

**A TERMÁLIS HIPERALGÉZIA ÉS ANTINOCICEPTÍV  
GYÓGYSZERHATÁSOK ÁLLATKÍSÉRLETES VIZSGÁLATA  
A MAGATARTÁSI NOCICEPTÍV HŐKÜSZÖB MÉRÉSÉVEL**

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Dr. Almási Róbert**

**Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Lénárd László**

**Doktori program vezetője: Prof. Dr. Szolcsányi János**

**Témavezető: Dr. Pethő Gábor**

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

**Pécs**

**2008**

## 1. BEVEZETÉS

### 1.1. A nociceptorok általános jellemzői és fajtái

A fájdalomingerék felfogására specializálódott perifériás idegvégződések a nociceptorok, amelyek az elsődleges érzőneuronok egy különálló – nociceptív – populációját képező idegsejtek perifériás terminálisai. A nociceptorok osztályozásakor méretük valamint a velőshüvely megléte vagy hiánya alapján beszélhetünk vékony mielinhüvellyel rendelkező A $\delta$  rostokról és nem mielinizált, lassabban vezető C rostokról (összefoglalóként lásd Lynn, 1994; Woolf és Ma, 2007). Az aktiváló ingereknek megfelelően beszélhetünk mechano-, termo-, illetve kemonociceptorokról. Amennyiben csak egyféle inger aktiválja a nociceptorokat, azokat unimodálisoknak nevezzük, amennyiben több, pl. mechanikai, forró és kémiai (kapszaicin, bradikinin, alacsony pH stb.) egyaránt, azokat polimodálisoknak. A polimodális nociceptorok szerepe a forró ingerek felfogásában szinte kizárólagos, és membránjukban megtalálható a paprika csípős anyagának, a kapszaicinnek a farmakológiai receptora, az ún. tranziens receptor potenciál vanilloid 1-es (TRPV1) receptor. A primer afferens neuronok farmakológiailag kapszaicin-érzékeny, polimodális és kapszaicin-inszenzitív csoportra oszthatók. Előbbieknek van egy jelentős alcsoportja, amelyik neuropeptideket tartalmaz (összefoglalóként lásd Holzer, 1991; Maggi, 1995; Szolcsányi, 1996; Szállási és Blumberg, 1999). Ezen peptiderg nociceptoroknak kettős funkciójuk van: inger hatására aktiválódnak, depolarizálódnak és információt közvetítenek a központi idegrendszer felé, ez a klasszikus *afferens* funkciójuk, míg az idegvégződésekben kiszabadult neuropeptidek lokális *efferens* hatásokat közvetítenek. Az efferens funkció felelős a neurogén gyulladás számos szöveti reakciójának létrehozásáért (Jancsó és mtsai, 1967; 1968; Maggi, 1995; Szolcsányi, 1996).

### 1.2. A hőérzékeny ioncsatornák

A TRPV1-receptor volt az első feltételezett (Szolcsányi és Jancsó-Gábor, 1975) majd bizonyított (Bevan és Szolcsányi, 1990; Szállási és mtsai, 1993; 1995) kapszaicin- és hőérzékeny, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> és Ca<sup>2+</sup> ionokra permeábilis ioncsatorna, melyet végül 1997-ben klónoztak (Caterina és mtsai, 1997). Speciális sajátossága e receptornak, hogy forró ( $\geq 43$  °C) ingerek, illetve számos egyéb kémiai ágens (lásd lejjebb) hatására is aktiválódik. Ezek közé tartozik a resiniferatoxin (RTX) is, ami szintén egy növényi eredetű irritáns, és a kapszaicin ultrapotens analógja (Szolcsányi és mtsai, 1990; Szállási és Blumberg, 1999). Ezen kívül

számos endogén anyagról kimutatták, hogy képes aktiválni a TRPV1-receptort (alacsony pH, bradykinin, ATP, anandamid, lipoxigenáz-termékek stb). Meglepő módon TRPV1-receptor-génhiányos („knock-out”) egerekben nem károsodik a forró ingerek detektálása, de elmarad a gyulladáshoz vezető reakció során kifejlődő termális hiperalgémia (Caterina és mtsai, 2000; Davis és mtsai, 2000; Woodbury és mtsai, 2004; Bölskei és mtsai, 2005; Zimmermann és mtsai, 2005). 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 (Janicsák, 1959; Holzer, 1991; Szolcsányi, 1993; 2004; Szállási és Blumberg, 1999). 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 jódtresiniferatoxin (I-RTX) egy újabb, a capsazepinnél potensebb TRPV1-receptor-antagonista (Wahl és mtsai, 2001; Rigoni és mtsai, 2003).

A TRPV1-receptor felfedezését követően további öt hasonló szerkezetű membránfehérjét azonosítottak, így a TRPV-receptorcsalád hat tagból (TRPV1-6) áll, amelyek közül a TRPV2, TRPV3 és TRPV4 bizonyult még hőérzékenynek, eltérő aktivációs küszöbökkel (összefoglalóként lásd Benham és mtsai, 2003, Dhaka és mtsai, 2006).

### **1.3. A termonocicepció és a termális hiperalgémia 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 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, hiperalgémia szóval. A kiváltó inger alapján ez lehet termális, mechanikai vagy kémiai hiperalgémia. 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 hiperalgémia vagy allodyniát csökkentő hatásokat

antihiperalgetikusnak, illetve antiallodyniásnak nevezzük. Az antinociceptív hatás magába foglalja a nem érzékenyített állapotban a fájdalomingerrel kiváltott reakció csökkentését éppúgy, mint a hiperalgézia vagy allodynia mérséklését.

A fájdalmas hőinger intenzitása és az arra adott válaszreakció nagysága közötti relációt három paraméterrel jellemezhetjük: (i) a hőküszöb az a legkisebb ingerintenzitás (legalacsonyabb hőmérséklet), 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”). A patológiás körülmények között kifejlődő termális hiperalgézia kapcsán típusos esetben mindhárom említett paraméter karakterisztikusan megváltozik: a hőküszöb csökken, a maximális válaszintenzitás és az erősítés nő.

#### **1.4. A termonocicepció klasszikus vizsgálmódszerei**

A termonocicepciót vizsgáló hagyományos módszerek, mint pl. a forró lap („hot plate”), a fark- („tail flick”) illetve lábvisszahúzásos („paw withdrawal” vagy „plantar”) tesztekben a küszöbfeletti intenzitású hőingerek által kiváltott elhárító magatartási reakciók latenciaidejét mérik (összefoglalóként lásd Le Bars és mtsai, 2001). 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). 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 (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 vethető 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; Meyer 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. Kézenfekvő lenne a másik termonocicepciós paraméter, a nociceptív hőküszöb mérésén alapuló módszerek alkalmazása, már csak azért is, mert a mechanocicepció 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; 1987). Hunskaar és munkatársai (1986) a „hot plate” módszert módosították, kifejlesztve az emelkedő hőmérsékletű forró lapot, amely szobahőmérsékletről az állat lábának megnyalásáig folyamatosan emelkedő hőmérsékletével lehetővé tette a nociceptív hőküszöb pontos mérését. Ez a módszer eléggé érzékenynek bizonyult a morfin, paracetamol és acetilszalícilsav antinociceptív hatásának kimutatására (Hunskaar és mtsai, 1986), de a kapszaicin vagy más TRPV1-receptor-agonista hatásait nem vizsgálták ezzel a módszerrel, és hiperalgázia-modellt sem dolgoztak ki rá. A módszer lényegében feledésbe merült.

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

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

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 hiperalgázia-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 hiperalgèzia-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 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). Célunk volt a kettős, CB<sub>1</sub> cannabinoid/TRPV1-receptor-agonista, szintén zsírsavamid szerkezetű anandamid hatásainak tanulmányozása is. 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**

Kísérleteink megkezdésekor egy új fejlesztésű, a pécsi Supertech Kft által épített, számítógéppel vezérelt emelkedő hőmérsékletű forró lapot használtunk. 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. Újabb

vizsgálatainkat (3. saját közlemény) ezzel a készülékkel végeztük. A mérés „cut-off” hőmérsékleteként mindkét készülék esetén 50 °C volt beállítva.

### **3.2. Kísérleti állatok**

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

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 zajmentes és légkondicionált laboratóriumban végeztük. Minden állat csak egy mérési sorozatban vett részt. A mérések előtt minden állatot kondicionáltunk. A kondicionálás, azaz a mérési metódushoz 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, amelyenél 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 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.

### 3.4. Anyagok

Az RTX-t (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) etanolban oldottuk, majd a törzsoldatot (1 mg/ml) fiziológiás sóoldattal tovább hígítottuk 0,48  $\mu$ M koncentrációra. A I-RTX-t (Tocris Cookson Ltd, UK) hasonlóan oldottuk és hígítottuk a végső 10, illetve 1  $\mu$ M 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  $\alpha,\beta$ -metilén-ATP-t és a piridoxálfoszfát-6-azofenil-2'4'-diszulfonsavat (mindkettő Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) fiziológiás sóoldatban oldottuk fel. 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  $\mu$ l 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. Statisztikai eljárások

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 a varianciaanalízist (ANOVA) követő Newman-Keuls *post hoc* teszttel vizsgáltuk a szignifikanciát. A különbségeket  $P < 0,05$  esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## 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, 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. A hőküszöbök alakulásában jelentős eltéréseket nem találtunk, azaz igen nagyfokú reprodukálhatóságot tapasztaltunk. Nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a következők vonatkozásában: 1. ugyanazon láb különböző időpontokban mért hőküszöbei között; 2. az állat különböző időpontokban meghatározott hőküszöbei (a két láb hőküszöbe közül az alacsonyabb érték) között; 3. adott időpontban mérve az állat jobb és bal lábán mért hőküszöb között.

Általánosságban elmondható, hogy a különböző kísérletsorozatokban, különböző állatcsoportokban mért hőküszöbök sem mutattak jelentős eltéréseket jelezve, hogy a populációk közötti hőküszöb-variabilitások szintén nem túl nagyok.

#### 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 követően az állatcsoportok egyik felét a vizsgált szerrel, a másikat annak szolvensével kezeltük i.p. injekció formájában. A hőküszöbmérést 30 perc múlva megismételtük.

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

#### **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 hiperalgésia-modell**

Megvizsgáltuk az RTX (0,048 nmol, 100 µl) egyoldali i.pl. injekciójának hatását a hőküszöbre patkányokban. 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 i.pl. RTX-injekciót követően akut nocifenzív reakciót (a kezelt láb nyalása, rázása) figyeltünk meg, mely kevesebb mint 5 percen belül lezajlott. Az RTX jelentős hőküszöbcsökkenést okozott. Az emelkedő hőmérsékletű forró lapon az első megfigyelt reakció majdnem minden alkalommal a kezelt láb emelése volt, amit szinte soha nem tapasztaltunk kontroll körülmények között. A láb emelése az alacsonyabb hőmérsékleti tartományban (34–41 °C) jelent meg, míg a láb nyalása 41 °C-nál magasabb hőmérsékleten jelentkezett. A küszöb mindkét reakcióra nézve az 5. percben volt a legalacsonyabb, és fokozatos visszatérést mutatott, 25 perc múlva térve vissza a kiindulási értékre.

##### **4.2.2. A morfin, diclofenac és paracetamol hatása az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenésre**

A morfin, diclofenac és paracetamol RTX indukálta hőküszöbcsökkenésre gyakorolt hatásának vizsgálatokor az állatcsoport egyik fele 25 perccel az RTX beadása előtt i.p. analgetikumot kapott, míg a másik felét annak szolvensével kezeltük elő. A hőküszöböt csak a kezelt lábon határoztuk meg 5, 10, 15 és 20 perccel az RTX injekció beadását követően. A mérési eredményekből dózis–hatás görbét vettünk fel, és a gyógyszeres kezelés gátló hatását az RTX indukálta hőküszöbcsökkenésre %-ban kifejezve adtuk meg. Az eredmények analíziséhez egyrészt az 5. percben mért hőküszöbcsökkenést, másrészt globális mutatóként az 5., 10., 15. és 20. percben mért küszöbcsökkenések összegét vettük alapul.

A morfin, a diclofenac és a paracetamol dózisfüggő módon gátolta az RTX okozta hőküszöbcsökkenést, 1, 1 illetve 100 mg/kg minimális effektív dózissal.

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

A jód-resiniferatoxin (I-RTX) egy újabban kifejlesztett, a capsazepinnél potensebb TRPV1-receptor-antagonista (Wahl és mtsai, 2001). 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 megvizsgáltuk az I-RTX akut és hosszú távú hatását a hőküszöbre. I-RTX-et (0,1 és 1 nmol/100 µl végtagonként, n=8-8) adagoltunk mindkét hátsó végtagba. 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. Az I-RTX egyik dózisban sem váltott ki nocifenzív reakciót vagy hőküszöbváltozást a vizsgált rövid és hosszú távú időszakban.

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, az  $\alpha$ - $\beta$ -metilén-ATP hatását. I-RTX-et (0,05 nmol/50 µl végtagonként) vagy ennek oldószerét (0,03 % etanol) adagoltuk 5 perccel az RTX (0,048 nmol/100 µl) illetve az  $\alpha$ , $\beta$ -metilén-ATP (0,3 µmol/100 µl) ugyanabba a végtagba történő beadása előtt. Csak a kezelt hátsó végtag hőküszöbének meghatározását végeztük 5, 10, 15 és 20 perccel az RTX illetve  $\alpha$ , $\beta$ -metilén-ATP adagolását követően.

Az I-RTX előkezelés szignifikánsan csökkentette az RTX által indukált hőküszöbcsökkenést, az 5. percben mért gátló hatás 51 %-nak, míg az összesített hőküszöbcsökkenések tekintetében a gátlás 64 %-nak adódott. Az  $\alpha$ , $\beta$ -metilén-ATP szintén csökkentette a hőküszöböt 39,5±1,2 °C-ra az 5. percben és 42,0±0,9 °C-ig a 10. percben, míg a későbbi mérési időpontokban már nem okozott mérhető küszöbváltozást. Az  $\alpha$ , $\beta$ -metilén-ATP hatását megmértük a P2-purinerreceptor-antagonista piridoxálfoszfát-6-azofenil-2'4'-diszulfonsav (PPADS, 0,15 µmol/50 µl) vagy annak szolvansével végzett 5 perces i.pl. előkezelést követően is. A PPADS az  $\alpha$ , $\beta$ -metilén-ATP hőküszöbcsökkentő hatásának 83 %-

os gátlását eredményezte az 5. percben (n=8, P<0,01). Az I-RTX előkezelés nem gátolta az  $\alpha$ , $\beta$ -metilén-ATP okozta hőküszöbcsökkenést.

#### **4.2.4. Az RTX hosszú távú hatása a nociceptív hőküszöbre**

Az emelkedő hőmérsékletű forró lap validálásának részeként megvizsgáltuk az RTX hőküszöbre gyakorolt hosszú távú hatását. Az állat mindkét hátsó végtagját i.pl. kezeltük RTX-szel (0,048 nmol/100  $\mu$ l végtagonként), illetve annak szolvensével (0,03 % etanol), hogy elkerüljük a nem kezelt láb nocifenzív reakciójának zavaró hatását. 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. Az RTX szolvense nem okozott szignifikáns hőküszöbváltozást a hosszú távú mérések során sem.

#### **4.2.5. A TRPV1-receptor-génhiányos („knock-out”) és vad típusú egerek nociceptív hőküszöbének összehasonlítása**

Ebben a kísérletsorozatban a TRPV1-receptor-génhiányos egerekben és vad típusú párjaikban hasonlítottuk össze a nociceptív hőküszöböt. Ennek érdekében 28–42 grammos nőstény vad típusú ( $+/+$ ) C57BL6 egereken, illetve ezek TRPV1-receptor-génhiányos („knock-out”,  $-/-$ ) párjain végeztünk hőküszöbméréseket. A hőküszöb-meghatározásokat ugyanúgy végeztük, mint a patkányoknál, a tipikus végpont valamelyik hátsó végtag nyalása vagy rázása volt.

Nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a két egérpopuláció nociceptív hőküszöbe között (vad típusú:  $45,2 \pm 0,4$  °C, knock-out:  $45,6 \pm 0,5$  °C).

### **4.3. Lipid jellegű vegyületek nociceptív hőküszöbre gyakorolt hatásának vizsgálata**

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

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). Az anandamid és a 12-(*S*)-hidroperoxi-eikozatetraénsav (12-HPETE) (Zygmunt és mtsai, 1999; Hwang és mtsai, 2000) után egy újabb jelölt került reflektorfénybe, amikor leírtak egy kapszaicinhez szerkezetileg hasonló endogén lipidet, az *N*-oleoil-dopamint (OLDA). E vegyület i.pl. adás után nocifenzív reakciót váltott ki. Mindezen válaszokat I-RTX-szel antagonizálni lehetett, mutatva a TRPV1-receptor közvetítő szerepét (Chu és mtsai, 2003).

A kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy képes-e az OLDA csökkenteni a nociceptív hőküszöböt, illetve, hogy nocifenzív hatásának mi a receptorális háttere. 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 OLDA beadását követő első tíz percben a heves nocifenzív reakciót váltott ki, amely 10 perc múlva megszűnt. Ezután az OLDA az RTX-hez hasonlóan jelentős, 6–9 °C-os hőküszöbcsökkenést okozott, amely a 60. percre visszatért a kontroll értékre. Az OLDA hőküszöbcsökkentő hatását az i.pl. I-RTX-előkezelés az OLDA beadása utáni 10–30. percben szignifikánsan gátolta.

A kísérlet további részében megvizsgáltuk az OLDA (50 nmol/50 µl i.pl.) nocifenzív reakciót okozó hatását TRPV1-receptor-génhiányos („knock-out”) egerekben, összehasonlítva vad típusú párjaikkal. 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, amely a TRPV1-génhiányos egerekben szignifikánsan rövidebb idő alatt lezajlott, mint a vad típusú párjaikban. Azonban a génhiányos egerekben az OLDA még mindig képes volt némi nocifenzív reakciót kiváltani, ellentétben a szolvenssel, ami praktikusán hatástalan volt.

#### **4.3.2. 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 egyrészt az OLDA két metilált származékának, a 3-metil-*N*-oleoil-dopaminnak (3-MOLDA) és a 4-metil-*N*-oleoil-dopaminnak (4-MOLDA) a TRPV1-receptorra kifejtett hatásait, elsősorban a nociceptív hőküszöb mérésével. Másrészt egy rokon zsírsavamidról, az *N*-oleoil-etanolamidról (OEA) nyert ellentmondásos irodalmi adatok fényében (Ahern, 2003; Wang és mtsai, 2005; LoVerme és mtsai, 2006; Suardiaz és mtsai, 2007) az OEA TRPV1-receptorra gyakorolt hatásának analízise is célszerűnek látszott.

Ebben a sorozatban az esetleges TRPV1-receptor-agonista hatás vizsgálata során a kontroll hőküszöb mérése („incremental hot plate”, IITC Inc. Life Science) után az egyoldali 3-MOLDA, 4-MOLDA vagy OEA (i.pl., 100 µl) hatását vizsgáltuk. A TRPV1-receptor-antagonista hatás kimutatásához a korábban bemutatott RTX hiperalgéria/allodynia tesztet alkalmaztuk.

A 3-MOLDA i.pl. injekciója (5 nmol) azonnali nocifenzív reakciót váltott ki, amely 10 percen belül megszűnt. Ezt követően az emelkedő hőmérsékletű forró lappal mérve a 3-MOLDA ezen dózisa szignifikánsan csökkentette a hőküszöböt, és a hatás maximuma a beadást követő 15. percben volt. 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 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.

Mivel a 4-MOLDA és az OEA önmagában adva nem váltott ki választ a magatartási vizsgálatokban, a továbbiakban esetleges TRPV1-receptor-antagonista hatásukat teszteltük a referencia agonista RTX-szel szemben. A 4-MOLDA közepes és legmagasabb dózisa (1,5 és 5 nmol/50 µl i.pl.) szignifikánsan csökkentette az 5 perccel később adott RTX (0,05 nmol) hőküszöbcsökkentő hatását. Az OEA előkezelés (5 perccel korábban) (0,5, 1,5 és 5 nmol i.pl.) szintén gátolta az RTX küszöbcsökkentő hatását. Ennél a szernél egyértelmű dózis–hatás összefüggést találtunk, a százalékos gátlás 2,6-től 84,2 %-ig terjedt, és az OEA ID<sub>50</sub> értéke 1,4 nmolnak adódott.

#### **4.3.3. Az anandamid hatása a nociceptív hőküszöbre (3. saját közlemény)**

Egy másik zsírsavamid, az anandamid vagy más néven arachidonil-etanolamid a cannabinoidreceptorok, elsősorban a CB<sub>1</sub>-receptor endogén ligandja (összefoglalóként lásd Pertwee, 2001). Az anandamid számos különböző *in vivo* állatkísérletes modellben antinociceptív hatásúnak bizonyult, mivel CB<sub>1</sub>-receptorokon keresztül csökkentette a gyulladáshő- és mechanikai hiperalgéziát (Calignano és mtsai, 1998; Jaggar és mtsai, 1998; Richardson és mtsai, 1998; Farquhar-Smith és mtsai, 2002). Újabb adatok szerint az anandamid a TRPV1-receptorokat is képes aktiválni *in vitro* (Zygmunt és mtsai, 1999; Smart és mtsai, 2000), bár lényegesen magasabb koncentrációban (Németh és mtsai, 2003; Ahluwalia és mtsai, 2003). Mindezek alapján ma az anandamidot kettős, cannabinoid-

/TRPV1-receptor-agonistaként szokták említeni. Kísérleteink célja az volt, hogy saját *in vivo* kísérleti modellünkben megvizsgáljuk az anandamid TRPV1-receptorra gyakorolt hatását.

Az i.pl. adott anandamid (0,03-0,3 nmol) nem váltott ki nocifenzív reakciót, és nem befolyásolta az „incremental hot plate” készülékkel mért hőküszöböt sem. A továbbiakban az anandamiddal végzett 5 perces előkezelés hatását vizsgáltuk az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenésre. Az i.pl. adott anandamid (0,03 nmol/50 µl) szignifikánsan gátolta az RTX (0,05 nmol i.pl.) hőküszöbcsökkentő hatását. A szelektív CB<sub>1</sub>-receptor-antagonista SR141716A (0,18 nmol i.pl.) az anandamiddal való együttes adás esetén teljesen kivédte az anandamid gátló hatását az RTX okozta hőküszöbcsökkenésre.

#### **4.4. A carrageninnel kiváltott szubakut gyulladás hatása a nociceptív hőküszöbre**

A korábbiakban tárgyalt kísérleteink egyértelműen mutatják, hogy számos ágens képes csökkenteni a nociceptív hőküszöböt. Az RTX, az OLDA és a 3-MOLDA, illetve az  $\alpha,\beta$ -metilén-ATP egyaránt olyan receptorokon (TRPV1 illetve P2X3) hatnak, amelyek aktivációja akut gyulladós reakció kifejlődését eredményezi. Ezen ágensek okozta akut termális hiperalgécia magába foglalja mind a latenciaidő megrövidülését, mind a nociceptív hőküszöb csökkenését. Felvetődik a kérdés, hogy a termális hiperalgécia ezen két paramétere mindig együtt változik-e? Ennek vizsgálata érdekében egy szubakut gyulladós modellt választottunk, amelyben carragenin i.pl. injekciójával váltottunk ki több órán át fennálló gyulladós 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 latenciáidejére.

A carragenin adása előtt ugyanazon állatokban meghatároztuk az egyik hátsó végtagra vonatkozóan mind a hőküszöböt, mind pedig az 50 °C-os konstans laphőmérsékletnél a láb megnyalásáig eltelt latenciaidőt. Ezután carragenint (3 %, 100 µl) 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 gyulladós reakciót váltott ki, amely 3–4 órán át fennmaradt. Az „incremental hot plate” készülékkel emelkedő hőmérsékletű üzemmódban mérve a carragenin meglepő módon nem okozott hőküszöbcsökkenést a kontrollhoz képest.

Ugyanezeknél a carrageninnel kezelt állatoknál latenciaidő-mérést is végeztünk a készülék állandó hőmérsékletű üzemmódjában, 50 °C-os hőmérsékleten. Azt tapasztaltuk, hogy ezt a küszöbfeletti hőingert alkalmazva a carrageninnel kezelt hátsó láb megnyalásáig eltelt idő szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz képest.

## 5. MEGBESZÉLÉS

Az újonnan kifejlesztett emelkedő hőmérsékletű forró lap megbízható eszköznek bizonyult a nociceptív hőküszöb meghatározására, valamint gyógyszerek termális antinociceptív hatásainak mérésére éber, szabadon mozgó patkányokban. Az emelkedő hőmérsékletű forró lap lényeges tulajdonsága, hogy a hőküszöb nagyon jól reprodukálhatóan mérhető. A módszer további előnye a hagyományos forró laphoz képest, hogy a valódi nociceptív hőküszöböt méri, amely összevethető az elektrofiziológiai vagy humán pszichofizikai kísérletekben mért hőküszöbértékekkel.

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, míg a klasszikus standard hőmérsékletű forró lap csak az opioidok antinociceptív hatását képes kimutatni, és nagyban érzéketlen a ciklooxygenáz-gátlók iránt (a részleteket lásd Vogel és mtsai, 1997; Le Bars és mtsai, 2001).

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. Az RTX nagyon markáns hőküszöbcsökkenést okozott, és ez a reakció jó modellnek bizonyult analgetikus gyógyszerhatások mérésére. A morfin, diclofenac és paracetamol RTX-allodynaiát/hiperalgéziát gátló minimális effektív dózisaik kisebbnek bizonyultak, mint a három szer hőküszöb-emelkedést kiváltó minimális effektív dózisaik. Megállapítható, hogy az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenés mérése emelkedő hőmérsékletű forró lap segítségével egy új hiperalgézia-modell, amely nagy érzékenységet mutat a klasszikus referencia-analgetikumok iránt.

Az emelkedő hőmérsékletű forró lappal sikerült kimutatni az RTX hosszú távú, de még reverzibilis szenzoros deszenzibilizáló hatását is, amely a hőküszöb tartós emelkedésében nyilvánult meg.

Az emelkedő hőmérsékletű forró lapot használva az I-RTX potens és szelektív TRPV1-receptor-antagonistának bizonyult, mivel igen kis dózisban gátolta az RTX-szel



kiváltott hőküszöbcsökkenést, de nem befolyásolta az  $\alpha,\beta$ -metilén-ATP hőküszöbcsökkentő hatását. Az I-RTX nem okozott hosszú távú hőküszöb-emelkedést, így RTX-szé való metabolikus átalakulása nem valószínűsíthető ebben a modellben. Az  $\alpha,\beta$ -metilén-ATP-indukálta hőküszöbcsökkenést a P2 purinerg receptor antagonistá PPADS gátolta, jelezve P2-receptor-aktiváció szerepét.

Mivel a TRPV1-receptor-génhiányos („knock-out”) egerek hőküszöbe nem különbözött vad típusú társaikétól, illetve az I-RTX nem okozott hőküszöb-emelkedést patkányban, arra következtethetünk, hogy a perifériás nociceptorok TRPV1-receptorai nem vesznek részt a nociceptív hőküszöb meghatározásában fiziológias körülmények között.

Az OLDA a TRPV1-receptor agonistájaként viselkedve lecsökkentette a hőküszöböt, illetve nocifenzív reakciót okozott. Érdekes módon nocifenzív hatásában a TRPV1-receptor aktivációja mellett egy ettől független, nem azonosított mechanizmust is sikerült igazolni.

Kísérleteink kimutatták, hogy a 3-MOLDA TRPV1-receptor-agonistaként, míg a 4-MOLDA és az OEA TRPV1-receptor-antagonistaként (esetleg nagyon gyenge parciális agonistaként) viselkedett. Érdekes hangsúlyozni, hogy a 3-MOLDA és 4-MOLDA a TRPV1-receptor-agonista OLDA két metilált származéka, amelyek csak az aromás gyűrűn lévő metilcsoport helyzetében különböznek, mégis eltérő módon viselkednek. Ezek az eredmények mutatják, hogy egy kis kémiai változásnak is drámai hatása lehet egy ligand TRPV1-receptorra gyakorolt hatásában.

Egy további vizsgált zsírsavamid, az anandamid szintén gátolta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását. Az anandamid a cannabinoidreceptorok – elsősorban a CB<sub>1</sub>-receptor – endogén ligandja (részletesen lásd Pertwee, 2001). Továbbá az anandamid képes a TRPV1 receptor aktivációjára is (Zygmunt et al., 1999; Smart et al., 2000), bár jóval magasabb koncentrációban, mint amely a cannabinoidreceptorok aktiválásához szükséges (Németh et al., 2003; Ahluwalia et al., 2003). Jelen adataink nem támasztják alá azt a hipotézist, hogy az anandamid a TRPV1-receptorok endogén, fiziológias aktivátoraként szolgálna, mivel az anandamid gátolta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását, és ez utóbbi választ CB<sub>1</sub>-receptor-antagonistával teljesen meg lehetett szüntetni, vagyis az anandamid antihiperalgetikus hatását CB<sub>1</sub>-receptor-agonistaként fejtette ki.

Az emelkedő hőmérsékletű forró lappal nem sikerült hőküszöbcsökkenést kimutatnunk a carrageninnel kiváltott szubakut gyulladásban. Másrészt ugyanazzal a készülékkel, de állandó hőmérsékletű üzemmódban mérve, ugyanazon kezelt állatok erőteljes hőingerre adott elhárító reakciójának latenciaideje szignifikánsan lecsökkent. Mindezek alapján arra lehet következtetni, hogy bizonyos gyulladási körülmények között a termális

hiperalgèzia két komponense – a küszöbfeletti ingerre adott nocifenzív reakció latenciáidejének rövidülése és a nociceptív hőküszöb csökkenése – nem feltétlenül együttjáró jelenségek.

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. A PhD-DISZERTÁCIÓBAN BEMUTATOTT ÚJ EREDMÉNYEK TÉTELES ÖSSZEFOGLALÁSA**

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 CB<sub>1</sub>-cannabinoidreceptor-agonista (anandamid) vizsgálatára egyaránt.
6. A carrageninnel kiváltott szubakut gyulladási 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. *J. Biol. Chem.*, **15**:30429-34, 2003.
- AHLUWALIA J. et al. *Eur. J. Neurosci.*, **17**:2611-2618, 2003.
- AHLUWALIA J. et al. *J. Neurochem.*, **84**:585-591, 2003.
- ALMÁSI R. et al. *Br. J. Pharmacol.*, **139**:49-58, 2003.
- ALMÁSI R. et al. *Life Sci.*, **82**:644-651, 2008.
- BENHAM C.D. et al. *Cell Calcium.*, **33**:479-487, 2003.
- BEVAN S., SZOLCSÁNYI J. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**:330-333, 1990.
- BÖLCSKEI K. et al. *Pain*, **117**:368-376, 2005.
- CALIGNANO A. et al. *Nature*, **394**:277-281, 1998.
- CARSTENS E., WILSON C. *J. Neurophysiol.*, **70**:630-639, 1993.
- CATERINA M.J. et al. **288**:306-313, 2000.
- CATERINA M.J. et al. *Nature*, **389**: 816-824, 1997.
- CHU C.J., et al. *J. Biol. Chem.*, **278**:13633-13639, 2003.
- DAVIS J.B. et al. *Nature*, **405**:183-187, 2000.
- DHAKA, A. et al. *Ann. Rev. Neur. Sci.*, **29**:135-161, 2006.
- FARQUHAR-SMITH W.P. et al. *Pain*, **97**:11-21, 2002.
- GAMBLE G.D., MILNE R.J. *Neurosci. Lett.*, **96**:312-317, 1989.
- HARDY J.D. et al. *J. Clin. Invest.*, **29**:115-140, 1950.
- HARGREAVES K. et al. *Pain*, **32**:77-88, 1988.
- HOLZER P. *Pharmacol. Rev.*, **43**:143-201, 1991.
- HUNSKAAR S. et al. *Behav. Brain Res.*, **21**:101-108, 1986.
- HWANG, S.W. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**:6155-6160, 2000.
- JAGGAR S.I. et al. *Pain*, **76**:189-99, 1998.
- JANCSÓ M. *MTA Biológiai és Orvosi Tudományok Osztályának közleményei*. **10**:264-283, 1959.
- JANCSÓ N. et al. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **31**:138-151, 1967.
- JANCSÓ N. et al. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **33**:32-41, 1968.
- LE BARS D. et al. *Pharmacol. Rev.*, **53**: 597-652, 2001.
- LAMOTTE R.H. et al. *J. Neurosci.*, **2**:765-781, 1982.
- LOVERME J. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**:1051-1061, 2006.
- LYNN B. *Pain Rev.*, **1**:172-183, 1994.
- MAGGI C.A. *Prog. Neurobiol.*, **45**:1-98, 1995.
- MEYER R.A., CAMPBELL J.N. *Science*, **213**:1527-1529, 1981.
- MILNE R.J., GAMBLE G.D. *Pain*, **39**:103-107, 1989.
- NÉMETH J. et al. *Neurosci. Lett.*, **336**:89-92, 2003.
- PERTWEE R.G., *Progress Neurobiol.*, **63**:569-611, 2001.
- PINGLE S.C. et al. *Handbook of Experimental Pharmacology* **179**:155-171, 2007.
- PLONE M.A. et al. *Pain*, **66**:265-270, 1996.
- RICHARDSON J.D. et al. *Pain*, **75**:111-119, 1998.
- RIGONI M. et al. *Br. J. Pharmacol.*, **138**:977-985, 2003.
- SANDKÜHLER J. et al. *Neuroscience*, **73**:657-666, 1996.
- SMART D. et al. *Br. J. Pharmacol.* **129**: 227-230, 2000.
- SUARDÍAZ M. et al. *Pain*, **133**:99-110, 2007.
- SYCHA T., et al. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **56**:165-172, 2003.
- SZÁLLÁSI Á. Et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **267**:728-733, 1993
- SZÁLLÁSI Á. et al. *Brain Res.*, **703**:175-183, 1995
- SZÁLLÁSI Á. et al. *Br. J. Pharmacol.*, **128**:428-434, 1999.
- SZOLCSÁNYI J. *J. Physiol. (Paris)* **73**:251-259, 1977.
- SZOLCSÁNYI J. (In:) *Tachykinin Antagonists. (ed. Hakanson, R. & Sundler, F. pp.) Amsterdam: Elsevier*, 45-54, 1985.
- SZOLCSÁNYI J. *Acta Physiol. Hung.* **69**:323-332, 1987.
- SZOLCSÁNYI J. (In:) *Chemical Senses. Vol. 2. Irritation. (ed. Green, B.G., Mason, J.R. & Kare, M.R. pp.) New York: Marcel Dekker*, 141-168, 1990.
- SZOLCSÁNYI J. *Prog. Brain. Res.*, **113**:343-359, 1996.
- SZOLCSÁNYI J. et al. *Neurosci. Lett.*, **361**:155-158, 2004.
- UNDEM B.J., KOLLARIK M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **303**: 716-722, 2002.
- VOGEL H.G., VOGEL W.H. *Pharmacological Assays Berlin/Heidelberg/New York: Springer*, 1997.
- WAHL P. et al. *Mol. Pharmacol.*, **59**:9-15, 2001.
- WANG X. et al. *J. Physiol.* **564**:541-547, 2005.

WOODBURY C.J. et al. *J. Neurosci.*, **14**:6410-6415, 2004.  
WOOLF C.J., MA Q. *Neuron*. **2**:353-364, 2007.  
ZIMMERMANN M. *Pain*, **16**:109-110, 1983.  
ZYGUMUNT P.M. et al. *Nature*, **400**:452-457, 1999.

## 8. A PhD-DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

### 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*-oleylethanolamide 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.

*12<sup>th</sup> 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 4<sup>th</sup> 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 intraplantarisán 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., Hajos, G., Szolcsányi, J.: Az OLDA TRPV1 endogén ligand szerepének *in vitro* és *in vivo* vizsgálata.

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

## 9. A PhD-DISSZERTÁCIÓHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

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 bevezetett a fájdalom-farmakológia tudományába, tapasztalatával és irányításával mindvégig támogatott a kitűzött célok elérésében.

Köszönöm konzulensemnek, dr. Pethő Gábor egyetemi docensnek, hogy barátságába fogadott és közös munkánk során számtalan és felbecsülhetetlen segítséget nyújtott. Szemléletéért, precizitásáért és türelméért hálával tartozom.

Köszönettel tartozom dr. Bölcskei Kata tudományos munkatársnak a személyes és szakmai támogatásért, amit a kutatómunkánk során kaptam. Munkája, felejthetetlen társasága és barátsága felbecsülhetetlen segítséget jelentett e munka kidolgozásában az elmúlt néhány évben.

Külön köszönetemet fejezem ki asszisztensünknek, 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 a vendégszeretetükért, hogy az Intézet munkatársai és kutatói közé tartozhattam és „tiszteletbeli farmakológusnak” érezhettem magam.

Külön köszönetemet fejezem ki munkahelyem vezetőjének dr. Seffer Istvánnak és a Klinika valamennyi dolgozójának, munkatársaimnak támogatásukért és türelmükért.

Végül, nem lehetek elég hálás a gyermekeimnek szeretetükért, egész családomnak a hosszú évek során tanúsított türelmükért és toleranciájukért valamint barátaimnak, kedvesemnek, odaadásukért, minden szeretetükért, türelmükért, lelkesítésükért és biztatásukért.