

**A termális hiperalgéria és antinociceptív
gyógyszerhatások állatkísérletes vizsgálata a
magatartási nociceptív hőküszöb mérésével**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Dr. Almási Róbert

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

Doktori iskola: Neurofarmakológia

Programvezető: Prof. dr. Szolcsányi János

Témavezető: dr. Pethő Gábor

2008

1. BEVEZETÉS	4
1.1. A nociceptorok általános jellemzői és fajtái	4
1.2. A hőérzékeny ioncsatornák	6
1.3. A termonocicepció és a termális hiperalgéria jellegzetességei	9
1.4. A termonocicepció klasszikus vizsgálómódszerei	11
2. CÉLKITŰZÉSEK	14
3. MÓDSZEREK	16
4. EREDMÉNYEK	21
4.1. A nociceptív hőküszöb meghatározása és direkt farmakológiai modulációja (1. saját közlemény)	21
4.1.1. A nociceptív hőküszöb reprodukálhatósága	21
4.1.2. A morfin, diclofenac és paracetamol hatása a nociceptív hőküszöbre.....	23
4.2. A resiniferatoxin (RTX) hatása a hőküszöbre és annak farmakológiai modulációja (1. saját közlemény)	24
4.2.1. A TRPV1-receptor aktivációján alapuló, hőküszöbcsökkenéssel járó termális hiperalgéria-modell kidolgozása	24
4.2.2. Morfin, diclofenac és paracetamol hatása az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenésre	27
4.2.3. A TRPV1-receptor-antagonista jód-resiniferatoxin (I-RTX) vizsgálata az emelkedő hőmérsékletű forró lappal.....	30
4.2.4. Az RTX hosszú távú hatása a nociceptív hőküszöbre.....	33
4.3. A TRPV1-receptor-génhiányos („knockout”) és vad típusú egerek nociceptív hőküszöbének összehasonlítása (1. saját közlemény)	34
4.4. Lipid jellegű vegyületek nociceptív hőküszöbre gyakorolt hatásának vizsgálata	36
4.4.1. Az <i>N</i> -oleoil-dopamin (OLDA) hőküszöbre gyakorolt hatásának vizsgálata (2. saját közlemény)	36
4.4.2. A 3-metil- <i>N</i> -oleoil-dopamin (3-MOLDA), 4-metil- <i>N</i> -oleoil-dopamin (4-MOLDA) és az <i>N</i> -oleoil-etanolamid (OEA) TRPV1-receptorra gyakorolt hatásainak vizsgálata (3. saját közlemény)	39
4.4.3. Az anandamid hatása a nociceptív hőküszöbre (3. saját közlemény).....	45
4.5. A carrageninnel kiváltott szubakut gyulladás hatása a nociceptív hőküszöbre (még nem közölt eredmények)	47
6. ÖSSZEFOGLALÁS	58
7. IRODALOMJEGYZÉK	59
8. A PhD-ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK	64
8.1. Teljes közlemények	64
8.2. Idézhető absztraktok	64
8.3. Nemzetközi kongresszusokon bemutatott poszterek	64
8.4. Hazai kongresszusi prezentációk.....	65

9. EGYÉB PUBLIKÁCIÓK	66
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	67

1. BEVEZETÉS

1.1. A nociceptorok általános jellemzői és fajtái

A fájdalomingeret felfogására specializálódott perifériás idegvégződések a nociceptorok, amelyek az elsődleges érzőneuronok egy különálló – nociceptív – populációját képező idegsejtek perifériás terminálisai. Ezen idegsejtek sejtteste – a nem nociceptív, azaz a nem fájdalmas ingerekre reagáló szenzoros neuronokhoz hasonlóan – a gerincvelő hátsó gyöki ganglionjaiban, illetve az agyi idegek érződúcaiban található. A nociceptorok általános jellegzetessége, hogy fiziológiai körülmények között olyan erősségű mechanikai, hő, illetve kémiai ingerek aktiválják őket, amelyek intenzitása elég nagy ahhoz, hogy tartós expozíció esetén szövetkárosodást okozzanak (a patológiai állapotokban kialakuló hiperalgégiák esetében kisebb intenzitású ingerek is fájdalomkeltők lehetnek). A nociceptorok aktivációján azt értjük, hogy a fent említett ingerek hatására az idegvégződés membránja depolarizálódik, és ennek következtében az axon terminális részén akciós potenciálok jönnek létre, amelyek a központi idegrendszerbe vezetődnek.

A nociceptorok több szempont szerint osztályozhatók (összefoglalóként lásd Lynn, 1994; Woolf és Ma, 2007). A mielinhüvely hiánya vagy megléte alapján beszélhetünk nem mielinizált C rostokról és vékony mielinhüvellyel rendelkező A δ rostokról. A nociceptorok másik felosztása azon alapul, hogy milyen típusú ingerekkel aktiválhatók. A fent említett aktiváló ingereknek megfelelően beszélhetünk mechano-, termo-, illetve kemonociceptorokról. Amennyiben csak egyféle inger aktiválja a nociceptorokat, akkor azokat unimodálisoknak nevezzük. Erre példa a magas küszöbű mechanoreceptorok populációja, amelyik csak mechanikai ingerekkel aktiválható. Mind a C, mind az A δ nociceptorokon belül létezik egy jelentős populáció, amelynek tagjai forró, mechanikai és kémiai (kapszaicin, bradikinin, alacsony pH stb.) ingerekkel egyaránt aktiválhatók, ezeket polimodális nociceptoroknak hívjuk. A polimodális nociceptorok – különösen a nagy számban előforduló C polimodális nociceptorok – szerepe a forró ingerek felfogásában szinte kizárólagos, mivel nem ismeretes más jelentős elemszámú rostpopuláció, amely ilyen ingerekkel aktiválható. A C polimodális nociceptorok nem keverendők össze a C rostok egy melegérzékeny csoportjával, amelyek a normális, nem szövetkárosító

melegérzetért felelősek. Ezek már 30 °C körüli hőmérsékletnél aktiválódnak, aktivációjuk mértéke azonban csak kb. 47 °C-ig nő, ennél magasabb hőmérsékletknél már csökken, mutatva, hogy nem alkalmasak a forró ingerek intenzitásának kódolására.

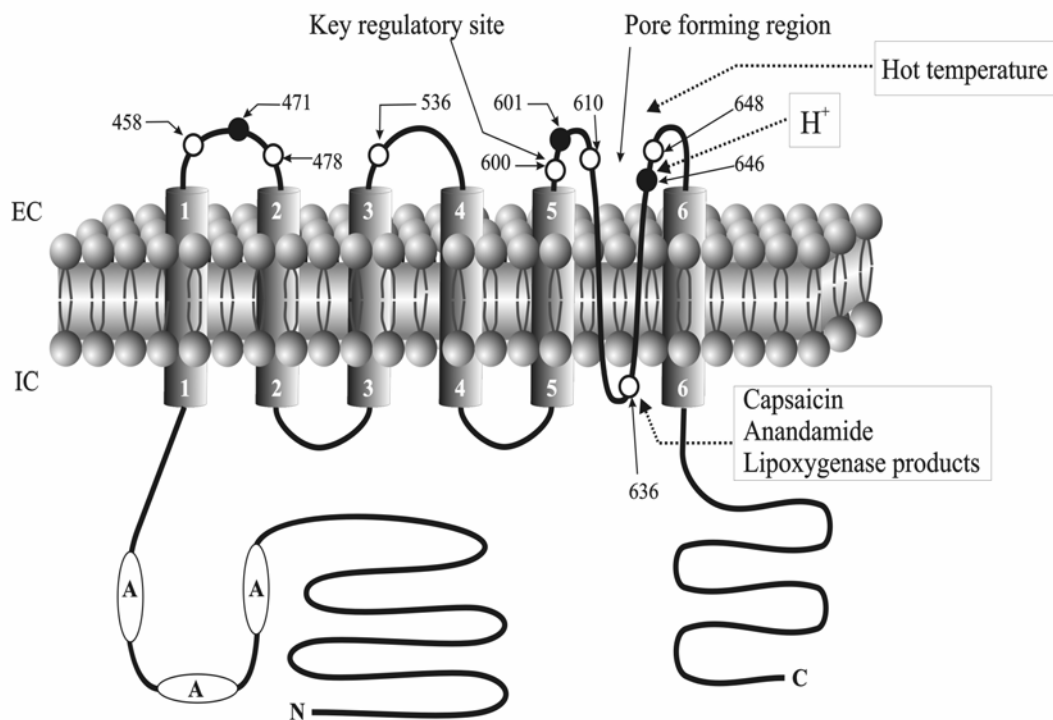
A polimodális nociceptorok további jellegzetessége, hogy membránjukban megtalálható a paprika csípős anyagának, a kapszaicinnek a farmakológiai receptora (az ún. TRPV1-receptor, részletesen lásd később). A primer afferens neuronok farmakológiai értelemben vett osztályozása kapszaicin-érzékeny és kapszaicin-inszenzitív csoportokra több mint húsz évre tekint vissza: kapszaicin intraarteriális vagy felületi alkalmazása bőr–ideg preparátumon izgatta a C és A δ polimodális nociceptorokat, de az alacsony vagy magas küszöbű C mechanoreceptorokban, C vagy A δ hidegreceptorokban, illetve a gyorsan és lassan adaptálódó mechanoreceptorokban nem volt kimutatható excitáció (Szolcsányi, 1987a). Ezen az alapon beszélünk a primer afferens neuronok kapszaicin-érzékeny populációjáról, amelyik lényegében a polimodális nociceptorok csoportjával azonos. Ezeknek az idegelemeknek van egy jelentős alcsoportja, amelyik neuropeptideket, mint P-anyag („substance P”, SP), neurokinin A (NKA), calcitonin „gén-rokon” peptid (CGRP), szomatosztatin tartalmaz (összefoglalóként lásd Holzer, 1991; Maggi, 1995; Szolcsányi, 1996; Szállási és Blumberg, 1999). Ezen peptiderg nociceptorok – hasonlóan a többi afferensekhez – inger hatására aktiválódnak, ennek során depolarizálódnak és akciós potenciál formájában információt közvetítenek a központi idegrendszer felé, ez a klasszikus *afferens* funkciójuk. Emellett aktiválódásuk során a tárolt neuropeptidok exocytosis révén felszabadulnak az idegvégződésből, és parakrin mediátorként hatva a környező szöveti struktúrákon *efferens* hatásokat váltanak ki, amely lehet értágulat, plazma-extravasatio, simaizom-kontrakció vagy -relaxáció. A kapszaicin-érzékeny, peptiderg polimodális nociceptorok tehát kettős, afferens–efferens funkcióval bírnak, és ez utóbbi a felelős a neurogén gyulladás és számos más nem-adrenerg nem-kolinerg (NANC) szöveti válasz létrehozásáért (Jancsó és mtsai, 1967; 1968; Maggi, 1995; Szolcsányi, 1996).

1.2. A hőérzékeny ioncsatornák

A kapszaicin hatásait közvetítő farmakológiai receptor létezését szerkezet-hatás összefüggésének analízise alapján már több mint harminc évvel ezelőtt felvetették (Szolcsányi és Jancsó-Gábor, 1975). A 80-as évektől kezdve egyértelmű bizonyítékok gyűltek össze a kapszaicinreceptor, illetve egy kapszaicin-vezérelt kationcsatorna létezésére vonatkozóan (Bevan és Szolcsányi, 1990; Szállási és mtsai, 1993; 1995), és végül 1997-ben molekuláris klónozás révén azonosították a kapszaicinreceptort (Caterina és mtsai, 1997). A polimodális nociceptorok expresszálják ezt a fehérjét, amely e neuronok kapszaicinérzékenységeért felelős. Speciális sajátossága e receptornak, hogy forró (≥ 43 °C) ingerek, illetve számos egyéb kémiai ágens (lásd lejjebb) hatására is aktiválódik. A *Drosophilában* már régen azonosított tranziens receptor potenciál (TRP) típusú kationcsatornákkal való szerkezeti hasonlóság miatt ezt a receptort tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) receptornak nevezik, mivel az elsőként leírt kémiai aktivátora, a kapszaicin vanilloid szerkezetű vegyület. Régebbi nomenklatúra alapján vanilloid receptor 1 (VR1) néven említették e struktúrát, amely tehát a kapszaicin farmakológiai receptora és egyben az elsőként felfedezett hővel aktiválható ioncsatorna. A TRPV1-receptor hat, a sejtmembránt átszelő alegységből áll, amelyek közül az 5. és 6. domén ioncsatornát (pórust) képez (1. ábra). Funkcióját tekintve a TRPV1-receptor ligandum-vezérelt kationcsatorna, amely aktivált állapotában Na^+ , K^+ és Ca^{2+} ionokat egyaránt átenged, és a domináló Na^+ -áram révén depolarizálódik a sejtmembrán.

A TRPV1-receptor nemcsak hővel és kapszaicinnal, hanem más kémiai ingerekkel is aktiválható. A resiniferatoxin (RTX) szintén növényi eredetű irritáns, amely nagyságrendekkel potensebb, mint a kapszaicin (összefoglalóként lásd Szolcsányi és mtsai, 1990; Szállási és Blumberg, 1999). Számos endogén, azaz a testben előforduló anyagról (protonok [alacsony pH], bradykinin, ATP, anandamid, lipoxigenáz-termékek stb.) kimutatták, hogy képes aktiválni a TRPV1-receptort (összefoglalóként lásd Pingle és mtsai, 2007). Mindezek alapján ez a membránfehérje fizikai és kémiai nociceptív ingerek molekuláris integrátoraként funkcionál (Tominaga és mtsai, 1998). Bár a TRPV1-receptor forró ingerekkel aktiválható, meglepő módon TRPV1-receptor-génhiányos („knockout”) egerekben nem károsodik a forró ingerek detektálása, de elmarad a gyulladáshoz vezető reakció során

kifejlődő termális hiperalgézia (Caterina és mtsai, 2000; Davis és mtsai, 2000; Woodbury és mtsai, 2004; Bölcskei és mtsai, 2005; Zimmermann és mtsai, 2005).



1. ábra. A TRPV1 kapszaicinreceptor szerkezete és funkcionális modellje. EC: extracelluláris tér, IC: intracelluláris tér, A: ankyrin domének, a számok aminosavakat jeleznek (Tominaga és Tominaga, 2005 munkájából).

A TRPV1-receptor-agonisták néhány képviselője (kapszaicin, RTX) egyedülálló abban a tekintetben, hogy a kezdeti izgató hatást követően egy tartós refrakter állapotot hoz létre, amelyet szenzoros deszenzibilizációnak nevezünk (Jancsó, 1959; összefoglalóként lásd Holzer, 1991; Szolcsányi, 1993; 2003; Szállási és Blumberg, 1999). A magasabb dózisban vagy hosszabb ideig adagolt kapszaicin vagy RTX csökkent válaszkészséget okoz hő, mechanikai és kémiai ingerekkel szemben egyaránt. Ez nem receptordeszenzibilizáció, vagyis nemcsak a TRPV1-receptoron ható ágensek iránti válaszkészség csökken, hanem a TRPV1-receptort expresszáló nociceptív idegvégződés egészének funkciósökkenéséről van szó, melynek hátterében dózistól függően ultrastrukturális vagy markánsabb morfológiai eltérések állnak (Szolcsányi és mtsai, 1975; Szállási és mtsai, 1989; összefoglalóként lásd Szolcsányi, 2003).

A TRPV1-receptoron ható antagonisták is ismeretesek. Ezek közül a capsazepin a kapszaicin vagy az RTX hatását kompetitíve gátló szer, míg a ruténium vörös a TRPV1-receptor ioncsatorna részét blokkoló ágens. A jód-resiniferatoxin (I-RTX) egy újabban szintetizált TRPV1-receptor-antagonista, amely hasonló mechanizmussal hat, mint a capsazepin, de jóval potensebb annál (Wahl és mtsai, 2001; Rigoni és mtsai, 2003). További TRPV1-receptor-antagonisták is ismeretesek (összefoglalóként lásd Szállási, 2006).

A TRPV1-receptor felfedezését követően további öt, hasonló szerkezetű membránfehérjét azonosítottak molekuláris klónozással, így a TRPV-receptorcsalád – azaz a TRP-receptorcsalád vanilloid alcsoportja – hat tagból (TRPV1-6, 1. táblázat) áll, amelyek közül a TRPV2, TRPV3 és TRPV4 bizonyult még hőérzékenynek eltérő aktivációs küszöbökkel (összefoglalóként lásd Benham és mtsai, 2003, Dhaka és mtsai, 2006). Ezek szintén nem-szelektív kationcsatornák, de érdekes módon nem aktiválhatók kapszaicinnal, viszont a TRPV1-hez hasonlóan gátolhatók ruténium vörössel. Érdekes, hogy a hűvös és hideg ingerekkel aktiválható ioncsatornák a TRP-család más alosztályaiba tartozó fehérjék, a 25–28 °C küszöbű TRPM8 és a hidegebb ingerekkel (< 17 °C) aktiválható, feltehetően a hideg-fájdalomért felelős, TRPV1-gyel kolokalizált TRPA1 a (részleteket illetően lásd Dhaka és mtsai, 2006).

Hivatalos név	Korábbi név	Előfordulás	Aktivátor	Gátló
TRPV1	VR1	primer afferens neuronok, agy, húgyhólyag, keratinocyták	kapszaicin resiniferatoxin anandamid $T \geq 43 \text{ }^\circ\text{C}$ $\text{pH} < 6$	capsazepin jód-resiniferatoxin ruténium vörös
TRPV2	VRL-1	primer afferens neuronok, agy, gerincvelő, lép, tüdő	$T \geq 52 \text{ }^\circ\text{C}$	ruténium vörös
TRPV3	VRL-3	primer afferens neuronok, keratinocyták	$T \geq 33 \text{ }^\circ\text{C}$	ruténium vörös
TRPV4	VRL-2	keratinocyták, agy, máj, vese, szív, zsírszövet, herék	$T \geq 25 \text{ }^\circ\text{C}$ csökkent ozmolaritás	ruténium vörös

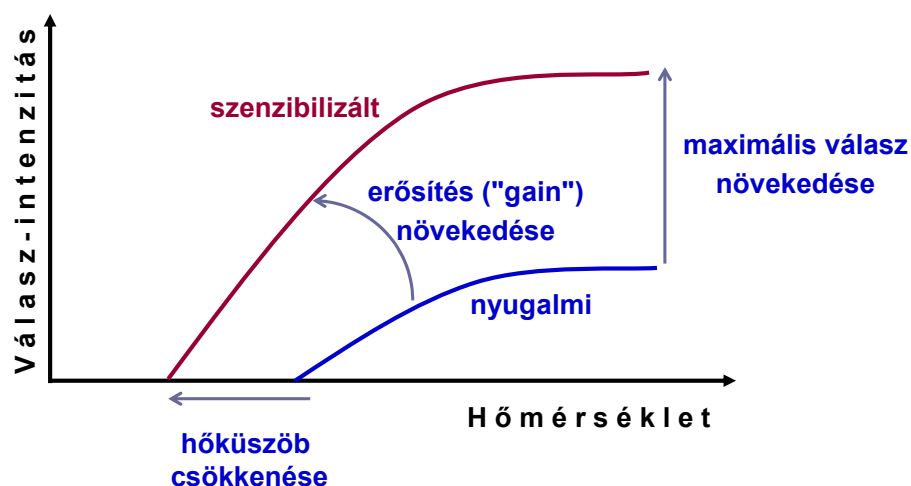
1. táblázat. A hőérzékeny TRPV-csatornák fontosabb jellegzetességei.

1.3. A termonocicepció és a termális hiperalgézia jellegzetességei

Állatkísérletekben szigorú értelemben véve sem fájdalom, sem analgetikus gyógyszerhatások nem mérhetők, mivel nem tudjuk, hogy az állatok mit éreznek. Ez utóbbira indirekt módon az állat viselkedéséből lehet következtetni: ha egy olyan ingerre, amelyik intenzitása alapján emberben fájdalomkeltő, az állat elkerülő, elhárító vagy menekülő magatartási választ (ún. nocifenzív reakció) mutat vagy vokalizációval reagál, joggal következtethetünk arra, hogy az állat is fájdalmat érez. Ilyen kísérleti körülmények között a nocicepció kifejezés helyettesíti szemantikailag a fájdalmat. A kiváltó inger természete alapján beszélünk termo-, mechano-, illetve kemonocicepcióról. A nocicepció kémiai ágenssel vagy fizikai eljárással történő csökkentése esetén antinociceptív hatásról beszélünk. Ha az állat vagy ember egy

fájdalomkeltő ingerre fokozott reakciót mutat, hiperalgéziáról van szó. A kiváltó inger alapján ez lehet termális, mechanikai vagy kémiai hiperalgécia. Amennyiben a szervezet érzékenysége annyira fokozódik egy inger iránt, hogy normál körülmények között nem fájdalomkeltő inger is nocifenziót, illetve fájdalmat vált ki, allodyniáról beszélünk. A hiperalgéziát vagy allodyniát csökkentő hatásokat antihiperalgétiának, illetve antiallodyniásnak nevezzük. Az antinociceptív hatás magába foglalja a nem érzékenyített állapotban a fájdalomingerrel kiváltott reakció csökkentését éppúgy, mint a hiperalgécia vagy allodynia mérséklését, vagyis az antihiperalgétiát és az antiallodyniás hatást.

A fájdalmas hőinger intenzitása és az arra adott válaszreakció nagysága közötti relációt szemlélteti a 2. ábra. Ebben az összefüggésben a választ tágan értelmezhetjük: lehet egy nociceptor *in vitro* vagy *in vivo* mért tüzelési frekvenciája éppúgy, mint egy nocifenzív magatartási reakció intenzitása. A relációt három paraméterrel jellemezhetjük: (i) az ingerküszöb az a legkisebb ingerintenzitás, amely már képes az adott modellben mérhető választ kiváltani; (ii) a maximális válaszreakció az a szintje a válasznak, amelyiknél nagyobbat az ingerintenzitás további növelésével már nem lehet kiváltani; (iii) az ingerintenzitás–válasz függvény meredeksége az ingerintenzitás kódolásának az erősítése (ún. „gain”).



2. ábra. A hőinger intenzitása és a kiváltott válasz nagysága közötti összefüggés és ennek karakterisztikus megváltozása szenzibilizáció során.

A patológiás körülmények között kifejlődő termális hiperalgéria (amelynek a nociceptorok szintjén a termális szenzibilizáció a megfelelője) kapcsán típusos esetben mindhárom említett paraméter karakterisztikusan megváltozik: a hőküszöb csökken, a maximális válaszhőmérséklet és az erősítés nő.

1.4. A termonocicepció klasszikus vizsgálómódszerei

A termonocicepciót vizsgáló hagyományos módszerek, mint pl. a forró lap („hot plate”), a fark- („tail flick”) illetve lábvisszahúzásos („paw withdrawal” vagy „plantar”) tesztek hasonló elven alapulnak (összefoglalóként lásd Le Bars és mtsai, 2001). Egy állandó, küszöbfeletti hőingert alkalmaznak az állat egy vagy több testrészére, és az ezzel kiváltott elhárító, nocifenzív magatartási reakció latenciáidejét mérik. Tehát egy konstans hőmérsékletet állítanak be akár a forró lapon, akár a vízfürdőben, illetve egy koncentrált hőszugárzást irányítanak az állat farkára vagy lábára, és azt az időt mérik, amíg az állat nocifenzív magatartást nem mutat (ez lehet a láb felemelése, megnyalása, rázása, ugrás, illetve a láb vagy a fark forró vízfürdőből való kirántása). Adott kísérletben általában előre eldöntik, hogy mely magatartásformát tekintik végpontnak. A fark vagy láb kirántása spinálisan szerveződő flexor-reflex, míg a láb megnyalása közepagyti szinten integrálódó magatartásforma.

A fent említett tesztek egyik potenciális hátránya, hogy ismételt méréseknél a latenciaidő módosulhat: csökkenhet (az előzőleg alkalmazott küszöbfeletti ingerek érzékenyítő hatása miatt) vagy nőhet (a korábbi ingerlések részleges deszenzibilizáló hatása következtében). Ezért a latenciaidő reprodukálhatósága korlátozott, különösen rövid időközönként ismételt tesztelés során (Groves és Thompson, 1970; Gamble és Milne, 1989; Milne és Gamble, 1989; Carstens és Wilson, 1993; Plone és mtsai, 1996; Sandkühler és mtsai, 1996). Egyértelmű hátránya ezen módszereknek, hogy a mért latenciaidő nem vehető össze az elektrofiziológiai egyrost-elvezetési vagy „patch-clamp” kísérletek eredményeivel, ugyanis ezekben (ritka kivételtől eltekintve) nem latenciaidőt, hanem aktivációs küszöbhőmérsékletet (hőküszöböt) határoznak meg. Emberen végzett kísérletekben szintén a hőküszöböt szokták meghatározni (Hardy és mtsai, 1950; Szolcsányi, 1977; Mayer és Campbell, 1981; La Motte és mtsai, 1982; Sycha és mtsai, 2003).

Belátható, hogy a latenciaidő lényegében a konstans, küszöbfeletti hőingerre adott válasz intenzitását tükröző paraméter (lásd 2. ábra). Kézenfekvő lenne a másik termonocicepciós paraméter, a nociceptív hőküszöb mérésén alapuló módszerek alkalmazása, már csak azért is, mert a mechanonocicepció vizsgálatában a nociceptív küszöb meghatározása széles körben alkalmazott eljárás, pl. a Randall–Selitto teszt esetében. Nem elhanyagolandó szempont az sem, hogy a hőküszöb mérése kisebb mértékű szenvedést okoz az állatoknak, mint a latenciaidő-mérés. Meglepő módon a szakirodalomban csak elvétve találunk olyan állatkísérletes közleményeket, amelyek hőküszöbmérési paradigmával nyert eredményeken alapulnak. Az első dokumentált próbálkozás Szolcsányi nevéhez fűződik, aki a vízfürdőben alkalmazott lábvisszahúzásos tesztet módosította a nociceptív hőküszöb mérésére (Szolcsányi, 1985; 1987b). A latenciaidő mérésénél alkalmazott 50 °C hőmérsékletű helyett az állatok hátsó lábát először 42 °C-os vízfürdőbe helyezte. Amennyiben az állat nem rántotta ki a lábát, megismételte a mérést 1 °C-kal magasabb hőmérsékletre előmelegített vízfürdőben. Azt a vízhőmérsékletet, amelynél az állat kirántotta a lábát, a nociceptív küszöbnek tekintette. Az eljárást addig folytatta, amíg az utolsó vizsgált állat is ki nem rántotta a lábát. A hőküszöb mérésének ez az egyszerű, de nehézkes módszere értelemszerűen 1 °C-nál pontosabb küszöbértéket nem tudott szolgáltatni. Hunskaar és munkatársai a „hot plate” módszert módosították, kifejlesztve az emelkedő hőmérsékletű forró lapot, amely szobahőmérsékletéről az állat lábának megnyalásáig folyamatosan emelkedő hőmérsékletével lehetővé tette a nociceptív hőküszöb pontos mérését (Hunskaar és mtsai, 1986). Ez a módszer eléggé érzékenynek bizonyult a morfin, paracetamol és acetilszalicilsav antinociceptív hatásának kimutatására, de a kapszaicin vagy más TRPV1-receptor-agonista hatásait nem vizsgálták ezzel a módszerrel. Továbbá, jelen ismereteink szerint hiperalgéria-modellt nem dolgoztak ki az emelkedő hőmérsékletű forró lapra. A módszer lényegében feledésbe merült, és nem terjedt el a termonocicepció vizsgálatára.

Összességében elmondható, hogy bár történtek próbálkozások a nociceptív hőküszöb mérésén alapuló állatkísérletes modellek kifejlesztésére, egyetlen eljárás sem vált a termonocicepció vizsgálatának standard módszerévé. Ennek egyik lehetséges oka az lehet, hogy a hőmérséklet pontos mérése technikailag sokkal nehezebb, mint a latenciaidőé. Utóbbi automatizált mérése ugyanakkor kiválóan alkalmas gyári keretek között folyó nagy volumenű vizsgálatokhoz. A másik ok az

lehet, hogy nem fejlesztettek ki hiperalgéziamodelleket a hőküszöbmérésre vonatkozóan. Ismert, hogy az analgetikumok antihiperalgetikus hatását nagyobb érzékenységgel lehet kimutatni, mint a nem érzékenyített alapreakció gátlására vonatkozó hatásukat (Le Bars és mtsai, 2001).

A fentiek alapján a nociceptív hőküszöb mérésének igényét a következő tényezők indokolták:

- a. Az utóbbi időben az elektrofiziológiai vizsgálatok, köztük a „patch-clamp” kísérletek rutinszerűvé váltak, amelyekben meghatározzák egy idegvégződés vagy ioncsatorna aktivációs hőküszöbét. Ezek az elektrofiziológiai eredmények nem vethetők össze a magatartási vizsgálatokban meghatározott latenciaidővel.
- b. A latenciaidő mérésének hátránya a nem optimális reprodukálhatóság, ezért igény mutatkozott a reprodukálhatóság javítására, a mérési módszer stabilitásának fokozására.
- c. Az állatok védelme szempontjából kívánatos, hogy alacsonyabb intenzitású hőingereket alkalmazzunk, amelyek a vizsgált állatok számára kevésbé vagy egyáltalán nem szövetkárosító hatásúak.

Mindezek figyelembevételével érdemesnek tűnt a nociceptív hőküszöb mérésén alapuló állatkísérletes paradigmák kidolgozása és azok farmakológiai modulációjának vizsgálata.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az értekezésben ismertetett munka során célunk a termonocicepció vizsgálata volt a magatartási nociceptív hőküszöb mérésével. Tekintettel arra, hogy munkánk kezdetén nem volt kapható olyan készülék, amellyel e paraméter mérhető lett volna, egy helyi ipari együttműködés keretében újonnan kifejlesztett emelkedő hőmérsékletű forró lapot használtunk. Kísérleteink első sorozatainak célja az volt, hogy e készüléket biológiai szempontból validáljuk. Ennek részeként az antinociceptív gyógyszerhatások mérésére alkalmas új hiperalgémia-modellek kidolgozását is célul tűztük ki. Az emelkedő hőmérsékletű forró lap biológiai validálásának keretében az alábbiakat vizsgáltuk:

- a. A hőküszöb reprodukálhatósága: milyen mértékben változik ismételt mérések esetén a hőküszöb kezeletlen állatokban?
- b. Referencia-analgetikumok hatása a hőküszöbre: milyen mértékben alkalmas e módszer a direkt termális antinociceptív hatás kimutatására?
- c. Hőküszöbcsökkenésen alapuló hiperalgémia-modellek kidolgozása: milyen mértékben képesek a TRPV1-receptor-agonisták a nociceptív hőküszöb csökkentésére?
- d. Referencia-analgetikumok termális antihiperalgetikus hatásának vizsgálata: hogyan befolyásolják a TRPV1-receptor-agonistával kiváltott hőküszöbcsökkenést a konvencionális analgetikumok?
- e. Kimutatható-e a TRPV1-receptor-agonisták szenzoros deszenzibilizáló hatása az emelkedő hőmérsékletű forró lappal?

További kísérleteink során – szintén az emelkedő hőmérsékletű forró lap segítségével – lipid jellegű vegyületek nociceptív hőküszöbre gyakorolt hatásait tanulmányoztuk. Ezen belül a az alábbi zsírsavamidokat vizsgáltuk: a TRPV1-receptor nemrég azonosított agonistáját, az *N*-oleoil-dopamint (OLDA), az OLDA két újonnan szintetizált metilált származékát, a 3-metil-*N*-oleoil-dopamint (3-MOLDA) és a 4-metil-*N*-oleoil-dopamint (4-MOLDA), valamint az *N*-oleoil-etanolamidot (OEA). További célunk volt a kettős, CB₁ cannabinoid/TRPV1-receptor-agonista anandamid hatásainak tanulmányozása.

A fent említett ágensek hőküszöbre kifejtett akut hatásainak tanulmányozása után arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a carrageninnel kiváltott szubakut gyulladás állapotában is lecsökken-e a nociceptív hőküszöb.

3. MÓDSZEREK

3.1. Eszközök

Tekintettel arra, hogy kísérleteink megkezdésekor nem volt kapható olyan műszer, amellyel mérhető lett volna a nociceptív hőküszöb, egy új fejlesztésű, számítógéppel vezérelt emelkedő hőmérsékletű forró lapot használtunk, amelyet a pécsi Supertech Kft. épített intézetünkkel történő együttműködés keretében. Ez a készülék három részből áll: egy 20x15 cm-es fémlapból (az alatta elhelyezkedő fűtőrendszerrel és a rajta levő plexiüveg megfigyelő kamrával), a fűtést szabályozó vezérlőegységből, illetve a számítógépből (3. ábra). A fűtőrendszer számítógépszoftver által szabályozott, ami lehetővé teszi a fűtés elindítását, megállítását, illetve különböző fűtési sebességek beállítását. Méréseink szerint a fűtés során a lemez hőmérsékletének emelkedése közel lineáris, és a hőmérsékletkülönbség a lemez különböző pontjai között nem haladja meg a 0,5 °C-t.



3. ábra. Az emelkedő hőmérsékletű forró lap (Supertech Kft., Pécs) kezelőegysége a számítógéppel (bal oldalon), illetve a fűtőegységgel egybeépített fémlap a megfigyelő kamrával, előtérben a hűtéshez használatos fémlap (jobb oldalon).

2003-ban kereskedelmi forgalomba került egy ún. „incremental hot plate” készülék (IITC Inc. Life Science, Woodland Hills, CA, USA), amely az emelkedő hőmérsékletű üzemmód mellett hagyományos, állandó hőmérsékletű forró lap üzemmódot is lehetővé tesz (4. ábra). Újabb vizsgálatainkat (3. saját közlemény) ezzel a készülékkel végeztük, melynek előnyei a még egyenletesebb fűtés, a lap különböző területeinek kisebb hőmérsékletvariabilitása és a gyorsabb visszahűtés. A készülék lehetővé teszi, hogy ugyanazon állatokban és ugyanazon a fémfelületen nemcsak a nociceptív hőküszöböt, hanem a konstans hőmérsékletű forró ingerrel kiváltott nocifenzív reakció latenciaidejét is meghatározzuk. Ez a készülék egy integrált egységből áll, amely tartalmazza a beállító és kezelő gombokat, a kijelzőt, a fémlemezt, amelynek fűtéséről és hűtéséről speciális Peltier-elemek gondoskodnak, illetve a plexiüvegből készült megfigyelő kamrát. A mérés „cut-off” hőmérsékleteként mindkét hőküszöbmérő készülék esetén 50 °C volt beállítva.



4. ábra. Az „incremental hot plate” készülék (IITC Inc. Life Science, Woodland Hills, CA, USA) központi egysége a fűtőrendszerrel, kezelőszervekkel és a megfigyelő kamrával (bal oldalon), illetve a megfigyelő kamrában a melegített lapra helyezett állat lábemelési reakciója (jobb oldalon).

3.2. Kísérleti állatok

A kísérleteket 140–200 grammos nőstény Wistar patkányokon (Charles River Kft., Isaszeg) végeztük. Az állatokat a kísérlet előtti napon szállítottuk le a laboratóriumba, ahol standard ketrecekben biztosítottuk szabad mozgásukat, élelemhez és vízhez való hozzájutásukat. Korlátozott számban 28–42 grammos nőstény vad típusú ($+/+$) C57BL6 egereken, illetve ezek TRPV1-receptor-génhiányos („knockout”, $-/-$) párjain is végeztünk hőküszöbméréseket. Az egerek tenyészpárjait dr. John B. Davis (Glaxo SmithKline, Harlow, UK) bocsátotta rendelkezésünkre.

Kísérleti módszereinket, amelyeket az IASP (International Association for the Study of Pain) etikai útmutatása (Zimmermann, 1983) szerint terveztünk, a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérletes Etikai Bizottsága jóváhagyta.

3.3. A nociceptív hőküszöb mérése

A kísérleteket nőstény patkányokon végeztük, mivel hímek esetében a lappal érintkező herezacskó melegítésével kiváltott nocifenzív reakció megzavarta volna a láb nocifenzív reakciójára irányuló megfigyeléseket. Kísérleteinket zaj-mentes és légkondicionált laboratóriumban végeztük. Minden állat csak egy mérési sorozatban vett részt. A mérések előtt minden állatot kondicionáltunk. A kondicionálás, azaz a mérési módszerhez való szoktatás azt jelenti, hogy egy hőküszöbmérést végeztünk, amelynek eredményét nem vontunk be az analízisbe. A küszöbmérés során az állatot a megfigyelő kamrába a fémlapra helyeztük, melynek hőmérsékletét 30 °C-ra állítottuk. Ezt követően a lemezt melegíteni kezdtük 6 °C/perc sebességgel, amíg az állat valamelyik végtagját érintő nocifenzív magatartást nem mutatott. A jellegzetes válasz valamelyik hátsó láb nyalása volt, lábemelést vagy -rázást nagyon ritkán tapasztaltunk. A nocifenzív reakció megjelenésekor a fűtést azonnal leállítottuk, és az állatot eltávolítottuk a lapról. Azt a lemezhőmérsékletet, amelynél a nocifenzív reakció megjelent, az állat nociceptív hőküszöbeként értelmeztük. A nociceptív hőküszöb leolvasását követően a lapot egy jégen tartott fémlap ráhelyezésével lehűtöttük 30 °C alá. 30 perc múlva újra megmértük a hőküszöböt, és a két érték átlaga szolgált az állat kontroll hőküszöbeként.

Azokban a kísérletsorozatokban, amelyekben hőküszöbcsökkentő hatású szer egyoldali intraplantaris adására került sor, a patkány egyik hátsó lábának hőküszöbét határoztuk meg 15 °C kiindulási laphőmérséletet és 12 °C/perc fűtési sebességet alkalmazva (ezt a hiperalgéziát kiváltó szerek masszív hőküszöbcsökkentő hatása és annak rövid tartama indokolta, a részleteket lásd az Eredmények fejezetben). Az első mérési sorozat alkalmával a láb fűtését addig folytattuk, amíg az állat valamelyik hátsó végtagján meg nem jelent a nocifenzív reakció. 30 perccel később a második mérésnél a fűtést folyamatosan fenntartottuk, amíg az a láb nem mutatott reakciót, amelyiknek a hőküszöbét az előző mérés során meghatároztuk, tekintet nélkül arra, hogy a másik végtagon megjelent-e előbb nocifenzív reakció vagy sem. A két érték átlaga szolgált a vizsgált hátsó végtag kontroll hőküszöbeként.

3.4. Anyagok, feloldásuk és beadásuk módja

Az alábbi szereket használtuk. Az RTX-t (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) etanolban oldottuk, majd a törzsoldatot (1 mg/ml) fiziológiás sóoldattal tovább hígítottuk 0,48 µM koncentrációra. A I-RTX-t (Tocris Cookson Ltd, UK) hasonlóan oldottuk és hígítottuk a végső 10, illetve 1 µM koncentrációig. A morfint (Ph. Hg. VII. gyógyszerészeti tisztaságú) és a diclofenacot (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA) fiziológiás sóoldatban oldottuk. A paracetamolt (Ph. Hg. VII. gyógyszerészeti tisztaságú) 12,5% 1,2-propándiolban oldottuk (először egy rész tiszta 1,2-propándiolban rövid melegítéssel, majd 7 rész fiziológiás sóoldat hozzáadásával). Az α,β-metilén-ATP-t és a piridoxálfoszfát-6-azofenil-2'4'-diszulfonsavat (mindkettő Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) fiziológiás sóoldatban oldottuk fel. A kapszaicint (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) és az OLDA-t (Tocris Cookson Ltd, UK) 10% etanolban, 10% TWEEN 80-ban és 80% fiziológiás sóoldatban oldottuk, majd a nyert 10 mM-os törzsoldatot fiziológiás sóval hígítottuk tovább. A 3-MOLDA és a 4-MOLDA szintézise a Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Kutatóközpontjában, Budapesten történt. A 3-MOLDA, 4-MOLDA és az OEA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 10 mM-os törzsoldatát DMSO-val készítettük, majd megfelelő pufferekkel hígítottuk. Az OEA oldatait minden kísérlet előtt frissen készítettük.

A vegyületek illetve szolvenseik szisztémás hatásait intraperitonealis (i.p.) injekciót (0,3 ml/100 g térfogatban) követően vizsgáltuk. A lokális hatásokat a hátsó végtag talpbőre alá adott 50 vagy 100 µl térfogatú intraplantaris (i.pl.) injekcióval hoztuk létre. A szerek hatásait mindig szolvensükkel összehasonlítva vizsgáltuk. A hőküszöbmérést végző személy nem tudta, hogy aktív kezelés vagy szolvens adása előzte-e meg a mérést.

3.5. Adatfeldolgozás, statisztikai eljárások

A kísérletekben nyert adatokat átlag \pm SEM („standard error of mean”) formában mutatom be. Az alábbi statisztikai eljárásokat alkalmaztuk. A Student-féle egymintás t-próbát használtuk akkor, amikor ugyanazon állatokban a gyógyszeres kezelés előtti és utáni értékeket hasonlítottuk össze. A Student-féle kétmintás t-próbával a szerek hatásait vetettük össze a szolvenseik által kifejtett változásokkal. Több alkalommal ismételt mérések során az egy-szemponos varianciaanalízist (ANOVA) követő Newman-Keuls *post hoc* teszttel vizsgáltuk a szignifikanciát. A különbségeket $P < 0,05$ esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Az egyes kísérletsorozatok további metodikai részleteit a könnyebb áttekinthetőség érdekében az Eredmények fejezet megfelelő pontjaiban írom le.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A nociceptív hőküszöb meghatározása és direkt farmakológiai modulációja (1. saját közlemény)

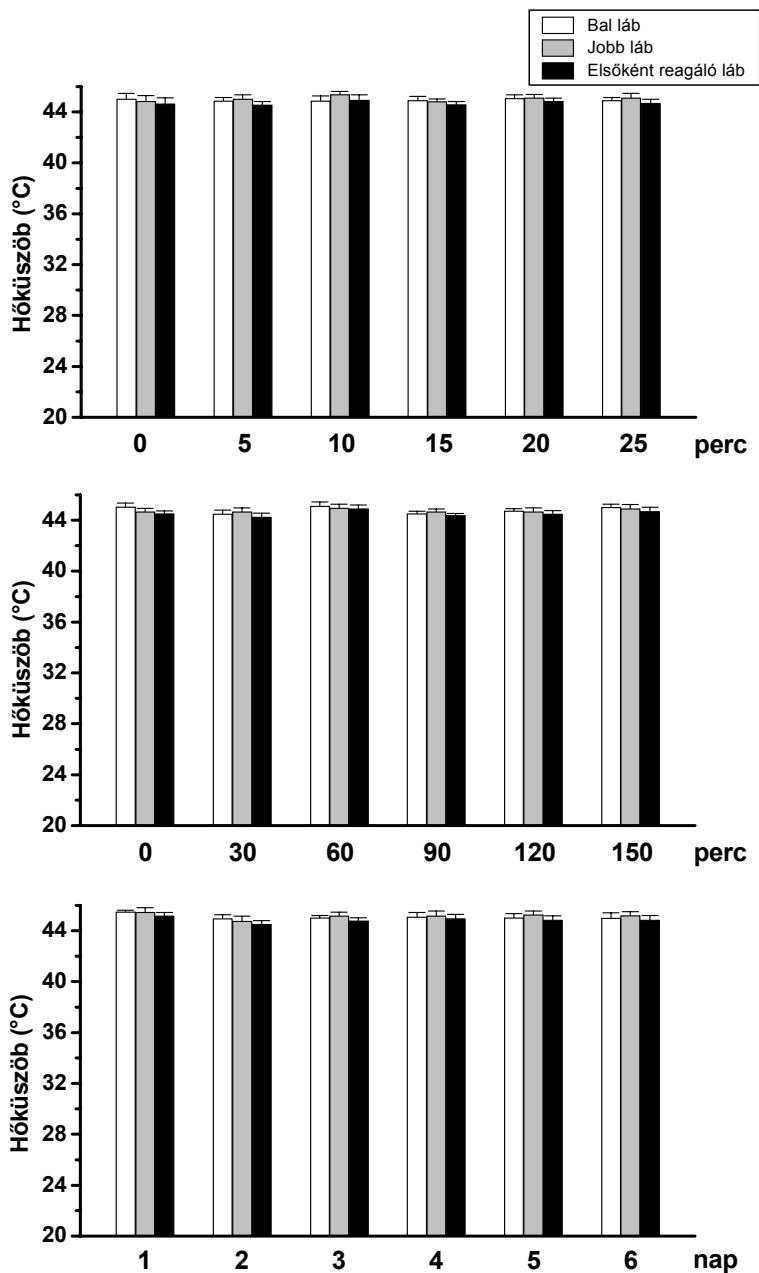
4.1.1. A nociceptív hőküszöb reprodukálhatósága

Az emelkedő hőmérsékletű forró lap validálásának első lépéseként meghatároztuk a kezeletlen állatok hőküszöbét (30 °C kiindulási laphőmérsékletet és 6 °C/perc fűtési sebességet alkalmazva), amely $45,3 \pm 0,3$ °C-nak adódott (n=36). Annak érdekében, hogy az állatpopuláción belüli hőküszöb-variabilitást megbecsüljük, ugyanazon állatokban ismételt méréseket végeztünk 5, 30 perc és 24 óra intervallumokban. Az 5 percenként ismételt mérések esetében 12 °C/perc fűtési sebességet alkalmaztunk a mérés időigényének csökkentése és így az 5 perces intervallum tarthatósága érdekében. Ezekben a kísérletekben az állat mindkét hátsó lábára vonatkozóan meghatároztuk a hőküszöböt, azaz az egyik hátsó végtagon megjelenő nocifenzív reakciót követően a fűtést folytattuk, amíg a másik hátsó végtagon is meg nem jelent az elhárító reakció. A hőküszöbök alakulásában jelentős eltéréseket nem találtunk, azaz igen nagyfokú reprodukálhatóságot tapasztaltunk (5. ábra). Nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget:

1. ugyanazon láb különböző időpontokban mért hőküszöbei között (egyszempontos ANOVA utáni Newman–Keuls teszt);
2. az állat különböző időpontokban meghatározott hőküszöbei (a két láb hőküszöbe közül az alacsonyabb érték) között (ANOVA utáni Newman–Keuls teszt);
3. adott időpontban mérve az állat jobb és bal lábán mért hőküszöb között (kétmintás t-próba).

Általánosságban elmondható, hogy a különböző kísérletsorozatokban használt állatcsoportokban mért hőküszöbök sem mutattak jelentős eltéréseket (erre

vonatkozóan statisztikai analízist nem végeztünk) jelezve, hogy a populációk közötti hőküszöb-variabilitások szintén nem túl nagyok.

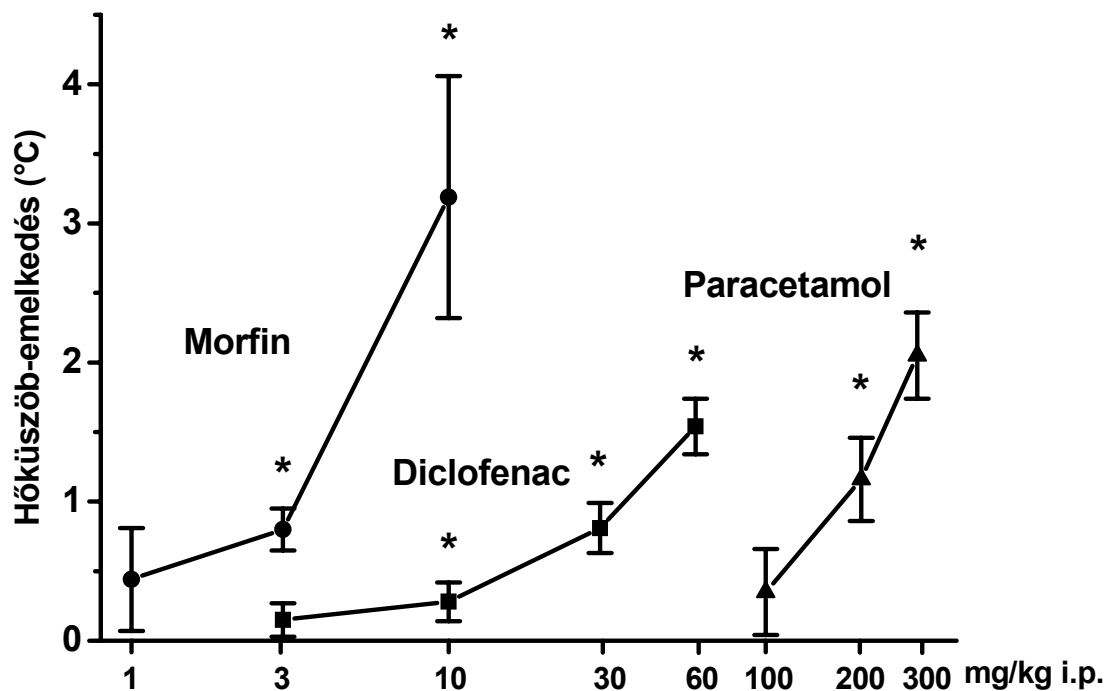


5. ábra. A nociceptív hőküszöb reprodukálhatósága ismételt mérések során három különböző kezeletlen patkánycsoportban. Az állat hőküszöbe a két végtag hőküszöbe közül az alacsonyabb érték (fekete oszlopok). Az adatok átlagértékek \pm SEM ($n=12$ minden csoportban). A fűtési sebesség $12\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ volt az első csoportban (felső panel) és $6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ a második és harmadik csoportban (középső és alsó panel). A statisztikai analízis nem mutatott szignifikáns eltérést az állat azonos lábának hőküszöbei, illetve az állat hőküszöbei között különböző időpontokban mérve (ANOVA utáni Newman-Keuls teszt), valamint a bal és jobb láb küszöbe között egy adott időpontban mérve (kétmintás t-próba).

4.1.2. A morfin, diclofenac és paracetamol hatása a nociceptív hőküszöbre

A morfin, paracetamol és diclofenac hőküszöbre gyakorolt hatásainak mérésekor a kontroll hőküszöb meghatározását (30 °C kezdőhőmérséklet, 6 °C/perc fűtési sebesség) követően az állatcsoportok egyik felét a vizsgált szerrel, a másikat annak szolvensével kezeltük intraperitonealis (i.p.) injekció (0,3 ml/100 g térfogatban) formájában. A hőküszöbmérést 30 perc múlva megismételtük.

Mindhárom szer a patkányok nociceptív hőküszöbének megemelkedését okozta dóziszfüggő módon (6. ábra), míg szolvenseik nem okoztak szignifikáns eltérést (az adatokat nem mutatom be). A morfin, diclofenac és paracetamol szignifikáns hőküszöbemelkedést okozó minimális effektív dózisaik rendre 3, 10 és 200 mg/kg voltak.



6. ábra. A morfin, diclofenac és paracetamol előkezelés (i.p., 30 min) hatása a nociceptív hőküszöbre. A hőküszöb-emelkedés a szer adása utáni és az az előtti (kontroll) érték különbségét jelenti. Az adatok átlagértékek \pm SEM (n=12). Csillag jelöli a kontrollhoz képest statisztikailag szignifikáns változásokat ($P < 0,05$, egymintás t-próba).

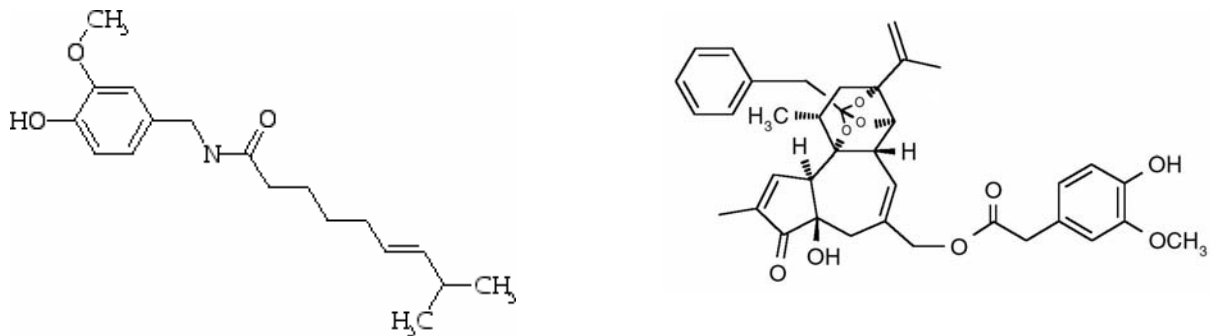
4.2. A resiniferatoxin (RTX) hatása a hőküszöbre és annak farmakológiai modulációja (1. saját közlemény)

4.2.1. A TRPV1-receptor aktivációján alapuló, hőküszöbcsökkenéssel járó termális hiperalgémia-modell kidolgozása

Célunk egy olyan termális hiperalgémia-modell kidolgozása volt, amelyben kémiai ágenssel a nociceptív hőküszöb csökkenését idézzük elő. Kézenfekvő volt a kapszaicin mint TRPV1-receptor-agonista alkalmazása, mivel ennek az ágensnek a termális hiperalgémia okozó hatását már számos modellben igazolták (Szolcsányi 1977; Simone és mtsai, 1987; Gilchrist és mtsai, 1996; Yeomans és mtsai, 1996). Vizsgálatainkat kapszaicin intraplantaris (i.pl.) adásával kezdtük. A markáns nocifenzív reakció (láb emelése, rázogatósa) ideje alatt küszöbmérést nem tudtunk végezni, a nocifenzív reakció megszűnése után viszont nem tapasztaltunk hőküszöbcsökkenést. Hasonló volt a helyzet a talp bőrének kapszaicines ecsetelésével. Ezen kísérletek során megállapítottuk, hogy a kapszaicin nem alkalmas hőküszöbcsökkenéssel alapuló hiperalgémia-modell kialakítására.

További kísérleteinkben egy másik ágenssel próbáltunk meg hőküszöbcsökkenést kiváltani, amelyik egy marokkói kaktusz-szerű növény (*Euphorbia resinifera*) tejnedvében fordul elő, és különösen irritáló hatású. Egészen 1975-ig az irritáló tulajdonságért felelős vegyületet nem sikerült azonosítani, ekkor Hecker izolálta, majd resiniferatoxinnak (RTX) nevezték el (Hergenhahn és mtsai, 1974), azonban 1989-ig nem tételezték fel, hogy az RTX hasonló mechanizmussal hat, mint a kapszaicin (Szállási és Blumberg, 1989). Az RTX egy diterpénvegyület, mely homovanillinsav-észtert tartalmaz, ami a kapszaicin struktúrális jellegzetessége (7. ábra). Az RTX a kapszaicin olyan analógja, amelynek TRPV1-receptor iránti affinitása igen nagy ($K_i = 43 \text{ pM}$); ezen az alapon nevezik ultrapotens TRPV1-receptor-agonistának. Az RTX egyesíti a természetes irritánsok két osztályának, a forbolésztereknek és a vanilloidoknak a sajátosságait. Bár az RTX kapcsolódik a protein-kináz C-hez, de csak kis affinitással, és ez az alacsony affinitás nem magyarázza extrém csípősségét, mivel a protein-kináz C aktiválásához jóval magasabb koncentráció szükséges, mint a csípősség kiváltásához. Az RTX nagymértékben szelektív a TRPV1-receptorra, ezért széleskörűen használt ágens a TRPV1-receptorok vizsgálatára. Hasonlóan a kapszaicinhez, az RTX először izgatja

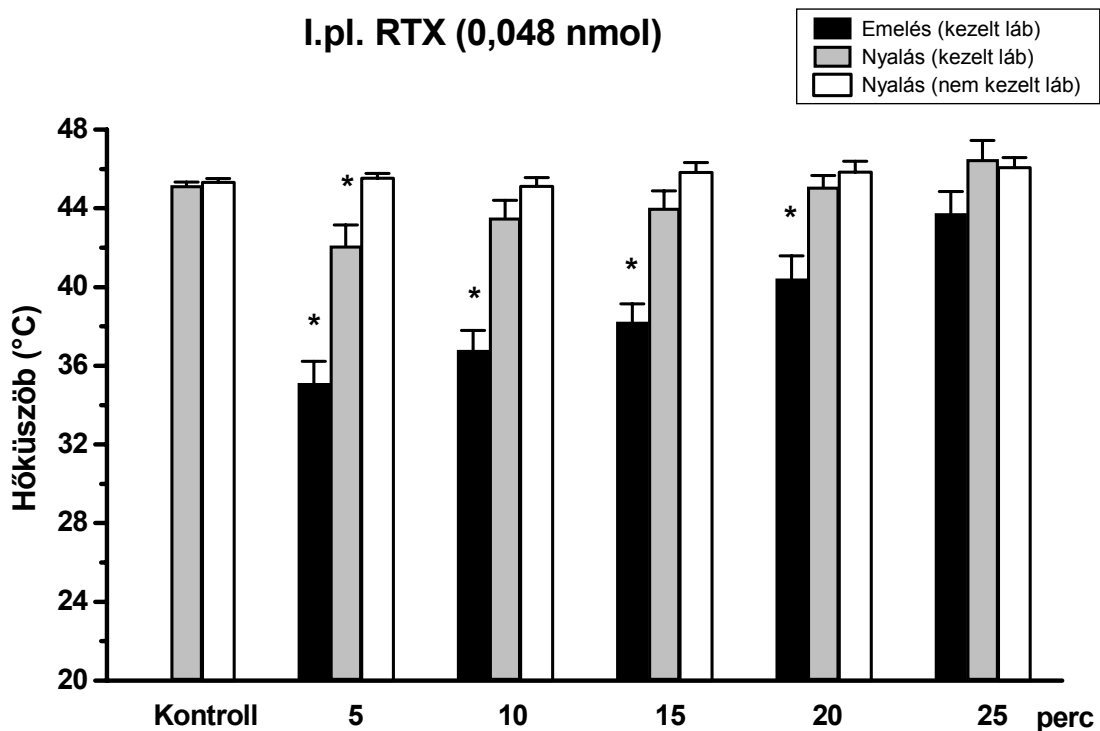
a TRPV1-receptort expresszáló polimodális nociceptorokat, majd ezt az excitációs fázist ezeknek az idegi struktúráknak egy tartósan károsodott állapota követi, amelyet szenzoros deszenzibilizációnak nevezünk (lásd korábban). Az RTX különösen potens a szenzoros deszenzibilizáló hatás szempontjából, ezért állatkísérletes modellekben gyakran mint deszenzibilizáló ágenst szokták alkalmazni.



7. ábra. A kapszaicin (bal oldalon) és a resiniferatoxin (RTX, jobb oldalon) szerkezeti képlete.

Megvizsgáltuk az RTX egyoldali i.pl. injekciójának hatását a hőküszöbre patkányokban. Az RTX-adagolás előtt meghatároztuk az állat egyik hátsó lábának hőküszöbét, amihez 15 °C kiindulási laphőmérséletet és 12 °C/perc fűtési sebességet alkalmaztunk. Ezt az RTX hőküszöbcsökkentő hatásának nagy mértéke és rövid tartama indokolta (lásd később). Az első mérési sorozat alkalmával a lap fűtését addig folytattuk, amíg az állat valamelyik hátsó végtagján meg nem jelent a nocifenzív reakció. 30 perccel később a második mérésnél a fűtést folyamatosan fenntartottuk, amíg az a láb nem mutatott reakciót, amelyiknek a hőküszöbét az előző mérés során meghatároztuk, tekintet nélkül arra, hogy a másik végtagon megjelent-e előbb nocifenzív reakció vagy sem. A két érték átlaga szolgált a vizsgált hátsó végtag kontroll hőküszöbeként. RTX-et (0,048 nmol) vagy ennek oldószerét (0,03% etanol fiziológiás sóoldatban) adtuk be a hátsó láb talpbőre alá 100 µl-es térfogatban. Egy mérési sorozatban (n=12) mind a kezelt, mind a kezeletlen végtag hőküszöbét meghatároztuk 5, 10, 15, 20 és 25 perccel az RTX beadása után. Az RTX oldószerének alkalmazása semmilyen nocifenzív reakciót nem váltott ki, és nem változtatta meg a hőküszöböt (az adatokat nem mutatom be).

Az i.pl. RTX-injekciót követően akut nocifenzív reakciót figyeltünk meg, ami a kezelt láb nyalásában, rágásában és emelésében nyilvánult meg. Ezek a reakciók kevesebb mint 5 percen belül lezajlottak, bár ritka esetben némelyik reakció 5 perc után is fellépett. Amikor az RTX-szel kezelt állatokat az emelkedő hőmérsékletű forró lapon vizsgáltuk, az első megfigyelt reakció majdnem minden alkalommal a kezelt láb emelése volt, amit szinte soha nem tapasztaltunk kontroll körülmények között. Néhány esetben kb. 1 másodpercig tartó fázikus emelést, míg más esetekben tartós emelést tapasztaltunk. A láb emelése az alacsonyabb hőmérsékleti tartományban (34–41 °C) jelent meg, míg a láb nyalása 41 °C-nál magasabb hőmérsékleten jelentkezett (8. ábra). A kettő között átlagosan 4–6 °C különbség adódott. A küszöb mindkét reakcióra nézve az 5. percen volt a legalacsonyabb, és fokozatos visszatérést mutatott, 25 perc múlva térve vissza a kontroll értékre.



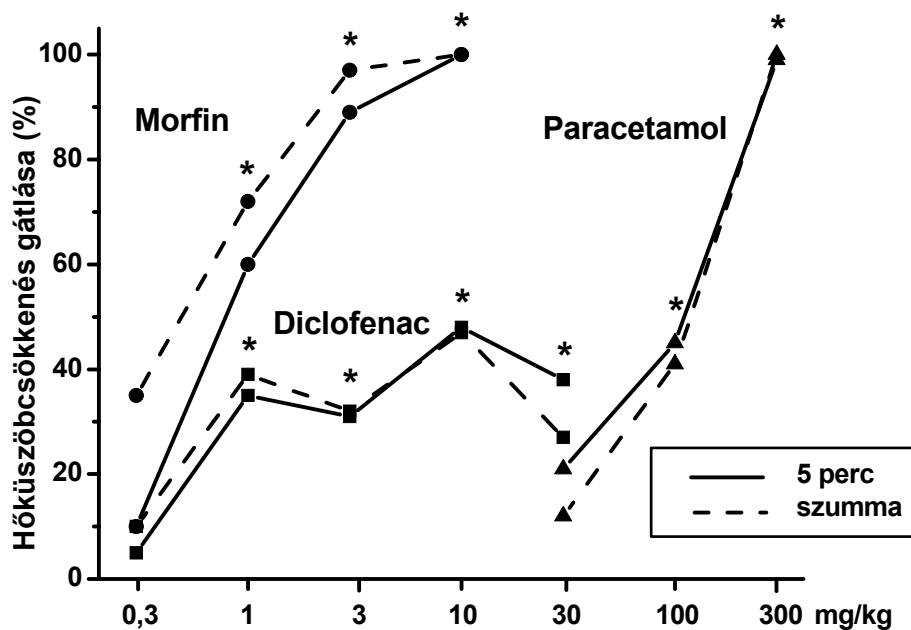
8. ábra. Az RTX (0,048 nmol) egyoldali intraplantaris (i.pl.) injekciójának hatása a nociceptív hőküszöbre. Az adatok átlagértékek \pm SEM ($n=12$). Az 5 percenként ismételt mérések során a láb emelése, majd nyalása, végül a nem kezelt láb nyalása jelent meg. Csillag jelzi a szignifikáns eltéréseket a kezelt láb kontroll hőküszöbéhez képest ($P<0,05$, egy-szemponos ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt).

Az RTX okozta nagyfokú és rövid ideig tartó hőkülönböztetés érzékelhetővé teszi, miért vettük le a kezdő laphőmérsékletet 15 °C-ra és emeltük a fűtési sebességet 6-ról 12 °C/percre. Az előbbi tette lehetővé az alacsony hőkülönböztetések kimérését, utóbbi pedig a rövidebb mérési időket, ami megengedte a gyakori, 5 percenkénti hőkülönböztetés meghatározásokat.

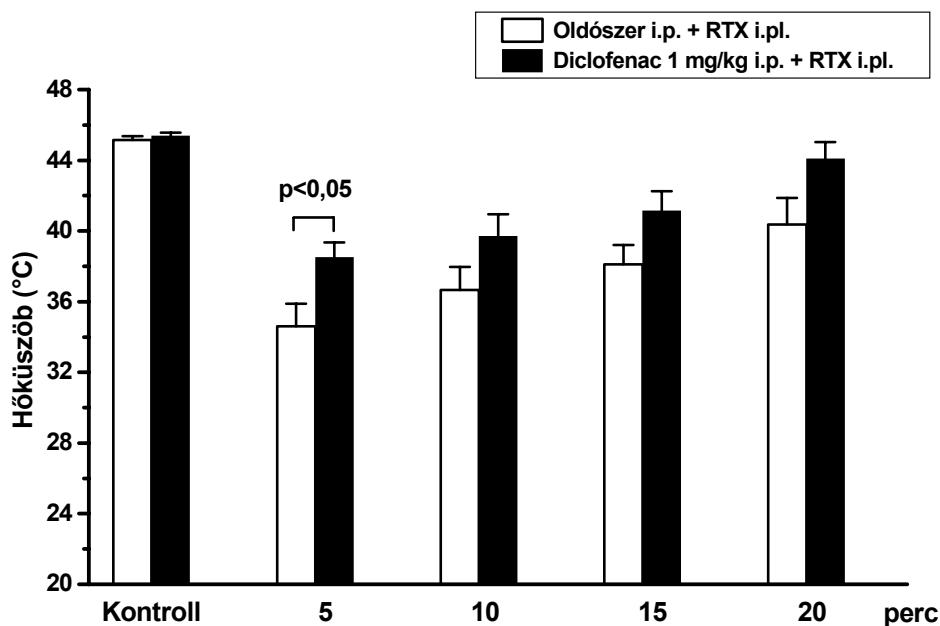
4.2.2. Morfin, diclofenac és paracetamol hatása az RTX-szel kiváltott hőkülönböztetésre

Ebben a sorozatban szisztémásan adott referencia-analgetikumok hatását vizsgáltuk olyan állatokban, melyek egyik hátsó lábában i.pl. RTX-injekció segítségével hőkülönböztetést váltottunk ki. A morfin, diclofenac és paracetamol RTX-indukálta hőkülönböztetésre gyakorolt hatásának vizsgálatokor a megfelelő oldószerkontrollt használtuk, vagyis az állatcsoport egyik fele 25 perccel az RTX beadása előtt analgetikumot kapott i.p., míg a másik felét annak szolvensével kezeltük elő. Ez a protokoll biztosította, hogy a különböző állatpopulációkban az RTX-indukálta hőkülönböztetés nagyságának variabilitása ne befolyásolja a vizsgálatot. A lap kiindulási hőmérsékletét 15 °C-ra, míg a fűtési sebességet 12 °C/percre állítottuk. A hőkülönböztetést csak a kezelt lábon határoztuk meg 5, 10, 15 és 20 perccel az RTX-injekció beadását követően, csak a hamarabb bekövetkező lábemelési reakcióra vonatkozóan. A statisztikai analízis során minden mérési időpontra vonatkozóan a szerrel, illetve a szolvenssel előkezelt csoportban a kontroll hőkülönböztetéshez viszonyított csökkenést a kétmintás t-próbával vetettük össze. Az analgetikumok hőkülönböztetést gátló hatásának mértékét a következő képlettel számoltuk: $(Csökk_{szolv} - Csökk_{szer}) / Csökk_{szolv} \times 100$, ahol a $Csökk_{szolv}$ és $Csökk_{szer}$ az RTX-szel kiváltott hőkülönböztetések átlagára vonatkozik a szolvenssel, illetve a szerrel kezelt csoportban. Az eredmények analíziséhez egyrészt az 5. percben mért hőkülönböztetést, másrészt globális mutatóként az 5., 10., 15. és 20. percben mért hőkülönböztetések összegét vettük alapul.

A morfin, a diclofenac és a paracetamol előkezelés dóziszfüggő módon gátolta az RTX- okozta hőkülönböztetést. A mérési eredményekből dózis-hatás görbét vettünk fel, és a gyógyszeres kezelés gátló hatását az RTX-indukálta hőkülönböztetésre %-ban kifejezve adtuk meg (9. ábra).



9. ábra. A morfin, diclofenac és paracetamol előkezelés gátló hatása az RTX-szel kiváltott hőcsökkenésre (n=10-12 minden csoportban). A folyamatos vonal mutatja az 5. percben mért csökkenések átlagából számolt százalékos gátlást, míg a szaggatott vonal a 4 mérési időpontban kapott értékek összege alapján meghatározott gátlást. Csillag jelzi a szignifikáns eltéréseket a szolvenshez képest ($P < 0,05$, kétmintás t-próba) mindkét paraméterre vonatkozóan.



10. ábra. 1 mg/kg i.p. adott diclofenac hatása a 25 perccel később i.pl. adott 0,048 nmol RTX-szel kiváltott hőcsökbenésre (lábemelési reakció). Az adatok átlagértékek \pm SEM (n=12 mindkét csoportban, kétmintás t-próba).

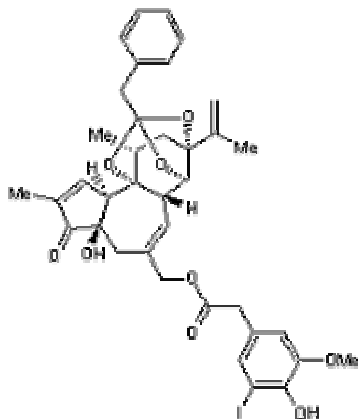
Egy konkrét kísérlet eredményét mutatja a 10. ábra, melyben 1 mg/kg diclofenac hatását vizsgáltuk. Ennek az igen alacsony dózisonak a gátló hatása csak az 5. percen volt szignifikáns.

A morfin, diclofenac és paracetamol az RTX hőküszöbcsökkentő hatását 1, 1 illetve 100 mg/kg minimális effektív dózisban gátolta. A 2. táblázatban tüntettem fel a vizsgált referencia-analgetikumok termális antinociceptív hatásaira vonatkozó farmakodinámiai mutatókat mind a kontroll hőküszöb megemelésére, mind az RTX okozta hőküszöbcsökkenés gátlására vonatkozóan.

	<i>Morfin</i>		<i>Diclofenac</i>		<i>Paracetamol</i>	
	Minimális effektív dózis (mg/kg)	ED _{1°C} (mg/kg)	Minimális effektív dózis (mg/kg)	ED _{1°C} (mg/kg)	Minimális effektív dózis (mg/kg)	ED _{1°C} (mg/kg)
Hőküszöb emelkedése	3	4,5	10	40	200	160
RTX-indukálta hőküszöbcsökkenés gátlása	Minimális effektív dózis (mg/kg)	ED ₅₀ (mg/kg)	Minimális effektív dózis (mg/kg)	ED ₅₀ (mg/kg)	Minimális effektív dózis (mg/kg)	ED ₅₀ (mg/kg)
5. perc	1	0,8	1	0,7	100	120
Szumma	1	0,5	1	0,6	100	115

2. táblázat. Referencia-analgetikumok termális antinociceptív hatása. Minimális effektív dózis: az alkalmazott legkisebb dózis, amely a hőküszöb szignifikáns emelkedését, illetve az RTX-indukálta hőküszöbcsökkenés szignifikáns gátlását okozta. ED_{1°C}: az a dózis, amely a hőküszöb 1 °C-os emelkedését okozta. ED₅₀: az a dózis, amelyik az RTX-indukálta hőküszöbcsökkenés maximális gátlásának 50%-át váltotta ki. A táblázat utolsó sorában található értékek az 5., 10., 15. és 20. percen mért küszöbcsökkenések összegére vonatkoznak.

4.2.3. A TRPV1-receptor-antagonista jód-resiniferatoxin (I-RTX) vizsgálata az emelkedő hőmérsékletű forró lappal



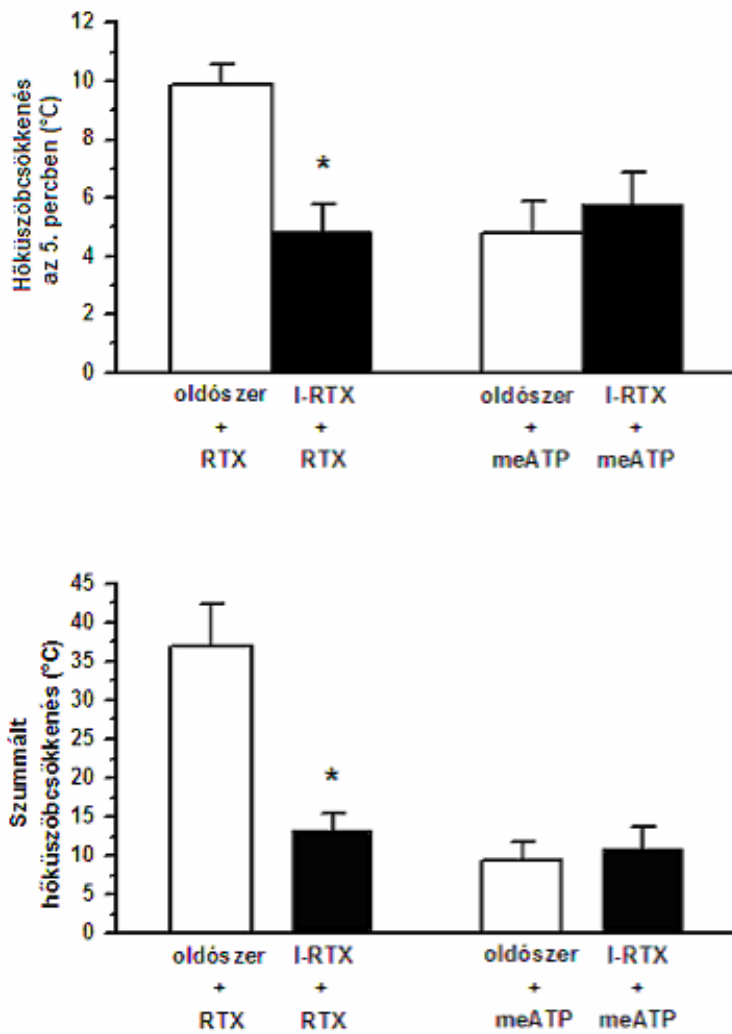
11. ábra. A jód-resiniferatoxin (I-RTX) szerkezeti képlete.

A jód-resiniferatoxin (I-RTX) egy újabban kifejlesztett TRPV1-receptor-antagonista (Wahl és mtsai, 2001), amely jóval potensebbnek bizonyult *in vitro*, mint a capsazepin. Kísérleteink elvégzésének idejéig az I-RTX *in vivo* TRPV1-receptor-antagonista hatásáról csak kevés adat állt rendelkezésre (Wahl és mtsai, 2001; Udem és Kollarik, 2002).

Az első sorozatban azt vizsgáltuk, hogy az önmagában adott I-RTX befolyásolja-e a hőküszöböt, vagyis a TRPV1-receptornak van-e kimutatható szerepe a forró ingerek detektálásában. I-RTX-et (0,1 és 1 nmol/100 µl végtagonként, n=8-8) adagoltunk mindkét hátsó végtagba, a lap kezdeti hőmérsékletét 15 °C-ra, míg a fűtési sebességet 12 °C/percre állítottuk. A kétoldali kezelésre azért volt szükség, hogy az I-RTX esetleges hőküszöbemelő hatásának kimutatását ne zavarja meg a nem kezelt láb nocifenzív reakciója, amelynek fellépése állatvédelmi szempontból sem lett volna kívánatos. A hőküszöb-meghatározásokat 5, 10, 15, 20, 30, 40 és 50 perccel az I-RTX beadását követően végeztük, illetve 1, 2, 4 és 6 óra múlva a nap folyamán, valamint 5 további napon át naponta egyszer. A hőküszöböt az első reagáló végtag nyalási reakciója alapján határoztuk meg. Az I-RTX egyik dózisban sem váltott ki nocifenzív reakciót vagy hőküszöbváltozást a vizsgált rövid és hosszú távú időszakban (az adatokat nem mutatom be).

A második mérési sorozatban azt vizsgáltuk, hogy az I-RTX képes-e gátolni az RTX hőküszöbcsökkentő hatását, illetve hogy hatása szelektív-e a TRPV1-receptorra. Utóbbi kapcsán azt teszteltük, hogy az I-RTX befolyásolja-e egy nem a TRPV1-receptoron ható, de hőküszöbcsökkenést okozó ágens hatását. Ilyen hatásúnak találtuk az α,β -metilén-ATP-t, amely egy metabolikusan stabil ATP-analóg. I-RTX-et (0,05 nmol/50 μ l végtagonként) vagy ennek oldószerét (0,03% etanol fiziológias sóoldatban) adagoltuk 5 perccel az RTX (0,048 nmol/100 μ l) illetve az α,β -metilén-ATP (0,3 μ mol/100 μ l) ugyanabba a végtagba történő beadása előtt. Csak a kezelt hátsó végtag hőküszöbének meghatározását végeztük 5, 10, 15 és 20 perccel az RTX, illetve α,β -metilén-ATP adagolását követően. Az I-RTX-szel vagy annak szolvensével előkezelt állatcsoportokban az RTX, illetve az α,β -metilén-ATP hőküszöbcsökkentő hatását ugyanolyan módon hasonlítottuk össze statisztikailag, mint ahogy azt a korábbiakban leírtam (4.2.2. pont): minden mérési időpontra vonatkozóan az I-RTX-szel, illetve a szolvenssel előkezelt csoportban a kontroll hőküszöbhez viszonyított csökkenést kétmintás t-próbával vetettük össze. A hőküszöbcsökkenés gátlásának mértékét kifejező százalékos mutatót az alábbi képlettel számoltuk ki: $(Csökk_{szolv} - Csökk_{szer}) / Csökk_{szolv} \times 100$, ahol a $Csökk_{szolv}$ és $Csökk_{szer}$ az 5. percben mért, illetve a négy mérési időpontban regisztrált hőküszöbcsökkenés(ek) összegének átlaga a szolvenssel, illetve az I-RTX-szel előkezelt csoportban.

Az I-RTX-előkezelés szignifikánsan mérsékelte az RTX által indukált hőküszöbcsökkenést (12. ábra), az 5. percben mért gátló hatás 51%-nak, míg az összesített hőküszöbcsökkenések tekintetében (szummált érték) a gátlás 64%-nak adódott. Az α,β -metilén-ATP szintén csökkentette a hőküszöböt $39,5 \pm 1,2$ °C-ra az 5. percben és $42,0 \pm 0,9$ °C-ig a 10. percben míg a későbbi mérési időpontokban már nem okozott mérhető küszöbváltozást (a szolvense hatástalan volt). Az emelkedő hőmérsékletű forró lapon megfigyelt első nocifenzív reakció itt is a láb emelése volt. Az α,β -metilén-ATP hatását megmértük a P2-purinergreceptor-antagonista piridoxálfoszfát-6-azofenil-2'4'-diszulfonsav (PPADS, 0,15 μ mol/50 μ l) vagy annak szolvensével végzett 5 perces i.pl. előkezelést követően is. A PPADS az α,β -metilén-ATP hőküszöbcsökkentő hatásának 83%-os gátlását eredményezte az 5. percben ($n=8$, $P<0,01$). Az I-RTX-előkezelés nem gátolta az α,β -metilén-ATP-okozta hőküszöbcsökkenést (12. ábra).



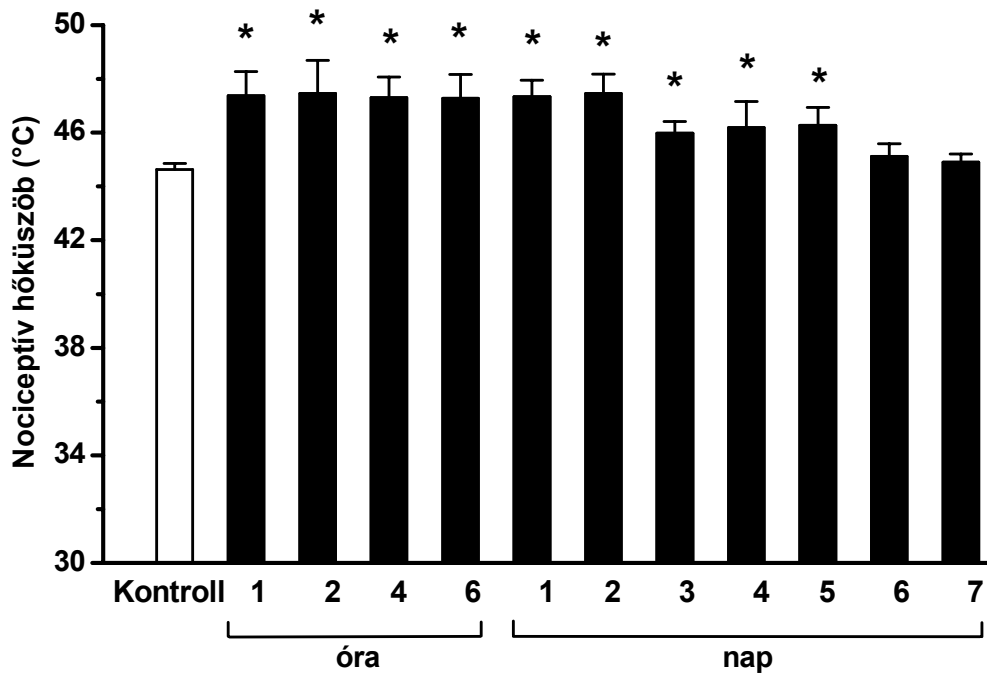
12. ábra. Az I-RTX (0,05 nmol) hatása szolvansével összehasonlítva az RTX (0,048 nmol) illetve az α,β -metilén-ATP (meATP, 0,3 μ mol) indukálta hőküszöbcsökkenésre. Az ábra felső részén az 5. percben mért hőküszöbcsökkenés, az alsó részén a hőküszöbcsökkenések összege látható ($n=8$ csoportonként). A csillagok a szolvans-előkezeléshez viszonyított szignifikáns különbségeket mutatják ($P<0,05$, kétmintás t -próba).

4.2.4. Az RTX hosszú távú hatása a nociceptív hőküszöbre

A fentiekben említés történt arról, hogy a TRPV1-receptoron ható agonisták egy része, pl. a kapszaicin vagy az RTX, a kezdeti izgató hatást követően egy tartós refrakter állapotot hoznak létre, amelyet szenzoros deszenzibilizációnak nevezünk (Jancsó, 1959; összefoglalóként lásd Holzer, 1991; Szolcsányi, 1993; 2003; Szállási és Blumberg, 1999). Ennek során a polimodális idegvégződés mindenfajta ingerrel (hő, mechanikai, kémiai) szemben érzéketlenné válik. Az emelkedő hőmérsékletű forró lap validálásának részeként megvizsgáltuk, hogy a TRPV1-receptor-agonisták jól ismert, hővel szembeni deszenzibilizációt okozó hatása kimérhető-e ezzel az eszközzel, vagyis az RTX okoz-e tartós hőküszöb-emelkedést.

Az állatok mindkét hátsó végtagját i.pl. kezeltük RTX-szel (0,048 nmol/100 µl végtagonként, n=12), illetve annak szolvensével (0,03% etanol fiziológias sóoldatban, n=6), hogy elkerüljük a nem kezelt láb nocifenzív reakciójának zavaró hatását. A bilaterális kezelés etikailag is indokolt, mivel csak az egyik láb kezelésével az állatot kitettük volna annak, hogy a nem kezelt láb fájdalmát elviselje mindaddig, amíg a kezelt láb nocifenzív reakciót nem mutat. A fémlapot 30 °C-ról 6 °C/perc fűtési sebességgel melegítettük, amíg valamelyik lábon elhárító reakció nem jelentkezett. A hőküszöb-meghatározásokat az RTX beadását követő 5, 10, 15 és 20 percben végeztük, illetve 1, 2, 4 és 6 óra múlva, majd naponta 1 héten át. A hőküszöb-meghatározás alapjaként az elsőként reagáló végtag szolgált. Ha a „cut-off” hőmérsékletet elértük, az állatot azonnal eltávolítottuk a lemezről, és 50 °C-t tekintettük a mérés eredményének.

A kétoldali RTX-kezelés hatására a hőküszöb már a beadást követő első óra végén megnőtt, több napig emelkedett szinten maradt (az emelkedés maximuma kb. 3 °C volt), majd a kezelést követő 6. napra tért vissza a kiindulási tartományba (13. ábra). Az RTX-okozta nocifenzív reakció és az átmeneti (a beadás utáni első 20 percben észlelhető) hőküszöbcsökkenés természetesen itt is kimutatható volt, de azt nem tüntettem fel, mivel a 4.2.1. pontban már részletesen bemutattam. A hőküszöb-emelkedés fázisában az emelkedő hőmérsékletű forró lapon megfigyelhető reakció valamelyik hátsó láb nyalása volt, hasonlóan a kezelés előtti állapothoz. Az RTX szolvense nem okozott szignifikáns hőküszöbváltozást a hosszú távú mérések során sem (az adatokat nem mutatom be).



13. ábra. Az RTX (0,048 nmol/láb) kétoldali i.pl. injekciójának hosszútávú hatása a nociceptív hőküszöbre. Az adatok átlagértékek \pm SEM (n=12). A csillagok szignifikáns eltérést jeleznek a kontrollhoz képest ($P < 0,05$, egy-szemponos ANOVA utáni Newman–Keuls teszt).

4.3. A TRPV1-receptor-génhiányos („knockout”) és vad típusú egerek nociceptív hőküszöbének összehasonlítása (1. saját közlemény)

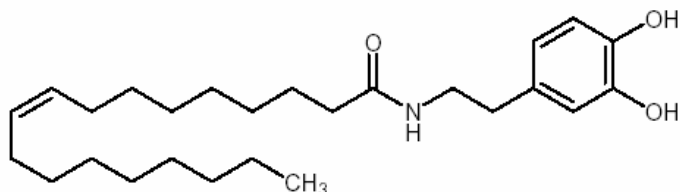
A bevezetésben említés történt arról, hogy részben elektrofiziológiai, részben latenciaidő-mérésen alapuló termonociceptív tesztek alkalmazásával összehasonlították a vad típusú és a TRPV1-receptor-génhiányos egerekben a forró ingerekre adott választ. Arra a meglepő eredményre jutottak, hogy TRPV1-receptor-génhiányos („knockout”) egerekben – legalábbis 48–50 °C-ig – nem károsodik a forró ingerek detektálása (Caterina és mtsai, 2000; Davis és mtsai, 2000; Woodbury és mtsai, 2004; Zimmermann és mtsai, 2005). Mindezek fényében érdemesnek tűnt annak vizsgálata, hogy a nociceptív hőküszöböt illetően kimutatható-e különbség a

vad típusú és a TRPV1-„knockout” egerek között. Ennek érdekében 28–42 grammos nőstény vad típusú ($+/+$) C57BL6 egereken, illetve ezek TRPV1-receptor-génhiányos („knockout”, $-/-$) párjain végeztünk hőküszöbméréseket. A hőküszöb-meghatározást ugyanúgy végeztük, mint a patkányoknál (30 °C kiindulási laphőmérséklet, 6 °C/perc fűtési sebesség), a tipikus végpont valamelyik hátsó végtag nyalása vagy rázása volt.

Nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a két egérpopuláció (n=10-10) nociceptív hőküszöbe között (vad típusú: $45,2 \pm 0,4$ °C, TRPV1 „knockout”: $45,6 \pm 0,5$ °C, $P=0,76$, kétmintás t-próba).

4.4. Lipid jellegű vegyületek nociceptív hőküszöbre gyakorolt hatásának vizsgálata

4.4.1. Az *N*-oleoil-dopamin (OLDA) hőküszöbre gyakorolt hatásának vizsgálata (2. saját közlemény)



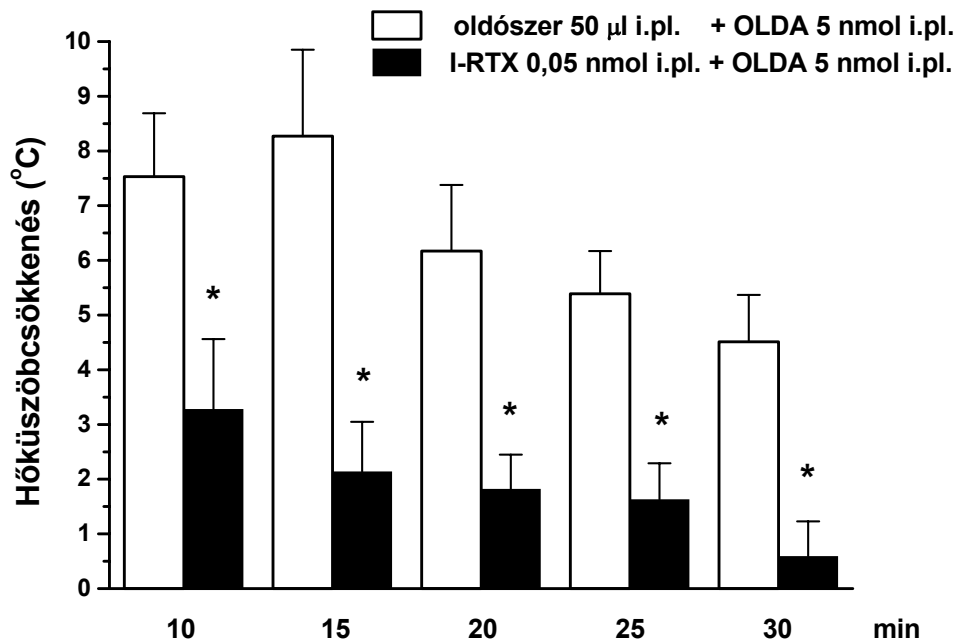
14. ábra. Az *N*-oleoil-dopamin (OLDA) szerkezeti képlete.

Bár számos ágensről ismert, hogy képes aktiválni a TRPV1-receptort (összefoglalóként lásd Pingle és mtsai, 2007), nem tisztázott, hogy mely vegyület(ek) e receptor endogén liganduma(i). Bizonyos adatok felvetették annak lehetőségét, hogy esetleg az endocannabinoid anandamid vagy a lipoxigenáz-termék 12-(*S*)-hidroperoxi-eikozatetraénsav (12-HPETE) lennének ilyen funkciójú vegyületek (Zygmunt és mtsai, 1999; Hwang és mtsai, 2000). Egy újabb jelölt került reflektorfénybe 2003-ban, amikor leírtak egy, a központi idegrendszerben előforduló lipidet, az *N*-oleoil-dopamint (OLDA, 14. ábra), amely szerkezetileg hasonló a kapszaicinhez, és képes Ca^{2+} -beáramlást kiváltani TRPV1-transzfektált „human embryo kidney” (HEK) sejteken (Chu és mtsai, 2003). Ezen túlmenően e vegyület i.pl. adás után nocifenzív reakciót váltott ki, és a „plantar” tesztben csökkentette a hőingerrel kiváltott lábvisszahúzás latenciaidejét, azaz termális hiperalgéziát okozott. Mindezen válaszokat I-RTX-szel antagonizálni lehetett, mutatva a TRPV1-receptor közvetítő szerepét (Chu és mtsai, 2003).

Kísérleteink célja az volt, hogy tovább vizsgáljuk az OLDA TRPV1-receptorra kifejtett hatásait. Az *in vitro* kísérleteket intézetünk másik munkacsoportja végezte: egyrészt radioaktív $^{45}\text{Ca}^{2+}$ celluláris felvételét mérték a patkány TRPV1-receptort stabilan kifejező HT5-1 sejtvonalon (Sándor és mtsai, 2005), másrészt tenyésztett trigeminalis szenzoros neuronokban az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció monitorozása történt fura-2 festékkel történő előkezelés után mikrofluorimetriával.

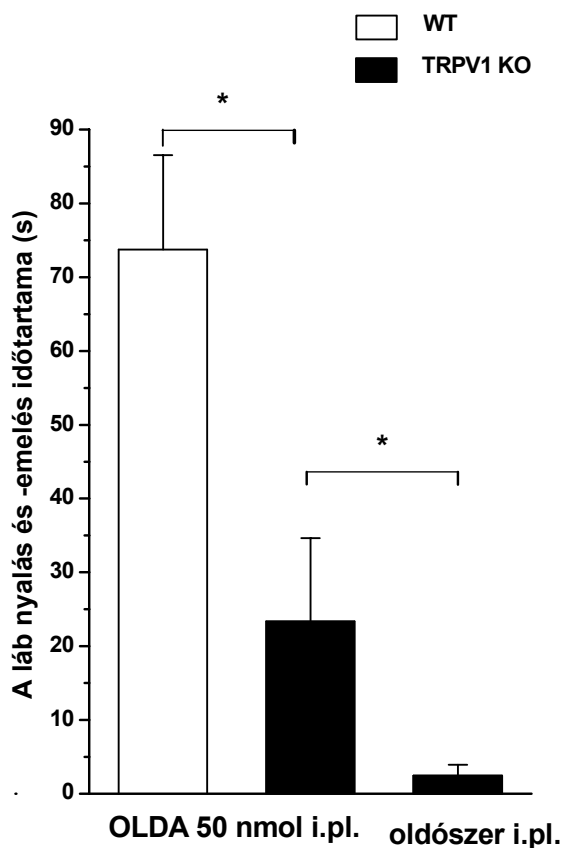
Ezen kísérletek eredményeire vonatkozóan ábrát nem mutatok, viszont rövid szöveges leírásukat megadom az *in vivo* adatokkal való összevetés céljából. Az OLDA koncentrációfüggő módon $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvételt váltott ki a TRPV1-transzfektált sejtekben; a kapszaicinhez képest hatékonysága 60% volt, azaz parciális agonistaként viselkedett, az EC_{50} érték alapján megítélt hatásereősége pedig 50-szer kisebb volt. Az OLDA a tenyésztett trigeminális neuronokban is növelte az intracelluláris Ca^{2+} -szintet, és ez a válasz ismételt adagolás során tachyphylaxiát mutatott.

Az általam végzett *in vivo* kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy képes-e az OLDA csökkenteni a nociceptív hőküszöböt, illetve, hogy nocifenzív hatásának mi a receptorális háttere. A küszöbméréshez a Supertech Kft. által készített emelkedő hőmérsékletű forró lapot használtuk. A kísérletben az állatok egyik hátsó lábába 5 nmol OLDA-t adtunk. Az OLDA beadását az állatok egyik csoportjában az I-RTX szolvensének, míg másik felében 0,05 nmol I-RTX i.pl. beadása előzte meg. Az I-RTX szolvensével előkezelt csoportban az OLDA beadását követő első tíz percben a heves nocifenzív reakció (a láb emelése és nyalása) miatt a hőküszöböt nem tudtuk megmérni. Ezt követően az emelkedő hőmérsékletű forró lappal mérve (15 °C kiindulási hőmérséklet és 12 °C/perc fűtési sebesség) azt tapasztaltuk, hogy az OLDA az RTX-hez hasonlóan jelentős, 5–8 °C-os hőküszöbcsökkenést okozott (15. ábra), ami a beadás utáni 60. percre megszűnt (egy-szemponos ANOVA utáni Newman–Keuls teszttel vizsgálva). Az emelkedő hőmérsékletű forró lapon megfigyelt első nocifenzív reakció az OLDA esetében is a kezelt láb emelése volt. Mivel az I-RTX szolvenséről korábban kimutattuk, hogy nem okoz hőküszöbváltozást (lásd 4.2.3. pont), a nyert adatok az OLDA hőküszöbcsökkentő hatását torzítás nélkül mutatták. Külön kísérletsorozatban kimutattuk, hogy az OLDA szolvense sem nocifenzív, sem hőküszöböt módosító hatást nem váltott ki (az adatokat nem mutatom be). Az OLDA hőküszöbcsökkentő hatását az i.pl. I-RTX-előkezelés az OLDA beadása utáni 10–30. percben szignifikánsan gátolta (15. ábra). Az I-RTX-szel, illetve annak szolvensével előkezelt állatcsoportokban az OLDA hőküszöbcsökkentő hatását ugyanolyan módon hasonlítottuk össze statisztikailag, mint ahogy azt a korábbiakban leírtuk (4.2.2. pont): minden mérési időpontra vonatkozóan a szerrel, illetve a szolvenssel előkezelt csoportban a kontroll hőküszöbhez viszonyított csökkenést kétmintás t-próbával vetettük össze.



15. ábra. Az *i.pl.* adott *N*-oleoil-dopamin (OLDA) hőküszöbcsökkentő hatása az *I*-RTX-szel vagy annak szolvensével végzett előkezelés után. Az adatok átlagértékek \pm SEM, ($n=8$, csoportonként). Csillag jelzi az *I*-RTX szolvenséhez viszonyított szignifikáns eltéréseket ($P<0,05$, kétmintás *t*-próba).

A továbbiakban megvizsgáltuk az OLDA (50 nmol *i.pl.*) nocifenzív reakciót okozó hatását 30–41 grammos nőstény vad típusú ($+/+$) C57BL6 és TRPV1-receptor-génhiányos („knockout”, $-/-$) egerekben. A mérés során az injekció beadását követően mértük a láb emelésének és nyalásának időtartamát. Egerekben a patkányokhoz hasonlóan az *i.pl.* adott OLDA azonnali és heves nocifenzív reakciót váltott ki (a láb emelése, rázogatása és nyalása), amely a TRPV1-génhiányos egerekben szignifikánsan rövidebb idő alatt lezajlott, mint vad típusú párjaikban (16. ábra). Azonban a génhiányos egerekben az OLDA még mindig képes volt nocifenzív reakciót kiváltani, ellentétben a szolvenssel, ami praktikusán hatástalan volt.



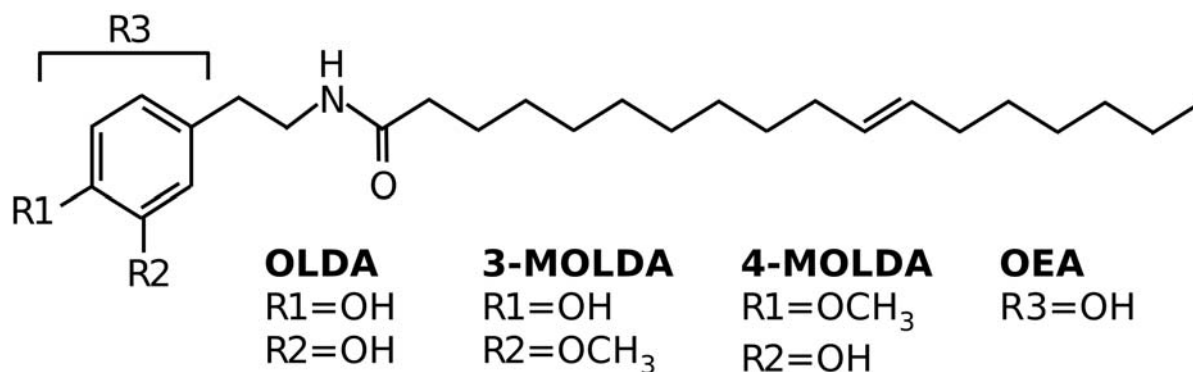
16. ábra. Az *i.pl.* adott *N*-oleoil-dopamin (OLDA) akut nocifenzív hatásának időtartama vad típusú (WT) és TRPV1-receptor „knockout” (KO) egerekben szolvenciával összehasonlítva. Az adatok átlagértékek \pm SEM, ($n=12$). Csillag jelöli a szignifikáns eltéréseket ($P < 0,05$, kétmintás *t*-próba).

4.4.2. A 3-metil-*N*-oleoil-dopamin (3-MOLDA), 4-metil-*N*-oleoil-dopamin (4-MOLDA) és az *N*-oleoil-etanolamid (OEA) TRPV1-receptorra gyakorolt hatásainak vizsgálata (3. saját közlemény)

A TRPV1-receptor-agonistának bizonyult OLDA-val végzett kísérleteink folytatásaként megvizsgáltuk az OLDA két metilált származékának, a 3-metil-*N*-oleoil-dopaminnak (3-MOLDA, 17. ábra) és a 4-metil-*N*-oleoil-dopaminnak (4-MOLDA, 17. ábra) a TRPV1-receptorra kifejtett *in vivo* hatásait, elsősorban a nociceptív hőküszöb mérésével. A 3-MOLDA és 4-MOLDA szintézisének – ami a

Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Kutatóintézetében történt – elméleti alapja az volt, hogy feltételeztük, hogy az endogén OLDA esetleg metilálódik a szimpatikus neurotranszmisszió mediátorát, a noradrenalint metabolizáló katekol-O-metil-transferáz (COMT) révén, és ezáltal nagyobb affinitású (és emiatt potensebb) endogén TRPV1-receptor-agonista keletkezik. Egy rokon zsírsavamidról, az *N*-oleoil-etanolamidról (OEA, 17. ábra) kimutatták, hogy a TRPV1-receptor aktiválásával képes az elsődleges érzőneuronok izgatására, illetve hiperalgémia kiváltására (Ahern, 2003; Wang és mtsai, 2005; LoVerme és mtsai, 2006). Ezzel ellentétben az OEA antinociceptív hatást mutatott egy visceralis fájdalommodellben egérben és egy gyulladásos modellben patkányban (Suardiáz és mtsai, 2007).

Vizsgálataink célja egyrészt az volt, hogy a két újonnan szintetizált OLDA-származék (3-MOLDA és 4-MOLDA) TRPV1-receptorra kifejtett esetleges hatásait kimutassuk. Másrészt, – az OEA-val nyert ellentmondásos irodalmi adatok fényében – az OEA TRPV1-receptorra gyakorolt hatásának analízise is célszerűnek látszott.



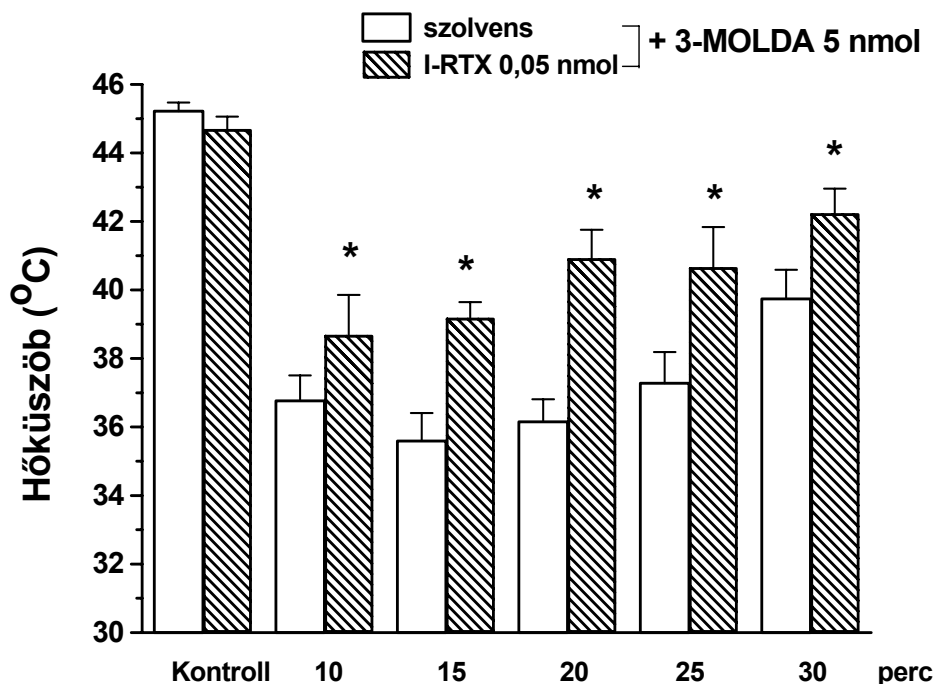
17. ábra. Az *N*-oleoil-dopamin (OLDA), 3-metil-*N*-oleoil-dopamin (3-MOLDA), 4-metil-*N*-oleoil-dopamin (4-MOLDA) és az *N*-oleoil-etanolamid (OEA) kémiai szerkezete.

Az *in vitro* kísérleteket ezen ágensekkel is intézetünk másik munkacsoportja végezte ugyanazon módszerekkel, mint az OLDA esetében: egyrészt ⁴⁵Ca²⁺ celluláris felvételét mérték a patkány TRPV1-receptort stabilan kifejező HT5-1 sejtvonalon (Sándor és mtsai, 2005), másrészt tenyésztett trigeminalis szenzoros neuronokban az intracelluláris Ca²⁺-koncentrációt monitorozták mikrofluorimetriával. Ezen kísérletek eredményeire vonatkozóan sem mutatok ábrát, de röviden

megemlítem őket az *in vivo* adatokkal való összevetés céljából. Az *in vitro* kísérletekben a 3-MOLDA a 0,1–100 μM -os koncentrációtartományban vizsgálva koncentrációfüggően $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvételt indukált a TRPV1-receptort stabilan expresszáló sejtekben. A 3-MOLDA hatékonysága (maximális hatása) 70%-a volt a kapszaicinének, míg az EC_{50} érték alapján megítélt hatáserőssége körülbelül 500-szor kisebbnek bizonyult a kapszaicinéhez viszonyítva. A fenti koncentrációtartományban vizsgált 4-MOLDA és OEA önmagában adva nem váltott ki mérhető $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvételt, de mindkét vegyület koncentrációfüggően csökkentette a 100 nM kapszaicin $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvételt indukáló hatását. A tenyésztett trigeminalis érzőneuronokban a 3-MOLDA növelte az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt, míg a 4-MOLDA és az OEA hatástalan volt. Ezen eredmények alapján valószínűsíthető volt, hogy az *in vitro* kísérletekben a 3-MOLDA a TRPV1-receptor parciális agonistájaként, míg a 4-MOLDA és az OEA TRPV1-receptor-antagonistaként viselkedett.

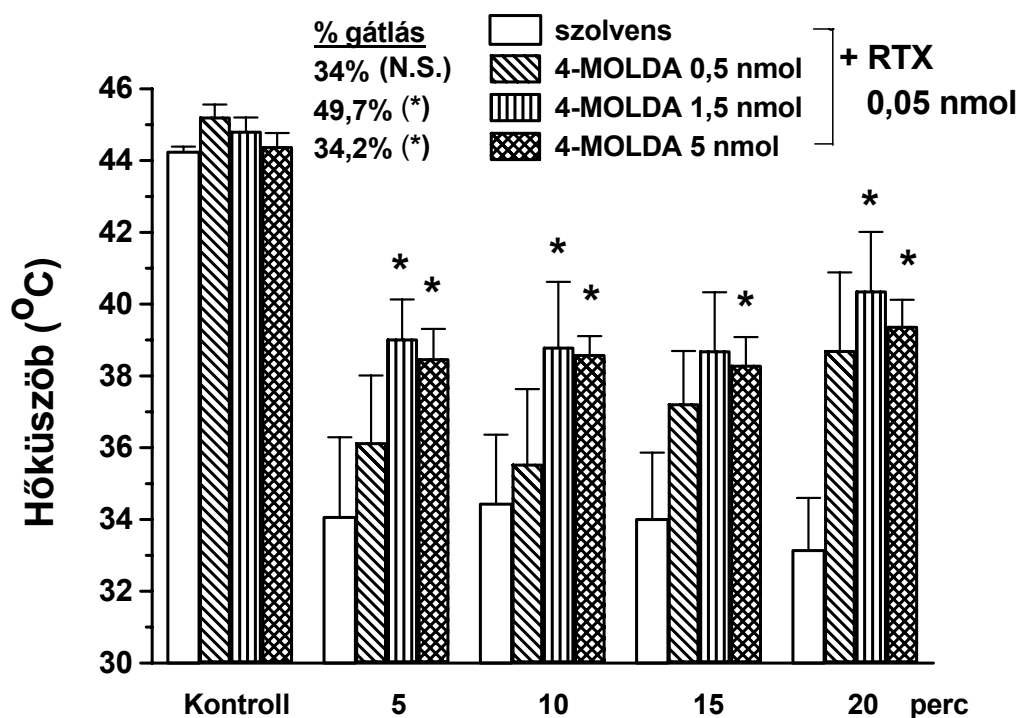
Az *in vivo* kísérletekben az esetleges TRPV1-receptor-agonista hatás vizsgálata során a kontroll hőküszöb mérése („incremental hot plate”, IITC Inc. Life Science, 15 °C kiindulási hőmérséklet, 12 °C/perc fűtési sebesség) után a patkányok egyik hátsó lábába 3-MOLDA, 4-MOLDA vagy OEA oldatát adtuk 100 μl térfogatban i.pl. (egy másik csoportot a megfelelő szolvenssel kezeltünk elő), majd ezt követően 5 percenként hőküszöbmérést végeztünk (azonos paraméterekkel, mint a kontrollmérésnél). A TRPV1-receptor-antagonista hatás kimutatásához a korábban bemutatott RTX hiperalgéria/allodynia tesztet alkalmaztuk (lásd 4.2.1. pont). Kontroll küszöbmérés után i.pl. előkezelést végeztünk a vizsgálandó vegyület oldatával, illetve a megfelelő szolvenssel 100 μl térfogatban. 5 perccel később RTX-et (0,05 nmol) adtunk ugyanabba a lábba, majd hőküszöbmérést végeztünk 5, 10, 15 és 20 perccel később (15 °C kiindulási hőmérséklet, 12 °C/perc fűtési sebesség). A szolvenssel vagy szerrel előkezelt állatcsoportban az RTX hőküszöbcsökkentő hatását ugyanolyan módon hasonlítottuk össze, mint ahogy azt a korábbiakban leírtam (4.2.2. pont): minden mérési időpontra vonatkozóan a szerrel, illetve a szolvenssel előkezelt csoportban a kontroll hőküszöbhez viszonyított csökkenést a kétmintás t-próbával vetettük össze. A hőküszöbcsökkenés gátlásának mértékét kifejező összesített százalékos mutatót az alábbi képlettel számoltuk ki: $(\text{Csökk}_{\text{szolv}} - \text{Csökk}_{\text{szer}}) / \text{Csökk}_{\text{szolv}} \times 100$, ahol a $\text{Csökk}_{\text{szolv}}$ és $\text{Csökk}_{\text{szer}}$ a négy mérési időpontban regisztrált hőküszöbcsökkenés összegének átlaga a szolvenssel, illetve a szerrel előkezelt csoportban.

Az *in vitro* kísérletekben TRPV1-receptor-agonistaként viselkedő 3-MOLDA i.pl. injekciója (5 nmol) azonnali nocifenzív reakciót (a láb nyalása és emelése) váltott ki, amely 10 percen belül megszűnt. Ezt követően az emelkedő hőmérsékletű forró lappal mérve azt tapasztaltuk, hogy a 3-MOLDA ezen dózisa szignifikánsan csökkentette a hőküszöböt (18. ábra), és a hatás maximuma a beadást követő 10–15. percben volt (egy-szemponos ANOVA utáni Newman–Keuls teszttel vizsgálva). Az emelkedő hőmérsékletű forró lapon megfigyelt első nocifenzív reakció itt is a láb emelése volt. A 3-MOLDA szolvense nem váltott ki nocifenzív reakciót vagy hőküszöbváltozást (az adatokat nem mutatom be). A 3-MOLDA hőküszöbcsökkentő hatását gátolni lehetett a TRPV1-receptor-antagonista I-RTX-szel történő előkezeléssel (0,05 nmol i.pl. 5 perccel a 3-MOLDA adása előtt). A 18. ábra tanúsága szerint az I-RTX-szel kezelt csoportban minden mérési pontban magasabb volt a hőküszöb, mint az I-RTX szolvensével előkezeltben. A 3-MOLDA-val ellentétben a 4-MOLDA és az OEA nem váltott ki semmilyen nocifenzív reakciót és nem változtatta a hőküszöböt az i.pl. adott 5 nmol dózisban (az adatokat nem mutatom be).



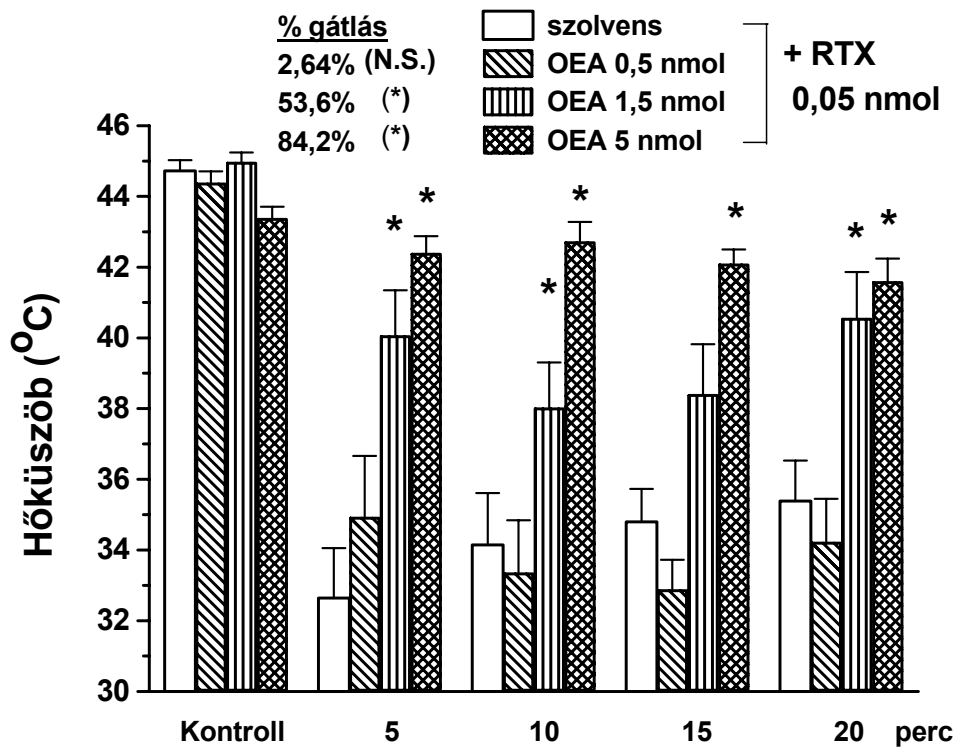
18. ábra. A 3-metil-N-oleoil-dopamin (3-MOLDA) hatása a hőküszöbre I-RTX-szel vagy annak szolvensével végzett előkezelés után. Az adatok átlagértékek \pm SEM ($n=8$, csoportonként). Csillag jelöli a szignifikáns eltéréseket az I-RTX szolvenséhez viszonyítva ($P<0,05$, kétmintás t -próba).

Mivel a 4-MOLDA és az OEA az *in vitro* kísérletekben TRPV1-receptor-antagonistaként viselkedett, és önmagában adva nem váltott ki választ a magatartási vizsgálatokban, a továbbiakban esetleges *in vivo* TRPV1-receptor-antagonista hatásukat teszteltük. A patkányok egyik hátsó lábába adott 4-MOLDA közepes (1,5 nmol) és legmagasabb dózisa (5 nmol) szignifikánsan csökkentette az 5 perccel később ugyanabba a lábba adott RTX (0,05 nmol) hőküszöbcsökkentő hatását a szolvenséhez képest majdnem minden mérési időpontban (19. ábra). A négy időpontban mért hőküszöbcsökkenés összege alapján számított százalékos gátlás a legmagasabb 4-MOLDA-dózis esetében kisebb (34,2%) volt, mint a középső dózis esetében (49,7%), jelezve, hogy a 4-MOLDA gátló hatása kb. 50%-nál elérte a maximumát. Magasabb dózisokat nem vizsgáltunk az anyag kicsapódásának veszélye miatt. Egyértelmű dózis–hatás összefüggés hiányában nem határoztuk meg a 4-MOLDA ID₅₀ értékét (az RTX-hatást 50%-ban gátló dózis).



19. ábra. A 4-metil-N-oleoil-dopamin (4-MOLDA) hatása az RTX-indukálta hőküszöbcsökkenésre. Az adatok átlagértékek \pm SEM, (n=8, csoportonként). Csillag jelöli a 4-MOLDA szolvenséhez viszonyított szignifikáns eltéréseket ($P < 0,05$, kétmintás t-próba). A százalékos gátlásokat a négy időpontban mért hőküszöbcsökkenés összege alapján számítottuk.

Hasonló paradigma szerint vizsgálva az OEA közép (1,5 nmol) és legnagyobb dózisa (5 nmol) is gátolta az RTX küszöbcsökkentő hatását a szolvenséhez képest (20. ábra). Ennél a szerénél egyértelmű dózis–hatás összefüggést találtunk, a négy időpontban mért hőküszöbcsökkenés összege alapján számított százalékos gátlás 2,6-től 84,2%-ig terjedt, és az OEA ID₅₀ értéke 1,4 nmolnak adódott.



20. ábra. Az *N*-oleoil-etanolamid (OEA) hatása az RTX-indukálta hőküszöbcsökkenésre. Az adatok átlagértékek \pm SEM, ($n=8$, csoportonként). Csillag jelöli az OEA szolvenséhez viszonyított szignifikáns eltéréseket ($P<0,05$, kétmintás *t*-próba). A százalékos gátlásokat a négy időpontban mért hőküszöbcsökkenés összege alapján számítottuk.

4.4.3. Az anandamid hatása a nociceptív hőküszöbre (3. saját közlemény)

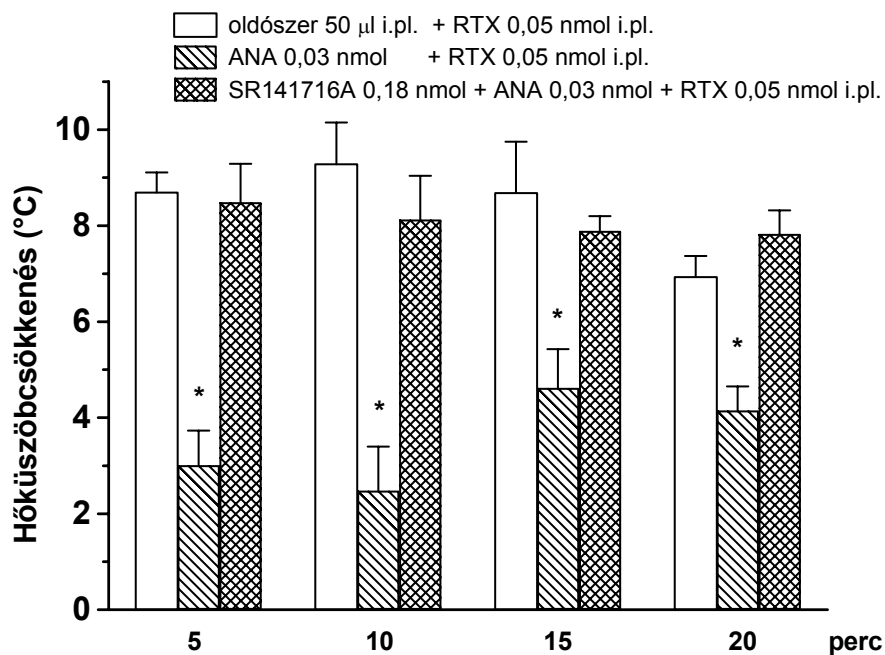


21. ábra. Az anandamid (arachidonil-etanolamid) szerkezeti képlete.

Egy másik zsírsavamid, az anandamid vagy más néven arachidonil-etanolamid (21. ábra) a cannabinoidreceptorok – elsősorban a CB₁-receptor és jóval kisebb affinitással a CB₂-receptor – endogén ligandja (összefoglalóként lásd Pertwee, 2001). A CB₁-receptorok megtalálhatók a központi idegrendszerben és a periférián egyaránt, és aktivációjuk révén az anandamid gátolja a depolarizáció hatására történő neurotranszmitter-felszabadulást (Vaughan és mtsai, 2000). Az anandamid számos *in vivo* állatkísérletes modellben antinociceptív hatásának bizonyult, mivel CB₁-receptorok aktiválásával csökkentette a gyulladásos hő- és mechanikai hiperalgéziát (Calignano és mtsai, 1998; Jaggar és mtsai, 1998; Richardson és mtsai, 1998; Farquhar-Smith és mtsai, 2002). További adatok szerint az anandamid a TRPV1-receptorokat is képes aktiválni *in vitro* (Zygmunt és mtsai, 1999; Smart és mtsai, 2000), bár lényegesen magasabb koncentrációban, mint amely a cannabinoidreceptorok stimulációjához szükséges (Németh és mtsai, 2003; Ahluwalia és mtsai, 2003). Mindezek alapján ma az anandamidot kettős, cannabinoid/TRPV1-receptor-agonistaként szokták említeni. Az anandamiddal kapcsolatos sokat vitatott kérdés, hogy funkcionálhat-e mint a TRPV1-receptor endogén, fiziológias agonistája (Szolcsányi, 2000; Di Marzo és mtsai, 2001). Kísérleteink célja az volt, hogy saját *in vivo* kísérleti modellünkben megvizsgáljuk ezt a lehetőséget. Amennyiben az anandamid TRPV1-receptor-agonistaként viselkedik, csökkentenie kell a hőküszöböt (az RTX-hez hasonlóan), míg CB₁-receptor-agonista hatás érvényesülésekor inkább antinociceptív hatása várható, amely elméletileg az RTX-okozta hőküszöbcsökkenés gátlásában nyilvánulhat meg.

Az i.pl. adott anandamid (0,03-0,3 nmol) nem váltott ki nocifenzív reakciót, és nem befolyásolta az „incremental hot plate” (IITC Inc. Life Science) készülékkel mért

hőküszöböt sem (az adatokat nem mutatom be). A továbbiakban az anandamiddal végzett 5 perces i.pl. előkezelés hatását vizsgáltuk az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenésre. Az anandamiddal vagy szolvensével előkezelt állatcsoportban az RTX hőküszöbcsökkentő hatását ugyanolyan módon hasonlítottuk össze, mint ahogy azt a korábbiakban leírtam (4.2.2. pont): minden mérési időpontra vonatkozóan az anandamiddal, illetve a szolvenssel előkezelt csoportban a kontroll hőküszöbhez viszonyított csökkenést a kétmintás t-próbával vetettük össze. Az i.pl. adott anandamid (0,03 nmol) szignifikánsan gátolta az 5 perccel később ugyanazon lábba adott RTX (0,05 nmol i.pl.) hőküszöbcsökkentő hatását mind a négy mérési időpontban (22. ábra). A szelektív CB₁-receptor-antagonista SR141716A (0,18 nmol i.pl.) az anandamiddal való együttes adás esetén teljesen kivédte az anandamid gátló hatását az RTX-okozta hőküszöbcsökkenésre (22. ábra).



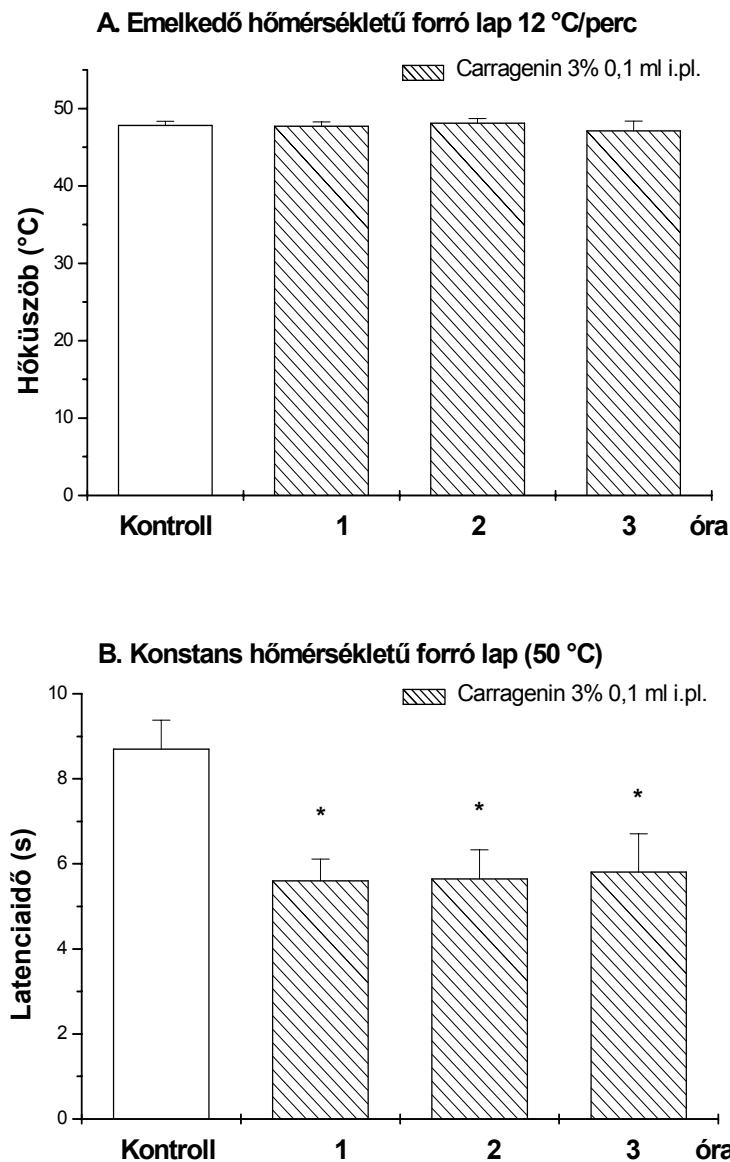
22. ábra. Az anandamid (ANA) hatása az RTX-okozta hőküszöbcsökkenésre a CB₁-receptor-antagonista SR141716A hiányában és jelenlétében. Az adatok átlagértékek \pm SEM ($n=8$, csoportonként). Csillag jelöli a szignifikáns különbségeket az anandamid szolvenséhez viszonyítva ($P<0,05$, kétmintás t-próba).

4.5. A carrageninnel kiváltott szubakut gyulladás hatása a nociceptív hőküszöbre (még nem közölt eredmények)

A korábbiakban tárgyalt kísérleteink egyértelműen mutatják, hogy számos ágens képes csökkenteni a nociceptív hőküszöböt. Az RTX, az OLDA és a 3-MOLDA, illetve az α,β -metilén-ATP egyaránt fázikus küszöbcsökkenést váltott ki, vagyis a válasz rövid latencia után jelentkezett és 10–60 percen belül megszűnt. A fenti ágensek olyan receptorokon (TRPV1 és P_{2X3}) hatnak, amelyek aktivációja akut neurogén gyulladás kifejlődését eredményezi. A TRPV1- és a P_{2X3} -receptor aktivációja a hagyományos latenciaidő-méréseken alapuló módszerekkel is kimutatható termális hiperalgéziát vált ki (Gilchrist és mtsai, 1996; Yeomans és mtsai, 1996; Hamilton és mtsai, 1999). Vagyis az ezen ágensek okozta akut termális hiperalgézia magába foglalja mind a latenciaidő megrövidülését, mind a nociceptív hőküszöb csökkenését. Felvetődik a kérdés, hogy a termális hiperalgézia ezen két paramétere (lásd 2. ábra) mindig együtt változik-e? Ennek vizsgálata érdekében egy szubakut gyulladásos modellt választottunk, amelyben carragenin i.pl. injekciójával váltottunk ki több órán át fennálló gyulladásos reakciót a kezelt talpban. Irodalmi adatok egyértelműen mutatják, hogy ezen ágens a hagyományos termonociceptív tesztekben latenciarövidülést okoz (lásd pl. Hargreaves és mtsai, 1988). Kihasnálva az „incremental hot plate” (IITC Inc. Life Science) azon előnyét, hogy segítségével emelkedő hőmérsékletű üzemmódban hőküszöböt lehet mérni, konstans hőmérsékletűben pedig latenciaidőt, kísérleteinkben párhuzamosan vizsgáltuk ugyanabban az állatcsoportban a carragenin hatását a nociceptív hőküszöbre, illetve a küszöbfeletti hőingerre adott nocifenzív reakció latenciaidejére.

A carragenin adása előtt ugyanazon állatokban meghatároztuk az egyik hátsó végtagra vonatkozóan mind a hőküszöböt (30 °C kiindulási laphőmérséklet, 6 vagy 12 °C/perc fűtési sebesség), mind pedig az 50 °C-os konstans laphőmérsékletnél a láb megnyalásáig eltelt latenciaidőt (mindkét esetben 2-2 mérés történt 30 perc különbséggel, ezek átlaga szolgált kontrollként). Ezután carragenint (3%, fiziológias sóoldatban diszpergálva, 100 μ l térfogatban) adtunk i.pl. abba a lábba, amelyre nézve a kontroll értékeket előzetesen meghatároztuk. A carragenin már egy órával a kezelés után a patkányok hátsó végtagján gyulladásos reakciót váltott ki (a kezelt láb kipirult, jelentősen megduzzadt), amely 3–4 órán át fennmaradt. Az „incremental hot

plate” készüléssel emelkedő hőmérsékletű üzemmódban mérve a carragenin meglepő módon nem okozott hőküszöbcsökkenést a kontrollhoz képest (23. ábra, A rész). Ugyanakkor ezeknél a carrageninnel kezelt állatoknál a készülék állandó hőmérsékletű üzemmódjában, 50 °C-os hőmérsékletet alkalmazva a kezelt láb megnyalásáig eltelt latenciaidő szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz képest a kezelés utáni 1–3. órában (23. ábra, B rész).



23. ábra. A rész: a carragenin hatása a nociceptív hőküszöbre. B-rész: a carragenin hatása az 50 °C-os állandó hőmérsékletű forró lapon meghatározott nyalási reakció latenciaidejére. Az adatok átlagértékek \pm SEM ($n=16$, mindkét tesztben ugyanazon állatok vettek részt). Csillag jelzi a szignifikáns eltéréseket a kontrollhoz képest ($P<0,05$, egy-szemponos ANOVA utáni Newman–Keuls teszt).

5. MEGBESZÉLÉS

Az újonnan kifejlesztett emelkedő hőmérsékletű forró lap megbízható eszköznek bizonyult a nociceptív hőküszöb meghatározására, valamint gyógyszerek termális antinociceptív és antihiperalgetikus hatásainak mérésére éber, szabadon mozgó patkányokban. Az emelkedő hőmérsékletű forró lapon a típusos nocifenzív reakció valamelyik hátsó láb megnyalása volt, hasonlóan a hagyományos, állandó hőmérsékletű forró laphoz. A patkányok magatartási nociceptív hőküszöbe 45 °C körüli értéknek adódott, amely hasonló a polimodális nociceptorok elektrofiziológiailag meghatározott aktivációs küszöbéhez, illetve az emberben mért fájdalmas hőküszöbhez (Szolcsányi, 1977; Mayer és Campbell, 1981; La Motte és mtsai, 1982; Reeh, 1988; Sycha és mtsai, 2003). Az emelkedő hőmérsékletű forró lap lényeges tulajdonsága, hogy a hőküszöb nagyon jól reprodukálhatóan mérhető. A nociceptív hőküszöb – 5 perctől egy napig terjedő intervallumban – ismételt mérések során állandónak (minimálisan variábilisnak) mutatkozott. Ezzel ellentétben a klasszikus, állandó hőmérsékletű forró lapon meghatározott latenciaidő ismételt mérések során módosulhat (Groves és Thompson, 1970; Gambe és Milne, 1989; Milne és Gamble, 1989; Carstens és Wilson, 1993; Plone és mtsai, 1996; Sandkühler és mtsai, 1996). Az ismételt hőküszöbmérések során sem szenzibilizációt (hőküszöbcsökkenés), sem deszenzibilizációt (hőküszöb-emelkedés) nem tapasztaltunk. Ennek az lehet az oka, hogy az alkalmazott hőstimulus jóval kisebb nociceptor-izgalmat vált ki, mint a küszöbfeletti hőingerek, melyeket a hagyományos standard hőmérsékletű forró lapon alkalmaznak. A módszer további előnye a hagyományos forró laphoz képest, hogy a valódi nociceptív hőküszöböt méri. Ez azért hangsúlyozandó, mert sokszor a közleményekben a latenciaidőt hőküszöbként értelmezik. A kísérleteink során mért hőküszöb valódi abban az értelemben is, hogy az emelkedő hőmérsékletű forró lap tizedfok pontossággal képes mérni, szemben a korábbi, intézetünkben alkalmazott módszerrel – ahol az állatok hátsó végtagját konzekutív módon 1 °C-onként emelkedő, állandó hőmérsékletű fürdőbe mártották –, amellyel csak egy hozzávetőleges, 1 °C-nál nem pontosabb hőküszöböt lehetett meghatározni (Szolcsányi, 1985; 1987b).

Vizsgálataink során kiderült, hogy a morfin mellett a nem-szteroid gyulladáscsökkentő diclofenac és a nem-opioid analgetikum paracetamol is képes

megemelni a nociceptív hőküszöböt dóziszfüggő módon. Ezek az eredmények egybevágóak Hunskar és mtsai (1986) megfigyeléseivel, akik a morfin, az acetilszalicilsav (aszpirin) és a paracetamol hőküszöbemelő hatását írták le az általuk kifejlesztett, de azóta „feledésbe merült” emelkedő hőmérsékletű forró lap alkalmazásával. A morfin minimális effektív dózisát hasonlóan találtuk, mint a klasszikus (állandó hőmérsékletű) forró lapon meghatározott minimális latenciaidőt megnyújtó dózis (lásd Vogel és Vogel, 1997; Le Bars és mtsai, 2001). Széles körben elfogadott, hogy a klasszikus standard hőmérsékletű forró lap csak az opioidok antinociceptív hatását képes kimutatni, és nagyban érzéketlen a ciklooxygenáz-gátlók iránt (lásd Vogel és mtsai, 1997; Le Bars és mtsai, 2001). A diclofenacot (100 mg/kg i.p. dóziséig) hatástalannak találták a klasszikus forró lapot alkalmazó vizsgálatokban (Björkman és mtsai, 1990; Engelhardt és mtsai, 1995; Santos és mtsai, 1998), míg a paracetamolról ellentmondásos adatokat közöltek (Pini és mtsai, 1996; Amabeoku és mtsai, 2000; Kouadio és mtsai, 2000; Sandrini és mtsai, 2001). Elmondható tehát, hogy a latenciaidő-méréssel ellentétben a nociceptív hőküszöb mérésével a diclofenac és a paracetamol direkt (nem érzékenyített állapotban mért) termális antinociceptív hatása jól kimutatható.

Az i.pl. adott RTX-szel kapcsolatos kísérleteink mutatták ki elsőként egy TRPV1-receptoron ható ágens tényleges nociceptív hőküszöbcsökkentő hatását éber, mozgásukban nem korlátozott állatokban. Érdekes módon az RTX egy, a kezeletlen állatoknál ritkán látott reakciót váltott ki az emelkedő hőmérsékletű forró lapon. Az RTX-szel kezelt állatokban a láb emelése volt az első nocifenzív válasz, amit a láb nyalása követett magasabb hőmérsékletnél. Ugyanezt tapasztaltuk a szintén hőküszöbcsökkenést kiváltani képes α,β -metilén-ATP, OLDA és 3-MOLDA esetében is (ezek hatásainak megbeszélését lásd lejjebb). Az elsőként megjelenő nocifenzív reakció alapelvét követve a hőküszöb-meghatározás végpontjaként az RTX (α,β -metilén-ATP, OLDA, illetve 3-MOLDA) adását követően a láb emelését, míg nem kezelt állatokban a láb nyalását tekintettük. Az RTX által okozott hőküszöbcsökkenés rendkívül markáns volt: a küszöb 34–41 °C közé csökkent, ami nem ártalmas hőmérséklet, emiatt termális allodyniaként is értelmezhetjük. Mivel az allodynia fogalmát egyes szerzők a nem-nociceptív ($A\beta$) rostok által közvetített fájdalomra tartják fenn, az RTX hőküszöbcsökkentő hatását termális hiperalgéziának is nevezhetjük. Tekintettel arra, hogy a TRPV1-receptor-antagonista I-RTX gátolta az

RTX hatását, a TRPV1-receptor közvetítő szerepét direkt módon tudtuk igazolni. Meglepő módon az „arany standard” TRPV1-receptor-agonista kapszaicinnal nem tudunk hőküszöbcsökkenést kimutatni, dacára annak, hogy a kapszaicin számos modellben termális szenzibilizálót okozott. Emberben a bőrön alkalmazott felületi kapszaicinkezelés (Szolcsányi, 1977), illetve intradermális injekció (Simone és mtsai, 1987) eredményezett termális hiperalgéziát. Kapszaicin alkalmazása felületi vagy intradermalis formában termális hiperalgéziát váltott ki patkányokban is, melyet a láb visszahúzás latenciaidejének rövidülésével lehetett igazolni „plantar” tesztben (Gilchrist és mtsai, 1996; Yeomans és mtsai, 1996). A kapszaicin termális szenzibilizáló hatását „patch-clamp” és egyrost-elvezetéses kísérletekben is sikerült bizonyítani (Kirschstein és mtsai, 1997; Günther és mtsai, 1999; Vyklicky és mtsai, 1999). A jelen vizsgálatsorozat eredményei jól illeszkednek ezekhez az adatokhoz, jelezve, hogy az RTX – mint egy másik, ultrapotens TRPV1-receptor-agonista – markáns hőküszöbcsökkenést okoz egészen az ártalmatlan hőmérsékleti tartományig.

A morfin, diclofenac és paracetamol már nagyon alacsony dózisban gátolta az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenést, vagyis termális antiallodyniás/antihiperalgetikus hatást fejtett ki. Ennek a hatásnak a kvantifikálására két paramétert is alkalmaztunk: egyrészt az 5. percben mért hőküszöbcsökkenésnek, mint a maximális RTX-hatásnak a csökkentését, másrészt a négy időpontban mért hőküszöbcsökkenés összegének, mint az RTX-hatás integratív mutatójának a csökkentését. A kétféle számítással nyert egybevágó eredmények azt jelzik, hogy mindkét paraméter egyformán alkalmas a gyógyszerek termális antihiperalgetikus hatásának mérésére az általunk vizsgált modellben. Érdekes, hogy míg a morfin és a paracetamol esetében a hőküszöbcsökkenést gátló hatás dóziszfüggő volt és elérte a 100%-ot, a diclofenac gátló hatása nem mutatott egyértelmű dózis–hatás összefüggést, és nem érte el az 50%-ot sem. A morfin, diclofenac és paracetamol RTX-allodyníát/hiperalgéziát gátló minimális effektív dózisaik kisebbnek bizonyultak, mint a három szer hőküszöb-emelkedést kiváltó minimális effektív dózisaik. Mindez összhangban van azzal az általános nézettel, hogy az analgetikumok antihiperalgetikus hatását nagyobb érzékenységgel lehet kimutatni, mint a nem érzékenyített alapreakció gátlására vonatkozó hatásukat (lásd Le Bars és mtsai, 2001). Az RTX gyors hatásbeállása és a hőküszöbcsökkenés rövid, 20 perces hatástartama valószínűtlenné teszi, hogy az RTX-indukálta termális hiperalgéziában

szignifikáns gyulladáscsökkentő komponens érvényesüljön. Így a nem-szteroid gyulladáscsökkentő diclofenac kimutatott antiallodyniás/antihiperalgétiás aktivitása elsősorban nem gyulladáscsökkentő hatás következménye, hanem valószínűleg tisztán antinociceptív effektus. Ezzel ellentétben számos általánosan használt hiperalgéziatesztben, mint amelyben pl. carragenint vagy Freund-adjuvánst használnak, jelentős gyulladáscsökkentő reakció alakul ki, melynek vizsgálata során igen nehéz a gyógyszerek antinociceptív és gyulladáscsökkentő hatásának elkülönítése (lásd Vogel és Vogel, 1997). Összefoglalóan megállapítható, hogy az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenés mérése emelkedő hőmérsékletű forró lap segítségével egy új hiperalgézia-modell, amely igen nagy érzékenységet mutat a klasszikus referencia-analgetikumok iránt.

A TRPV1-receptor-agonisták néhány képviselője (kapszaicin, RTX) egyedülálló abban a tekintetben, hogy a kezdeti izgató hatást követően egy tartós refrakter állapotot hoz létre, melyet szenzoros deszenzibilizációnak nevezünk (Jancsó, 1959; összefoglalóként lásd Holzer, 1991; Szolcsányi, 1993; Szállási és Blumberg, 1999). Nagyobb dózisban és/vagy hosszabb időn keresztül adagolva ezek csökkent válaszkészséget okoznak hő, mechanikai és kémiai ingerekkel szemben egyaránt. Modellünkben az RTX alkalmazását követően egy óra múlva már kimutatható volt a hőküszöb emelkedése, amely néhány napig változatlanul fennállt, majd a 6. napon a hőküszöb visszatért a kiindulási értékre. A hőküszöb emelkedése nem magyarázható a TRPV1-receptor deszenzibilizációjával, mert TRPV1-receptor-génhiányos („knockout”) egereken végzett vizsgálatok kimutatták, hogy nem-kondicionált állapotban a forró ingerek detektálásában (legalábbis 48–50 °C-ig) nem játszik szerepet ez az ioncsatorna (Caterina és mtsai, 2000; Davis és mtsai, 2000; Woodbury és mtsai, 2004; Zimmermann és mtsai, 2005). Ezzel összhangban saját kísérleteinkben a TRPV1-receptor-antagonista I-RTX nem befolyásolta a patkányok kontroll hőküszöbét, és a TRPV1-receptor-génhiányos („knockout”) egerek hőküszöbe sem különbözött vad típusú társaikétól. Tehát fiziológiás körülmények között a perifériás nociceptorok TRPV1-receptorai nem vesznek részt a nociceptív hőküszöb meghatározásában. Valószínűleg egyéb hőérzékeny csatornák (összefoglalóként lásd Benham és mtsai, 2003; Dhaka és mtsai, 2006) felelősek a nociceptív hőküszöb „beállításáért”. Az RTX tartós hőküszöbemelő hatásáért sokkal inkább a kapszaicin-érzékeny idegvégződések ultrastrukturális károsodásán alapuló szenzoros deszenzibilizáció felelős (Szolcsányi és mtsai, 1975; Szállási és mtsai,

1989; Szolcsányi, 2003). Elmondható, hogy az emelkedő hőmérsékletű forró lappal sikerült kimutatni az RTX hosszú távú, de még reverzibilis szenzoros deszenzibilizáló hatását, hasonlóan a kapszaicin emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel történt korábbi vizsgálatához (Szolcsányi, 1985; 1987b). Mindezek alapján elmondható, hogy az emelkedő hőmérsékletű forró lap nemcsak akut, hanem hosszabb távú mérésekre is alkalmas, feltehetően a hőküszöb nagyfokú stabilitása miatt (is).

Az I-RTX egy újabban kifejlesztett TRPV1-receptor-antagonista, amely *in vitro* jóval potensebbnek bizonyult, mint a capsazepin (Wahl és mtsai, 2001; Undem és Kollarik, 2002; Rigoni és mtsai, 2003). Az I-RTX dejodináció révén RTX-szé való alakulásának lehetősége *in vivo* körülmények között nem zárható ki. Egy ilyen átalakulás eredményezhetné az I-RTX TRPV1-receptor-antagonista tulajdonságának és a keletkező RTX TRPV1-receptor-agonista hatásának a keveredését. Eredményeink azt mutatják, hogy az I-RTX-nek nincs mérhető parciális agonista hatása, mivel önmagában adva nem csökkentette a hőküszöböt és nem váltott ki nocifenzív reakciót, ezért RTX-szé való átalakulása – legalábbis számottevő mértékben – *in vivo* nem valószínűsíthető. Az I-RTX igen kis dózisban gátolta az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenést, de nem befolyásolta az α,β -metilén-ATP hőküszöbcsökkentő hatását. Ennek alapján elmondható, hogy az I-RTX potens és szelektív TRPV1-receptor-antagonistaként viselkedett modellünkben. Az α,β -metilén-ATP hőküszöbcsökkentő hatása kisebb és rövidebb volt, mint az RTX-é, és a P2 purinerg receptor közvetítő szerepét a receptorspecifikus antagonistá PPADS gátló hatása alapján ki tudtuk mutatni. Eredményeink összhangban vannak azokkal az irodalmi adatokkal, amelyek a latenciamérésen alapuló „plantar” teszttel igazolták az ATP termális hiperalgéziát okozó hatását (Hamilton és mtsai, 1999).

A lipid jellegű vegyületek, közelebbről a zsírsavamidok hőküszöbre kifejtett hatásának vizsgálata során kimutattuk, hogy az OLDA – az RTX-hez és az α,β -metilén-ATP-hez hasonlóan – i.pl. adás esetén nocifenzív reakciót vált ki és lecsökkenti a nociceptív hőküszöböt, azaz termális hiperalgéziát okoz. Ez utóbbi hatást a TRPV1-receptor aktivációjával hozza létre, amint azt az I-RTX-előkezelés gátló hatása egyértelműen mutatja. Mivel az I-RTX az alkalmazott dózisban szelektív a TRPV1-receptorra (lásd feljebb) megállapítható, hogy az OLDA hőküszöbcsökkentő hatását a TRPV1-receptor aktiválásával fejt ki. Az OLDA 100-szor nagyobb dózisban váltott ki hasonló hőküszöbcsökkentő hatást, mint az RTX,

megerősítve az RTX ultrapotens jellegét. Az i.pl. adott OLDA egerekben is nocifenzív reakciót váltott ki, amelynek időtartama kisebb volt a TRPV1-receptor-génhiányos állatokban, mint vad típusú társaikban, mutatva a TRPV1-receptor közvetítő szerepét. Érdekes módon az OLDA a TRPV1 „knockout” egerekben is okozott némi nocifenzív választ. Tekintettel arra, hogy a szolvense teljesen hatástalan volt a „knockout” állatokban, arra következtethetünk, hogy az OLDA nocifenzív hatásában a TRPV1-receptor aktivációja és egy ettől független, nem azonosított mechanizmus egyaránt szerepet játszik. Összességében elmondható, hogy eredményeink egybevágóak az OLDA korábban leírt hatásaival (Chu és mtsai, 2003), és elképzelhetővé teszik, hogy az OLDA egy lehetséges endogén liganduma a TRPV1-receptornak. Az intézetünkben más munkacsoport által végzett *in vitro* kísérletek is alátámasztják ezt a feltételezést, mivel az OLDA Ca^{2+} -beáramlást okozott mind TRPV1-génnel transzfektált sejteken, mind tenyésztett trigeminális neuronokon. Az OLDA endogén TRPV1-receptor ligandum hipotézisének a bizonyításához vagy esetleges elvetéséhez további kísérletek szükségesek, mindenekelőtt arra vonatkozóan, hogy az OLDA kimutatható-e a nociceptív primer afferens neuronok perifériás (esetleg centrális) végződési környezetében.

Az OLDA metilált származékai TRPV1-receptorra kifejtett hatásainak vizsgálata során kimutattuk, hogy a 3-MOLDA i.pl. adva nocifenzív reakciót követően hőküszöbcsökkenést okozott, amelynek mértéke hasonló volt, mint az RTX esetében. Ez utóbbi választ a korábbi kísérleteinkben validált TRPV1-receptor-antagonista I-RTX gátolta. Ennek alapján a 3-MOLDA-t TRPV1-receptor-agonistának minősíthetjük modellünkben. Ezt a következtetést alátámasztják a másik munkacsoport által végzett *in vitro* kísérletek is, amelyekben a 3-MOLDA intracelluláris Ca^{2+} -akkumulációt okozott mind a TRPV1-génnel transzfektált sejteken, mind trigeminális szenzoros neuronokban. Reményeinkkel ellentétben a 3-MOLDA nem bizonyult potensebb TRPV1-receptor-agonistának, mint az OLDA, sőt az *in vitro* kísérletekben az EC_{50} értéke kb. tízszer nagyobb volt. A 3-MOLDA-val ellentétben a 4-MOLDA és az OEA nem váltott ki sem nocifenzív magatartást, sem hőküszöbváltozást. Ugyanakkor mindkét szer gátolta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását. Az OEA RTX-antagonista hatása egyértelmű dózis–hatás összefüggést mutatott, lehetővé téve az ID_{50} érték meghatározását, viszont a 4-MOLDA esetében a dózis–hatás összefüggés hiányzott, és a gátlás 50% körül elérte maximumát. Figyelembe véve, hogy az *in vitro* kísérletekben sem a 4-MOLDA, sem az OEA nem

váltott ki Ca^{2+} -akkumulációt, de mindkét szer gátolta a kapszaicin Ca^{2+} -akkumulációt okozó hatását, a 4-MOLDA és az OEA egyaránt TRPV1-receptor-antagonistának minősíthető. Az antagonizmus mechanizmusa nem állapítható meg a kísérleti eredmények alapján: a TRPV1-receptoron ható OLDA-val való szerkezeti hasonlóság miatt kézenfekvőnek tűnik a kompetitív antagonizmus, de a TRPV1-receptor ioncsatorna részének gátlása (csatornablokk) sem zárható ki. A kétféle MOLDA-val nyert eredményeink megerősítik a farmakológia régi alaptételét, miszerint egy vegyület szerkezetének minimális megváltoztatása jelentősen módosíthatja a hatást, illetve ugyanannak a szubsztituensnek eltérő pozícióban történő elhelyezése a molekulán belül képes ellentétes – agonista illetve antagonist – tulajdonságokat előidézni.

Az OEA-val nyert eredmények kompatibilisek azokkal a korábbi vizsgálatokkal, amelyekben az OEA antinociceptív hatásának mutatkozott az ecetsavval kiváltott „writhing” tesztben egérben, illetve a formalintesztben mind egérben mind patkányban (Suardiaz és mtsai, 2007). Másfelől azonban az OEA a TRPV1-receptor aktiválása révén izgatta az egér vagalis szenzoros neuronjait, és zsigeri nocicepciót váltott ki (Wang és mtsai, 2005). Szintén egérben, az OEA i.pl. injekciója nocefenzív reakciót váltott ki, bár 6–30-szor magasabb dózisban, mint amelyeket saját vizsgálatainkban alkalmaztunk (LoVerme és mtsai, 2006). Bár ezen ellentmondásos adatok háttérében az alkalmazott állatfajok (egér *versus* patkány) és kísérleti elrendezések különbözősége is állhat, kínálkozik egy másfajta magyarázat is. Eszerint az OEA egy gyenge parciális TRPV1-receptor-agonista, amelyik kompetitíve gátolhatja a nagyobb hatékonyságú agonisták hatását. Ennek megfelelően az OEA alacsonyabb dózisban agonistaként hatástalan lehet, de gátolhatja egy hatékonyabb ligand (pl. a teljes agonista kapszaicin vagy RTX) hatását (mint a saját vizsgálatainkban), magasabb dózisban viszont érvényre juthat agonista jellege (Wang és mtsai, 2005; LoVerme és mtsai, 2006). Ezt a hipotézist (amely elvileg a 4-MOLDA-ra is érvényes lehet) alátámasztja az a vizsgálat is, amelyben az OEA parciális agonistaként viselkedett a humán TRPV1-génnel transzfektált sejtekben (Movahed és mtsai, 2005).

Az anandamid vizsgálata során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy ez a szer a cannabinoid CB_1 - vagy a TRPV1-receptorok aktivátora-e az általunk vizsgált modellben. Számos irodalmi adat támasztja alá mindkét hipotézist (Zygmunt és mtsai, 1999; Smart és mtsai, 2000; Pertwee, 2001). Mivel az anandamid magasabb

dózisban sem tudott nocifenzív reakciót vagy hőküszöbcsökkenést kiváltani, TRPV1-receptor-agonista hatását nem tudtuk igazolni. Ugyanakkor már alacsony adagban gátolta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását, és ez utóbbi választ CB₁-receptor-antagonistával teljesen meg lehetett szüntetni, ezért arra következtethetünk, hogy antihiperalgetikus hatását CB₁-receptor-agonistaként fejtette ki. Ha az anandamidra vonatkozóan is feltételezünk egy gyenge parciális TRPV1-receptor-agonista hatást (az OEA-hoz hasonlóan), elméleteileg meg lehetne magyarázni mind a hőküszöbcsökkentő hatás hiányát, mind pedig – kompetíció révén – az RTX-antagonista hatást. Azonban az a tény, hogy a CB₁-receptor-antagonista 100%-ban kivédte az antihiperalgetikus hatását, amellet szól, hogy kizárólag a CB₁-receptorok aktiválása felelős a hatásáért. A CB₁-receptorokat kimutatták a primer afferens neuronok perifériás végződésein, és az opioid receptorokéhoz hasonló jelátviteli folyamataik (pl. K⁺-csatornák megnyitása miatti membrán-hiperpolarizáció) magyarázhatják a nociceptorok excitabilitásának csökkentését és ebből következően a perifériás antihiperalgetikus hatást. Eredményeink összhangban vannak azzal a nézettel, hogy az anandamid esetében magasabb koncentrációk szükségesek a TRPV1-receptor aktiválásához, mint a CB₁-receptor izgatásához (Németh és mtsai, 2003; Ahluwalia és mtsai, 2003).

A szubakut gyulladást kiváltó carragenin vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az emelkedő hőmérsékletű forró lappal nem sikerült hőküszöbcsökkenést kimutatnunk, dacára annak, hogy jelentős lábödéma fejlődött ki, mutatva a kezelés gyulladáskeltő voltát. Másrészt ugyanazzal a készüléssel, de állandó hőmérsékletű üzemmódban mérve, ugyanazon kezelt állatok küszöbfeletti hőingerre (50 °C) adott elhárító reakciójának (láb nyalása) latenciaideje szignifikánsan lecsökkent. Az i.pl. adott carragenin latenciaidőt rövidítő hatása az irodalomból jól ismert (lásd például Hargreaves és mtsai, 1988). Mindezek alapján arra lehet következtetni, hogy a termális hiperalgézia két komponense – a küszöbfeletti ingerre adott nocifenzív reakció latenciaidejének csökkenése és a nociceptív hőküszöb csökkenése (lásd 2. ábra) – nem feltétlenül együttjáró jelenségek, ami eltérő patofiziológiai szabályozásukra utal. Érdeemes megjegyezni, hogy *in vitro* egyrost-elvezetéses kísérletekben membránpermeábilis cAMP-analógokkal hasonló eredményt kaptak: fokozódott a C polimodális nociceptorok hőingerre adott akciós potenciáljainak száma, de a rostok aktivációs hőküszöbe (az a legalacsonyabb hőmérséklet, amely kisülés-sorozatot vált ki) nem változott meg (Günther és mtsai, 1999). A

prostaglandinok közül a PGE₂/I₂-re vonatkozóan is leírtak hasonló diszkrpanciát (Derow és mtsai, 2007). Ezeknek a jelenségeknek egy lehetséges magyarázata, hogy az adott kísérleti elrendezésben szenzibilizálódnak pl. a feszültségfüggő Na⁺-csatornák, és ezáltal nő a hőingerre adott válasz nagysága (ez tükröződik a latenciaidő megrövidülésében), de a hőküszöböt meghatározó ioncsatornák nem facilitálódnak. Hangsúlyozandó azonban, hogy az általunk kimutatott, a TRPV1- vagy a purinerg P2-receptor izgatásával kiváltott akut hőküszöbcsökkenéshez – irodalmi adatok szerint (lásd feljebb) – a küszöbfeletti hőingerre adott reakció latenciaidejének csökkenése társul. Tehát a kiváltó ágenstől függ, hogy a termális hiperalgészia két paramétere együttesen változik-e vagy sem. A fentiek fényében célszerűnek látszik további, főleg krónikus gyulladásmoდეllek vizsgálata a hőküszöb vonatkozásában.

Végül, de nem utolsósorban, fontosnak tartom annak hangsúlyozását, hogy bár a nociceptív hőküszöb mérése az emelkedő hőmérsékletű forró lappal számos gyakorlati és elméleti kérdés vizsgálatára igen alkalmasnak bizonyult, további vizsgálatok szükségesek a hőküszöbmérés előnyeinek és korlátainak pontosabb megismeréséhez. A régóta vágyott új típusú és hatásmódú analgetikumok kifejlesztéséhez minden bizonnyal a hagyományos, latenciaidő-méréseken alapuló és a hőküszöb-meghatározást alkalmazó módszerek együttes alkalmazására egyaránt szükség lesz.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Legfontosabb következtetéseinket az alábbi pontok tartalmazzák.

1. A magatartási nociceptív hőküszöb megbízhatóan és nagyon jól reprodukálhatóan mérhető az emelkedő hőmérsékletű forró lappal.
2. A TRPV1-receptor nem játszik szerepet a magatartási nociceptív hőküszöb meghatározásában.
3. A nociceptív hőküszöb megemelkedésének mérésével kimutatható a morfin, diclofenac és paracetamol direkt termális antinociceptív hatása.
4. A hőküszöbméréssel a TRPV1-receptoron ható agonisták akut, termális hiperalgéziát okozó (RTX, OLDA, 3-MOLDA) és krónikus, szenzoros deszenzibilizáción alapuló termális antinociceptív hatása (RTX) egyaránt jól kimutatható.
5. Az i.pl. adott RTX-szel kiváltott, hőküszöbcsökkenésen alapuló termális hiperalgézia/allodynia modell alkalmas standard analgetikumok (morfin, diclofenac és paracetamol), TRPV1-receptoron ható antagonisták (I-RTX, 4-MOLDA, OEA) és CB₁-cannabinoidreceptor-agonista (anandamid) vizsgálatára egyaránt.
6. A carrageninnel kiváltott szubakut gyulladákos modell vizsgálatával kimutattuk, hogy a termális hiperalgézia két komponense – a hőküszöb csökkenése és a küszöbfeletti hőingerre adott nocifenzív reakció latenciaidejének megrövidülése –, nem feltétlenül együttjáró jelenségek, ami eltérő patofiziológiai szabályozásukra utal.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- AHERN, G.P. Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J. Biol. Chem.*, **15**:30429-30434, 2003.
- AHLUWALIA, J., URBAN, L., BEVAN, S., NAGY, I. Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the vanilloid receptor 1 in vitro. *Eur. J. Neurosci.*, **17**:2611-2618, 2003.
- AHLUWALIA, J., YAQOUB, M., URBAN, L., BEVAN, S., NAGY, I. Activation of capsaicin-sensitive primary sensory neurones induces anandamide production and release. *J. Neurochem.*, **84**:585-591, 2003.
- ALMÁSI, R., PETHŐ, G., BÖLCSKEI, K., SZOLCSÁNYI, J. Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a novel heat allodynia model sensitive to analgesics. *Br. J. Pharmacol.*, **139**:49-58, 2003.
- ALMÁSI, R., SZŐKE, É., VARGA, A., RIEDL, Z., SÁNDOR, Z., BÖLCSKEI, K., SZOLCSÁNYI, J., PETHŐ, G. Actions of 3-methyl-N-oleoyldopamine, 4-methyl-N-oleoyldopamine and N-oleoylethanolamide on the rat TRPV1 receptor in vitro and in vivo. *Life Sci.*, **82**:644-651, 2008.
- AMABEOKU, G.J., GREEN, I., EAGLES, P., BENJEDDOU, M. Effects of *Tarhonantus camphoratus* and *Eriocephalus africanus* on nociception in mice and pyrexia in rats. *Phytomedicine*, **7**:517-522, 2000.
- BENHAM, C.D., GUNTHORPE, M.J., DAVIS, J.B. TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium*, **33**:479-487, 2003.
- BEVAN, S., SZOLCSÁNYI, J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**:330-333, 1990.
- BITTNER, M.A., LAHANN, T.R. Biphasic time-course of capsaicin-induced substance P depletion: failure to correlate with thermal analgesia in the rat. *Brain Res.*, **322**:305-309, 1984.
- BJÖRKMAN, R., HEDNER, J., HEDNER, T., HENNING, M. Central, naloxone-reversible antinociception by diclofenac in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **342**:171-176, 1990.
- BÖLCSKEI, K., HELYES, ZS., SZABÓ, A., SÁNDOR, K., ELEKES, K., NÉMETH, J., ALMÁSI, R., PINTÉR, E., PETHŐ, G., SZOLCSÁNYI, J. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain*, **117**:368-376, 2005.
- CALIGNANO, A., LA RANA, G., GIUFFRIDA, A., PIOMELLI, D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*, **394**:277-281, 1998.
- CARSTENS, E., WILSON, C. Rat tail flick reflex: magnitude measurement of stimulus-response function, suppression by morphine and habituation. *J. Neurophysiol.*, **70**:630-639, 1993.
- CATERINA, M.J., LEFFLER, A., MALMBERG, A.B., MARTIN, W.J., TRAFTON, J., PETERSEN-ZEITZ, K.R., KOLTZENBURG, M., BASBAUM, A.I., JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, **288**:306-313, 2000.
- CATERINA, M.J., SCHUMACHER, M.A., TOMINAGA, M., ROSEN, T.A., LEVINE, J.D., JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**:816-824, 1997.
- CHU, C.J., HUANG, S.M., DE PETROCELLIS, L., BISOGNO, T., EWING, S.A., MILLER, J.D., ZIPKIN, R.E., DADDARIO, N., APPENDINO, G., DI MARZO, V., WALKER, J.M. N-oleoildopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J. Biol. Chem.*, **278**:13633-13639, 2003.
- DAVIS, J.B., GRAY, J., GUNTHORPE, M.J., HATCHER, J.P., DAVEY, P.T., OVEREND, P., HARRIES, M.H., LATCHMAN, J., CLAPHAM, C., ATKINSON, K., HUGHES, S.A., RANCE, K., GRAU, E., HARPER, A.J., PUGH, P.A., ROGERS, D.C., BINGHAM, S., RANDALL, A., SHEARDOWN, A.S. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, **405**:183-187, 2000.
- DEROW, A., IZYDORCZYK, I., KUHN, A., REEH, P.W., PETHŐ, G. Prostaglandin E(2) and I(2) facilitate noxious heat-induced spike discharge but not iCGRP release from rat cutaneous nociceptors. *Life Sci.*, **14**:1685-1693, 2007.
- DI MARZO, V., BISOGNO, T., DE PETROCELLIS, L. Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**:346-349, 2001.
- DHAKA, A., VISWANATH, V., PATAPOUTIAN, A. TRP ion channels and temperature sensation. *Ann. Rev. Neurosci.*, **29**:135-161, 2006.

- ENGELHARDT, G., HOMMA, D., SCHLEGEL, K., UTZMANN, R., SCHNITZLER, C. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory agent with favorable gastrointestinal tolerance. *Inflamm. Res.*, **44**:423-433, 1995.
- FARQUHAR-SMITH, W.P., JAGGAR, S.I., RICE, A.S. Attenuation of nerve growth factor-induced visceral hyperalgesia via cannabinoid CB(1) and CB(2)-like receptors. *Pain*, **97**:11-21, 2002.
- GAMBLE, G.D., MILNE, R.J. Repeated exposure to sham testing procedures reduces reflex withdrawal and hot-plate latencies: attenuation of tonic descending inhibition? *Neurosci. Lett.*, **96**: 312-317, 1989.
- GILCHRIST, H.D., ALLARD, B.L., SIMONE, D.A. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanikai stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. *Pain*, **67**:179-188, 1996.
- GROVES, P.M., THOMPSON, R.F. Habituation: a dual process theory. *Psychol. Rev.*, **77**:419-450, 1970.
- GÜNTHER, S., REEH, P.W., KRESS, M. Rises in $[Ca^{2+}]_i$ mediate capsaicin- and proton-induced heat sensitization of rat primary nociceptive neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **11**:3143-3150, 1999.
- HAMILTON, S.G., WADE, A., MCMAHON, S.B. The effects of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behaviour induced by ATP analogues in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **126**: 326-332, 1999.
- HARDY, J.D., WOLFF, H.G., GOODELL, H. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J. Clin. Invest.*, **29**:115-140, 1950.
- HARGREAVES, K., DUBNER, R., BROWN, F., FLORES, C., JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hiperalgézia. *Pain*, **32**:77-88, 1988.
- HERGENHAHN, M., KUSUMOTO, S., HECKER, E. Diterpene esters from 'Euphorbium' and their irritant and cocarcinogenic activity. *Experientia*, **15**:1438-1440, 1974.
- HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.*, **43**:143-201, 1991.
- HUNSKAAR, S., BERGE, O-G., HOLE, K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behav. Brain Res.*, **21**:101-108, 1986.
- HWANG, S.W., CHO, H., KWAK, J., LEE, S.Y., KANG, C.J., JUNG, J., CHO, S., MIN, K.H., SUH, J.G., KLIM, D., OH, U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**:6155-6160, 2000.
- JAGGAR, S.I., HASNIE, F.S., SELLATURAY, S., RICE, A.S. The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain*, **76**:189-99, 1998.
- JANCSÓ, M. A kémiai fájdalomérzés tartós kikapcsolása farmakológiai úton és a neurogén gyulladás problémája. *MTA Biológiai és Orvosi Tudományok Osztályának közleményei*, **10**:264-283, 1959.
- JANCSÓ, N., JANCSÓ-GÁBOR, A., SZOLCSÁNYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **31**:138-151, 1967.
- JANCSÓ, N., JANCSÓ-GÁBOR, A., SZOLCSÁNYI, J. The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **33**:32-41, 1968.
- KIRSCHSTEIN, T., BUSSELBERG, D., TREEDE, R.D. Coexpression of heat-evoked and capsaicin-evoked inward currents in acutely dissociated rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.*, **231**:33-36, 1997.
- KOUADIO, F., KANKO, C., JUGE, M., GRIMAUD, N., JEAN, A., N'GUESSAN, Y.T., PETIT, J.Y. Analgesic and antiinflammatory activities of an extract from *Parkia biglobosa* used in traditional medicine in the Ivory Coast. *Phytother. Res.*, **14**:635-637, 2000.
- LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, S.W. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.*, **53**:597-652, 2001.
- LA MOTTE, R.H., THALHAMMER, J.G., TOREBJÖRK, H.E., ROBINSON, C.J. Peripheral neural mechanisms of cutaneous hyperalgesia following mild injury by heat. *J. Neurosci.*, **2**:765-781, 1982.
- LOVERME, J., RUSSO, R., LA RANA, G., FU, J., FARTHING, J., MATTACE-RASO, G., MELI, R., HOHMANN, A., CALIGNANO, A., PIOMELLI, D., Rapid broad spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**:1051-1061, 2006.

- LYNN, B. The fibre composition of cutaneous nerves and the classification and response properties of cutaneous afferents, with particular reference to nociception. *Pain Rev.*, **1**:172-183, 1994.
- MAGGI, C.A. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog. Neurobiol.*, **45**:1-98, 1995.
- MARTIN, H.A., BASBAUM, A.I., KWIAT, G.C., GOETZL, E.J., LEVINE, J.D. Leukotriene and prostaglandin sensitization of cutaneous high-threshold C- and A-delta mechanonociceptors in the hairy skin of rat hindlimbs. *Neuroscience*, **22**:651-659, 1987.
- MATTA, J.A., MIYARES, R.L., AHERN, G.P., TRPV1 is a novel target for omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J.Physiol.*, **578**:(2) 397-411, 2007.
- MAYER, R.A., CAMPBELL J.N. Myelinated nociceptive afferents account for the hyperalgesia that follows a burn to the hand. *Science*, **213**:1527-1529, 1981.
- MILNE, R.J., GAMBLE, G.D. Habituation to sham testing procedures modifies tail-flick latencies: effects on nociception rather than vasomotor tone. *Pain*, **39**:103-107, 1989.
- MOVAHED, P., JÖNSSON BO, A.G., BIRNIR, B., WINGSTRAND, J.A., JORGENSEN, T.D., ERMUND, A., STERNER, O., ZYGMUNT, P.M., HÖGESTATT, E., Endogenous unsaturated C18 N-acyl ethanolamines are vanilloid receptor (TRPV1) agonists. *J. Biol.Chem.*, **280**:38496-38504, 2005.
- NÉMETH, J., HELYES, ZS., THÁN, M., JAKAB, B., PINTÉR, E., SZOLCSÁNYI, J., Concentration-dependent dual effect of anandamide on sensory neuropeptide release from isolated rat tracheae. *Neurosci. Lett.*, **336**:89-92, 2003.
- PERTWEE, R.G., Cannabinoid receptors and pain. *Prog. Neurobiol.*, **63**:569-611, 2001.
- PINGLE, S.C., MATTA, J.A., AHERN, G.P. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Handbook of Experimental Pharmacology*, **179**:155-171, 2007.
- PINI, L.A., SANDRINI, M., VITALE, G. The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, **308**:31-40, 1996.
- PLONE, M.A., EMERICH, D.F., LINDNER, M.D. Individual differences in the hotplate test and effects of habituation on sensitivity to morphine. *Pain*, **66**:265-270, 1996.
- REEH, P.W. Sensory receptors in a mammalian skin-nerve in vitro preparation. *Prog. Brain Res.*, **74**:271-276, 1988.
- RICHARDSON, J.D., KILO, S., HARGREAVES, K.M. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain*, **75**:111-119, 1998.
- RIGONI, M., TREVISANI, M., GAZZIERI, D., NADALETTO, R., TOGNETTO, M., CREMINON, C., DAVIS, J.B., CAMPI, B., AMADESI, S., GEPPELTI, P., HARRISON, S. Neurogenic responses mediated by vanilloid receptor-1 (TRPV1) are blocked by the high affinity antagonist, iodoresiniferatoxin. *Br. J. Pharmacol.*, **138**:977-985, 2003.
- SANDKÜHLER, J., TREIER, A.C., LIU, X.G., OHNIMUS, M. The massive expression of c-fos protein in spinal dorsal horn neurons is not followed by long-term changes in spinal nociception. *Neuroscience*, **73**:657-666, 1996.
- SÁNDOR, Z., VARGA, A., HORVÁTH, P., NAGY, B., SZOLCSÁNYI, J. Construction of a stable cell line uniformly expressing the rat TRPV1 receptor. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **10**:499-514, 2005.
- SANDRINI, M., ROMUALDI, P., CAPOBIANCO, A., VITALE, G., MORELLI, G., PINI, L.A., CANDELETTI, S. The effect of paracetamol on nociception and dynorphin A levels in the rat brain. *Neuropeptides*, **35**:110-116, 2001.
- SANTOS, A.R., VEDANA, E.M., DE-FREITAS, G.A. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. *Inflamm. Res.*, **47**:302-307, 1998.
- SIMONE, D.A., NGEOW, J.Y.F., PUTTERMAN, G.J., LAMOTTE, R.H. Hyperalgesia to heat after intradermal injection of capsaicin. *Brain Res.*, **418**:201-203, 1987.
- SMART, D., GUNTHORPE, M.J., JERMAN, J.C., NASIR, S., GRAY, J., NUIR, A.I., CHAMBERS, J.K., RANDALL, A.D., DAVIS, J.D., The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br. J. Pharmacol.*, **129**: 227-230, 2000.
- SUARDÍAZ, M., ESTIVILL-TORRÚS, G., GOICOECHEA, C., BILBAO, A., RODRÍGUEZ, DE FONSECA F. Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain. *Pain*, **133**:99-110, 2007.
- SYCHA, T., GUSTORFF, B., LEHR, S., TANEW, A., EICHLER, H.G., SCHMETTERER, L. A simple pain model for the evaluation of analgesic effects of NSAIDs in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **56**:165-172, 2003.

SZÁLLÁSI, Á. Small molecule vanilloid TRPV1 receptor antagonists approaching drug status: can they live up to the expectations? *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **373**:273-286, 2006.

SZÁLLÁSI, Á., BLUMBERG, P.M. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience*, **30**:515-520, 1989.

SZÁLLÁSI, Á., BLUMBERG, P.M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.*, **51**:159-212, 1999.

SZÁLLÁSI, Á., GOSO, C., BLUMBERG, P.M., MANZINI, S. Competitive inhibition by capsazepine of [3H]resiniferatoxin binding to central (spinal cord and dorsal root ganglia) and peripheral (urinary bladder and airways) vanilloid (capsaicin) receptors in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **267**:728-733, 1993.

SZÁLLÁSI, Á., JOÓ, F., BLUMBERG, P.M. Duration of desensitization and ultrastructural changes in dorsal root ganglia in rats treated with resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog. *Brain Res.*, **503**:68-72, 1989.

SZÁLLÁSI, Á., NILSSON, S., FARKAS-SZÁLLÁSI, T., BLUMBERG, P.M., HÖKFELT, T., LUNDBERG, J.M. Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment. *Brain Res.*, **703**:175-183, 1995.

SZÁLLÁSI, Á., SZABÓ, T., BÍRÓ, T., MODARRES, S., BLUMBERG, P.M., KRAUSE, J.E., CORTRIGHT, D.N., APPENDINO, G. Resiniferatoxin-type phorboid vanilloids display capsaicin-like selectivity at native vanilloid receptors on rat DRG neurons and at the cloned vanilloid receptor VR1. *Br. J. Pharmacol.*, **128**:428-434, 1999.

SZOLCSÁNYI, J. A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. *J. Physiol. (Paris)* **73**:251-259, 1977.

SZOLCSÁNYI, J. Sensory receptors and the antinociceptive effects of capsaicin. In: *Tachykinin Antagonists. (Ed. Hakanson, R., Sundler, F.)* Amsterdam Elsevier, pp. 45-54, 1985.

SZOLCSÁNYI, J. Selective responsiveness of polymodal nociceptors of the rabbit ear to capsaicin, bradykinin and ultra-violet irradiation. *J. Physiol.*, **388**: 9-23, 1987a.

SZOLCSÁNYI, J. Capsaicin and nociception. *Acta Physiol. Hung.*, **69**:323-332, 1987b.

SZOLCSÁNYI, J. Capsaicin, irritation and desensitization: neurophysiological basis and future perspectives. (In:) *Chemical Senses. Vol. 2. Irritation. (Ed. Green, B.G., Mason, J.R., Kare, M.R.)* New York, Marcel Dekker, pp. 141-168, 1990.

SZOLCSÁNYI, J. Actions of capsaicin on sensory receptors. In: *Capsaicin in the study of pain. Neuroscience Perspectives, (Ed. Wood, J.N.)* Academic Press pp. 1-23, 1993.

SZOLCSÁNYI, J. Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. *Prog. Brain. Res.*, **113**:343-359, 1996.

SZOLCSÁNYI, J. Anandamide and the question of its functional role for activation of capsaicin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**:203-204, 2000.

SZOLCSÁNYI, J. Future perspectives of capsaicin research, In: *Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles. Vol. Capsicum. (Ed. Amit, K.)* Harwood Acad. Press, pp. 248-269, 2003.

SZOLCSÁNYI, J., JANCSÓ-GÁBOR, A. Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung*, **25**:1877-1881, 1975.

SZOLCSÁNYI, J., JANCSÓ-GÁBOR, A., JOÓ, F. Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **287**:157-169, 1975.

SZOLCSÁNYI, J., SÁNDOR, Z., PETHŐ, G., VARGA, A., BÖLCSKEI, K., ALMÁSI, R., RIEDL, Z., HAJÓS, G., CZÉH, G. Direct evidence for activation and desensitization of the capsaicin receptor by N-oleoil-dopamine on TRPV1-transfected cell, line in gene deleted mice and in the rat. *Neurosci. Lett.*, **361**:155-158, 2004.

SZOLCSÁNYI, J., SZÁLLÁSI, Á., SZÁLLÁSI, V., JOÓ, F., BLUMBERG, P.M., Resiniferatoxin: an ultrapotent selective modulator of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **255**:923-928, 1990.

TOMINAGA, M., TOMINAGA, T. Structure and function of TRPV1. *Pflügers Arch.*, **451**:143-150, 2005.

TOMINAGA, M., CATERINA, M.J., MALMBERG, A.B., ROSEN, T.A., GILBERT, H., SKINNER, K., RAUMANN, B.E., BASBAUM, A.I., JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, **21**:531-543, 1998.

UNDEM, B.J., KOLLARIK, M. Characterization of the vanilloid receptor 1 antagonist iodo-resiniferatoxin on the afferent and efferent function of vagal sensory C-fibers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **303**: 716-722, 2002.

VAUGHAN, C.W., CONNOR, M., BAGLEY, E.E., CHRISTIE, M.J. Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Mol. Pharmacol.*, **57**:288-95, 2000.

VOGEL, H.G., VOGEL, W.H. Drug Discovery and Evaluation. *Pharmacological Assays Berlin/Heidelberg/New York*: Springer, 1997.

VYKLICKY, L., VLACHOVÁ, V., VITASKOVÁ, Z., DITTERT, I., KABAT, M., ORKAND, R.K. Temperature coefficient of membrane currents induced by noxious heat in sensory neurones in the rat. *J. Physiol.*, **517**:181-192, 1999.

WAHL, P., FOGED, C., TULLIN, S., THOMSEN, C. Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.*, **59**:9-15, 2001.

WANG, X., MIYARES, R.L., AHERN, G.P. Oleoylethanolamide excites vagal sensory neurones, induces visceral pain and reduces short-term food intake in mice via capsaicin receptor TRPV1. *J. Physiol.*, **564**:541-547, 2005.

WOODBURY, C.J., ZWICK, M., WANG, S., LAWSON, J.J., CATERINA, M.J., KOLTZENBURG, M., ALBERS, K.M., KOERBER, H.R., DAVIS, B.M. Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have normal heat responses. *J. Neurosci.*, **14**:6410-6415, 2004.

WOOLF, C.J., MA, Q. Nociceptors – noxious stimulus detectors. *Neuron*, **2**:353-364, 2007.

YEOMANS, D.C., PIREC, V., PROUDFIT, H.K. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors of the rat: behavioral evidence. *Pain*, **68**:133-140, 1996.

ZIMMERMANN, K., LEFFLER, A., FISCHER, M.M., MESSLINGER, K., NAU, C., REEH, P.W. The TRPV1/2/3 activator 2-aminoethoxydiphenyl borate sensitizes native nociceptive neurons to heat in wildtype but not TRPV1 deficient mice. *Neuroscience*, **135**:1277-1284, 2005.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, **16**:109-110, 1983.

ZYGMUNT, P.M., PETERSSON, J., ANDERSSON, D.A., CHUANG, H., SØRGÅRD, M., DI MARZO, V., JULIUS, D., HÖGESTÄTT, E.D. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, **400**:452-457, 1999.

8. A PhD-ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

8.1. Teljes közlemények

1. **Almási, R.**, Pethő, G., Bölcskei, K., Szolcsányi, J.: Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a novel heat allodynia model sensitive to analgesics.

Br. J. Pharmacol., **139**:49-58, 2003. (IF: 3,611)

2. Szolcsányi, J., Sándor, Z., Pethő, G., Varga, A., Bölcskei, K., **Almási, R.**, Riedl, Zs., Hajós, G., Czéh, G.: Direct evidence for activation and desensitization of the capsaicin receptor by *N*-oleoyldopamine on TRPV1-transfected cell line, in gene deleted mice and in the rat.

Neurosci. Lett., **361**:155-158, 2004. (IF: 2,019 / 2 = 1,009)

3. **Almási, R.**, Szőke, É., Bölcskei, K., Varga, A., Riedl, Z., Sándor, Z., Szolcsányi, J., Pethő, G.: Actions of 3-methyl-*N*-oleoyldopamine, 4-methyl-*N*-oleoyldopamine and *N*-oleoylethanolamide on the rat TRPV1 receptor in vitro and in vivo.

Life Sci., **82**:644-651, 2008. (IF: 2,389)

8.2. Idézhető absztraktok

1. Szolcsányi, J., Pethő, G., Szőke, É., **Almási, R.**, Seress, L.: Effect of resiniferatoxin, anandamide and analgesics on noxious heat threshold. *Proc. Soc. Neurosci.*, San Diego, program No. 926.10., 2001.

2. Bölcskei, K., **Almási, R.**, Pethő, G., Szolcsányi, J.: Inhibition of resiniferatoxin-induced drop of the noxious heat threshold by analgesics and anandamide in the rat as measured with an increasing temperature hot plate.

Neuropeptides, **36(6)**:470, 2002.

3. Pethő, G., **Almási, R.**, Bölcskei, K., Szolcsányi, J.: Measurement of the noxious heat threshold: a novel approach to study heat hyperalgesia and the antinociceptive effects of drugs.

Br. J. Pharmacol., **138**:217P, 2003.

8.3. Nemzetközi kongresszusokon bemutatott poszterek

1. Szolcsányi, J., Pethő, G., Szőke, É., **Almási, R.**, Seress, L.: Effect of resiniferatoxin, anandamide and analgesics on noxious heat threshold. *Annual Meeting of the Neuroscience Society*, San Diego (USA), 2001.

2. **Almási, R.**, Pethő, G., Szolcsányi, J.: Measurement of noxious heat threshold: a novel approach to the study of thermal analgesic/antihyperalgesic effects of drugs.

23th annual meeting of European Anaesth. Academy. Graz (Austria), August 30 - September 1, 2001.

3. Bölcskei, K., **Almási, R.**, Pethő, G., Szolcsányi, J.: Inhibition of resiniferatoxin-induced drop of the noxious heat threshold by analgesics and anandamide in the rat as measured with an increasing temperature hot plate.

12th Meeting of European Neuropeptide Club, Olsztyn (Poland), May 22-25, 2002.

4. Pethő, G., **Almási, R.**, Bölcskei, K., Szolcsányi, J.: Measurement of the noxious heat threshold: a novel approach to study heat hyperalgesia and the antinociceptive effects of drugs.

British Pharmacological Society 2002 Winter Meeting, Brighton (UK), January 7-10, 2003.

5. Pethő, G., Bölcskei, K., **Almási, R.**, Szolcsányi, J.: The significance of measurement of the noxious heat threshold in the study of thermonociception and its pharmacological modulation.

Pain in Europe IV 4th Congress of EFIC–The European Federation of the International Association for the Study of Pain Chapters. Prague, Czech Republic, September 2-6, 2003.

8.4. Hazai kongresszusi prezentációk

1. **Almási, R.**, Pethő, G., Szolcsányi, J.: Hőküszöbmérésen alapuló új farmakológiai módszer analgetikumok hatásainak vizsgálatára.

Magyarországi Fájdalom Társaság 2000. évi Tudományos Ülése. Siófok, 2000. október 13-14.

2. **Almási, R.**, Pethő, G., Szolcsányi, J.: Ópiátok, nem-szteroid gyulladásgátlók és cannabinoid receptor agonisták hatása az intraplantárisan adott resiniferatoxinnal kiváltott termális hiperalgeziára patkányban.

Fiatal Magyar Anaesthesiológusok V. Kongresszusa nemzetközi részvétellel. Sopron, 2001. május 10-12.

3. Pethő, G., **Almási, R.**, Szőke, É., Szolcsányi, J.: Anandamid, resiniferatoxin és analgetikumok hatása a nociceptív hőküszöbre.

MÉT 66. Vándorgyűlése, Szeged, 2001. június 6-8.

4. Bölcskei, K., **Almási, R.**, Pethő, G., Szolcsányi, J.: A nociceptív hőküszöb mérése és farmakológiai modulációja *in vivo*.

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság V. Kongresszusa, Debrecen, 2002. december 12-14.

5. Pethő, G., Bölcskei, K., **Almási, R.**, Szolcsányi, J.: A magatartási nociceptív hőküszöb farmakológiai modulációja *in vivo*.

MÉT 67. Vándorgyűlése, Pécs, 2003. június 2-4.

6. Varga, A., Bölcskei, K., Disztl, C., Sándor, Z., **Almási, R.**, Pethő G., Czéh G., Riedl Zs., Hajós Gy., Szolcsányi J.: Az N-oleoyldopamin szerepe a TRPV1 capsaicin receptor aktiválásában és deszenzibilizálásában.

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság VI. Kongresszusa, Debrecen, 2003. december 11-13.

7. Bölcskei, K., Varga, A., **Almási, R.**, Pethő, G., Sándor, Z., Czéh, G., Riedl, Zs., Hajós, Gy., Szolcsányi, J.: Activation and desensitization of the TRPV1 capsaicin receptor by N-oleoyldopamine.

IBRO Workshop, Budapest, Hungary, January 29-31, 2004.

8. Varga, A., Bölcskei, K., Sándor, Z., **Almási, R.**, Pethő, G., Czéh, G., Riedl, Z., Hajós, G., Szolcsányi, J.: Az OLDA TRPV1 endogén ligand szerepének *in vitro* és *in vivo* vizsgálata.

MÉT 68. Vándorgyűlése, Debrecen, 2004. június 7-9.

9. EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

1. Szolcsányi, J., Bölcskei, K., Szabó, Á., Pintér, E., Pethő, G., Elekes, K., Börzsei, R., **Almási, R.**, Szűts, T., Kéri, G., Helyes, Z.: Analgesic effect of TT-232, a heptapeptide somatostatin analogue, in acute pain models of the rat and the mouse and in streptozotocin-induced diabetic mechanical allodynia.

Eur. J. Pharmacol., **498**:103-109, 2004. (IF: 2,432)

2. Bölcskei K., Helyes, Zs., Szabó, Á., Sándor, K., Elekes, K., Németh, J., **Almási, R.**, Pintér, E., Pethő, G., Szolcsányi J.: Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice.

Pain, **117**:368-376, 2005. (IF: 4,309)

3. Varga, A., Bölcskei, K., Szőke, É., **Almási, R.**, Czéh, G., Szolcsányi, J., Pethő, G.: Relative roles of protein kinase A and protein kinase C in modulation of TRPV1 receptor responsiveness in rat sensory neurons *in vitro* and peripheral nociceptors *in vivo*.

Neuroscience, **140**:645-657, 2006. (IF: 3,410)

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki és tisztelettel tartozom Prof. Dr. Szolcsányi János egyetemi tanárnak, aki munkacsoportjába fogadott, bevezetett a fájdalomfarmakológia tudományába, elindított kutatómunkámban, tapasztalatával, és irányításával mindvégig támogatott a kitűzött célok elérésében.

Köszönöm Dr. Pethő Gábor egyetemi docensnek, hogy barátságába fogadott és közös munkánk során számtalan és felbecsülhetetlen segítséget nyújtott. Szemléletéért, precizitásáért és türelméért hálával tartozom. Kitartása és elért eredményei példaként szolgáltak.

Köszönettel tartozom Dr. Bölcskei Kata tudományos munkatársnak a kutatómunkánk során együtt töltött évekért, a közösen szerzett tapasztalatokért. Munkája, felejtethetetlen társasága és barátsága felbecsülhetetlen segítséget jelentett tudományos munkám lépcsőfokainak teljesítésében, az akadályok leküzdésében. Lelkesítése ösztönzően és bátorítólag hatott céljaink eléréséhez.

Köszönetemet fejezem ki Gógl Csabáné, Katikának az évek hosszú során nyújtott asszisztensi munkájáért és értékes segítségéért, aki nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Barthó Loránd egyetemi tanárnak és a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet valamennyi munkatársának, hogy életem egy szakaszában az Intézet munkatársai és kutatói közé tartozhattam és „tisztéletbeli farmakológusnak” érezhettem magam. Társaságuk, munkájuk és segítségük nagyban hozzájárult kutatómunkám eredményességéhez, a farmakológia mélyebb megismeréséhez, tiszteletéhez, gyakorlati alkalmazásához, valamint gyógyszeres oktatómunkám elindításához.

Köszönetemet fejezem ki munkahelyem vezetőjének Dr. Seffer Istvánnak és a Klinika valamennyi dolgozójának, munkatársaimnak türelmükért, biztatásukért és támogatásukért.

Hálás köszönetemet fejezem ki és tisztelettel tartozom gyermekeimnek szeretetükért, feleségemnek, illetve családom minden tagjának a hosszú évek során tanúsított türelmükért és toleranciájukért, valamint Kedvesemnek, barátaimnak odaadásukért, szeretetükért, lelkesítésükért és biztatásukért.