

**Plantáris incízióval kiváltott viselkedési nociceptív  
hőküszöb csökkenés patkányban: mediátorai és  
modulációja hagyományos fájdalomcsillapítók és egy új  
perifériás neuroregulációs mechanizmus által**

**PhD tézis**

**Dr. Réka Füredi**

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar  
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Gyógyszertudományok Doktori Iskola  
Neurofarmakológia Program



Programvezető: Dr. Pintér Erika PhD, DSc  
Témavezető: Dr. Pethő Gábor PhD

2013

# 1 Bevezetés

A fájdalom a szöveti integritást veszélyeztető behatások által kiváltott kellemetlen, szubjektív érzet. Nocicepciónak nevezzük a folyamatot, amelynek során a fájdalmas inger (pl. magas hőmérséklet, endogén és exogén irritáló molekulák) ingerületté alakul. melyet viselkedési válasz megjelenése követ. Ezeket a válaszokat nocifenzív viselkedésnek nevezzük, mely magában foglalja az ingerforrás elkerülését, a menekülést és a vokalizációt. Szenzitizáció során a fájdalmas ingerekre adott válaszkészség megnő, vagyis az ingerküszöb lecsökken és fokozott fájdalomérzet (hiperalgézia) alakul ki. Antinociceptív hatásról akkor beszélünk, ha kémiai vagy fizikai behatások következtében csökken a nocicepció, mind hiperalgéziás mind fizioiógias körülmények közt. A nociceptív inger transzdukciójának helyei az uni- és polimodális nociceptorok, melyek a primér afferens neuronok specializált végződésai. Ezek a pszeudounipoláris neuronok idegezik be a bőrt, a nyálkahártyákat és a belső szerveket. Perifériás axonjaik alkotják az érző idegrostokat, sejttestük pedig a gerincvelő hátsószarvi idegdúcaiban vagy a ganglion trigeminaleban helyezkednek el. Közös jellemzőjük hogy sejtmembránjukban megtalálható az erős paprika csípős anyagának, a kapszaicinnek a receptora, a TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1). Ez a receptor többek közt 43°C-t meghaladó hőmérséklet, alacsony pH, lipoxigenáz termékek, ciklooxygenáz (COX) termékek valamint nitrogén monoxid (NO) hatására aktiválódik. Neurokémiai szempontból peptiderg és non-peptiderg neuronok polimodális nociceptorok különíthetők el. A peptiderg nociceptorok neuropeptideket, (pl. substance P, neurokinin A és B, calcitonin gene-related peptide, szomatosztatin) tartalmaznak és szabadítanak fel ingerlés hatására. A peptidergic nociceptok afferens funkciójuk mellett, efferens tevékenységet is mutatnak, ami a felszabadult neuropeptidekre adott helyi, szöveti válaszban nyilvánul meg.

Intézetünkben Pintér és Szolcsányi fedezte fel, hogy egy hátsógyök vagy a n. ischiadicus kétoldali átmetszését követően a perifériás csonk ingerlése markáns neurogén gyulladást vált ki az azonos oldali végtag bőrében, amit szignifikánsan lecsökkent az ellenoldali csonk stimulációja. Megfigyeléseik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az érző idegvégződésekből gyulladáscsökkentő

mediátor(ok) szabadulnak fel és jutnak el a vérkeringéssel a test távoli tájaira. Megfigyelték továbbá, hogy a perineurális kapszaicin kezeléssel rocsolt kapszaicin-érzékeny idegrostokon nem váltható ki a gyulladásellenes hatás. Felismerték azt is, hogy a azokban az állatokban, amelyekben a távoli gyulladáscsökkentő hatás jelentkezett, a plazma szomatosztatin-szerű immunreaktivitása jelentősen megnőtt a kontroll állatokhoz képest, míg szomatosztatin ellenes poliklonális antitestekkel történt előkezelést követően a jelenség nem volt kiváltható. Az állatoknak szisztémásan beadott exogén szomatosztatin szintén kiváltotta a neurogén gyulladás csökkenését. Vizsgálataik bizonyították be első alkalommal, hogy a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződések aktivációja szisztémás gyulladáscsökkentő hatással is rendelkezik, amit az idegvégződésekből a keringésbe jutó szomatosztatin közvetít. A leírt jelenséget a peptiderg nociceptorok szenzokrin funkciójának nevezték el.

A termonocicepció vizsgálatának módszerei közé tartozik a viselkedési nociceptív hőküszöb meghatározása. Ez annak a legalacsonyabb hőmérsékletnek a meghatározásán alapszik, amely már nocifenzív viselkedést vált ki. Intézetünkben a viselkedési nociceptív hőküszöb vizsgálatára a közelmúltban kifejlesztésre került egy emelkedő hőmérsékletű vízfürdő. A készülékkel az állatok hátsó lábát 30°C-ról egyenletesen emelkedő hőingernek tesszük ki, mindaddig, amíg az állat a lábát a vízből ki nem emeli. A nocifenzív reakció megjelenéséhez tartozó vízfürdő-hőmérsékletet tekintjük a vizsgált láb nociceptív hőküszöbének. A hőküszöb mérése jól reprodukálható, kevés különbség mutatkozik azonos állatok ismételt mérései valamint az egyes példányok mért értékei között egyaránt. Ez jelentős előny a klasszikus, reflex latencia mérésen alapuló módszerekkel szemben (pl. hot plate, tail flick) ahol az ismételt mérések között jelentős eltérések lehetnek.

## 2 Célkitűzések

1. Korábbi eredményeink szerint, hőtraumát követően kialakuló akut termális hiperalgégiában az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mért viselkedési nociceptív hőküszöb lecsökken. A humán posztoperatív fájdalom modellezésére (amely egy hosszabb ideig fennálló hiperalgégiás állapot) fejlesztették ki a patkányok és egerek talpán végrehajtott sebészi bemetszést. Első vizsgálatunk célja annak meghatározása volt, hogy a plantáris incízióra jellemző tartós hiperalgégiában is kimutatható-e emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel a viselkedési nociceptív hőküszöb csökkenése. Vizsgálni kívántuk továbbá a modellben a hagyományos opioid és nem-opioid analgetikumok hatását.
2. A hőtrauma által kiváltott és a plantáris incízió hatására kialakuló termális hiperalgézia időbeli lefolyása jelentősen eltér, ezért feltételeztük, hogy a két folyamat háttérében eltérő mediátorok állhatnak. Második vizsgálatunk célja a hőtrauma és a plantáris incízió perifériás mediátorainak összehasonlítása volt. Lokálisan alkalmazott tesztanyagokat és a viselkedési nociceptív hőküszöb mérését használtuk módszerként. Az alábbi receptorok és enzimtermékek hatásait vizsgáltuk: bradikinin B<sub>2</sub> és B<sub>1</sub> receptor, P2X purinoceptor, TRPV1 receptor, lipoxigenáz termékek és NO.
3. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a kapszaicin érzékeny idegvégződések stimulációját követően szisztémás gyulladáscsökkentő hatás észlelhető a test távoli részein. Ennek háttérében az idegvégződések közül a vérkeringésbe jutó szomatosztatin áll, ezt nevezik a peptiderg nociceptorok szenzokrin funkciójának. A szomatosztatinról több vizsgálat is bebizonyította, hogy antinociceptív hatással is rendelkezik, mely részben perifériás mechanizmusokon alapul. Harmadik kísérletsorozatunkban azt vizsgáltuk, hogy a polimodális nociceptorok stimulációja hatására kialakul-e olyan antinociceptív hatás amely a test távoli részein észlelhető, vagyis a peptiderg neuronok rendelkeznek-e antinociceptív szenzokrin hatással is. A célunk az volt, hogy a plantáris incízióval kiváltott hőküszöb csökkenést a távoli nociceptorok kémiai stimulációjával befolyásoljuk.

### **3 Módszerek**

A vizsgálatok Pécsi Tudományegyetem Állatkísérletes Etikai Bizottságának engedélyével történtek. A vizsgálatokat 150–200 g súlyú nőstény Wistar patkányokon végeztük. A kísérletek során mindig ugyanaz az asszisztens kezelte az állatokat. A vizsgáló nem ismerte az állatok kezelt vagy kontroll besorolását.

A viselkedési nociceptív hőküszöb meghatározására az intézetünkben a közelmúltban kifejlesztett emelkedő hőmérsékletű vízfürdőt használtuk. A szerkezet két fő egysége a fűthető víztartály és a vezérlőegység. A lazán megfogott állatokat függőleges helyzetben a víztartály fölé emeltük, úgy, hogy a hátsó végtagok mozgása akadálymentes legyen. Miután az állat egyik hátsó lábát a vízbe merítettük, elindítottuk a víz melegítését. Azt a hőmérsékletet tekintettük a vizsgált láb viselkedési nociceptív hőküszöbének amelynél az állat a vízből kiemelte a lábát.

#### **3.1 A termális és mechanikai hiperalgézia kialakítása és modulációja**

Hőtrauma kiváltása előtt meghatároztuk mindkét hátsó láb kiindulási viselkedési nociceptív hőküszöbét. Ezt követően az állatokat éterrel elaltattuk és bal hátsó lábukat egy állandó, 51 °C hőmérsékletű vízfürdőbe merítettük 20 másodpercre. A kialakult hőtrauma nem eredményezte spontán nocifenzív viselkedések megjelenését. Az ébredést követően a sérült láb viselkedési nociceptív hőküszöbét megmértük. Plantáris incízió esetén mindkét láb viselkedési nociceptív hőküszöbét meghatároztuk a műtét előtt, majd az állatokat pentobarbitállal elaltattuk, és a talpon egy 1 cm hosszú bemetszést ejtettünk a középvonalban. A metszés a bőr rétegein, a talpi fasciáin és m. plantarison hatolt át. A keletkezett sebet varrattal zártuk. A lábadozási idő az a legrövidebb időtartam volt, ami alatt az altatás hatásai teljesen megszűntek.

A hagyományos analgetikumok plantáris incízióval létrehozott hiperalgéziára gyakorolt hatásainak vizsgálatát célzó kísérleteinkben a posztoperatív viselkedési nociceptív hőküszöb meghatározását követően az analgetikumokat vagy azok oldószereit intraperitoneálisan vagy intraplantárisan beadtuk az állatoknak, majd

10 percenként hőküszöb méréseket végeztünk. Minden gyógyszer hatását saját oldószeréhez viszonyítva határoztuk meg.

A távoli antihiperalgetikus hatás vizsgálatához az akután denervált (n. ischiadicus és n. saphenus átmetszésével) hátsó láb fájdalomérző idegvégződéseit kémiai ingerekkel (kapszaicin i.pl. vagy mustárolajos ecsetelés) stimuláltuk, majd az ellenoldali, bemetszett lábon viselkedési nociceptív hőküszöb méréseket végeztünk 10 percenként. A denerváció megakadályozta, hogy a nociceptorokban keletkező ingerület a központi idegrendszerbe jusson. A kontroll csoport tagjait az stimuláló anyag oldószerével kezeltük.

A hátsó lábak mechanonociceptív küszöbeit Randall–Selitto féle módszerrel határoztuk meg, majd az állatokat elaltattuk és a n. ischiadicus részleges lekötésével (Seltzer féle műtét) neuropátiát, és az azt kísérő mechanikai hiperalgeziát hoztunk létre. Az ellenoldali láb denervációjára 48 órával később, 18 órával a kísérlet előtt került sor.

### **3.2 Statisztikai elemzések**

Az azonos állatok ismételt hőküszöb méréseinek eredményeit variancia analízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze. Az aktív hatóanyagot vagy annak oldószerét kapó vizsgálati csoportok összehasonlítására kétutas varianciaanalízist (two-way ANOVA) végeztünk. Egymintás Student-féle t-tesztel hasonlítottuk össze az ismételt hőküszöb mérésekor tapasztalt hőküszöb csökkenések összegét, amit az adott anyag hatásosságának megítélésére használtunk.

A százalékban kifejezett gátlást az alábbi képlet szerint számítottuk ki:

$$\frac{[(\text{Drop}_{\text{solv}} - \text{Drop}_{\text{drug}})]}{\text{Drop}_{\text{solv}}} \times 100$$

Ahol a  $\text{Drop}_{\text{solv}}$  és a  $\text{Drop}_{\text{drug}}$  az átlagos hőküszöb csökkenések összegét jelöli, a kezelést követő időpontokban, a kezelt és a kontroll állatokban.

## **4 Eredmények**

### **4.1 A plantáris incízió viselkedési nociceptív hőküszöbre gyakorolt hatása**

Plantáris incíziót követően az állatok viselkedési nociceptív hőküszöbét mindkét lábon, hét egymást követő napon meghatároztuk. Az intakt, kontroll hátsó lábak esetében nem találtunk szignifikáns eltérést a kiindulási értékhez képest. Az ellenoldali, operált hátsó lábak viselkedési nociceptív hőküszöbe statisztikailag szignifikánsan csökkent mind a kiindulási, mind az ellenoldali lábakon mért értékekhez képest. A viselkedési nociceptív hőküszöb csökkenését, vagyis a hiperalgéziát a műtétet követő hetedik napig vizsgáltuk. A hatodik posztoperatív napon a műtött oldali viselkedési nociceptív hőküszöb értékek növekedésnek indultak, ezért a kísérletet a hetedik napon etikai okokból befejeztük.

### **4.2 A hagyományos analgetikumok hatása a plantáris incízióval kiváltott viselkedési nociceptív hőküszöb csökkenésre**

A posztoperatív hőküszöb mérést követően, miután igazoltuk a hiperalgézia fennállását, az állatok intraperitoneális morfin vagy oldószer kezelésben részesültek, majd 10 percenként hőküszöb méréseket végeztünk. Vizsgálatunkban az oldószerrel összehasonlítva a morfin dóziszfüggő módon enyhítette a plantáris incízió által kiváltott viselkedési nociceptív hőküszöb csökkenést. A legkisebb hatékony dózis 0,3 mg/kg volt. Az alkalmazott legmagasabb dózis (3 mg/kg) pedig 60 %-al csökkentette a hiperalgéziát, anélkül, hogy szedációt okozott volna.

A szisztémásan alkalmazott diklofenák dóziszfüggő módon csökkentette a posztoperatív hiperalgéziát. A legkisebb hatékony dózis 1 mg/kg volt, a legmagasabb dózis (10 mg/kg) 40 %-al emelte meg a posztoperatív viselkedési nociceptív hőküszöböt.

Az intraperitoneálisan beadott paracetamol dóziszfüggő módon csökkentette a plantáris incízióval kiváltott termális hiperalgéziát. A legkisebb hatékony dózis 100

mg/kg volt, a legmagasabb alkalmazott dózis pedig 52 %-al csökkentette a termális hiperalgéziát.

A vizsgált analgetikumok dózis-hatás görbéi alapján a morfin bizonyult a lepotensebbnek, a paracetamol pedig a legkevésbé potensnek, a legkisebb hatékony dózisokat összevetve. A morfin és a paracetamol hatékonysága hasonló volt, vagyis közel azonos mértékben csökkentették a termális hiperalgéziát, a diklofenák kevésbé volt hatékony a vizsgálati elrendezésben. Egy külön vizsgálatban igazoltuk, hogy az altatáson átesett, de meg nem operált állatok esetén a jelen vizsgálatban alkalmazott legmagasabb morfin, diklofenák vagy paracetamol dózis nem emelte meg az intakt lábak viselkedési nociceptív hőküszöbét, valamint nem okozott szedációt.

A hagyományos analgetikumok lokális hatásosságát is vizsgáltuk a plantáris incízióval kiváltott termális hiperalgéziában. Az analgetikumok olyan dózisát adtuk be az állatok bemetszett talpába, melyek a legalacsonyabb szisztémásan hatékony dózisonál alacsonyabbak voltak. A gyógyszeradásra közvetlenül a posztoperatív viselkedési nociceptív hőküszöb meghatározását követően került sor. Minden analgetikum hatását saját szolvenséhez hasonlítottuk. Intraplantarisan adva 10 µg morfin vagy 100 µg diclofenac szignifikánsan csökkentette a termális hiperalgéziát, paracetamol esetében lokális hatást nem tudtunk kimutatni.

#### **4.3 A plantáris incízióval vagy enyhe hőtraumával kiváltott viselkedési nociceptív hőküszöb csökkenésben részvevő mediátorok összehasonlítása**

Intraplantarisan adva 10 µM HOE 140, (szelektív bradikinin B<sub>2</sub> receptor antagonist), szignifikánsan csökkentette a hőtraumával kiváltott termális hiperalgéziát, 10 és 20 perccel a kezelés után valamint a hőküszöb csökkenések összegét is szignifikánsan csökkentette. Plantáris incízió esetén az intraplantarisan adott HOE 140 minden mérési időpontban jelentősen csökkentette a termális hiperalgéziát, az oldószerrel kezelt csoporttal összehasonlítva.



Intraplantárisan adva 10  $\mu\text{M}$  [des-Arg<sup>10</sup>]-HOE 140 (bradikinin B<sub>1</sub> receptor antagonist) hőtrauma esetén csak 20 perccel a kezelés után csökkentette a termális hiperalgéziát, így a hőküszöb csökkenések összege sem változott szignifikánsan. Plantáris incízió esetén viszont a lokálisan adott [des-Arg<sup>10</sup>]-HOE 140 minden mérési időpontban szignifikánsan csökkentette a termális hiperalgéziát, az oldószerrel kezelt csoporttal összehasonlítva.

Hőtraumát követően az intraplantárisan adott nem szelektív lipoxigenáz inhibitor nordihidroguaiaretin sav mindkét alkalmazott koncentrációja szignifikánsan csökkentette a hőküszöbcsökkenések összegét. Plantáris incíziót követően az intraplantárisan adott nordihidroguaiaretin sav alacsonyabb koncentrációja (10  $\mu\text{M}$ ) nem mérsékelte jelentősen a termális hiperalgéziát, magasabb koncentrációban adva (30  $\mu\text{M}$ ) is csak 10 perccel a kezelést követően csökkentette szignifikánsan a termális hiperalgéziát az oldószerrel kezelt csoporttal összehasonlítva, és hőküszöb csökkenések összege sem tért el.

A hőtraumát követően a nitrogén-monoxid szintetáz gátló L-NOARG 100  $\mu\text{M}$ -jának intraplantáris adása minden mérési időpontban jelentősen csökkentette a termális hiperalgéziát. Plantáris incíziót követően 100  $\mu\text{M}$  L-NOARG intraplantáris adása minden mérési időpontban szignifikánsan enyhítette a hőküszöb csökkenést, a kontroll csoporttal összehasonlítva.

A hőtrauma által kiváltott hőküszöb csökkenést 0,3  $\mu\text{M}$  TNP-ATP (P2X purinoceptor antagonist) intraplantáris adása minden mérési időpontban jelentősen mérsékelte. Plantáris incízió esetén az intraplantáris TNP-ATP (0,3  $\mu\text{M}$ ) kezelés az első három mérési időpontban szignifikánsan csökkentette a termális hiperalgéziát, és a hőküszöb csökkenések összege is szignifikánsan tért el a kontroll csoportétól.

Az intraplantárisan alkalmazott TRPV1 receptor antagonist AMG9810 koncentrációfüggő módon csökkentette a hőtrauma által kiváltott termális hiperalgéziát. Plantáris incíziót követően az intraplantárisan alkalmazott TRPV1 receptor antagonist SB-366791 alacsonyabb koncentrációja (10  $\mu\text{M}$ ) nem csökkentette szignifikánsan a termális hiperalgéziát, amíg magasabb

koncentrióban adva (100  $\mu$ M) minden mérési időpontban hatékonyak bizonyult. A fentieknek megfelelően az alacsonyabb koncentráció esetében a hőküszöb csökkenések összege nem tért el szignifikánsan a kontroll csoportnál tapasztalttól, míg a magasabb koncentráció esetében a különbség szignifikáns volt.

#### **4.4 A nociceptív idegvégződéses kémiai ingerlésével kiváltott termális antinociceptív hatás vizsgálata**

Ebben a kísérletsorozatban az állatok akutan denervált hátsó lábában lévő érző idegvégződéseket kémiai anyagokkal stimuláltuk, majd az ellenoldali láb viselkedési nociceptív hőküszöbét vizsgáltuk. Az akutan denervált lábba intraplantárisan adott 1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g vagy 100  $\mu$ g kapszaicin nem változtatta meg az ellenoldali intakt láb viselkedési nociceptív hőküszöbét, ezért plantáris incízióval termális hiperalgeziát indukáltunk, hogy kismértékű antinociceptív hatások is kimutathatóvá váljanak. Ezt követően a denervált lábba adott kapszaicin dózisfüggő módon csökkentette az ellenoldali lábon mért hőküszöb csökkenést, vagyis távoli antihyperalgetikus hatást tapasztaltunk. A legalacsonyabb alkalmazott kapszaicin dózis mellett nem tapasztaltunk távoli antihyperalgetikus hatást, míg a legmagasabb alkalmazott dózis hatékonysága megközelítette az intraperitoneálisan adott morfin (3 mg/kg) hatását.

Azért, hogy tisztázhassuk a kapszaicin-érzékeny idegvégződéses szerepét a tapasztalt jelenségben krónikus denervációt alkalmaztunk. Az idegvégződéses – köztük a kapszaicin szenzitív idegvégződéses – irreverzibilisen károsodásuk következtében érzéketlenné válnak a kapszaicinre, de annak esetleges szisztémás hatásait a denerváció nem befolyásolja. Öt nappal a denervációt követően (n. ischiadicus és n. saphenus átmetszése) a talpba adott legmagasabb kapszaicin dózis sem váltott ki antihyperalgetikus hatást, az ellenoldali, bemetszett lábon. Ha kapszaicin magas dózisainak teszünk ki TRPV1-et expresszáló polimodális nociceptorokat, azok deszezibilizálódnak, és sem kapszaicinnal sem más módon nem hozhatók ingerületbe. Három nappal a kísérlet előtt, egy alkalommal intraplantárisan adott kapszaicinnal (100  $\mu$ g) kezeltük elő az állatok intakt talpát. Az előkezelést követően a kísérlet során a talpba adott kapszaicin

nem befolyásolta az ellenoldali, bemetszett lábon mért viselkedési nociceptív hőküszöb csökkenést. Az oldószerrel előkezelt kontroll csoport esetén az antihiperalgétiás hatás változatlan formában észlelhető volt az ellenoldali lábon.

A denervált láb mustárolajos (5%) ecsetelésének hatására, az ellenoldali, bemetszett lábon a hőküszöb csökkenés jelentős mérséklődését tapasztaltuk. Az antihiperalgéziás hatás mértéke azonos volt a kapszaicinével.

Intézetünkben korábban elvégzett kísérletek alapján azt feltételeztük, hogy az észlelt távoli antihiperalgétiás hatásban szerepet játszhat a szomatosztatin. Feltételezésünk ellenőrzésére az állatokat intraperitoneálisan adott cikloszomatosztatinnal (szomatosztatin antagonistá) kezeltük elő, 20 perccel a kapszaicin beadása vagy a mustárolajos ecsetelés előtt. Az előkezelés az intraplantáris kapszaicin adását követően az ellenoldalon, a bemetszett talpon az antihiperalgétiás hatás kifejlődését megakadályozta, míg az oldószeres kezelés hatástalan volt és a bemetszett talp hőküszöbe megemelkedett. A szomatosztatin távoli antihiperalgétiás hatásában betöltött szerepének további vizsgálatára a plantáris incízió átesett állatokat intraperitoneálisan adott exogén szomatosztatinnal kezeltük. Az oldószerrel kezelt állatokkal összehasonlítva az i.p adott szomatosztatin minden mérési időpontban jelentősen emelte az ellenoldali, bemetszett láb viselkedési nociceptív hőküszöbét. Az észlelt antihiperalgétiás hatás cikloszomatosztatin előkezelést követően nem volt kiváltható.

Endogén antihiperalgétiás rendszerek vizsgálata során természetesen felmerül az endogén opioidok és endogén kannabinoidok szerepének a lehetősége, ezért a denervált láb kapszaicin kezelését megismételtük opioid antagonistá naloxon és CB<sub>1</sub> receptor antagonistá AM 251 előkezelést követően is. Az előkezelések hatására jelentősen csökkent az ellenoldali, bemetszett lábon tapasztalható antihiperalgétiás hatás. A perifériásan ható naloxon metijodiddal végzett előkezelés nem csökkentette a kapszaicinnal kiváltott távoli antihiperalgétiás hatást.

A kapszaicinnal kiváltott távoli antihiperalgétiás hatást mechanikai hiperalgéziában is vizsgáltuk. A mechanikai hiperalgéziát a n. ischiadicus

részleges lekötésével (Seltzer-féle operáció) váltottuk ki. A denervált talpba adott kapszaicin szignifikánsan növelte, az ellenoldali, műtött, hiperalgéziás láb Randall–Selitto féle módszerrel mért mechanonociceptív küszöbét. A denervált láb mustárolajos ecsetelésének hatására hasonló távoli antinociceptív hatást észleltünk.

A legkisebb hatékony kapszaicin dózis (10 µg) nem denervált talpba adva, az ellenoldali bemetszett talp termális hőküszöb csökkenését jelentősen mérsékelte. A kapszaicin injekció hatására az állatok kb. 5 percig tartó markáns nocifenzív viselkedést (a láb emelése és nyalogatása) mutattak. Etikai okokból magasabb kapszaicin dózisokat nem vizsgáltunk.

## 5 Diszkusszió

Intézetünkben a termonocicepció vizsgálatára újfajta megközelítést alkalmaztunk: a viselkedési nociceptív hőküszöb mérést. A mérésekhez emelkedő hőmérsékletű vízfürdőt használtunk. A termális hiperalgéria ebben a megközelítésben a viselkedési nociceptív hőküszöb csökkenésében nyilvánul meg.

Első kísérletsorozatunkban a plantáris incízió jelentős, tartós, több napig fennálló viselkedési nociceptív hőküszöb csökkenést okozott, melynek időbeli lefolyása hasonló volt a standard latencia idő mérésekkel tapasztaltakhoz. Ezzel igazoltuk, hogy a viselkedési nociceptív hőküszöb mérése legalább annyira megbízható módszer a termális hiperalgéria kimutatására mint a hagyományos módszerek.

Mivel a viselkedési nociceptív hőküszöb még rövid időközönként végzett mérések esetén is nagyfokú reprodukálhatóságot mutat, ezért egy állatban volt vizsgálható a hagyományos analgetikumok hatásának mértéke és időbeli lefolyása is. Minden vizsgált analgetikum dóziszfüggő módon gátolta a plantáris incízióval kiváltott viselkedési nociceptív hőküszöb csökkenést. Mivel intakt lábak esetén még az analgetikumok legmagasabb dózisa sem emelték meg a viselkedési nociceptív hőküszöböt, kijelenthetjük, hogy valódi antihiperalgériás és nem a hőküszöböt közvetlenül megemelő határról van szó. Vizsgálataink alapján elmondhatjuk, a viselkedési nociceptív hőküszöb legalább olyan érzékeny paraméter a morfin plantáris incízióra gyakorolt antihiperalgetikus hatásának kimutatására, mint a hagyományos látencia idő mérés. A nem-szelektív COX gátló diklofenák dóziszfüggő módon gátolta a plantáris incíziót követően kialakult hiperalgériát. A szisztémásan adott analgetikumok közül a nem-opioid analgetikum paracetamol bizonyult a legkevésbé potensnek a vizsgált analgetikumok között, igaz, hatékonysága meghaladta a diklofenákét, de elmaradt a morfinétól. Az intraplantárisan adott diklofenák és morfin hasonlóan hatékonyak bizonyult mint korábbi kísérleteinkben, ahol hőtraumával vagy reziniferatoxinnal kiváltott termális hiperalgériát csökkentő hatásukat vizsgáltuk. A lokálisan alkalmazott dózisok jelentősen alatta maradtak a legkisebb hatásos szisztémás dózishoz, így biztosítható volt, hogy a lokális hatáson kívül ne tapasztaljunk mérhető analgetikus

hatást. A diklofenák helyi hatása háttérében a gyulladt vagy sérült szövetekben keletkező, és a nociceptorokat szenzitizáló prosztaglandinok szintézisének gátlása állhat. Az opioidok perifériás analgetikus hatásáról ismert, a nociceptorokon expresszáldó opioid receptorokon keresztül valósul meg.

A második kísérletsorozatban az enyhe hőtrauma és a plantáris incízió hatására kialakuló termális hiperalgémia háttérében álló mediátorokat hasonlítottuk össze. A vizsgált anyagokat olyan dózisban adtuk intraplantárisan az állatoknak, melyekről több korábbi vizsgálat bebizonyította, hogy csak az adás helyén fejtenek ki lokális hatásokat. A bradikinin B<sub>2</sub> receptor, a P2X purinoceptor és a TRPV1 receptor aktivációja, valamint NO képződés mindkét modellben megfigyelhető volt. Az előzőeken túl enyhe hőtrauma által kiváltott hiperalgémia esetén a lipoxigenáz termékek megjelenése, míg plantáris incíziót követően a bradikinin B<sub>1</sub> receptor aktivációja volt megfigyelhető. A plantáris incízió hatására mind a B<sub>2</sub> mind a B<sub>1</sub> receptorok aktivációja megfigyelhető volt 18 órával a műtétet követően. Enyhe hőtrauma esetén csak B<sub>2</sub> receptor aktivitás volt észlelhető, 20–50 perccel a sérülést követően, ekkor a B<sub>1</sub> receptorok indukálható expressziója feltehetőleg még nem kezdődött meg. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő validáló vizsgálatai során kimértük, hogy a COX gátlók intraplantáris adása mind enyhe hőtraumát mind plantáris incíziót követően jelentős antihiperalgétiás hatást fejtett ki. Eredményeink rámutattak, hogy mindkét modellben a COX termékek, vagyis a prosztanoidok jelentős szerepet a hiperalgémia kialakításában. A lipoxigenáz termékek ismert fájdalomkeltő hatásának megfelelően vizsgálataink is kimutatták ezen molekulák szerepét mindkét modellben, de hőtraumát követően jelentősebb mértékben járultak hozzá a hiperalgémia kialakulásához. Eredményeink összhangban állnak más kutatócsoportok megfigyelésével a lokálisan termelő NO fájdalomkeltő hatásáról, mivel a NO szintézis gátló mindkét modellben csökkentette a termális hiperalgémia kialakulását. A P2X receptor aktivációjának szerepe mindkét modellben kimutatható volt, a szelektív antagonisták TNP-ATP használatával. A TRPV1 receptorok szerepének igazolása várható eredmény volt modelljeinkben, mivel ismert, hogy a termális hiperalgémia kialakulásában kulcsfontosságú ennek az ioncsatornának az aktivációja akut és szubakut gyulladással járó folyamatokban.

Figyelembe véve, hogy az egyes antagonisták százalékos formában kifejezett hőküszöb csökkenést gátló hatásainak összege meghaladja a 100 %-ot, nem valószínű, hogy ezek a folyamatok egymástól függetlenül, párhuzamosan zajlanak, sokkal inkább közös útvonalak feltételezhetők, melyek egy-egy központi molekulán keresztül kapcsolódnak egymáshoz. Ilyen központi molekula lehet többek közt a TRPV1.

Összegzésül elmondhatjuk, hogy a két modell között a termális hiperalgéria kialakításában részt vevő vizsgált perifériás mediátorok tekintetében csak kis különbséget találtunk, annak ellenére, hogy az enyhe hőtraumával vagy plantáris incízióval kiváltott hőtrauma időbeli lefolyása igen eltérő.

Harmadik kísérletsorozatunkban a nociceptív idegvégződések kémiai stimulációjával kiváltott távoli antihiperalgetikus hatást vizsgáltuk. A kísérletek tervezésekor az intézetünkben korábban kidolgozott Pintér és Szolcsányi-féle modellt vettük alapul, melynek segítségével egy olyan neuroregulátoros mechanizmust írtak le, ami szerint a fájdalomérző idegvégződések kémiai vagy elektromos stimuláció hatására távoli gyulladáscsökkentő hatást fejtenek ki. Kimutatták továbbá, hogy a stimuláció hatására a nociceptorokból szomatosztatin szabadul fel, amely a szisztémás keringésbe jutva a test távoli részein fejt ki gyulladáscsökkentő hatást, vagyis a nociceptív idegvégződésekől származó hormonszerű molekulának tekinthető. Mivel a szomatosztatinról ismert, hogy antinociceptív hatása is van, feltételeztük, hogy a gyulladás kapcsán észlelt szenzokrin jelenség hatással lehet a nocicepcióra is. Hogy kizárhassuk a nociceptorokból a központi idegrendszerbe jutó akciós potenciálok hatására aktiválódó neuronális endogén antinociceptív rendszerek hatását, a vizsgált lábakat akutan denerváltuk. A peptiderg neuronok az akut denervációt követően is képesek stimuláció hatására mediátorokat felszabadítani.

Az ellenoldali lábon plantáris incízióval kiváltott viselkedési nociceptív hőküszöb csökkenés a denervált lábba intraplantárisan adott kapszaicinnal visszafordítható volt. Az antinociceptív hatás dóziszfüggő volt, és a legmagasabb vizsgált dózis közel olyan hatékony volt, mint a szisztémásan adott morfin. Mivel a kapszaicin a primér afferens neuronok egy jól körülírt csoportján fejt ki hatást, feltételeztük,

hogy az észlelt antinociceptív hatás kialakulásában neuronális elemek vesznek részt. A feltevés igazolására krónikus denervációt követően végeztünk intraplantáris kapszaicin kezelést, mely nem volt hatással az ellenoldali lábon észlelhető, plantáris incízióval kiváltott hiperalgéziára. Ez a megfigyelés megerősítette a neuronális elemek központi szerepét, valamint kizárta a kapszaicin szisztémás hatásának lehetőségét is. A kapszaicin hatását a TRPV1 receptort expresszáló polimodális nociceptorok közvetítik. Ezeknek a rostoknak az antihiperalgétiás hatásban betöltött szerepének vizsgálatára lokális kapszaicin deszenzitizációs előkezelést alkalmaztunk három nappal a kísérlet előtt. A kísérlet során a deszenzitizált talpba adott kapszaicin nem csökkentette az ellenoldali, bemetszett talpon kialakult hőküszöb csökkenést, ezért kijelenthetjük, hogy a kapszaicin-érzékeny idegvégződések központi szerepet játszanak az észlelt antihiperalgétiás hatásban. A denervált láb bőrének mustárolajos ecsetelése a kapszaicinhez hasonló távoli antihiperalgétiás hatással bírt, ezért levontuk azt a következtetést, hogy a jelenség nem köthető kizárólagosan a TRPV1 receptor aktivációjához.

Mivel ismert, hogy a szomatosztatin rendelkezik perifériás antinociceptív hatással feltételeztük, hogy antihiperalgéziás hatása is van. Nem-specifikus szomatosztatin receptor antagonisták cikloszomatosztatin adását követően a denervált talpba adott kapszaicin nem mérsékelte az ellenoldali, bemetszett lábon észlelhető hőküszöb csökkenést. Egy következő kísérletsorozatban az állatok szisztémás szomatosztatin kezelésben részesültek, intraplantáris kapszaicin adás helyett. Az intraperitoneálisan adott szomatosztatin a denervált lábba intraplantárisan adott kapszaicinhez hasonló mértékben csökkentette az ellenoldali, bemetszett talpon mért hőküszöb csökkenést. Eredményeink megerősítették, hogy a távoli antinociceptív hatás hátterében az idegvégződésekben a szisztémás keringésbe jutó szomatosztatin állhat. Mivel a vér-agy gát a szomatosztatin számára átjárhatatlan, valószínűsíthető, hogy az antihiperalgétiás hatást a perifériás nociceptorokon expresszálódó szomatosztatin receptorok aktivációja által fejtik ki. Mivel denervációt követően ingereltük kapszaicinnal a primér afferens neuronokat akciós potenciálok nem juthattak a központi idegrendszerbe a kezelt rostokról, így arra következtettünk, hogy a szomatosztatin felszabadulás kapszaicin érzékeny neuronokból axonreflex kialakulása nélkül is lehetséges.



Az endogén antinociceptív mechanizmusok vizsgálata során az endogén opioidok szerepének vizsgálata is szükséges. Egy kísérletsorozatban az állatokat opioid receptor antagonistá naloxon intraperitoneális adásával kezeltük elő, a denervált láb idegvégződéseinek kapszaicinnel történő ingerlése előtt. Az előkezelés hatására az ellenoldali, bemetszett lábon észlelhető hőküszöb csökkenés kevésbé mérséklődött, mint az oldószerrel előkezelt állatok esetében, vagyis az endogén opioidok szerepe a távoli antihiperalgetikus hatásban megerősítést nyert. A perifériásan ható naloxon methiodiddal végzett előkezelés nem okozott szignifikáns változást, az endogén opioidok esetén centrális hatás feltételezhető, azonban az opioidok felszabadulásának helye az alkalmazott módszerekkel nem meghatározható. A szelektív CB<sub>1</sub> receptor antagonistá előkezelés a naloxonhoz hasonló csökkentette a denervált lábba adott kapszaicinnel kiváltott antihiperalgetikus hatást, vagyis az endokannabinoidok szintén részt vesznek benne. Annak ellenére, hogy a primér afferens neuronokon mind opioid mind CB<sub>1</sub> receptorok expresszálódnak, jelen vizsgálatunk alapján ezen molekulák centrális központi idegrendszeren belüli hatását sem zárhatjuk ki. A fiziológiás körülmények jobb modellezése céljából intakt, nem denervált lábban is kiváltható volt az antihiperalgéziás hatás.

Az antagonistákkal végzett vizsgálataink alapján kijelenthetjük, hogy legalább három mediátor (szomatosztatin, endogén opioidok és endogén kannabinoidok) játszik szerepet a denervált lábba intraplantárisan adott kapszaicinnel kiváltott távoli antihiperalgetikus hatásban. A mediátorok felszabadulásának pontos helyéről és a köztük fellépő esetleges interakciókról jelen vizsgálatunk alapján nem tudunk nyilatkozni, ezek tisztázásához további vizsgálatok elvégzése szükséges.

Felmerült, hogy az észlelt antihiperalgetikus hatás kimutatható-e nem termális, pl. mechanikai hiperalgéziában. Mivel a neuropátiás állapotok gyakran járnak együtt mechanikai hiperalgéziával, vizsgálatunkhoz a n. ischiadicus részleges lekötésével (Seltzer-féle műtét) létrehozott neuropátia modellt használtuk, a távoli antihiperalgetikus hatás kimutatására. Az ellenoldali n. ischiadicus részleges lekötése 48 órával a denerváció előtt történt.,plantáris incíziót ebben a kíaérletben nem alkalmaztunk. A mechano-nociceptív küszöb vizsgálatát Randall–Selitto módszerrel végeztük. A denervált láb idegvégződéseinek kapszaicinnel vagy mustárolajjal történő stimulációja jelentősen csökkentette a mechanikai

hiperalgéziát. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az általunk felfedezett távoli antihiperalgétiás hatás nem csak légyszöveti trauma által kiváltott termális hiperalgézia hanem a neuropátiás eredetű mechanikai hiperalgézia esetén is hatékony, ami az általunk leírt mechanizmuson alapuló esetleges jövőbeli fájdalomcsillapító eljárások széleskörű alkalmazhatóságára is utal.

A jelen vizsgálatainkban alkalmazott kísérleti elrendezés az ellenirritáció egyik modelljének tekinthető. Az ellenirritációval kiváltott analgetikus hatás mechanizmusa még nem pontosan tisztázott, de a legtöbben a központi idegrendszerbe befutó neuronális impulzusok modulációját tekintik meghatározónak. Jelen vizsgálatunk felveti a perifériás mechanizmusok jelentőségét is az ellenirritációval kiváltott fájdalomcsillapításban. Feltételezhetjük továbbá, hogy a kellemetlen hatás megélése nem szükséges az analgetikus hatáshoz. Vizsgálatunk egy új, perifériás eredetű, a fájdalomra vonatkozó neuroregulációs folyamatot tárt fel. A kapszaicin érzékeny, peptiderg primér afferens neuronok idegvégződéseiből kémiai ingerlés hatására szomatosztatin és más mediátorok szabadulnak fel, melyek a vérkeringésbe jutva a szervezet egészében antihiperalgétiás hatást fejtenek ki. A leírt mechanizmus újdonsága abban áll, hogy a nociceptorok nem csak a fájdalom detektálására szolgálnak, hanem hormonszerű antinociceptív mediátorokat juttatnak a vérkeringésbe.

## 6 Új eredmények

1. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő használatával plantáris incíziót követően több napig fennálló viselkedési nociceptív hőküszöb csökkenést mértünk a termális hiperalgémia részjelenségeként.
2. A plantáris incízió modellben a szisztémásan vagy lokálisan adott morfin, diklofenák és paracetamol antihiperalgetikus hatást fejtett ki, ezáltal bebizonyosodott, hogy a kísérleti elrendezés alkalmas lehet analgetikumok preklinikai tesztelésére.
3. Annak ellenére, hogy az enyhe hőtrauma és a plantáris incízió által kiváltott termális hiperalgémia időbeli lefolyása jelentősen eltér, viszonylag kevés különbséget tártunk fel a két modell között a hiperalgémia kialakításában résztvevő mediátorok tekintetében. A bradikinin B<sub>1</sub> receptorok markánsabb szerepe volt igazolható a plantáris incízióval kiváltott hiperalgémiaiban, míg a lipoxigenáz termékek szerepe csak az enyhe hőtraumában volt számottevő. A bradikinin B<sub>2</sub> receptor, a P2X purinoceptor és a TRPV1 receptor aktivációja, valamint a NO szintézis jelentősége mindkét modellben kimutatható volt.
4. Az akutan denervált – a központi idegrendszerrel közvetlen kapcsolatban nem lévő – patkány láb kapszaicin érzékeny idegvégződéseinek kémiai ingerlése távoli antihiperalgémias hatást vált ki, ami az ellenoldali talp bemetszését követően kialakult viselkedési nociceptív hőküszöb csökkenés visszafordításában nyilvánul meg. Az ellenirritáció ezen új megnyilvánulása perifériás eredetű, és szomatosztatin, endogén opioidok és CB<sub>1</sub> receptoron ható endogén kannabinoidok közvetítik.
5. Az akutan denervált patkány láb kapszaicin érzékeny idegvégződéseinek kémiai ingerlése az ellenoldali n. ischiadicus részleges lekötése által kiváltott mechanikai allodínia csökkenését okozza, mutatva a jelen vizsgálatban leírt szenzokrin antinociceptív hatás széles hatókörét.

## 7 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Pethő Gábornak, hogy nem csak kutatásaimhoz nyújtott iránymutatást, de sokat segített abban, hogy fejlesszem vizsgálattervezői és tudományos szövegírási készségeimet. Különös köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Bölcskei Katának, aki nemcsak kiváló kutató és tanár, de igaz barátom is. Köszönöm a Gyógyszertudományok Doktori Iskolájának Neurofarmakológiai programjának és a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének, Prof. Dr. Pinter Erikának és elődeinek, Prof. Dr. Szolcsányi Jánosnak és Dr. Barthó Lorándnak mindazt a támogatást, amit munkámhoz nyújtottak. Külön szeretném megköszönni Gógl Csabáné, Katalinnak minden egyes kísérletben nyújtott pótolhatatlan segítségét. Köszönöm továbbá a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden munkatársának a támogatását. Végül legmélyebb köszönetemet fejezem ki férjemnek mindazért a támogatásért, amit az évek során nekem nyújtott.

## **8 A disszertáció alapját képező publikációk**

### **8.1 Eredeti közlemények**

**Furedi R**, Bolcskei K, Szolcsanyi J, Petho G

Effects of analgesics on the plantar incision-induced drop of the noxious heat threshold measured with an increasing-temperature water bath in the rat.

EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY 605:(1-3) pp. 63-67. (2009)

**IF: 2.778**

Független hivatkozások: 5, Összes hivatkozás: 9

**Furedi R**, Bolcskei K, Szolcsanyi J, Petho G

Comparison of the peripheral mediator background of heat injury- and plantar incision-induced drop of the noxious heat threshold in the rat.

LIFE SCIENCES 86:(7-8) pp. 244-250. (2010)

**IF: 2.704**

Független hivatkozások: 2, Összes hivatkozás: 4

### **8.2 Poszterek**

**Furedi R**, Bolcskei K, Petho G, Szolcsanyi J.

Somatostatin-mediated, remote thermal antihyper-algesic effect evoked by counter-irritation of the denervated hindpaw in rats. Poster presented at: Neuropeptides 2007 – Function, Dysfunction and Therapeutic Options; Santorini, Greece

**Furedi R**, Bolcskei K, Petho G, Szolcsanyi J. Remote thermal antihyperalgesic effect evoked by counter-irritation of the denervated hindpaw in rats.. Poster presented at: FENS Forum 2008; Geneva, Switzerland

## 9 A disszertációhoz nem kötődő publikációk

### 9.1 Eredeti közlemények

Varga E, Simon M, Tényi T, Schnell Z, Hajnal A, Orsi G, Dóczy T, Komoly S, Janszky J, Füredi R, Hamvas E, Fekete S, Herold R.

Irony comprehension and context processing in schizophrenia during remission - A functional MRI study.

BRAIN AND LANGUAGE;126:231-242 (2013)

**IF: 3.841**

Muhl D, **Furedi R**, Gecse K, Ghosh S, Falusi B, Bogar L, Roth E, Lantos J  
Time course of platelet aggregation during thrombolytic treatment of massive pulmonary embolism.

BLOOD COAGULATION & FIBRINOLYSIS 18:(7) pp. 661-667. (2007)

**IF: 1.248**

Independent citations: 1 All citations: 2

Muhl D, **Furedi R**, Cristofari J, Ghosh S, Bogar L, Borsiczki B, Gasz B, Roth E, Lantos J

Evaluation of oxidative stress in the thrombolysis of pulmonary embolism.

JOURNAL OF THROMBOSIS AND THROMBOLYSIS 22:(3) pp. 221-228. (2006)

**IF: 1.985**

Independent citations: 3 All citations:: 7