatoxin decreases spinal c-fos expression and increases bladder volume to reflex micturition in rats with chronic inflamed urinary bladders. BJU international 94: 153-157.

Dinis P, Charrua A, Avelino A, Yaqoob M, Bevan S, Nagy I és Cruz F (2004b). Anandamide-evoked activation of vanilloid receptor 1 contributes to the development of bladder hyperreflexia and nociceptive transmission to spinal dorsal horn neurons in cystitis. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 24: 11253-11263.

Dinis P, Silva J, Ribeiro MJ, Avelino A, Reis M és Cruz F (2004c). Bladder C-fiber desensitization induces a long-lasting improvement of BPH-associated storage LUTS: a pilot study. European urology 46: 88-93; discussion 93-84.

DiNitto JP, Cronin TC és Lambright DG (2003). Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains. Sci STKE 2003: re16.

Dirajlal S, Pauers LE és Stucky CL (2003). Differential response properties of IB(4)-positive and -negative unmyelinated sensory neurons to protons and capsaicin. Journal of neurophysiology 89: 513-524.

Docherty RJ, Yeats JC, Bevan S és Boddeke HW (1996). Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. Pflugers Archiv : European journal of physiology 431: 828-837.

Dolphin AC (2016). Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. The Journal of physiology 594: 5369-5390.

Duncan M, Millns P, Smart D, Wright JE, Kendall DA és Ralevic V (2004). Noladin ether, a putative endocannabinoid, attenuates sensory neurotransmission in the rat isolated mesenteric arterial bed via a non-CB1/CB2 G(i/o) linked receptor. Br J Pharmacol 142: 509-518.

Edelmayer RM, Brederson JD, Jarvis MF és Bitner RS (2014). Biochemical and pharmacological assessment of MAP-kinase signaling along pain pathways in experimental rodent models: a potential tool for the discovery of novel antinociceptive therapeutics. Biochem Pharmacol 87: 390-398.

Ellington HC, Cotter MA, Cameron NE és Ross RA (2002). The effect of cannabinoids on capsaicin-evoked calcitonin gene-related peptide (CGRP) release from the isolated paw skin of diabetic and non-diabetic rats. Neuropharmacology 42: 966-975.

Elman I és Borsook D (2016). Common Brain Mechanisms of Chronic Pain and Addiction. Neuron 89: 11-36.

Engel MA, Izydorczyk I, Mueller-Tribbensee SM, Becker C, Neurath MF és Reeh PW (2011). Inhibitory CB1 and activating/desensitizing TRPV1-mediated cannabinoid actions on CGRP release in rodent skin. Neuropeptides 45: 229-237.

Erler I, Hirnet D, Wissenbach U, Flockerzi V és Niemeyer BA (2004). Ca2+-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. J Biol Chem 279: 34456-34463.

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 és Talavera K (2011). The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil. Curr Biol 21: 316-321.

Favia AD, Habrant D, Scarpelli R, Migliore M, Albani C, Bertozzi SM, Dionisi M, Tarozzo G, Piomelli D, Cavalli A és De Vivo M (2012). Identification and characterization of carprofen as a multitarget fatty acid amide hydrolase/cyclooxygenase inhibitor. J Med Chem 55: 8807-8826.

Fegley D, Kathuria S, Mercier R, Li C, Goutopoulos A, Makriyannis A és Piomelli D (2004). Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 8756-8761.

Ferreira J, da Silva GL és Calixto JB (2004). Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. Br J Pharmacol 141: 787-794.

Ferreira J, Triches KM, Medeiros R és Calixto JB (2005). Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. Pain 117: 171-181.

Fezza F, Bisogno T, Minassi A, Appendino G, Mechoulam R és Di Marzo V (2002). Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues. FEBS Lett 513: 294-298.

Fichna J, Salaga M, Stuart J, Saur D, Sobczak M, Zatorski H, Timmermans JP, Bradshaw HB, Ahn K és Storr MA (2014). Selective inhibition of FAAH produces

antidiarrheal and antinociceptive effect mediated by endocannabinoids and cannabinoid-like fatty acid amides. Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society 26: 470-481.

Fioravanti B, De Felice M, Stucky CL, Medler KA, Luo MC, Gardell LR, Ibrahim M, Malan TP, Jr., Yamamura HI, Ossipov MH, King T, Lai J, Porreca F és Vanderah TW (2008). Constitutive activity at the cannabinoid CB1 receptor is required for behavioral response to noxious chemical stimulation of TRPV1: antinociceptive actions of CB1 inverse agonists. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 28: 11593-11602.

Fischbach T, Greffrath W, Nawrath H és Treede RD (2007). Effects of anandamide and noxious heat on intracellular calcium concentration in nociceptive drg neurons of rats. Journal of neurophysiology 98: 929-938.

Fischer MJ, Balasuriya D, Jeggle P, Goetze TA, McNaughton PA, Reeh PW és Edwardson JM (2014). Direct evidence for functional TRPV1/TRPA1 heteromers. Pflugers Archiv : European journal of physiology 466: 2229-2241.

Fischer MJ, Btesh J és McNaughton PA (2013). Disrupting sensitization of transient receptor potential vanilloid subtype 1 inhibits inflammatory hyperalgesia. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 33: 7407-7414.

Fogaca MV, Aguiar DC, Moreira FA és Guimaraes FS (2012). The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. Neuropharmacology 63: 202-210.

Fong TM és Heymsfield SB (2009). Cannabinoid-1 receptor inverse agonists: current understanding of mechanism of action and unanswered questions. International journal of obesity (2005) 33: 947-955.

Fowler CJ (2012). Anandamide uptake explained? Trends in pharmacological sciences 33: 181-185.

Fowler CJ (2015). The Potential of Inhibitors of Endocannabinoid Metabolism for Drug Development: A Critical Review. Handbook of experimental pharmacology 231: 95-128.

Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, Guijarro A, Lodola A, Armirotti A, Garau G, Bandiera T, Reggiani A, Mor M, Cavalli A és Piomelli D (2011). A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. Nature neuroscience 15: 64-69.

Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G és Piomelli D (2003). Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. Nature 425: 90-93.

Gangadharan V és Kuner R (2013). Pain hypersensitivity mechanisms at a glance. Disease models & mechanisms 6: 889-895.

Ganguly K és Poo MM (2013). Activity-dependent neural plasticity from bench to bedside. Neuron 80: 729-741.

Garcia DE, Brown S, Hille B és Mackie K (1998). Protein kinase C disrupts cannabinoid actions by phosphorylation of the CB1 cannabinoid receptor. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 18: 2834-2841.

Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Merino JM és Ferrer-Montiel A (2000). Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. J Biol Chem 275: 32552-32558.

Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Fajardo-Sanchez E, Fernandez-Ballester G és Ferrer-Montiel A (2004). Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 24: 5307-5314.

Garcia-Sanz N, Valente P, Gomis A, Fernandez-Carvajal A, Fernandez-Ballester G, Viana F, Belmonte C és Ferrer-Montiel A (2007). A role of the transient receptor potential domain of vanilloid receptor I in channel gating. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 27: 11641-11650.

Gavva NR, Klionsky L, Qu Y, Shi L, Tamir R, Edenson S, Zhang TJ, Viswanadhan VN, Toth A, Pearce LV, Vanderah TW, Porreca F, Blumberg PM, Lile J, Sun Y, Wild K, Louis JC és Treanor JJ (2004). Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. J Biol Chem 279: 20283-20295.

Gebhart GF és Bielefeldt K (2016). Physiology of Visceral Pain. Comprehensive Physiology 6: 1609-1633.

Geppetti P, Nassini R, Materazzi S és Benemei S (2008). The concept of neurogenic inflammation. BJU international 101 Suppl 3: 2-6.

Giang DK és Cravatt BF (1997). Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 2238-2242.

Glass M, Dragunow M és Faull RL (1997). Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. Neuroscience 77: 299-318.

Glass M és Felder CC (1997). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 17: 5327-5333.

Golech SA, McCarron RM, Chen Y, Bembry J, Lenz F, Mechoulam R, Shohami E és Spatz M (2004). Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. Brain Res Mol Brain Res 132: 87-92.

Gonzalez EJ, Merrill L és Vizzard MA (2014). Bladder sensory physiology: neuroactive compounds and receptors, sensory transducers, and target-derived growth factors as targets to improve function. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology 306: R869-878.

Goodfellow CE és Glass M (2009). Anandamide receptor signal transduction. Vitam Horm 81: 79-110.

Goswami C, Dreger M, Jahnel R, Bogen O, Gillen C és Hucho F (2004). Identification and characterization of a Ca2+ -sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin. Journal of neurochemistry 91: 1092-1103.

Greco R, Bandiera T, Mangione AS, Demartini C, Siani F, Nappi G, Sandrini G, Guijarro A, Armirotti A, Piomelli D és Tassorelli C (2015). Effects of peripheral FAAH blockade on NTG-induced hyperalgesia--evaluation of URB937 in an animal model of migraine. Cephalalgia : an international journal of headache 35: 1065-1076.

Grim TW, Ghosh S, Hsu KL, Cravatt BF, Kinsey SG és Lichtman AH (2014). Combined inhibition of FAAH and COX produces enhanced anti-allodynic effects in mouse neuropathic and inflammatory pain models. Pharmacology, biochemistry, and behavior 124: 405-411.

Groneberg DA, Quarcoo D, Frossard N és Fischer A (2004). Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases. Allergy 59: 1139-1152.

Grycova L, Lansky Z, Friedlova E, Obsilova V, Janouskova H, Obsil T és Teisinger J (2008). Ionic interactions are essential for TRPV1 C-terminus binding to calmodulin. Biochem Biophys Res Commun 375: 680-683.

Guindon J, Lai Y, Takacs SM, Bradshaw HB és Hohmann AG (2013). Alterations in endocannabinoid tone following chemotherapy-induced peripheral neuropathy: effects of endocannabinoid deactivation inhibitors targeting fatty-acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase in comparison to reference analgesics following cisplatin treatment. Pharmacol Res 67: 94-109.

Guler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M és Caterina M (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 22: 6408-6414.

Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X és Elde R (1999). Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. The European journal of neuroscience 11: 946-958.

Hama AT, Germano P, Varghese MS, Cravatt BF, Milne GT, Pearson JP és Sagen J (2014). Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors exert pharmacological effects, but lack antinociceptive efficacy in rats with neuropathic spinal cord injury pain. PloS one 9: e96396.

Han C, Huang J és Waxman SG (2016). Sodium channel Nav1.8: Emerging links to human disease. Neurology 86: 473-483.

Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I és Mechoulam R (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 3662-3665.

Hasanein P, Shahidi S, Komaki A és Mirazi N (2008). Effects of URB597 as an inhibitor of fatty acid amide hydrolase on modulation of nociception in a rat model of cholestasis. European journal of pharmacology 591: 132-135.

Helyes Z, Nemeth J, Than M, Bolcskei K, Pinter E és Szolcsanyi J (2003). Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat. Life Sci 73: 2345-2353.

Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR és Rice KC (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 11: 563-583.

Hermann H, De Petrocellis L, Bisogno T, Schiano Moriello A, Lutz B és Di Marzo V (2003). Dual effect of cannabinoid CB1 receptor stimulation on a vanilloid VR1 receptor-mediated response. Cellular and molecular life sciences : CMLS 60: 607-616.

Heyman I és Rang HP (1985). Depolarizing responses to capsaicin in a subpopulation of rat dorsal root ganglion cells. Neuroscience letters 56: 69-75.

Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrahian A és Campbell WB (1997). Accumulation of Narachidonoylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. Journal of neurochemistry 69: 631-638.

Hogan P (1983). Expression of markers for pain sensory neurons in cell cultureHarvard University.

Hohmann AG és Herkenham M (1999). Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. Neuroscience 90: 923-931.

Holzer P és Izzo AA (2014). The pharmacology of TRP channels. Br J Pharmacol 171: 2469-2473.

Homma Y, Nomiya A, Tagaya M, Oyama T, Takagaki K, Nishimatsu H és Igawa Y (2013). Increased mRNA expression of genes involved in pronociceptive inflammatory reactions in bladder tissue of interstitial cystitis. The Journal of urology 190: 1925-1931.

Hong S, Fan J, Kemmerer ES, Evans S, Li Y és Wiley JW (2009). Reciprocal changes in vanilloid (TRPV1) and endocannabinoid (CB1) receptors contribute to visceral hyperalgesia in the water avoidance stressed rat. Gut 58: 202-210.

Huang J, Zhang X és McNaughton PA (2006a). Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. Current neuropharmacology 4: 197-206.

Huang J, Zhang X és McNaughton PA (2006b). Modulation of temperature-sensitive TRP channels. Semin Cell Dev Biol 17: 638-645.

Huang RF, Huang SM, Lin BS, Hung CY és Lu HT (2002). N-Acetylcysteine, vitamin C and vitamin E diminish homocysteine thiolactone-induced apoptosis in human promyeloid HL-60 cells. J Nutr 132: 2151-2156.

Huggins JP, Smart TS, Langman S, Taylor L és Young T (2012). An efficient randomised, placebo-controlled clinical trial with the irreversible fatty acid amide hydrolase-1 inhibitor PF-04457845, which modulates endocannabinoids but fails to induce effective analgesia in patients with pain due to osteoarthritis of the knee. Pain 153: 1837-1846.

Hunt SP, Pini A és Evan G (1987). Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. Nature 328: 632-634.

Hussain Z, Uyama T, Tsuboi K és Ueda N (2017). Mammalian enzymes responsible for the biosynthesis of N-acylethanolamines. Biochim Biophys Acta 1862: 1546-1561.

Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D és Oh U (2000). Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 6155-6160.

Iannotti FA, Di Marzo V és Petrosino S (2016). Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. Prog Lipid Res 62: 107-128.

Ishizuka O, Igawa Y, Mattiasson A és Andersson KE (1994). Capsaicin-induced bladder hyperactivity in normal conscious rats. The Journal of urology 152: 525-530.

Jahnel R, Dreger M, Gillen C, Bender O, Kurreck J és Hucho F (2001). Biochemical characterization of the vanilloid receptor 1 expressed in a dorsal root ganglia derived cell line. European journal of biochemistry 268: 5489-5496.

Jancso G, Kiraly E és Jancso-Gabor A (1977). Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. Nature 270: 741-743.

Jancso G, Savay G és Kiraly E (1978). Appearance of histochemically detectable ionic calcium in degenerating primary sensory neurons. Acta histochemica 62: 165-169.

Jansson ET, Trkulja CL, Ahemaiti A, Millingen M, Jeffries GD, Jardemark K és Orwar O (2013). Effect of cholesterol depletion on the pore dilation of TRPV1. Molecular pain 9: 1.

Jayamanne A, Greenwood R, Mitchell VA, Aslan S, Piomelli D és Vaughan CW (2006). Actions of the FAAH inhibitor URB597 in neuropathic and inflammatory chronic pain models. Br J Pharmacol 147: 281-288.

JC T (1876). Capsaicin, the active principle in Capsicum fruits. The Analyst 1: 148–149.

Jeske NA, Patwardhan AM, Gamper N, Price TJ, Akopian AN és Hargreaves KM (2006). Cannabinoid WIN 55,212-2 regulates TRPV1 phosphorylation in sensory neurons. J Biol Chem 281: 32879-32890.

Jeske NA, Patwardhan AM, Ruparel NB, Akopian AN, Shapiro MS és Henry MA (2009). A-kinase anchoring protein 150 controls protein kinase C-mediated phosphorylation and sensitization of TRPV1. Pain 146: 301-307.

Jhaveri MD, Richardson D, Kendall DA, Barrett DA és Chapman V (2006). Analgesic effects of fatty acid amide hydrolase inhibition in a rat model of neuropathic pain. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 26: 13318-13327.

Ji RR és Woolf CJ (2001). Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. Neurobiology of disease 8: 1-10.

Jordt SE és Julius D (2002). Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. Cell 108: 421-430.

Jordt SE, Tominaga M és Julius D (2000). Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 8134-8139.

Jung J, Lee SY, Hwang SW, Cho H, Shin J, Kang YS, Kim S és Oh U (2002). Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. J Biol Chem 277: 44448-44454.

Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H és Oh U (2004). Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca2+/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. J Biol Chem 279: 7048-7054.

Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ és Blumberg PM (2001). Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. J Biol Chem 276: 28613-28619.

Keith JM, Jones WM, Tichenor M, Liu J, Seierstad M, Palmer JA, Webb M, Karbarz M, Scott BP, Wilson SJ, Luo L, Wennerholm ML, Chang L, Rizzolio M, Rynberg R,

Chaplan SR és Breitenbucher JG (2015). Preclinical Characterization of the FAAH Inhibitor JNJ-42165279. ACS medicinal chemistry letters 6: 1204-1208.

Kerbrat A, Ferre JC, Fillatre P, Ronziere T, Vannier S, Carsin-Nicol B, Lavoue S, Verin M, Gauvrit JY, Le Tulzo Y és Edan G (2016). Acute Neurologic Disorder from an Inhibitor of Fatty Acid Amide Hydrolase. The New England journal of medicine 375: 1717-1725.

Khajehali E, Malone DT, Glass M, Sexton PM, Christopoulos A és Leach K (2015). Biased Agonism and Biased Allosteric Modulation at the CB1 Cannabinoid Receptor. Mol Pharmacol 88: 368-379.

Khasabova IA, Khasabov SG, Harding-Rose C, Coicou LG, Seybold BA, Lindberg AE, Steevens CD, Simone DA és Seybold VS (2008). A decrease in anandamide signaling contributes to the maintenance of cutaneous mechanical hyperalgesia in a model of bone cancer pain. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 28: 11141-11152.

Khasabova IA, Simone DA és Seybold VS (2002). Cannabinoids attenuate depolarization-dependent Ca2+ influx in intermediate-size primary afferent neurons of adult rats. Neuroscience 115: 613-625.

Kim AY, Tang Z, Liu Q, Patel KN, Maag D, Geng Y és Dong X (2008). Pirt, a phosphoinositide-binding protein, functions as a regulatory subunit of TRPV1. Cell 133: 475-485.

Kinsey SG, Long JZ, O'Neal ST, Abdullah RA, Poklis JL, Boger DL, Cravatt BF és Lichtman AH (2009). Blockade of endocannabinoid-degrading enzymes attenuates neuropathic pain. J Pharmacol Exp Ther 330: 902-910.

Kinsey SG, Naidu PS, Cravatt BF, Dudley DT és Lichtman AH (2011). Fatty acid amide hydrolase blockade attenuates the development of collagen-induced arthritis and related thermal hyperalgesia in mice. Pharmacology, biochemistry, and behavior 99: 718-725.

Kirschstein T, Busselberg D és Treede RD (1997). Coexpression of heat-evoked and capsaicin-evoked inward currents in acutely dissociated rat dorsal root ganglion neurons. Neuroscience letters 231: 33-36.

Kitagawa Y, Miyai A, Usui K, Hamada Y, Deai K, Wada M, Koga Y, Sakata M, Hayashi M, Tominaga M és Matsushita M (2012). Pharmacological characterization of (3S)-3-(hydroxymethyl)-4-(5-methylpyridin-2-yl)-N-[6-(2,2,2trifluoroethoxy)pyrid in-3-yl]-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazine-8-carboxamide (JTS-653), a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist. J Pharmacol Exp Ther 342: 520-528.

Kitagawa Y, Wada M, Kanehisa T, Miyai A, Usui K, Maekawa M, Sakata M, Matsuo A, Hayashi M és Matsushita M (2013). JTS-653 blocks afferent nerve firing and attenuates bladder overactivity without affecting normal voiding function. The Journal of urology 189: 1137-1146.

Koplas PA, Rosenberg RL és Oxford GS (1997). The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 17: 3525-3537.

Kress M és Kuner R (2009). Mode of action of cannabinoids on nociceptive nerve endings. Exp Brain Res 196: 79-88.

Kulik A, Polgar E, Matesz C, Szucs P, Kothalawala S és Nagy I (1996). Subpopulation of capsaicin sensitive primary afferent neurons in thoracic, lumbar and sacral dorsal root ganglion in young rats revealed by stimulated cobalt uptake. Acta biologica Hungarica 47: 251-259.

Kullmann FA, Shah MA, Birder LA és de Groat WC (2009). Functional TRP and ASIC-like channels in cultured urothelial cells from the rat. American journal of physiology Renal physiology 296: F892-901.

Kwak J, Wang MH, Hwang SW, Kim TY, Lee SY és Oh U (2000). Intracellular ATP increases capsaicin-activated channel activity by interacting with nucleotide-binding domains. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 20: 8298-8304.

Lainez S, Valente P, Ontoria-Oviedo I, Estevez-Herrera J, Camprubi-Robles M, Ferrer-Montiel A és Planells-Cases R (2010). GABAA receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization. Faseb j 24: 1958-1970.

Latorre R, Brauchi S, Orta G, Zaelzer C és Vargas G (2007). ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. Cell Calcium 42: 427-438.

Latremoliere A és Woolf CJ (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. The journal of pain : official journal of the American Pain Society 10: 895-926.

Lauckner JE, Hille B és Mackie K (2005). The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 19144-19149.

Laycock H, Valente J, Bantel C és Nagy I (2013). Peripheral mechanisms of burn injury-associated pain. European journal of pharmacology 716: 169-178.

Lazzeri M, Vannucchi MG, Zardo C, Spinelli M, Beneforti P, Turini D és Faussone-Pellegrini MS (2004). Immunohistochemical evidence of vanilloid receptor 1 in normal human urinary bladder. European urology 46: 792-798.

Lemmon MA (2003). Phosphoinositide recognition domains. Traffic 4: 201-213.

Leung D, Saghatelian A, Simon GM és Cravatt BF (2006). Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. Biochemistry 45: 4720-4726.

Lever IJ, Robinson M, Cibelli M, Paule C, Santha P, Yee L, Hunt SP, Cravatt BF, Elphick MR, Nagy I és Rice AS (2009). Localization of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase in rat dorsal root ganglion cells and its regulation after peripheral nerve injury. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 29: 3766-3780.

Levine JD, Lam D, Taiwo YO, Donatoni P és Goetzl EJ (1986). Hyperalgesic properties of 15-lipoxygenase products of arachidonic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83: 5331-5334.

Liao M, Cao E, Julius D és Cheng Y (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. Nature 504: 107-112.

Lichtman AH, Shelton CC, Advani T és Cravatt BF (2004). Mice lacking fatty acid amide hydrolase exhibit a cannabinoid receptor-mediated phenotypic hypoalgesia. Pain 109: 319-327.

Ligresti A, De Petrocellis L és Di Marzo V (2016). From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. Physiological reviews 96: 1593-1659.

Ligresti A, Morera E, Van Der Stelt M, Monory K, Lutz B, Ortar G és Di Marzo V (2004). Further evidence for the existence of a specific process for the membrane transport of anandamide. The Biochemical journal 380: 265-272.

Ligresti A, Petrosino S és Di Marzo V (2009). From endocannabinoid profiling to 'endocannabinoid therapeutics'. Current opinion in chemical biology 13: 321-331.

Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB és Gaudet R (2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. Neuron 54: 905-918.

Little PJ, Compton DR, Johnson MR, Melvin LS és Martin BR (1988). Pharmacology and stereoselectivity of structurally novel cannabinoids in mice. J Pharmacol Exp Ther 247: 1046-1051.

Liu B, Zhang C és Qin F (2005). Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 25: 4835-4843.

Liu BL, Yang F, Zhan HL, Feng ZY, Zhang ZG, Li WB és Zhou XF (2014). Increased severity of inflammation correlates with elevated expression of TRPV1 nerve fibers and nerve growth factor on interstitial cystitis/bladder pain syndrome. Urologia internationalis 92: 202-208.

Liu J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Wagner JA, Cravatt BF, Gao B és Kunos G (2003). Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. J Biol Chem 278: 45034-45039.

Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim HY és Kunos G (2006). A biosynthetic pathway for anandamide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 13345-13350.

Liu M, Willmott NJ, Michael GJ és Priestley JV (2004). Differential pH and capsaicin responses of Griffonia simplicifolia IB4 (IB4)-positive and IB4-negative small sensory neurons. Neuroscience 127: 659-672.

Lodola A, Castelli R, Mor M és Rivara S (2015). Fatty acid amide hydrolase inhibitors: a patent review (2009-2014). Expert opinion on therapeutic patents 25: 1247-1266.

Long LE, Chesworth R, Huang XF, McGregor IS, Arnold JC és Karl T (2010). A behavioural comparison of acute and chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in C57BL/6JArc mice. Int J Neuropsychopharmacol 13: 861-876.

Lopshire JC és Nicol GD (1998). The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 18: 6081-6092.

Lynch DL és Reggio PH (2005). Molecular dynamics simulations of the endocannabinoid N-arachidonoylethanolamine (anandamide) in a phospholipid bilayer: probing structure and dynamics. J Med Chem 48: 4824-4833.

Maccarrone M (2017). Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. Frontiers in molecular neuroscience 10: 166.

Maccarrone M és Finazzi-Agro A (2002). Endocannabinoids and their actions. Vitam Horm 65: 225-255.

Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S és Patapoutian A (2005). The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. Curr Biol 15: 929-934.

Maggi CA, Barbanti G, Santicioli P, Beneforti P, Misuri D, Meli A és Turini D (1989). Cystometric evidence that capsaicin-sensitive nerves modulate the afferent branch of micturition reflex in humans. The Journal of urology 142: 150-154.

Maggi CA, Santicioli P, Geppetti P, Furio M, Frilli S, Conte B, Fanciullacci M, Giuliani S és Meli A (1987). The contribution of capsaicin-sensitive innervation to activation of the spinal vesico-vesical reflex in rats: relationship between substance P levels in the urinary bladder and the sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. Brain research 415: 1-13.

Maggi CA, Santicioli P, Giuliani S, Regoli D és Meli A (1986). Activation of micturition reflex by substance P and substance K: indirect evidence for the existence of multiple tachykinin receptors in the rat urinary bladder. J Pharmacol Exp Ther 238: 259-266.

Maggi CA, Santicioli P és Meli A (1985). Evidence for the involvement of endogenous substance P in the motor effects of capsaicin on the rat urinary bladder. The Journal of pharmacy and pharmacology 37: 203-204.

Mahmud A, Santha P, Paule CC és Nagy I (2009). Cannabinoid 1 receptor activation inhibits transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-mediated cationic influx into rat cultured primary sensory neurons. Neuroscience 162: 1202-1211.

Mailleux P és Vanderhaeghen JJ (1992). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. Neuroscience 48: 655-668.

Maione S, De Petrocellis L, de Novellis V, Moriello AS, Petrosino S, Palazzo E, Rossi FS, Woodward DF és Di Marzo V (2007). Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. Br J Pharmacol 150: 766-781.

Makriyannis A, Tian X és Guo J (2005). How lipophilic cannabinergic ligands reach their receptor sites. Prostaglandins & other lipid mediators 77: 210-218.

Malek N, Mrugala M, Makuch W, Kolosowska N, Przewlocka B, Binkowski M, Czaja M, Morera E, Di Marzo V és Starowicz K (2015). A multi-target approach for pain treatment: dual inhibition of fatty acid amide hydrolase and TRPV1 in a rat model of osteoarthritis. Pain 156: 890-903.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC és Bonner TI (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature 346: 561-564.

McFarland MJ, Bardell TK, Yates ML, Placzek EA és Barker EL (2008). RNA interference-mediated knockdown of dynamin 2 reduces endocannabinoid uptake into neuronal dCAD cells. Mol Pharmacol 74: 101-108.

McFarland MJ, Porter AC, Rakhshan FR, Rawat DS, Gibbs RA és Barker EL (2004). A role for caveolae/lipid rafts in the uptake and recycling of the endogenous cannabinoid anandamide. J Biol Chem 279: 41991-41997.

McFarland MJ, Terebova EA és Barker EL (2006). Detergent-resistant membrane microdomains in the disposition of the lipid signaling molecule anandamide. The AAPS journal 8: E95-100.

McKemy DD, Neuhausser WM és Julius D (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. Nature 416: 52-58.

McVey DC, Schmid PC, Schmid HH és Vigna SR (2003). Endocannabinoids induce ileitis in rats via the capsaicin receptor (VR1). J Pharmacol Exp Ther 304: 713-722.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR és et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. Biochem Pharmacol 50: 83-90.

Merriam FV, Wang ZY, Hillard CJ, Stuhr KL és Bjorling DE (2011). Inhibition of fatty acid amide hydrolase suppresses referred hyperalgesia induced by bladder inflammation. BJU international 108: 1145-1149.

Meyers MJ, Long SA, Pelc MJ, Wang JL, Bowen SJ, Schweitzer BA, Wilcox MV, McDonald J, Smith SE, Foltin S, Rumsey J, Yang YS, Walker MC, Kamtekar S, Beidler D és Thorarensen A (2011). Discovery of novel spirocyclic inhibitors of fatty acid amide hydrolase (FAAH). Part 2. Discovery of 7-azaspiro[3.5]nonane urea PF-04862853, an orally efficacious inhibitor of fatty acid amide hydrolase (FAAH) for pain. Bioorganic & medicinal chemistry letters 21: 6545-6553.

Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM és Szallasi A (2000). Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 3655-3660.

Michael GJ és Priestley JV (1999). Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 19: 1844-1854.

Milburn T, Saint DA és Chung SH (1995). The temperature dependence of conductance of the sodium channel: implications for mechanisms of ion permeation. Receptors & channels 3: 201-211.

Min X, Thibault ST, Porter AC, Gustin DJ, Carlson TJ, Xu H, Lindstrom M, Xu G, Uyeda C, Ma Z, Li Y, Kayser F, Walker NP és Wang Z (2011). Discovery and molecular basis of potent noncovalent inhibitors of fatty acid amide hydrolase (FAAH). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108: 7379-7384.

Mistry S, Paule CC, Varga A, Photiou A, Jenes A, Avelino A, Buluwela L és Nagy I (2014). Prolonged exposure to bradykinin and prostaglandin E2 increases TRPV1 mRNA but does not alter TRPV1 and TRPV1b protein expression in cultured rat primary sensory neurons. Neuroscience letters 564: 89-93.

Mitrirattanakul S, Ramakul N, Guerrero AV, Matsuka Y, Ono T, Iwase H, Mackie K, Faull KF és Spigelman I (2006). Site-specific increases in peripheral cannabinoid receptors and their endogenous ligands in a model of neuropathic pain. Pain 126: 102-114.

Miyazato M, Kadekawa K, Kitta T, Wada N, Shimizu N, de Groat WC, Birder LA, Kanai AJ, Saito S és Yoshimura N (2017). New Frontiers of Basic Science Research in Neurogenic Lower Urinary Tract Dysfunction. The Urologic clinics of North America 44: 491-505.

Mohammadi-Farani A, Sahebgharani M, Sepehrizadeh Z, Jaberi E és Ghazi-Khansari M (2010). Diabetic thermal hyperalgesia: role of TRPV1 and CB1 receptors of periaqueductal gray. Brain research 1328: 49-56.

Mohapatra DP és Nau C (2003). Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. J Biol Chem 278: 50080-50090.

Mohapatra DP, Wang SY, Wang GK és Nau C (2003). A tyrosine residue in TM6 of the Vanilloid Receptor TRPV1 involved in desensitization and calcium permeability of capsaicin-activated currents. Mol Cell Neurosci 23: 314-324.

Molliver DC, Radeke MJ, Feinstein SC és Snider WD (1995). Presence or absence of TrkA protein distinguishes subsets of small sensory neurons with unique cytochemical characteristics and dorsal horn projections. The Journal of comparative neurology 361: 404-416.

Morales-Lazaro SL, Simon SA és Rosenbaum T (2013). The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). The Journal of physiology 591: 3109-3121.

Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Garcia-Sanz N és Ferrer-Montiel A (2004). Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. J Biol Chem 279: 25665-25672.

Morishita J, Okamoto Y, Tsuboi K, Ueno M, Sakamoto H, Maekawa N és Ueda N (2005). Regional distribution and age-dependent expression of N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D in rat brain. Journal of neurochemistry 94: 753-762.

Morisset V, Ahluwalia J, Nagy I és Urban L (2001). Possible mechanisms of cannabinoid-induced antinociception in the spinal cord. European journal of pharmacology 429: 93-100.

Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S és Tominaga M (2005). Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. Molecular pain 1: 3.

Moriyama T, Iida T, Kobayashi K, Higashi T, Fukuoka T, Tsumura H, Leon C, Suzuki N, Inoue K, Gachet C, Noguchi K és Tominaga M (2003). Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 23: 6058-6062.

Movahed P, Jonsson BA, Birnir B, Wingstrand JA, Jorgensen TD, Ermund A, Sterner O, Zygmunt PM és Hogestatt ED (2005). Endogenous unsaturated C18 N-acylethanolamines are vanilloid receptor (TRPV1) agonists. J Biol Chem 280: 38496-38504.

Muir WW, 3rd és Woolf CJ (2001). Mechanisms of pain and their therapeutic implications. Journal of the American Veterinary Medical Association 219: 1346-1356.

Nagy B, Fedonidis C, Photiou A, Wahba J, Paule CC, Ma D, Buluwela L és Nagy I (2009a). Capsaicin-sensitive primary sensory neurons in the mouse express N-Acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D. Neuroscience 161: 572-577.

Nagy I (2004). Sensory processing: primary afferent neurons/DRG. Anesthetic Pharmacology: Physiologic Principles and Clinical Practice, eds: Evers and Maze: 187-197.

Nagy I, Friston D, Valente JS, Torres Perez JV és Andreou AP (2014). Pharmacology of the capsaicin receptor, transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel. Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung Progres des recherches pharmaceutiques 68: 39-76.

Nagy I, Pabla R, Matesz C, Dray A, Woolf CJ és Urban L (1993). Cobalt uptake enables identification of capsaicin- and bradykinin-sensitive subpopulations of rat dorsal root ganglion cells in vitro. Neuroscience 56: 241-246.

Nagy I, Paule CC és White JP (2009b). Molecular mechanisms of TRPV1-mediated pain. Neuroimmune biology 8: 75-99.

Nagy I és Rang H (1999a). Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. Neuroscience 88: 995-997.

Nagy I és Rang HP (1999b). Similarities and differences between the responses of rat sensory neurons to noxious heat and capsaicin. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 19: 10647-10655.

Nagy I, Santha P, Jancso G és Urban L (2004). The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. European journal of pharmacology 500: 351-369.

Nagy I, White JP, Paule CC, Maze M és Urban L (2008). Functional Molecular Biology of the TRPV 1 Ion Channel. In Cannabinoids and the Brain. Springer, pp 101-130.

Nagy I és Woolf CJ (1996). Lignocaine selectively reduces C fibre-evoked neuronal activity in rat spinal cord in vitro by decreasing N-methyl-D-aspartate and neurokinin receptor-mediated post-synaptic depolarizations; implications for the development of novel centrally acting analgesics. Pain 64: 59-70.

Nagy I; Bevan, S; Urban, L; Yacoob, M (2011). Retraction. Activation of capsaicinsensitive primary sensory neurones induces anandamide production and release. Journal of neurochemistry 119: 890.

Nagy I és Rice A (2003) Applied physiology of inflammatory pain. In: *Acute Pain, Clinical Pain Management*, eds: Rowbotham and Macintyre, Arnold, London, pp. 17-41.

Naidu PS, Kinsey SG, Guo TL, Cravatt BF és Lichtman AH (2010). Regulation of inflammatory pain by inhibition of fatty acid amide hydrolase. J Pharmacol Exp Ther 334: 182-190.

Naziroglu M (2015). TRPV1 Channel: A Potential Drug Target for Treating Epilepsy. Current neuropharmacology 13: 239-247.

Nemeth J, Helyes Z, Than M, Jakab B, Pinter E és Szolcsanyi J (2003). Concentration-dependent dual effect of anandamide on sensory neuropeptide release from isolated rat tracheae. Neuroscience letters 336: 89-92.

Nerandzic V, Mrozkova P, Adamek P, Spicarova D, Nagy I és Palecek J (2018). Peripheral inflammation affects modulation of nociceptive synaptic transmission in the spinal cord induced by N-arachidonoylphosphatidylethanolamine. Br J Pharmacol 175: 2322-2336.

Nieto-Posadas A, Picazo-Juarez G, Llorente I, Jara-Oseguera A, Morales-Lazaro S, Escalante-Alcalde D, Islas LD és Rosenbaum T (2011). Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. Nat Chem Biol 8: 78-85.

Nilius B és Appendino G (2011). Tasty and healthy TR(i)Ps. The human quest for culinary pungency. EMBO Rep 12: 1094-1101.

Nilius B és Owsianik G (2011). The transient receptor potential family of ion channels. Genome Biol. 12: 218.

Nilius B és Voets T (2005). TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. Pflugers Archiv : European journal of physiology 451: 1-10.

Noguchi K, Herr D, Mutoh T és Chun J (2009). Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. Curr Opin Pharmacol 9: 15-23.

Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H és Tominaga M (2003). Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 8002-8006.

Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H és Tominaga M (2002). Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. J Biol Chem 277: 13375-13378.

Ogun-Muyiwa P, Helliwell R, McIntyre P és Winter J (1999). Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) regulates VR1 and substance P in cultured sensory neurons. Neuroreport 10: 2107-2111.

Oh U, Hwang SW és Kim D (1996). Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 16: 1659-1667.

Ohta T, Imagawa T és Ito S (2007). Novel agonistic action of mustard oil on recombinant and endogenous porcine transient receptor potential V1 (pTRPV1) channels. Biochem Pharmacol 73: 1646-1656.

Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T és Ueda N (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. J Biol Chem 279: 5298-5305.

Okamoto Y, Wang J, Morishita J és Ueda N (2007). Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. Chemistry & biodiversity 4: 1842-1857.

Okine BN, Norris LM, Woodhams S, Burston J, Patel A, Alexander SP, Barrett DA, Kendall DA, Bennett AJ és Chapman V (2012). Lack of effect of chronic pretreatment with the FAAH inhibitor URB597 on inflammatory pain behaviour: evidence for plastic changes in the endocannabinoid system. Br J Pharmacol 167: 627-640.

Ortega-Gutierrez S, Hawkins EG, Viso A, Lopez-Rodriguez ML és Cravatt BF (2004). Comparison of anandamide transport in FAAH wild-type and knockout neurons: evidence for contributions by both FAAH and the CB1 receptor to anandamide uptake. Biochemistry 43: 8184-8190.

Padgett LW, Howlett AC és Shim JY (2008). Binding mode prediction of conformationally restricted anandamide analogs within the CB1 receptor. J Mol Signal 3: 5.

Pan JP, Zhang HQ, Wei W, Guo YF, Na X, Cao XH és Liu LJ (2011). Some subtypes of endocannabinoid/endovanilloid receptors mediate docosahexaenoic acid-induced enhanced spatial memory in rats. Brain research 1412: 18-27.

Pawsey S, Wood M, Browne H, Donaldson K, Christie M és Warrington S (2016). Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of FAAH Inhibitor V158866: A Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled Phase I Study in Healthy Volunteers. Drugs in R&D 16: 181-191.

Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S és Patapoutian A (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. Cell 108: 705-715.

Pernia-Andrade AJ, Kato A, Witschi R, Nyilas R, Katona I, Freund TF, Watanabe M, Filitz J, Koppert W, Schuttler J, Ji G, Neugebauer V, Marsicano G, Lutz B, Vanegas H és Zeilhofer HU (2009). Spinal endocannabinoids and CB1 receptors mediate C-

fiber-induced heterosynaptic pain sensitization. Science (New York, NY) 325: 760-764.

Perry MJ és Lawson SN (1998). Differences in expression of oligosaccharides, neuropeptides, carbonic anhydrase and neurofilament in rat primary afferent neurons retrogradely labelled via skin, muscle or visceral nerves. Neuroscience 85: 293-310.

Pertwee RG (2005). Pharmacological actions of cannabinoids. Handbook of experimental pharmacology: 1-51.

Petrosino S és Di Marzo V (2010). FAAH and MAGL inhibitors: therapeutic opportunities from regulating endocannabinoid levels. Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000) 11: 51-62.

Petruska JC, Napaporn J, Johnson RD, Gu JG és Cooper BY (2000). Subclassified acutely dissociated cells of rat DRG: histochemistry and patterns of capsaicin-, proton-, and ATP-activated currents. Journal of neurophysiology 84: 2365-2379.

Picazo-Juarez G, Romero-Suarez S, Nieto-Posadas A, Llorente I, Jara-Oseguera A, Briggs M, McIntosh TJ, Simon SA, Ladron-de-Guevara E, Islas LD és Rosenbaum T (2011). Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel. J Biol Chem 286: 24966-24976.

Piscitelli F és Di Marzo V (2012). "Redundancy" of endocannabinoid inactivation: new challenges and opportunities for pain control. ACS chemical neuroscience 3: 356-363.

Pisi G, Olivieri D és Chetta A (2009). The airway neurogenic inflammation: clinical and pharmacological implications. Inflammation & allergy drug targets 8: 176-181.

Placzek EA, Okamoto Y, Ueda N és Barker EL (2008). Mechanisms for recycling and biosynthesis of endogenous cannabinoids anandamide and 2-arachidonylglycerol. Journal of neurochemistry 107: 987-1000.

Plenderleith MB és Snow PJ (1993). The plant lectin Bandeiraea simplicifolia I-B4 identifies a subpopulation of small diameter primary sensory neurones which innervate the skin in the rat. Neuroscience letters 159: 17-20.

Por ED, Bierbower SM, Berg KA, Gomez R, Akopian AN, Wetsel WC és Jeske NA (2012). beta-Arrestin-2 desensitizes the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel. J Biol Chem 287: 37552-37563.

Porszasz J és Jancso N (1959). Studies on the action potentials of sensory nerves in animals desensitized with capsaicine. Acta physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae 16: 299-306.

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB és Felder CC (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. J Pharmacol Exp Ther 301: 1020-1024.

Postnov A, Schmidt ME, Pemberton DJ, de Hoon J, van Hecken A, van den Boer M, Zannikos P, van der Ark P, Palmer JA, Rassnick S, Celen S, Bormans G és van Laere K (2018). Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibition by JNJ-42165279: A Multiple-Ascending Dose and a Positron Emission Tomography Study in Healthy Volunteers. Clinical and translational science 11: 397-404.

Potenzieri C, Brink TS és Simone DA (2009). Excitation of cutaneous C nociceptors by intraplantar administration of anandamide. Brain research 1268: 38-47.

Premkumar LS és Ahern GP (2000). Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. Nature 408: 985-990.

Prescott ED és Julius D (2003). A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. Science (New York, NY) 300: 1284-1288.

Price J (1985). An immunohistochemical and quantitative examination of dorsal root ganglion neuronal subpopulations. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 5: 2051-2059.

Price TJ és Gold MS (2017). From Mechanism to Cure: Renewing the Goal to Eliminate the Disease of Pain. Pain medicine (Malden, Mass).

Price TJ, Helesic G, Parghi D, Hargreaves KM és Flores CM (2003). The neuronal distribution of cannabinoid receptor type 1 in the trigeminal ganglion of the rat. Neuroscience 120: 155-162.

Price TJ, Patwardhan A, Akopian AN, Hargreaves KM és Flores CM (2004a). Cannabinoid receptor-independent actions of the aminoalkylindole WIN 55,212-2 on trigeminal sensory neurons. Br J Pharmacol 142: 257-266.

Price TJ, Patwardhan A, Akopian AN, Hargreaves KM és Flores CM (2004b). Modulation of trigeminal sensory neuron activity by the dual cannabinoid-vanilloid agonists anandamide, N-arachidonoyl-dopamine and arachidonyl-2-chloroethylamide. Br J Pharmacol 141: 1118-1130.

Rakhshan F, Day TA, Blakely RD és Barker EL (2000). Carrier-mediated uptake of the endogenous cannabinoid anandamide in RBL-2H3 cells. J Pharmacol Exp Ther 292: 960-967.

Rathee PK, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang GK, Wang SY, Nau C és Kress M (2002). PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 22: 4740-4745.

Raychaudhuri SP és Raychaudhuri SK (2004). Role of NGF and neurogenic inflammation in the pathogenesis of psoriasis. Progress in brain research 146: 433-437.

Re G, Barbero R, Miolo A és Di Marzo V (2007). Palmitoylethanolamide, endocannabinoids and related cannabimimetic compounds in protection against tissue inflammation and pain: potential use in companion animals. Vet J 173: 21-30.

Rice AS, Farquhar-Smith WP és Nagy I (2002). Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 66: 243-256.

Richardson JD, Kilo S és Hargreaves KM (1998). Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. Pain 75: 111-119.

Riera CE, Vogel H, Simon SA és le Coutre J (2007). Artificial sweeteners and salts producing a metallic taste sensation activate TRPV1 receptors. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology 293: R626-634.

Roca-Lapirot O, Radwani H, Aby F, Nagy F, Landry M és Fossat P (2018). Calcium signalling through L-type calcium channels: role in pathophysiology of spinal nociceptive transmission. Br J Pharmacol 175: 2362-2374.

Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodriguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C és Piomelli D (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. Nature 414: 209-212.

Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW és Steinhoff M (2006). Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. Physiological reviews 86: 1309-1379.

Rosell S és Agurell S (1975). Effects of 7-hydroxy-delta-6-tetrahydrocannabinol and some related cannabinoids on the guinea pig isolated ileum. Acta physiologica Scandinavica 94: 142-144.

Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M és Gordon SE (2004). Ca2+/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. J Gen Physiol 123: 53-62.

Ross RA (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. Br J Pharmacol 140: 790-801.

Russo R, Loverme J, La Rana G, Compton TR, Parrott J, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Calignano A és Piomelli D (2007). The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 (cyclohexylcarbamic acid 3'-carbamoylbiphenyl-3-yl ester) reduces neuropathic pain after oral administration in mice. J Pharmacol Exp Ther 322: 236-242.

Russo S és De Azevedo WF (2018). Advances in the Understanding of the Cannabinoid Receptor 1 - Focusing on the Inverse Agonists Interactions. Current medicinal chemistry.

Ryu S, Liu B, Yao J, Fu Q és Qin F (2007). Uncoupling proton activation of vanilloid receptor TRPV1. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 27: 12797-12807.

Sagar DR, Smith PA, Millns PJ, Smart D, Kendall DA és Chapman V (2004). TRPV1 and CB(1) receptor-mediated effects of the endovanilloid/endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine on primary afferent fibre and spinal cord neuronal responses in the rat. The European journal of neuroscience 20: 175-184.

Sakin YS, Dogrul A, Ilkaya F, Seyrek M, Ulas UH, Gulsen M és Bagci S (2015). The effect of FAAH, MAGL, and Dual FAAH/MAGL inhibition on inflammatory and colorectal distension-induced visceral pain models in Rodents. Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society 27: 936-944.

Salazar H, Jara-Oseguera A, Hernandez-Garcia E, Llorente I, Arias O, II, Soriano-Garcia M, Islas LD és Rosenbaum T (2009). Structural determinants of gating in the TRPV1 channel. Nat Struct Mol Biol 16: 704-710.

Sandkuhler J (2009). Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. Physiological reviews 89: 707-758.

Santha P, Jenes A, Somogyi C és Nagy I (2010a). The endogenous cannabinoid anandamide inhibits transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-mediated currents in rat cultured primary sensory neurons. Acta physiologica Hungarica 97: 149-158.

Santha P, Oszlacs O, Dux M, Dobos I és Jancso G (2010b). Inhibition of glucosylceramide synthase reversibly decreases the capsaicin-induced activation and TRPV1 expression of cultured dorsal root ganglion neurons. Pain 150: 103-112.

Santicioli P, Maggi CA és Meli A (1985). The effect of capsaicin pretreatment on the cystometrograms of urethane anesthetized rats. The Journal of urology 133: 700-703.

Sasso O, Bertorelli R, Bandiera T, Scarpelli R, Colombano G, Armirotti A, Moreno-Sanz G, Reggiani A és Piomelli D (2012). Peripheral FAAH inhibition causes profound antinociception and protects against indomethacin-induced gastric lesions. Pharmacol Res 65: 553-563.

Sasso O, Wagner K, Morisseau C, Inceoglu B, Hammock BD és Piomelli D (2015). Peripheral FAAH and soluble epoxide hydrolase inhibitors are synergistically antinociceptive. Pharmacol Res 97: 7-15.

Sathianathan V, Avelino A, Charrua A, Santha P, Matesz K, Cruz F és Nagy I (2003). Insulin induces cobalt uptake in a subpopulation of rat cultured primary sensory neurons. The European journal of neuroscience 18: 2477-2486.

Scarpelli R, Sasso O és Piomelli D (2016). A Double Whammy: Targeting Both Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) and Cyclooxygenase (COX) To Treat Pain and Inflammation. ChemMedChem 11: 1242-1251.

Schmid HH, Schmid PC és Berdyshev EV (2002). Cell signaling by endocannabinoids and their congeners: questions of selectivity and other challenges. Chem Phys Lipids 121: 111-134.

Schmid PC, Kuwae T, Krebsbach RJ és Schmid HH (1997a). Anandamide and other N-acylethanolamines in mouse peritoneal macrophages. Chemistry and physics of lipids 87: 103-110.

Schmid PC, Paria BC, Krebsbach RJ, Schmid HH és Dey SK (1997b). Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 4188-4192.

Scholz J és Woolf CJ (2002). Can we conquer pain? Nature neuroscience 5 Suppl: 1062-1067.

Sengupta JN és Gebhart GF (1994a). Characterization of mechanosensitive pelvic nerve afferent fibers innervating the colon of the rat. Journal of neurophysiology 71: 2046-2060.

Sengupta JN és Gebhart GF (1994b). Mechanosensitive properties of pelvic nerve afferent fibers innervating the urinary bladder of the rat. Journal of neurophysiology 72: 2420-2430.

Shao Z, Yin J, Chapman K, Grzemska M, Clark L, Wang J és Rosenbaum DM (2016). High-resolution crystal structure of the human CB1 cannabinoid receptor. Nature.

Sharkey KA, Williams RG, Schultzberg M és Dockray GJ (1983). Sensory substance P-innervation of the urinary bladder: possible site of action of capsaicin in causing urine retention in rats. Neuroscience 10: 861-868.

Shin HJ, Gye MH, Chung KH és Yoo BS (2002). Activity of protein kinase C modulates the apoptosis induced by polychlorinated biphenyls in human leukemic HL-60 cells. Toxicol Lett 135: 25-31.

Siemens J, Zhou S, Piskorowski R, Nikai T, Lumpkin EA, Basbaum AI, King D és Julius D (2006). Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. Nature 444: 208-212.

Silva C, Silva J, Ribeiro MJ, Avelino A és Cruz F (2005). Urodynamic effect of intravesical resiniferatoxin in patients with neurogenic detrusor overactivity of spinal origin: results of a double-blind randomized placebo-controlled trial. European urology 48: 650-655.

Silverman JD és Kruger L (1988). Lectin and neuropeptide labeling of separate populations of dorsal root ganglion neurons and associated "nociceptor" thin axons in rat testis and cornea whole-mount preparations. Somatosensory research 5: 259-267.

Simon GM és Cravatt BF (2008). Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. J Biol Chem 283: 9341-9349.

Simone DA, Baumann TK és LaMotte RH (1989). Dose-dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin. Pain 38: 99-107.

Simone DA, Ngeow JY, Putterman GJ és LaMotte RH (1987). Hyperalgesia to heat after intradermal injection of capsaicin. Brain research 418: 201-203.

Singh Tahim A, Santha P és Nagy I (2005). Inflammatory mediators convert anandamide into a potent activator of the vanilloid type 1 transient receptor potential receptor in nociceptive primary sensory neurons. Neuroscience 136: 539-548.

Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P és Davis JB (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. Nature 418: 186-190.

Snider WD és McMahon SB (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. Neuron 20: 629-632.

Soneji ND, Paule CC, Mlynarczyk M és Nagy I (2010). Effects of cannabinoids on capsaicin receptor activity following exposure of primary sensory neurons to inflammatory mediators. Life Sci 87: 162-168.

Song C és Howlett AC (1995). Rat brain cannabinoid receptors are N-linked glycosylated proteins. Life Sci 56: 1983-1989.

Sorkin LS, Eddinger KA, Woller SA és Yaksh TL (2018). Origins of antidromic activity in sensory afferent fibers and neurogenic inflammation. Seminars in immunopathology 40: 237-247.

Sousa-Valente J, Andreou AP, Urban L és Nagy I (2014a). Transient receptor potential ion channels in primary sensory neurons as targets for novel analgesics. Br J Pharmacol 171: 2508-2527.

Sousa-Valente J, Varga A, Ananthan K, Khajuria A és Nagy I (2014b). Anandamide in primary sensory neurons: too much of a good thing? The European journal of neuroscience 39: 409-418.

Sousa-Valente J, Varga A, Torres-Perez JV, Jenes A, Wahba J, Mackie K, Cravatt B, Ueda N, Tsuboi K, Santha P, Jancso G, Tailor H, Avelino A és Nagy I (2017). Inflammation of peripheral tissues and injury to peripheral nerves induce differing effects in the expression of the calcium-sensitive N-arachydonoylethanolamine-synthesizing enzyme and related molecules in rat primary sensory neurons. The Journal of comparative neurology 525: 1778-1796.

Starowicz K, Cristino L és Di Marzo V (2008). TRPV1 receptors in the central nervous system: potential for previously unforeseen therapeutic applications. Current pharmaceutical design 14: 42-54.

Starowicz K, Makuch W, Korostynski M, Malek N, Slezak M, Zychowska M, Petrosino S, De Petrocellis L, Cristino L, Przewlocka B és Di Marzo V (2013). Full inhibition of spinal FAAH leads to TRPV1-mediated analgesic effects in neuropathic rats and possible lipoxygenase-mediated remodeling of anandamide metabolism. PloS one 8: e60040.

Starowicz K, Nigam S és Di Marzo V (2007). Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. Pharmacology & therapeutics 114: 13-33.

Starowicz K és Przewlocka B (2012). Modulation of neuropathic-pain-related behaviour by the spinal endocannabinoid/endovanilloid system. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences 367: 3286-3299.

Stein AT, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Santana LF és Gordon SE (2006). Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. J Gen Physiol 128: 509-522.

Storozhuk MV és Zholos AV (2018). TRP Channels as Novel Targets for Endogenous Ligands: Focus on Endocannabinoids and Nociceptive Signalling. Current neuropharmacology 16: 137-150.

Storti B, Bizzarri R, Cardarelli F és Beltram F (2012). Intact microtubules preserve transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) functionality through receptor binding. J Biol Chem 287: 7803-7811.

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 és Patapoutian A (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. Cell 112: 819-829.

Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G és Plant TD (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. Nature cell biology 2: 695-702.

Stucky CL és Lewin GR (1999). Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 19: 6497-6505.

Studer M és McNaughton PA (2010). Modulation of single-channel properties of TRPV1 by phosphorylation. The Journal of physiology 588: 3743-3756.

Su HC, Wharton J, Polak JM, Mulderry PK, Ghatei MA, Gibson SJ, Terenghi G, Morrison JF, Ballesta J és Bloom SR (1986). Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in afferent neurons supplying the urinary tract: combined retrograde tracing and immunohistochemistry. Neuroscience 18: 727-747.

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Tonegawa T, Nakane S, Yamashita A és Waku K (1996). Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca(2+)-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. Biochem Biophys Res Commun 218: 113-117.

Sun YX, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I és Ueda N (2004). Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. The Biochemical journal 380: 749-756.

Szoke E, Borzsei R, Toth DM, Lengl O, Helyes Z, Sandor Z és Szolcsanyi J (2010). Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. European journal of pharmacology 628: 67-74.

Takeda M, Tsuboi Y, Kitagawa J, Nakagawa K, Iwata K és Matsumoto S (2011). Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. Molecular pain 7: 5.

Tian X, Guo J, Yao F, Yang DP és Makriyannis A (2005). The conformation, location, and dynamic properties of the endocannabinoid ligand anandamide in a membrane bilayer. J Biol Chem 280: 29788-29795.

Tibbs GR, Posson DJ és Goldstein PA (2016). Voltage-Gated Ion Channels in the PNS: Novel Therapies for Neuropathic Pain? Trends in pharmacological sciences 37: 522-542.

Todd AJ (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. Nature reviews Neuroscience 11: 823-836.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI és Julius D (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. Neuron 21: 531-543.

Toth A, Blumberg PM és Boczan J (2009). Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1). Vitam Horm 81: 389-419.

Toth A, Boczan J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, Edes I, Csiba L és Blumberg PM (2005). Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. Brain Res Mol Brain Res 135: 162-168.

Toth A, Kedei N, Wang Y és Blumberg PM (2003). Arachidonyl dopamine as a ligand for the vanilloid receptor VR1 of the rat. Life Sci 73: 487-498.

Trevisani M, Smart D, Gunthorpe MJ, Tognetto M, Barbieri M, Campi B, Amadesi S, Gray J, Jerman JC, Brough SJ, Owen D, Smith GD, Randall AD, Harrison S, Bianchi A, Davis JB és Geppetti P (2002). Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. Nature neuroscience 5: 546-551.

Ueda H, Matsunaga H, Olaposi OI és Nagai J (2013). Lysophosphatidic acid: chemical signature of neuropathic pain. Biochim Biophys Acta 1831: 61-73.

Ueda N, Yamanaka K, Terasawa Y és Yamamoto S (1999). An acid amidase hydrolyzing anandamide as an endogenous ligand for cannabinoid receptors. FEBS Lett 454: 267-270.

Uhelski ML, Khasabova IA és Simone DA (2015). Inhibition of anandamide hydrolysis attenuates nociceptor sensitization in a murine model of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. Journal of neurophysiology 113: 1501-1510.

Uliana DL, Hott SC, Lisboa SF és Resstel LB (2016). Dorsolateral periaqueductal gray matter CB1 and TRPV1 receptors exert opposite modulation on expression of contextual fear conditioning. Neuropharmacology 103: 257-269.

Urban L, White JP és Nagy I (2011). Molecular structure of transient receptor potential vanilloid type 1 ion channel (TRPV1). Current pharmaceutical biotechnology 12: 115-121.

Valente P, Garcia-Sanz N, Gomis A, Fernandez-Carvajal A, Fernandez-Ballester G, Viana F, Belmonte C és Ferrer-Montiel A (2008). Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor I. Faseb j 22: 3298-3309.

Van Der Stelt M és Di Marzo V (2004). Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. European journal of biochemistry 271: 1827-1834.

van der Stelt M és Di Marzo V (2005). Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. Prostaglandins & other lipid mediators 77: 111-122.

van der Stelt M, Trevisani M, Vellani V, De Petrocellis L, Schiano Moriello A, Campi B, McNaughton P, Geppetti P és Di Marzo V (2005). Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca2+ influx via TRPV1 channels. The EMBO journal 24: 3026-3037.

Varga A, Jenes A, Marczylo TH, Sousa-Valente J, Chen J, Austin J, Selvarajah S, Piscitelli F, Andreou AP, Taylor AH, Kyle F, Yaqoob M, Brain S, White JP, Csernoch L, Di Marzo V, Buluwela L és Nagy I (2014). Anandamide produced by Ca(2+)-insensitive enzymes induces excitation in primary sensory neurons. Pflugers Archiv : European journal of physiology 466: 1421-1435.

Veldhuis NA, Lew MJ, Abogadie FC, Poole DP, Jennings EA, Ivanusic JJ, Eilers H, Bunnett NW és McIntyre P (2012). N-glycosylation determines ionic permeability and desensitization of the TRPV1 capsaicin receptor. J Biol Chem 287: 21765-21772.

Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB és McNaughton PA (2001). Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. The Journal of physiology 534: 813-825.

Vellani V, Petrosino S, De Petrocellis L, Valenti M, Prandini M, Magherini PC, McNaughton PA és Di Marzo V (2008). Functional lipidomics. Calcium-independent activation of endocannabinoid/endovanilloid lipid signalling in sensory neurons by protein kinases C and A and thrombin. Neuropharmacology 55: 1274-1279.

Vennekens R, Voets T, Bindels RJ, Droogmans G és Nilius B (2002). Current understanding of mammalian TRP homologues. Cell Calcium 31: 253-264.

Veress G, Meszar Z, Muszil D, Avelino A, Matesz K, Mackie K és Nagy I (2013). Characterisation of cannabinoid 1 receptor expression in the perikarya, and peripheral and spinal processes of primary sensory neurons. Brain Struct Funct 218: 733-750.

Vilceanu D, Honore P, Hogan QH és Stucky CL (2010). Spinal nerve ligation in mouse upregulates TRPV1 heat function in injured IB4-positive nociceptors. The journal of pain : official journal of the American Pain Society 11: 588-599.

Vlachova V, Teisinger J, Susankova K, Lyfenko A, Ettrich R és Vyklicky L (2003). Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 23: 1340-1350.

Voets T, Owsianik G, Janssens A, Talavera K és Nilius B (2007). TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. Nat Chem Biol 3: 174-182.

Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B és Voets T (2011). TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. Neuron 70: 482-494.

Wagenlehner FME, van Till JWO, Houbiers JGA, Martina RV, Cerneus DP, Melis J, Majek A, Vjaters E, Urban M, Ramonas H, Shoskes DA és Nickel JC (2017). Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitor Treatment in Men With Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome: An Adaptive Double-blind, Randomized Controlled Trial. Urology 103: 191-197.

Walczak JS és Cervero F (2011). Local activation of cannabinoid CB(1) receptors in the urinary bladder reduces the inflammation-induced sensitization of bladder afferents. Molecular pain 7: 31.

Walter L, Franklin A, Witting A, Moller T és Stella N (2002). Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. J Biol Chem 277: 20869-20876.

Wang H, Ehnert C, Brenner GJ és Woolf CJ (2006). Bradykinin and peripheral sensitization. Biological chemistry 387: 11-14.

Wang ZY, McDowell T, Wang P, Alvarez R, Gomez T és Bjorling DE (2014). Activation of CB1 inhibits NGF-induced sensitization of TRPV1 in adult mouse afferent neurons. Neuroscience 277: 679-689.

Ward SJ és Raffa RB (2011). Rimonabant redux and strategies to improve the future outlook of CB1 receptor neutral-antagonist/inverse-agonist therapies. Obesity (Silver Spring, Md) 19: 1325-1334.

Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES és Cravatt BF (2006). A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. J Biol Chem 281: 36569-36578.

White JP, Calcott G, Jenes A, Hossein M, Paule CC, Santha P, Davis JB, Ma D, Rice AS és Nagy I (2011a). Xenon reduces activation of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) in rat dorsal root ganglion cells and in human TRPV1-expressing HEK293 cells. Life Sci 88: 141-149.

White JP, Urban L és Nagy I (2011b). TRPV1 function in health and disease. Current pharmaceutical biotechnology 12: 130-144.

Winter J (1987). Characterization of capsaicin-sensitive neurones in adult rat dorsal root ganglion cultures. Neuroscience letters 80: 134-140.

Winter J, Forbes CA, Sternberg J és Lindsay RM (1988). Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to the excitotoxin capsaicin. Neuron 1: 973-981.

Woo DH, Jung SJ, Zhu MH, Park CK, Kim YH, Oh SB és Lee CJ (2008). Direct activation of transient receptor potential vanilloid 1(TRPV1) by diacylglycerol (DAG). Molecular pain 4: 42.

Wood JN, Winter J, James IF, Rang HP, Yeats J és Bevan S (1988). Capsaicininduced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 8: 3208-3220.

Woolf CJ (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. Nature 306: 686-688.

Woolf CJ (2004). Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. Life Sci 74: 2605-2610.

Woolf CJ (2010). What is this thing called pain? The Journal of clinical investigation 120: 3742-3744.

Woolf CJ (2014). What to call the amplification of nociceptive signals in the central nervous system that contribute to widespread pain? Pain 155: 1911-1912.

Woolf CJ és Costigan M (1999). Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96: 7723-7730.

Woolf CJ és Ma Q (2007). Nociceptors--noxious stimulus detectors. Neuron 55: 353-364.

Woolf CJ és Salter MW (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. Science (New York, NY) 288: 1765-1769.

Xie S, Furjanic MA, Ferrara JJ, McAndrew NR, Ardino EL, Ngondara A, Bernstein Y, Thomas KJ, Kim E, Walker JM, Nagar S, Ward SJ és Raffa RB (2007). The endocannabinoid system and rimonabant: a new drug with a novel mechanism of action involving cannabinoid CB1 receptor antagonism--or inverse agonism--as potential obesity treatment and other therapeutic use. Journal of clinical pharmacy and therapeutics 32: 209-231.

Xu H, Blair NT és Clapham DE (2005). Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 25: 8924-8937.

Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R és Clapham DE (2002). TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. Nature 418: 181-186.

Xu L és Gebhart GF (2008). Characterization of mouse lumbar splanchnic and pelvic nerve urinary bladder mechanosensory afferents. Journal of neurophysiology 99: 244-253.

Yang F, Cui Y, Wang K és Zheng J (2010). Thermosensitive TRP channel pore turret is part of the temperature activation pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107: 7083-7088.

Yang Y, Mis MA, Estacion M, Dib-Hajj SD és Waxman SG (2018). NaV1.7 as a Pharmacogenomic Target for Pain: Moving Toward Precision Medicine. Trends in pharmacological sciences 39: 258-275.

Yates ML és Barker EL (2009). Organized trafficking of anandamide and related lipids. Vitam Horm 81: 25-53.

Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y és Mori Y (2006). Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. Nat Chem Biol 2: 596-607.

Zhang F, Hong S, Stone V és Smith PJ (2007). Expression of cannabinoid CB1 receptors in models of diabetic neuropathy. J Pharmacol Exp Ther 323: 508-515.

Zhang X, Huang J és McNaughton PA (2005). NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. The EMBO journal 24: 4211-4223.

Zhang X, Li L és McNaughton PA (2008). Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. Neuron 59: 450-461.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D és Hogestatt ED (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. Nature 400: 452-457.

Zylka MJ (2005). Nonpeptidergic circuits feel your pain. Neuron 47: 771-772.