

**A primer afferensek nocicepcióban betöltött szerepének
vizsgálata in vivo állatkísérletekben**

PhD-tézisek

Dr. Peitl Barna

Témavezető: Dr. Pethő Gábor

Programvezető: Prof. Dr. Szolcsányi János

PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

2001

Általános bevezetés

A primer afferensek néhány alapvető farmakológiai tulajdonsága

A primer afferensek funkciójának vizsgálata a PTE Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetében nagy hagyományokkal rendelkezik. Ezen neuronok funkciójának a kutatása évszázados múltra tekint vissza, azonban a gyógyszer-tan-könyvek mind a mai napig nem tartalmazznak a szenzoros neuron farmakológiájával foglalkozó fejezetet.

A nociceptorok olyan primer afferensek, melyek azokra az ingerekre válaszolnak, melyek szövetséges károsodást okozhatnak. Ezek a rostok morfológiai sajátosságuk és vezetési sebességük alapján a A δ - (3-30 m/s) és a C-rostokhoz (0,2-2 m/s) tartoznak, és fájdalmas mechanikai, hő és kémiai ingerekkel aktiválhatók. A nociceptorok aszerint, hogy mi az az inger, ami az aktivációjukat eredményezi, két csoportra oszthatók. Az egyik csoportot a magas ingerküszöbű ("high-threshold", HT) mechanonociceptorok (A δ -HTM, C-HTM) képezik. A másik csoportba tartoznak a mechanikai és forró ingerekre egyaránt érzékeny nociceptorok (A δ -MH, C-MH). Ezen úgynevezett "mechano-heat"-nociceptorok, melyek elsősorban velőhüvely nélküli C-rostok, fájdalomkeltő kémiai ingerekre is reagálnak, ezért polimodális nociceptoroknak is nevezik őket. A teljes képhez az is hozzátartozik, hogy az utóbbi években olyan mechanikai és forró ingerekkel nem aktiválható ún. "silent" nociceptorokat is találtak, melyek gyulladást kiváltó behatások után mutatnak polimodális ingerelhetőséget.

A bört ellátó nociceptorok mintegy 20%-a a HTM-rostok csoportjába tartozik, és ezen rostok többsége lassú vezetésű myelinhüvelyes axon (A δ -HTM), míg a többi rost polimodális nociceptor, melyek nagy része (kb. 90%) C-MH. A nociceptorhoz tartozó receptor mezt tekintve is különbség van a kétféle nociceptor között. Az A δ -HTM rostokhoz tartozó érző mező több érzőpontot is magába foglal, és az összterülete az emberi bőrben kb. 10 cm², ezzel szemben a C-MH rostok érzőterülete csak egy érzőpontot foglal magába, s a területe kb. 2 cm².

A C-polimodális rostokat tehát olyan fájdalmas kiváltó stimulusok képesek aktiválni, mint a hő, mechanikai valamint a kémiai ingerek, és az is régóta ismert, hogy a kapszaicin szelektíven képes izgathatni ezen afferens rostokat anélkül, hogy az alacsony ingerküszöbű termo- és mechanoreceptorokat, illetve a HTM-rostokat izgathatná.

A polimodális nociceptorok a többi nociceptor-típustól eltérően kettős funkcióval rendelkeznek. Inger hatására nemcsak akciós potenciálokat generálnak, amelyek a

központi idegrendszerbe futnak be (afferens funkció), hanem ugyanezen ingerek hatására végződéseikből a bennük tárolt neuropeptidok (kalcitonin-gén rokon peptid [CGRP], substance P [SP], neurokinin A [NKA], szomatostatinn) felszabadulnak, ami lokális, sőt akár szisztémás szöveti hatásokat (simaizom-relaxáció vagy kontrakció, vazodilatáció, plazma extravazáció stb.) is kiválthat (efferens funkció). A plazma extravazáció és vazodilatáció együttesen neurogén gyulladást eredményez, amelynek fő mediátorai a SP és a CGRP. A CGRP erős értágító, az artériolák simaizom-sejtjeinek felszínén lévő CGRP-1 és/vagy CGRP-2 receptorokon keresztül az intracelluláris cAMP-szint megemelésével a vaszkuláris simaizomzat relaxációját eredményezi, míg a SP elsősorban plazma extravazációt hoz létre a venumák endothelisejlein lévő tachykinin NK₁-receptorok aktiválását követő érfaai permeabilitásváltozódással.

A primer afferensek vizsgálatát nagyban nehezíti az a tény, hogy kevés olyan anyagot ismerünk, amely szelektíven hat az érzőrostokra. Ezek közül mindmáig a legfontosabb a paprika csipős anyaga, a kapszaicin. A kapszaicin felfedezésének és alkalmazásának részletes áttekintésétől eltekintek, mivel annak számos aspektusa már a munkacsoport több tagjának (Pethő Gábor, Pintér Erika) PhD-értékezésében részletesen szerepel. Összefoglalva megállapítható, hogy a kapszaicin primer afferens neuronokra kifejtett hatásában négy fázist lehet elkülöníteni. Az első szakasz az izgalmi fázis, melynek lényege, hogy kapszaicin hatására a szenzoros neuron különböző részein (periferiás és centrális végződés, sejttest) a plazmamembrán depolarizáció jön létre, ami akciós potenciálokat generál. Ezzel párhuzamosan az idegvégződésekből ill. a sejttestből neuropeptidok (CGRP, SP, NKA) szabadulnak fel. A további hatások csak magasabb kapszaicin dózisok ill. hosszabb expozíciós idő esetén manifesztálódnak. A második szakasz a szenzoros neuron blokkolás fázisa, ami alatt az értendő, hogy szenzoros neuron és receptorra egy vagy több nociceptív ingerrel (hő, mechanikai, kémiai) szemben érzéketlenné válik mind az afferens (akciós potenciál képződés), mind az efferens funkciót (neuropeptid felszabadulás) illetően. Az érződúcok "kis sötét B-típusú" sejtekben ultrastrukturális változások kimutathatóak, de még nincs degeneráció ill. neuropeptid depleció. A harmadik szakaszban, ami lényegét tekintve egy szelektív neurotoxikus hatás, teljesen megszűnik ezen neuronok excitabilitása, gátlódik az axonális transzport, a sejtek neuropeptid tartalma depletálódik. A perifériás és a centrális végződés degenerálódhat, de a sejttest túléli a behatást. A második és/vagy harmadik fázis állhat a kapszaicin-deszzenzibilizációnak nevezett állapot hátterében. Ennek lényege, hogy kellően magas kapszaicindózis ill. expozíciós idő alkalmazása esetén a kapszaicin-érzékeny érzőidegvégződések nemcsak

kapszaicinnel, hanem minden olyan ingerrel (hő, mechanikai ill. kémiai) szemben refrakterre válnak, amelyek ezen receptorokat a szer adása előtt aktiválni tudták. Ennek megfelelően a kapszaicin-deszenzibilizáció rendkívül fontos módszer annak vizsgálataiban, hogy egy adott jelenség közvetítésében szerepet játszanak-e a kapszaicin-érzékeny peptiderg rostok. A megyedik fázisi újszülött patkányok szisztémás előkezelése után figyelték meg. Ilyen előkezelés az érződűcsőjiek "B típusának" nekrotikus degenerációját eredményezi, mely az utóbbi évek eredményei alapján a károsodott idegrégződések idegnyövekedési faktort (NGF) felvívó képességének a hiányával, és nem direkt citotoxikus hatással magyarázható. Ha intravenásan vagy intraarteriálisan adott kapszaicinnel akarunk szisztémás deszenzibilizációt kiváltani, akkor a szer erőteljes pulmonális J-receptor-izgató hatása miatt kiváltódik a pulmonális kemoreflex (bradycardia, hipotenzió, apnoe), ami megakadályozza, hogy egyszerre akkora kapszaicindózsist adjunk, ami elegendő a deszenzibilizáció kiváltásához. Emiatt a kapszaicint naponta szubkután kell adni emelkedő dózisokban.

A kapszaicinen kívül újabbban egy másik vanilloid struktúrájú ingeranyag használatára is sor került. Szállási és Blumberg munkacsoportja kimutatta, hogy egy marokkói kaktusz (Euphorbia resinifera) tartalmaz egy resiniferatoxinnak (RTX) nevezett anyagot, ami nemcsak szerkezetében, de hatásában is nagyon hasonlít a kapszaicinhez, de annál lényegesen potensebb. A RTX képes a szenzoros neuronokon mindazokat az izgató és deszenzibilizáló hatásokat kiváltani, amit a kapszaicin, de lényegesen kisebb dózisokban. Egy fontos eltérés a kapszaicinhez képest, hogy a pulmonális J-receptorokat minimális izgalmi fázis után már deszenzibilizálja - azaz a pulmonális kemoreflexet lényegében nem váltja ki -, ami lehetőséget ad arra, hogy olyan dózsist adjunk akután, ami elegendő a szisztémás deszenzibilizáció kiváltásához. Ez azzal az előnnyel jár, hogy a kapszaicin-érzékeny rostoknak a különféle szöveti választokban betöltött szerepét „önkontrollós” kísérletekben vizsgálhatjuk.

A kapszaicinnel, mint szenzoros izgató-blokkoló testanyaggal szerkezet-hatás vizsgálatokat először Szolcsányi és Jancsó-Gábor végzett még a 70-es évek közepén. Ezen vizsgálatok eredményei felvetették egy specifikus, kapszaicinnel aktiválható farmakológiai receptor létezésének a lehetőségét, melyek direkt bizonyítására csak 1997-ben, a kapszaicinreceptor klónozásával került sor. A kapszaicin VR1-nek nevezett receptor nemcsak kapszaicinnel ill. RTX-szel (két vanilloid struktúrájú agonistával), hanem fájdalomos hőingerekkel és alacsony pH-val is aktiválható, így egyfajta molekuláris integrátorként közvetíti a fájdalomos fizikai és kémiai ingereket. A

VR1-receptor kimutatható kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronban (sejttest, axon, perifériás és centrális végződés) és kisebb mértékben néhány agyi struktúrában (hipothalamus, kisagy, cortex, striatum, középagy, bulbus olfactorius, híd, hippocampus, thalamus) valamint nem idegi szövetben (pl. hízósejt).

Az érzékezés első fejezete a trigeminális terület vaszkuláris hatásainak szabályozásában szerepet játszó primer afferensekkel foglalkozik. Ennek fontosságát az adja, hogy az utóbbi időben a migrén patomechanizmusában a meningeális területen kialakuló neurogén gyulladásnak tulajdonítanak jelentős szerepet, és a triptánok terápiás hatásában lényeges lehet ennek farmakológiai gátálása. Az érzékezés második fejezete a nitrogén-monoxidnak (NO) a meningeális vazodilatációban ill. plazma-extravazációban betöltött szerepét tárgyalja, mivel számos experimentális és klinikai adat utal arra, hogy a NO-nak szerepe lehet a migrén patomechanizmusában. Végül a harmadik fejezetben a VR1-receptor agonistáknak a nociceptív hőküszöbire kifejtett hosszú távú hatását vizsgáltuk egy új módszer, az emelkedő hőmérsékletű forródiap segítségével.

Végezetül szeretném megjegyezni, hogy bár számos más kísérletsorozatban is aktív résztvevő voltam, érzékezésembe csak azokat a munkákat vettem be, amelyeket önállóan végeztem.

Célok

I. A trigeminális primer afferensek által létrehozott meningeális vazodilatáció és plazma extravazáció farmakológiai hátterének vizsgálata

I./1. Olyan új módszer kidolgozását és bevezetését tűztem ki célomul, mely alkalmas a trigeminus-dúc (ganglion Gasserii) elektromos ingerlésével kiváltott keringésfokozódás valós-idejű (real-time) vizsgálatára egymással párhuzamosan az intrakraniális (dura mater) és extrakraniális (nazális nyálkahártya) trigeminális ellátási területeken. Ezáltal olyan új módszer került a kezünkbe, mely lehetővé teszi a dura mater mikrocirculációjára ható anyag(ok) (pl. vinpocetin) farmakológiai vizsgálatát.

I./2. Az így beállított módszer segítségével megvizsgáltam, hogy az interoceptív és exteroceptív innervációs területet ellátó trigeminális primer afferensek által kiváltott vazodilatáció és plazma extravazáció miként változik szisztémás kapszalicin előkezelés és RTX adása után.

I./3. Megvizsgáltam a Gasser-dúc elektromos ingerlésével kiváltható szöveti mikrocirculációban és plazma extravazációban bekövetkező változások mediátor hátterét mind az intrakraniális (dura mater), mind az extrakraniális (nazális nyálkahártya/felső szemhéj) esetében.

I./4. Specifikus enzimgátlók segítségével tanulmányoztam a nitrogén monoxid (NO) szerepét és eredetét a Gasser-dúc elektromos ingerlésével kiváltott artéria meningea média értágulatban.

II. VRI-agonisták termális antinociceptív hatásának vizsgálata a hőküszöbmérésre alkalmas emelkedő-hőmérsékletű forrólap módszerrel

II./1. Egy új metodika, az emelkedő hőmérsékletű forró lap módszer segítségével vizsgáltam a szisztémásan adott RTX és kapszalicin nociceptív hőküszöbpre kifejtett deszenzibilizáló hatását, különös tekintettel annak dóziszűgésére és kinetikájára.

Az egyes kísérletssorozatok részletes ismertetése

I. A kapszalicinre érzéketlen trigeminális primer afferensek által létrehozott meningeális vazodilatáció (1., 6., 10., 11., 12. és 13. közlemény)

Általános megfontolások

Az élete során az emberek több, mint 95%-a legalább egy fejfájásos epizódon, míg mintegy 16%-a legalább egy migrénes rohamon átesik. 1988-ban a Nemzetközi Fejfájás Társaság (International Headache Society, IHS) a különböző típusú fejfájásokat felosztotta elsődleges és másodlagos csoportra. Az utóbbiba tartoznak azok a típusok, melyek valamilyen meglévő betegség tüneteiként jelentkeznek. Ezzel szemben az elsődleges fejfájásoknak kimutatható oka nincs, e csoporton belüli további felosztás a fejfájás tüneteinek jellemzői alapján történik. A migrén ezen elsődleges fejfájások csoportjába tartozik. A férfiak mintegy 8%-a, míg a nők körülből 25%-a érintett. A migrén a férfiaknál fiatalabb életkorban kezdődik, s az aurával járó forma is korábban kezdődik, mint a aura nélküli. Gyakoribb a magas intelligenciájú egyéneknél, valamint a jó szociális körülmények között előkben. A migrénben szenvedőknél számos, a központi idegrendszert érintő betegség gyakrabban fordul elő, mint az egészséges populációban. Így gyakoribb a stroke, az epilepszia, valamint számos major affektív betegség, mint például a depresszió vagy a pánikbetegség. Genetikai háttér mellett szöli a korai kezdet és a megfigyelhető családi halmozódás. A migrénes fejfájás létrejöttének pontos pathomechanizmusa mindenzideig nem ismert. Kimutatták migrénben szenvedőknél, hogy az agyi magnézium-szint alacsonyabb, ami az NMDA-receptorok érzékenységének fokozódásán keresztül az idegsejtek szenzibilizálódásához vezet, melyek az addig ártalmatlan stimulusokra, -mint amilyen az erek pulzációja- is fokozottan reagálnak. Ugyancsak az idegsejtek érzékenységének fokozódásához vezet az intrakraniális ereket körülvevő szenzoros idegvégződésekből felszabaduló neuropeptidek által kiváltott neurogén gyulladás.

A dura mater (kemény agyhártya) az afferens idegrostok gazdag hálózata látja el. Ezen idegrostok többsége az azonos oldali trigeminus-dúcból eredő 1.) szenzoros rost és az azonos oldali ganglion cervicale superiorból eredő 2.) szimpatikus idegrost. Mindezek mellett szórványos, a sphenopalatin és carotid interna dűcből eredő 3.) paraszimpatikus beidegzés is megfigyelhető. Az elvégzett immunocitokémiai vizsgálatokból azt is tudjuk, hogy a dura mater erei körül számos neuropeptid

tartalmú idegrost található. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a CGRP, SP és NKA immunpozitív sejtek a szenzoros, a NPY a szimpatikus, míg a VIP immunpozitív rostok a paraszimpatikus rendszerhez tartoznak. Eddigi ismereteink szerint a migrénes és egyéb éreredetű fejfájás kialakulásában a dura mater -trigemínus-dűcből eredő szenzoros rostok által közvetített- neurogén gyulladása (értágulat, szöveti plazmaextravazáció, endotélijséjt és hiszójsejt aktiváció, vélemezke aggregáció) kulcsfontosságú jelentőségű bír. Bizonyítékok vannak arra vonatkozóan is, hogy ezen primer afferensekből felszabaduló CGRP, SP és NKA erőteljes értágító hatású az emberi arteria meningea médián *in vitro*, valamint a piális (lágy agyhártya) artériákon *in situ*. Az is tisztázott már, hogy ezen trigeminális afferensek elektromos és/vagy kémiai ingerlése megemeli az intrakraniális vénás elfolyó vérből mérhető CGRP és SP plazmaszintjét. Ezzel párhuzamosan az agyi, a meningeális és a trigeminus által ellátott extrakraniális területeken a véráramlás fokozódása következik be. A dura mater és az extrakraniális trigeminális innervációs területek szöveteibe irányuló plazma fehérje kiáramlás szintén megfigyelhető. Az agyi és meningeális véráramlás fokozódás főként a CGRP értágító hatása miatt következik be, míg a plazma extravazációt a neurokininek felszabadulása és az ezzel együttjáró NK₁ receptor aktiváció hozza létre.

Az elmúlt évek során a migrén, illetve a vaszkuláris eredetű fejfájások terén végzett klinikai és experimentális kutatások eredményeképpen az is nyilvánvalóvá vált, hogy migrén kialakulásában pontosan még nem meghatározott módon a nitrogén monoxid (NO) is részt vesz. A NO-ról részletesen azonban itt most nem esik szó, mivel azt dolgozat következő része részletesen tárgyalja.

A n. trigeminus szerepe a fájdalom kialakulásában

A Gasser-dűc elektromos ingerlésének hatására tehát a trigeminális primer afferensek idegvégződéséből neuropeptidok (CGRP, SP, NKA) szabadulnak fel, melyek az értágulattal, szöveti plazma extravazációval, hiszójsejt és endotélijséjt aktivációval, valamint vélemezke aggregációval jellemezhető neurogén gyulladást váltják ki a nervus trigeminus mind az intrakraniális (pl. dura mater), mind pedig az extrakraniális (pl. orr nyálkahártya, felső szemhéj) ellátási területén. A következményes lokális acidózis és hőmérséklet-emelkedés pedig a nociceptorok túlzott érzékenysé válásához vezet, így azok olyan ingerekre is reagálnak, ami egészséges emberben nem vált ki válaszreakciót (pl. erek pulzációja).

A dura mater neurogén gyulladása következtében érzékenyedett nociceptorok által közvetített fájdalom a szupratentoriális területről a Gasser-dűcban található neuronok axonjai, míg az infratentoriális régióból a felső nyaki gerincvelő hátsó szarvában (C1-C2) lévő idegsejtek axonjai által jut a központi idegrendszerbe, ahol átkapcsolódnak a második idegsejtre. Az agytörzs azon része, mely a cerebrovaszkuláris fájdalomért felelős c-Fos és c-Jun immunhisztokémia segítségével vizsgálható. Ez a két gén azokat a neuronokat jelzi, melyek aktivitása megemelkedett. Így például a szaggitális sinusz ingerlését követően emelkedett szintjei figyelhetőek meg a nucleus caudalis nervi trigeminiből valamint a C1-C2 szintjében a gerincvelői hátsó szarvban. Hasonló eredményt kapunk, ha a sejtmetabolizmust vizsgáljuk 2-deoxyglükóz alkalmazásával. Ezen eredmények pedig alátámasztják azt a felvetést, hogy a hagyományos értelemben vett nucleus caudalis nervi trigeminini leterjed egészen az első két nyaki szegmentumig. A sejtcsoport ezen részét nucleus cervicalis nervi trigemininek, míg a nucleus caudalist is magába foglaló teljes sejtthalmazt trigeminocervicalis komplexnek nevezzük. A második neuronok axonjai az átkapcsolódás szintjében keresztelődnek, majd a thalamus ventrobazális és mediális magjaiban kapcsolódnak át a harmadik idegsejtre, melyek aztán a cortex eddig közelebbi még nem meghatározott területeire vetülnek.

A fájdalom feldolgozásának spinális és thalamikus folyamatait monoaminerg pályák szabályozzák. Az egyik ilyen a noradrenerg pálya, mely a locus coeruleusból indul, s nyúlóvélő illetve gerincvelői szinten "kapuzza" az érkező idegi impulzusokat a hátsószarvban a gátló α_2A/D -receptoraltípusokon keresztül. A másik a dorsális raphe magból eredő szerotoninerg rendszer, mely a gerincvelői hátsó szarvban és thalamikus szinten lát el hasonló feladatot. A központi noradrenerg beidégzés esszenciális a vérgy-gát integritásának fenntartásához is. Kimutatták, hogy a locus coeruleus elektromos ingerlésével befolyásolható, csökkenthető az agyi vérátáramlás, illetve fokozható a vérgy-gát permeabilitása is. Ez utóbbit támasztja alá az a klinikai megfigyelés is, hogy a szolmitriptan és az eletriptan, melyek az 5-HT_{1D} receptor agonistái, előnyösen alkalmazhatóak a migrénes fejfájás csökkentésére. A két központi idegrendszeri aminerg mag között azonban van egy lényeges különbség. A dorsális raphe magban, szemben a locus coeruleusszal NADPH-diaphorase aktivitás mutatható ki, ami pedig a nitrogén monoxid szintáz (NOS) aktiválására, s így a nitrogén monoxid (NO) jelenlétére és szerepére utal.

Anyagok és módszerek

Kísérleteinket thibutobarbitállal (Trapanal®, 100 mg/kg, i.p.) altatott, 250-400 grammos, him Wistar patkányokon végeztük. A jobb oldali artéria és véna femoralisba kanülöket vezetünk a vérnyomás mérése illetve az anyagbeadás céljából. Emellett szükséges trachea kanül behelyezése és az állatok mesterseges lélegeztetése is, mivel a kísérlet során az állatok izomzatát paralizálni (Arduan® 0.3 mg/kg i.v., és további fenntartó dózis ha szükséges) kell az elektromos ingerlés következtében fellépő izomrángások kivédése céljából. A kísérletek során az állatok testhőmérsékletét infravörös lámpa (Experimentia Ltd.) segítségével állandó szinten (37±0.5 °C) tartottuk. Minden esetben a méréseket az élettani paraméterek beállása után kezdtük, és egy-egy kísérlet nem tartott tovább 4 óránál. A kísérletek végén az állatokat thibutobarbitállal túlaltattuk (100 mg/kg i.v.).

A dura mater elektromos ingerlése és a meningeális véráramlás változás mérése

Ezen esetben Kurosawa és munkatársai (1995) által bevezetett modellt használtuk. Az állatok fejét sztereotaxiás készülékbe rögzítettük, s a koponyacsontok feltárása után 1-1 furatlyukakat készítettünk az ingerlő elektróda valamint a laser-Doppler (LD) mérőfej számára. A dura felszínét elektromosan ingereltük (15V, 5 Hz, 20 s, 0.5 ms) és a létrejövő durai mikrocirkuláció változást a LD-el monitoroztuk, s a kapott értékeket poligráfon (Beckman) valamint számítógépen (Haemosys) regisztráltuk. Ezen módszer hátránya, hogy a dura felszínének ingerlése során minden perivaszkuláris ideget stimulálunk, nemcsak a trigeminális primer afferenseket.

A trigeminus ganglion elektromos ingerlése és a meningeális és nazális véráramlás változás mérése

Ezt a kísérleti elrendezést mi fejlesztettük ki. Szándékainkat az a cél vezérelte, hogy egy olyan specifikus ingerlési módot találjunk, ami kizárólag a dura mater ereit beidégző trigeminális primer afferens rostokat stimulálja. Ezt a trigeminus ganglion elektromos ingerlésével sikerült elérnünk. Hasonlóan az előzőekhez, itt is két furatlyukakat készítettünk, egyet a bipoláris telektrodó számára, a másikat pedig a LD-mérőfejnek. Ezzel párhuzamosan az ingerlés oldali orr nyálkahártya mikrocirkulációs változásait is nyomon tudtuk követni a nazális szeptumra helyezett LD-mérőfej segítségével. Az ingerlő elektródát sztereotaxiás vezetés mellett, a durát átszakítva, az agyállományon keresztül egészen a csontos koponyaalapig vezetettük le (3.2 mm-re

oldalra a sinus sagittális superior-tól és a bregmától hátrafelé 3.7 mm-re, a dura felszín alatt 9.5 mm mélyre), s az itt található Gasser-dúcot elektromosan ingereltük (15 V, 0.5-10 Hz, 100 impulzus, 0.5 ms). Az ingerlés során fellépő szimpatikus presszor válasz kiküszöbölésére az állatainkat minden esetben adrenenerg neuron blokkoló anyaggal, guanethidinnel előkezeltük (8 mg/kg i.v.). A mikrocirkuláció változásait ez esetben is LD szöveti áramlásmérővel monitoroztuk és poligráfon (Beckman), valamint számítógépen (Haemosys) regisztráltuk.

Kapszalcin/reszinfertoxin (RTX) előkezelés

Kapszalcin/RTX előkezelés célja a kapszalcin érzékeny primer afferensek funkciójának felhígítása, s az így módon kiesett funkciók alapján tudunk következtetéseket levonni ezen idegrostok neurogén gyulladásban betöltött szerepére. Ezen kísérletek során 3 állat csoportot alakítottunk ki.

A patkányok első csoportját szisztémás kapszalcin előkezelésben részesítettük, oly módon, hogy 4 egymást követő napon a nyak bőre alá szubkután injekcióban, pentobarbitállal (Nembutal® 40 mg/kg i.p.) végzett altatás mellett emelkedő dózisban 30, 50, 100 és 120 mg/kg kapszalcint fecskendeztünk (Σ 300 mg/kg s.c.). Az utolsó előkezelést 3 nappal a kísérlet előtt végeztük el. Azért, hogy a kapszalcin-érzékeny primer afferensek még teljesebb gátlását érjük el, a kísérlet alatt emelkedő dózisokban (5, 10, 20, 50, 3x100, 3x200 µg/kg i.v.) összesen közel 1 mg/kg kapszalcint adtunk intravénásan.

A második csoportban 1%-os kapszalcin oldattal történő előkezelést használtunk, lokálisan a kemény agyhártya felszínére, illetve a nazális mukózára cseppente. Ezáltal azonnali deszenzibilizációt lehetett elérni a 30 perces kontaktus idő letelte után.

A harmadik csoportban a kapszalcin ultrapotens analógiát, az RTX-et használtuk azonnali deszenzibilizáció elérése céljából. 1-3 µg/kg RTX intravénásan beadva a kapszalcin-érzékeny primer afferensek vaszkuláris hatásait azonnal felhígítja.

A trigeminus-dúc elektromos ingerlésével kiváltott szöveti plazma extravazáció vizsgálata

Ebben az elrendezésben azt vizsgáltuk, hogy a Gasser-dúc elektromos ingerlésével a dura mater, illetve -a trigeminus ideg ophthalmicus ága által ellátott- a felső szemhéj területén kiváltott plazma extravazációt kapszalcin-érzékeny primer

afferensek közvetítik-e, vagy hasonlóan az értágulathoz fennáll hasonló különbség a két innervációs terület között. 1951-vel jelzett bovine szérum albumin beadását RTX (3 µg/kg i.v.) vagy a kontroll csoport esetében oldószert (1 ml 0.9% fiziológiás sóoldat) intravenás infúziója követte, majd a trigeminus-dűcöt elektromosan ingereltük (25 V, 5 Hz, 0.5 ms, 5 perc). Az ingerlés befejezését követően 10 perccel az állatot kivertettük, s a vett szövetszövetmintákat száraz súlyra viszonyított radioaktivitását meghatároztuk. Az ingerelt oldal aktivitását összehasonlítottuk a nem ingerelt oldal aktivitásával. Az így kapott arányszámot (ER) használtuk az eredmények kiértékelésére.

Eredmények és következtetések

A dura mater felszínű ingerlése

A dura mater felszínének elektromos ingerlése (15 V, 5 Hz, 20 s, 0.5 ms) a vérnyomás emelkedése nélkül az ingerelt oldali artéria meningea média áramlásfokozódását váltotta ki. Az RTX, mely a szenzoros neuronokat akután blokkolni képes, a kiváltott választ nem befolyásolta. Mindazonáltal a módszerünk alkalmas a farmakon okozta áramlás-fokozódás mérésére, hiszen a vinpocetin (Cavinton®), -melynek agyi keringésfokozó hatása jól ismert- a meningeális mikrocirkulációt fokozta.

A trigeminus-dűc ingerlése és a kapszalcinre való érzékenység vizsgálata

A Gasser-dűc elektromos ingerlésével (15 V, 5 Hz, 20 s, 0.5 ms) az ingerlés oldalán mind a meningeális, mind a nazális mikrocirkuláció fokozódását ki lehet váltani. Az ingerlés okozta átmeneti vérnyomás emelkedés guanethidín (8 mg/kg i.v.) előkezeléssel kivédhető. A 0.5 és 1 Hz-el történő ingerlés hatására csak az ott nyálkahártya területén alakult ki véráramlás fokozódás, a meningeális mikrocirkuláció ilyen ingerlései paraméterek mellett még nem fokozódtak. A frekvencia optimum a nazális innervációs területen 2 Hz-nek, míg a durán 5-10 Hz-nek adódott. Emellett különbség van a válaszok kinetikájában is. A meningeális véráramlás fokozódás rövidebb latenciával kezdődött el, és rövidebb ideig tartott összehasonlítva a nazális vaszkuláris válaszzal.

A háromféle szenzoros neuronblokkoló előkezelés segítségével megvizsgáltuk a kapszalcin-érzékeny primer afferensek szerepét a Gasser-dűc elektromos ingerlésével kiváltott meningeális és nazális vazodilatációban. Szisztémás kapszalcin előkezelés után a nazális válaszzal jelentősen csökkent, majd további, immáron i.v. kapszalcin (Σ 1

mg/kg összdózis) adását követően teljesen megszűnt. Az állatok második csoportja 1%-os lokális kapszalcin oldattal történő előkezelésben részesült. Az ott nyálkahártyára cseppentve a kapszalcin oldatot (30 percig), a trigeminus-dűc elektromos ingerlésével kiváltott válaszzal nagyfokú csökkenése következett be. Ugyanakkor egyik fajta kapszalcin előkezelés sem befolyásolta a trigeminus-dűc elektromos ingerlésével kiváltott meningeális véráramlás fokozódást.

RTX (1-3 µg/kg i.v.) adása a nazális vazodilatációt teljesen megszüntette, s a hatás hosszan tartónak bizonyult, 60-90 perc eltelté után sem volt semmilyen jele az érválasszal visszatérésnek. Ezzel szemben az RTX ezen dózissal, sőt még a csak néhány alkalommal alkalmazott nagyobb dózissal (10 és 100 µg/kg i.v.) sem voltak képesek a meningeális válaszzal csökkentésére.

Ezen általunk bevezetett módszernek az adja a jelentőségét, hogy egyszerű szelektíven a trigeminális primer afferenseket tudjuk ingerelni, másrészt egy időben tudjuk monitorozni a nervus trigeminus által ellátott intrakraniális (dura mater) és extrakraniális (nazális nyálkahártya) mikrocirkulációt. Továbbá, dolgozatunk az első, mely bizonyítékot szolgáltat arra vonatkozóan, hogy egy szenzoros-fferens választ kapszalcinre-érzékeny afferens rostok mediálnak. Ezt alátámasztják a háromféle kapszalcin/RTX előkezeléssel, valamint a kétféle ideg ingerléssel kapott eredményeink.

A meningeális vazodilatáció, akár a perivaszkuláris idegek, akár a trigeminus-dűc ingerlésével váltjuk ki, nagyon hasonló a kinetikáját és a kapszalcin-érzéklettségét tekintve. Ez azt jelzi, hogy a kétféle ingerlési technika a meningeális trigeminális afferensek azonos populációját stimulálja. Ugyanakkor összehasonlítva a nazális válaszzal lényeges különbségek vannak a frekvencia optimumot, a válasz latenciáját és időtartamát, valamint a kapszalcin illetve a CGRP_{α-37} iránti érzékenységet tekintve.

Az RTX a kapszalcin-érzékeny primer afferens neuronok akut és szelektív funkcionális blokkádát képes kiváltani (Szolcsányi és mtsai, 1990). Az általunk is alkalmazott RTX dózis az antidiromos vazodilatációt képes megszüntetni, vagy nagymértékben gátolni a különböző szövetekben, mint például a bőrben vagy a vázizomzatban. Az, hogy a szisztémásan alkalmazott kapszalcin és RTX, illetve a lokálisan alkalmazott kapszalcin oldat csak a nazális válaszreakciót gátolta, a meningeális nem, egy meglepő és új eredmény volt. Hiszen a mindeztideg vizsgált szenzoros-fferens válaszokat kapszalcin-érzékeny afferensek közvetítették. Különösen érdekes ezen eredmény annak a fényében, hogy a trigeminus ingerléssel kiváltott

plazma extravazáció az eddigi irodalmi adatokkal összhangban mind a durán, mind a felső szemhéjon kapszaicin-érzékenyek bizonyult.

A neuropeptid antagonisták, az atropin és a hexamethonium szerepe trigeminus-dúc ingerlésével kiváltott neurogén gyulladáshoz

CGRP antagonisták hCGRP₈₋₃₇ különböző hatásossága a meningeális és nazális vazodilatációban további különbözőségeket jelez. A nazális mukóza hiperémiája nagymértékben gátolható a hCGRP₈₋₃₇-el, ami azt bizonyítja, hogy a válaszreakció legalább részben a CGRP-1 receptoron ható CGRP által mediált, míg a CGRP-2 receptor –mely nem érzékeny a hCGRP₈₋₃₇-re - illetve egyéb mediátorok szerepét ugyancsak nem lehet kizárni. Azt már korábban kimutatták, hogy a hCGRP₈₋₃₇ nagy dózisban, lokálisan alkalmazva képes a perivaszkuláris trigeminális idegek ingerlése révén kiváltott meningeális értágulat gátlására. A jelen dolgozatunk viszont abban mutat újdonságot, hogy az olyan dózisú (50 µg/kg i.v.) hCGRP₈₋₃₇, mely képes a nazális vazodilatáció gátlására, inefektív a meningeális értágulat befolyásolására.

A korábbi eredményeknek megfelelően az NK₁ receptor aktivációja nem játszik szerepet a meningeális vazodilatációban, hiszen a szelektív NK₁ receptor antagonisták RP67580 nem gátolta a választ. Ugyanakkor szerepe lehet a nazális válaszreakció kezdeti fázisában, hiszen azon esetekben, mikor az alap vérátáramlás magas volt, a válasz kezdetén rövid gátlást sikerült kimutatni. A CGRP és az SP legvalószínűbb származási helye a patkány nazális nyálkahártya esetében a kapszaicin-érzékeny primer afferens rostok, melyekről kimutatták, hogy mind CGRP-t, mind SP-t raktároznak. Az eredményeink alátámasztják ezeket a megállapításokat.

Az autonóm idegrendszer részvételt a kiváltott válaszreakciókban szintén ki lehet zárni. Megvizsgálva más szóba jöhető mediátor szerepét -a muszkarin típusú acetilkolin receptorok szerepét atropinnal, az adrenerg receptorok szerepét guanethidin előkezeléssel, míg a VIP-receptor szerepét (p-chloro-D-Phe⁶-Leu¹⁷)-VIP-el- mind a meningeális, mind a nazális vazodilatációban egyértelműen ki tudtuk zárni, hiszen egyik antagonistával sem sikerült gátlást elérni a trigeminus-dúc elektromos ingerlésével kiváltott válaszokban. Továbbá, azt, hogy az autonóm idegrendszer nem játszik szerepet alátámasztja az is, hogy a ganglion blokkoló hexamethonium nem képes gátolni a trigeminus ganglion elektromos ingerlése által kiváltott meningeális vazodilatációt.

Az RTX hatása a trigeminus-dúc ingerlésével kiváltott szöveti plazma extravazációra

A Gasser-dúc elektromos ingerlésével (25 V, 5 Hz, 0.5 ms, 5 perc) az ingerlés oldalán szöveti plazma extravazáció váltható ki, mind az interoceptív (dura mater), mind az exteroceptív (felső szemhéj) trigeminális innervációs területen, mely RTX adását (1-3 µg/kg i.v.) követően gyakorlatilag megszűnik. Vagyis a kiváltott plazma extravazáció kapszaicin/RTX érzékeny primer afferensek közvetítése útján alakul ki. Ez viszont további érdekességet ad azon felismerésünknek, hogy ugyanezen ideg ingerlésével kiváltott meningeális vazodilatáció RTX-el nem befolyásolható.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a Kurosawa és mtsai (1995) által bevezetett módszer alkalmas a meningeális mikrocirkulációra ható farmakonok vizsgálatára. A dolgozatban bemutatjuk, hogy a Gasser-dúc elektromos ingerlésével kiváltott vazodilatáció lényeges jellemzőiben nagyfokú eltérést mutat. Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a nazális mikrocirkuláció változásokból nem szabad messzemenő következtetéseket levonni az artéria meningeá media ellátási területén kialakuló szöveti perfúzió változásokra, hiszen, mind a válaszok kinetikáját (latencia idő és a válasz időtartama is rövidebb az artéria meningeá media esetében), mind a válasz közvetítésében szerepet játszó trigeminális primer afferens rostok kapszaicin/RTX érzékenységet tekintve lényeges különbözőségekre adódnak. Dolgozatunk az első, mely bizonyítottan szolgáltat arra vonatkozóan, hogy egy szenzoros-afferens választ kapszaicinre-érzékeny primer afferens rostok is mediálhatnak. Az értrendszer egyéb területein, a szívben, a légutakban, a gasztrointesztinális és urogenitális traktusban, izomban és friszben több száz irodalmi adat egybehangzó eredménye alapján a szenzoros rostok által kiváltott vazodilatációt, neurogén gyulladást és simazom tónusváltozásokat kizárólag kapszaicin-érzékeny peptiderg afferensek közvetítették. Különösen figyelemreméltó az a tény, hogy a trigeminális innervációs területen is e tekintetben eltérés mutatkozott az exteroceptív (orr nyálkahártya) és interoceptív (dura mater) innervációs terület vonatkozásában. Ez az adat ígéretes lehetőségre utal további, olyan mígtrén ellenes szerek kifejlesztéséhez, melyek nem befolyásolják a mikrocirkulációt a szövetet más területén.

II. A nitrogén monoxid (NO) szerepe a trigeminus ingerléssel kiváltott neurogén gyulladásban (2., 7., 8. és 14. közlemény)

Általános megfontolások

Az előző kísérlet sorozat során kimutattuk, hogy a Gasser-dúc elektromos ingerlésével kiváltott neurogén vazodilatáció a trigeminus ideg intrakraniális és extrakraniális innervációs területén a kapszalicinre való érzékenység szempontjából eltérő primer afferensek révén közvetített. Továbbá, amellelt, hogy különbség adódott a hCGRP_a-s iránti szöveti érzékenységben, nem sikerült a kiváltott értágulat teljes mértékű gátlását elérni még az antagonistista dózist tovább emelve sem (200 µg/kg i.v.). Ez pedig felveti más mediátor szerepét a trigeminus-dúc elektromos ingerlésével kiváltott válaszbán. Mivel korábban már a P anyagot, a VIP-et és az acetylcolint (Ach) kizártuk, mint a meningeális vasodilatáció lehetséges mediátorait, figyelmünk a nitrogén monoxid (NO) felé terelődött.

Az elmúlt évtized során kimutatták, hogy az endothélium-függő relaxáló faktor (EDRF) szerepet játszik az erek simaizomzatának elernyedésében. Nem sokkal ezt követően a megkezdett intenzív kutatások eredményeként azt is megállapították, hogy az ERDF nem más, mint az NO, illetve kimutatták jelenlétét különböző szervek artériáinak falában, így pl. a vesékben, a coronáriákban és a bőrben is. Az NO, mint biológiai mediátor szerepét játszik számos életteni hatás létrehozásában, így például kimutatták a szerepét a rezisztencia erek alacsony tónusának fenntartásában, vagy a globális agyi ischaemia utáni reperfüzióban, míg a perifériás és központi idegrendszerben, mint neurotranszmitter ismert.

A sejtekben az L-argininből NO szintáz (NOS) enzim hatására L-citrullin és NO képződik. Ezen enzimmek jelen ismereteink szerint az emlősökben 3 formája (izoforma) ismert, melyeket 3 különböző gén kódol. Van az indukálható forma (iNOS). Ezen izoforma jellemző sajátossága, hogy *de novo* képződik a gyulladással szövetek különböző sejt típusaiban, -mint amilyenek az aktivált makrofágok, -valamiféle inger hatására, mint a bakteriális endotoxinok, vagy a különböző citokinek. Ezen enzim típus aktiválódásához nincs szükség kalcium ionra szemben az enzim másik ismert formájával, mely aktiválódása csak ezen ion jelenlétében megy végbe. Mivel ezen utóbbi enzim típus a szervezet minden egyes sejtjében megtalálható, így konstitutív formának (cNOS) nevezték el. Ezen belül további 2 al típust tudunk elkülöníteni aszerint, hogy mi a leggyakoribb előfordulási helyük. Így

megkülönböztetjük a főként az erek endothéli sejtjeiben megtalálható endotheliális NOS-t (eNOS), valamint főként az idegsejtekben előforduló, neurális (nNOS) izoformát.

Ahhoz, hogy az NO szerepét az életteni folyamatokban vizsgálni tudjuk, szükség van az eltérő NOS típusokat szelektíven gátolni képes kémiai anyagokra. Ma már rendelkezésünkre állnak a konstitutív NOS-t szelektíven gátolni képes vegyületek. Ezek között van olyan, mely mind az endotheliális, mind az idegi eredetű enzimet egyaránt gátolja, mint például az N-nitro-L-arginin (L-NNA), míg a 7-Nitroindazol (7-NI) és a 3-bromo-7-nitroindazol (3Br-7NI) specifiást mutat az nNOS iránt. Ezen két konstitutív enzim típus iránt affinitást mutató antagonisták felhasználásával vizsgálni tudjuk, hogy az NO mediálta értágulathoz az endothéliumból -például Ach hatására- felszabaduló, vagy pedig az erek falához futó primer afferensekből származó NO játszik-e szerepet.

Az idegsejtekben jelenlévő NOS kimutatására alkalmas a NADPH-diaphoráz reakció. Emellett számos olyan immunhisztokémiai tanulmány született már, amelyekben ilyen NADPH-pozitív idegsejteket kimutattak az erek falának izomzatában, beleértve a meningeális artériákat is.

De nemcsak *in vitro* vagy *in vivo* állatkísérletek útján nyert adatok vannak melyek felvetik, hogy az NO szerepet játszik a migrén illetve különböző eredetű fejfájások kialakulásában, hanem számos klinikai tanulmány eredménye is ezt támasztja alá. Így az NO donornak számító nitroglicerin intravénás infúziójával dózis-függően fejfájás váltható ki egészséges önkénteseken. Az NO fejfájást kiváltó hatása még szembevetendő, ha ugyanazt az infúziót migrénre hajlamos betegnek adunk. Ebben az esetben kialakuló fejfájás ugyanis jóval tovább tart és sokkal súlyosabb fokú, mint amilyen az egészséges egyéneknél kiváltható.

Ezen vizsgálatunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk laser-Doppler szöveti áramlasmérő illetve radioaktív jóddal (¹²⁵I) jelölt albumin segítségével, hogy az NO milyen szerepet játszik a trigeminus-dúc elektromos ingerlésével kiváltott neurogén vazodilatációban és plazma extravazációban a nervus trigeminus interoceptív (dura mater) és exteroceptív (orr nyálkahártya, felső szemhéj) beidégzési területén. A már az előzőekben leírt kísérleti beállítások alkalmazásával, kiegészítve a nem specifikus valamint specifikus idegi NOS-t gátoló anyagok felhasználásával, kimutattuk, hogy a dura mater területén kialakuló értágulat létrehozásában, legalább részben az NO is részt vesz. Az NO eredetűre vonatkozóan eredményeink alapján az állapítható meg, hogy a trigeminális primer afferensekben termelődött NO a Gasser-dúc elektromos ingerlésének hatására az axonterminálisokból felszabadul. Ugyanakkor a kiváltott

válaszreakcióban az endothel eredetű NO szerepét nem sikerült megerősíteni, hiszen a behanecol, mely köztudottan az endothelből szabadul fel NO-t így okozván értágulatot, a mi kísérleti elrendezésünkben semmilyen válaszreakciót nem hozott létre a meningeális mikrocirkulációban még olyan dózisban sem, mely párhuzamosan, a talpon már jelentős vazodilatációt váltott ki.

Anyagok és módszerek

Kísérleteimben ugyanazokat a metodikákat használtam a trigeminus-dúc elektromos ingerlésével kiváltott antidiromos vazodilatáció és plazma extravazáció vizsgálatára, amit azt az előzőekben már részletesen tárgyaltam.

Eredmények

A különböző NOS gátlók hatása a trigeminus-dúc ingerléssel kiváltott meningeális és nazális értágulatra

A NO értágító szerepét vizsgáltuk a trigeminális primer afferensek elektromos ingerlésével (15 V, 5 Hz, 20 s, 0.5 ms) kiváltott meningeális és nazális véráramlás fokozódásában a NOS-t gátló anyagok segítségével. LNNA, mely nem szelektív módon tudja a NOS aktivitását csökkenteni -tehát az endothelialis és idegi eredetű enzimre is hat-, dózis-függő gátlást eredményezett (4, 8 és 16 mg/kg i.v.), mind az artéria meningeae média, mind az ott nyálkahártya területén. Ezután a rendszerünkben megvizsgáltuk a neurális NOS-t szelektíven gátlóni képes anyagokat (7-NI és 3Br-7NI 10 mg/kg i.v.). A meningeális vazodilatációt, mindkét anyag képes volt szignifikánsan csökkenteni, továbbá a nazális nyálkahártya hiperémias választát a 3Br-7NI (a 7-NI-t nem vizsgáltuk) szintén gátolta.

A behanecol hatása a regionális véráramlásra intraarteriális adás után

Ebben a kísérlet sorozatban azt vizsgáltuk, hogy az artéria meningeae média trigeminus ingerlés hatására kialakuló vazodilatációjában szerepet játszó NO az endothelialis vagy a neuronális NOS aktiválódása következtében termelődik, illetve szabadul fel. Ennek kimutatására behanecolt használtunk, mely az endothel felszínén lévő M₃ muszkarin receptorokon keresztül NO termelődéséhez és így vazodilatációhoz vezet. Azt tapasztaltuk, hogy az artéria carotis communis-on keresztül közvetlenül az intrakraniális mikrocirkulációba juttatott behanecol (150 µg/kg i.a.) hatására a dura

mater területén nem fokozódott a véráramlás. Ezzel szemben a talp bórén az anyagbeadást követően vazodilatáció volt regisztrálható, mely válaszreakciót az idegi eredetű NOS gátló 7-NI adása sem gátolta.

A NOS gátlók hatása a Gasser-dúc elektromos ingerlésével kiváltott szöveti plazma extravazációban

Ebben a modellben a nem szelektíven ható LNNA-t, valamint az idegi eredetű NOS-ra szelektív 3Br-7NI-t vizsgáltuk meg, hogy milyen befolyással bírnak a trigeminális ingerléssel kiváltott plazma extravazációra a dura mater és a felső szemhéj szöveteiben. Azt tapasztaltuk, hogy olyan dózist használva, mely a vazodilatációt már szignifikánsan csökkent, egyik NOS gátló anyaggal (LNNA, 3Br-7NI) sem sikerült csökkentést elérni az idegingerléssel (25 V, 5 Hz, 0.5 ms, 5 perc) kiváltott szöveti plazma extravazációban.

Az eredmények megbeszélése

Ebben a tanulmányunkban kimutattuk, hogy a trigeminus-dúc elektromos ingerlésével kiváltott meningeális értágulat kialakulásában az idegi eredetű NO szerepet játszik. Ugyanakkor az erek endotheljéből felszabaduló NO szerepe a mi kísérleti modellünkben kizárható, hiszen a behanecol, mely ismeretlen képes a muszkarin receptorokon keresztül NO-közvetített értágulatot kiváltani a különböző szövetekben az általunk alkalmazott állatkísérleti modellben a talp bórben mikrocirkuláció fokozódását okozott, míg az artéria meningeae média ellátási területén áramlásfokozódás nem volt megfigyelhető.

Az elmúlt évtized során számos olyan állatkísérletes tanulmány látott napvilágot, melyek eredményei azt bizonyítják, hogy a trigeminus ideg antidiromos ingerlésével kiváltható az agyhártyák neurogén gyulladás, mely a migrén kialakulási mechanizmusában játszik fontos szerepet. A kemény agyhártyát ellátó erek körüli a peptiderg idegek gazdag hálózata található, s ezen idegek végződéseiből felszabaduló mediátor anyagok közül a CGRP az, mely az antidiromos vazodilatáció létrejöttéért elsősorban felelőssé tehető, míg ugyanezek idegvégződésekből felszabaduló P anyag illetve a NKA a szöveti plazmakiaramlást eredményezi.

Arra vonatkozóan is vannak eredmények, hogy a fennem említett neuropeptidok liberálizációját NO módosíthatja. Ezenkívül az NO ön maga is, mint értágító hatású molekula ismert, mivel az erek simazomszjéjében a cGMP termelés fokozása révén

hozzájárul az erek nyugalmi tónusának a kialakításához. Ezenkívül egyes szövetekben, mint például a bőr-, vese-, tüdőerek, coronariák vagy éppen az agyi és meningeális erek esetében nem csak a nyugalmi vaszkuláris rezisztencia, hanem kémiai (pl. kapszaicin) vagy idegi úton kiváltott további értágulat létrejöttében is szerepet játszik. Attól függően, hogy mely szövet/szerv mikrocirculációját vizsgáljuk, akár az endotheiális akár az idegi eredetű NO-nak szerepe lehet a válaszreakcióban. Annak kiderítésére, hogy az artéria meningea média értágulatáért a NOS mely formájának az aktiválódása felelős mindaddig csak egy tanulmány készült. A Messlinger és mtsai (2000) az általuk elkészített vizsgálatban arra a következtetésre jutottak a kapott eredményeik birtokában, hogy a meningeális értágulat kialakulásában az erek endothelejteiből származó NO játszik szerepet. Mindezek azonban nincsenek összhangban az általunk prezentált eredményekkel, jóllehet a kétféle állatkísérleti elrendezésben kisebb-nagyobb eltérések vannak, melyek a kapott eredmények közötti eltérést is magyarázhatják. Az alábbiakban összezedem ezen különbségeket, s egyúttal magyarázatot is szolgáltok arra vonatkozóan, hogy miért térünk el az imént említett tanulmányban alkalmazottaktól.

1.) A NOS gátlók adásmódja: úgy gondoljuk, hogy ezen anyagok intravenás adása biztosabb hatást eredményez, mint a lokális, gézcsikra való cseppentés, mivel az általunk alkalmazott esetben nincs felszívódási fázis, így a plazmában elérhető farmakon-koncentráció független a környezet fiziko-kémiai jellemzőitől, mint amilyen a pH, a diffúzió vagy a szöveti perfúzió. Egy olyan anyagnál pedig, -és ilyenek a használt idegi NOS gátlók- mely oldatba viece kellő odafigyelést és megfelelő speciális eljárásokat igényel még hangsúlyozotabban fontos, hogy a lehető legmegfelelőbb módot találjuk meg az anyag szervezetbe való jutására. És ez véleményünk szerint ebben az esetben az intravenás alkalmazás.

2.) Az artéria meningea médiát beidegző trigeminális szenzoros idegek ingerlése: az irodalomban fellelhető adatok alapján két módszer terjedt el. Az egyik, -melyet Messlinger és mtsai is használtak- a dura felszínének ingerlésén alapul. Ezen módszer előnye, hogy az elektromos ingerléssel kiváltott meningeális áramlásokozódás nem jár együtt a szisztémás vérnyomás emelkedésével, így az esetleges tenzióemelkedés okozta szöveti perfúzió fokozódással nem kell számolni. A hátránya viszont, hogy nem csak a trigeminus-dúcából érkező primer afferens rostokat stimulálja, hanem a ganglion pterygopalatinumból eredő paraszimpatikus idegrostokat is, mely dúc elektromos ingerlésével pedig ugyancsak értágulat

váltható ki, mely mediátora azonban a VIP. Sőt a VIP mellett az NO is szerepet játszhat az ily módon kialakuló keringés fokozódásban, hiszen ezen paraszimpatikus ganglionban a NADPH-pozitív sejtek, -vagyis NOS tartalmú sejtek- egyúttal VIP pozitívítást is mutatnak. Ezzel szemben az általunk kifejlesztett módszer alkalmas arra, hogy szelektíven a trigeminovaskuláris rendszert aktiváljuk, melyben a primer afferensek idegvégződéseiből felszabaduló neuropeptidok (CGRP, SP) a fő mediátorai az így kiváltott neurogén gyulladásnak. Hogy ebben a rendszerben a NO is szerepet játszik alátámasztják azok az immunhisztokémiai tanulmányokból származó bizonyítékok, hogy a Gasser-dúc NADPH-pozitív sejteket tartalmaz, illetve, hogy a szenzoros idegvégződésekből származó neuropeptidok felszabadulását az NO befolyásolhatja.

3.) Endothel szerepe: a szervezet egyes szövetekben a kialakuló értágulat létrejöhet az endotheltől függő mechanizmusok alapján. Az Ach alkalmas endothel-függő vazodilatáció kiváltásához. Ebben az esetben az Ach az érrendothel felszínén jelenlévő muszkarin (M₃) receptoron keresztül NO képződéshez vezet, ami pedig vazodilatációt eredményez. Vannak azonban olyan, állatkísérletekből származó bizonyítékok is, melyek azt mutatják, hogy kialakulhat az erek tágulata az endothel eltávolítását követően, vagyis az endotheltől független mechanizmusok alapján is. A mi kísérleti elrendezésünkben, közvetlenül az artéria carotis internában juttattuk az M₃-receptor agonista bethanecolt, hogy vizsgálhassuk a meningeális vazodilatáció endotheiális komponensét. Meglepésére azonban azt tapasztaltuk, hogy a meningeális erek felett nem jön létre értágulat bethanecol adását követően, ugyanakkor a kísérleti állatunk egy távolabbi pontján, ami esetünkben a talp bőre volt kialakult a vazodilatáció. Ezekből az eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az artéria meningea média értágulatában endothel-függő mechanizmusok nem vesznek részt. Ez pedig azt az elképzelést látszik alátámasztani, hogy a NOS gátlók alkalmazásával célrt eredmények az enzim idegsejtre specifikus formájának a gátlásából származik.

A különböző támadáspontú NOS gátlókkal végzett kísérleteink eredményei azt az elképzelésünket támasztják alá, hogy a Gasser-dúc elektromos ingerlésével kiváltott neurogén vazodilatáció a trigeminális innervációs területen részben az NO által mediált, de legalábbis az NO-cGMP jelátviteli mechanizmus valamilyen módon részt vesz az így kialakuló meningeális és nazális értágulatban. Eredményeink alátámasztják azokat a már meglévő klinikai tanulmányokat, melyek az NO szerepre

hívják fel a figyelmet a migrén pathomechanizmusában, ugyanis az NO donornak számító nitroglicerin intravenás infúziójával, mint egészséges önkéntesekben, mint migrénben szenvedőkben –utóbbi esetben tovább tartó és súlyosabb fokú- fejfájás indukálható.

II. VRI-receptor agonisták hosszú távú hatásának vizsgálata a nociceptív hőküszöbpre emelkedő hőmérsékletű forró lap módszerrel (15. Saját közlemény)

Általános megfontolások

A termonocicepció ill. a termális antinociceptív hatás állatkísérletes mérésére többféle módszer áll rendelkezésünkre. Ezek közös sajátossága, hogy küszöbfeletti intenzitású fájdalomcsapásokkal kiváltott elkerülő magatartásformák latenciadéjét mérjük. Ide tartozik az úgynevezett „tail-flick” teszt, amelynek során a patkány vagy eger farkának a végére fókuszájűk a hőingert egy lámpa vagy melegvízes fürdő segítségével, és azt az időt mérik, ami után az állat a farkát a hőforrástól elrántja. A második módszer a „hot plate” teszt, amelynél a patkányt vagy egeret egy állandó, kb. 55 °C hőmérsékletű felületre helyezik, és a fájdalomra utaló magatartás megjelenésének idejét. Ez lehet a lábát és/vagy talp megnyalása, a láb rázása vagy ugrálás. Ezen magatartásbeli válaszok közül a hátsó láb megnyalása az a végpont, melynek regisztrálása leginkább elterjedt. Egy viszonylag új módszer a termonocicepció vizsgálatára a Hargreaves által 1988-ban bevezetett „plantar” teszt, melynél az állatot egy vékony üveglapra helyezik, és a talpukat alulról sugárzó hő forrájában éri az inger. Itt szintén azt a latenciadéjét mérik, amíg az állat elveszi a lábát a hőforrástól. Ezek a fent említett módszerek a morfin és más kábító fájdalomcsillapítók termoanalgetikus hatásának a vizsgálatára alkalmasak, de a ciklooxigenáz-gátló, nem-szteroid gyulladáscsökkentő analgetikumok (NSAID-ok) iránti jórészt érzéketlenségnek.

Mint arra korábban utalás történt, kapszaicin ill. RTX magasabb dózissalval a primer afferens neuronok deszenzibilizációja hozható létre, amely egyaránt vonatkozik a hő, kémiai és mechanikai ingerekre. Míg a termális deszenzibilizáció *in vitro* körülmények között vagy alátott állapotban végzett egyrost-elvezetési kísérletekben egyértelműen kimutatható, az éber állatokon végzett, termonocicepciót vizsgáló kísérletek ellentmondó eredményekre vezettek. A klasszikus „hot plate” ill. „tail flick” módszerekkel egyesek találtak termális antinociceptív hatást szisztémás kapszaicin adás után, mások viszont nem.

Mind ezek alapján Szolcsányi az 1980-as évek közepén felvetette azt a lehetőséget, hogy az ellentmondó eredmények hátterében az állhat, hogy az alkalmazott tesztmódszerek érzékenysége nem megfelelő a termális antinociceptív

hatás vizsgálatára. A módszerek koncepcionális módosítását javasolta abban az értelemben, hogy célravezetőbb lenne nem a küszöbfeletti hőingerekre adott reakciók latenciáidejét mérni, hanem azt a küszöbhőmérsékletet, ami a nocifenzív reakciókat kiváltja. A kapszalcin előkezelés dózisztílgó deszenzibilizáló hatását a nociceptív hőküszöbre az alábbi egyszerű kísérletes elrendezés segítségével sikerült biztosítani. Patkány egyik hátsó lábát vagy eger farkát 5 másodpercig cirkuláló vízfürdőbe mártják, amelynek hőmérsékletét természetesen segítéggel lépcsőzetesen, 1°C-os egysegégekben emelik mindaddig, amíg az állat a lábát illetve farkát a vízfürdőből ki nem rántja. Ez a módszer természetesen csak 1°C-os pontossággal méri hőküszöböt, de segítségével sikerült egyértelműen kimutatni a szisztémásan vagy lokálisan adott kapszalcin termális antinociceptív hatását.

Mind ezzel párhuzamosan egy norvég kutatócsoport elkészített egy új típusú, hőküszöbmérésre alkalmas „hot-plate” készüléket. A patkányokat ill. egereket egy fémlapra helyezték, amelynek hőmérsékletét egyenletesen növelték 40°C-tól mindaddig, amíg az állat valamelyik hátsó lábát meg nem nyalta. Ez a módosított forró lap módszer tehát a hagyományossal szemben nem latenciadót, hanem valódi nociceptív hőküszöböt mért. Ez az emelkedő hőmérsékletű forró lap módszer alkalmasnak bizonyult nemcsak a morfin, hanem a paracetamol és az aszpirin hőküszöbemelő hatásának a kimutatására is. A norvég kutatócsoport néhány évig használta ezt a módszert, de a metódika nemzetközileg nem terjedt el, és a kilencvenes évektől lényegében feledésbe merült. 2000-ben Szolcányi professzor instrukciói alapján a Supertech Kft. elkészített egy számítógéppel vezérelt emelkedő hőmérsékletű forró lap készüléket, amelynél a fémlap hőmérséklete külfőhözó sebességgel (6-12°C/perc) növelhető. A kezdeti kísérletek kimutatták, hogy a készülékkel meghatározott nociceptív hőküszöb ismételt méréseknél jól reprodukálható, és mind a morfin mind a diclofenac ill. paracetamol hőküszöbemelő hatása érzékenyen kimutatható (a minimális effektív dózis morfinnál 3, diclofenacnál 10 ill. paracetamolnál 200 mg/kg).

A VR1-receptor klónozása nagy lendületet adott a kapszalcinnel kapcsolatos kutatásoknak. Kiderült, hogy ez a receptor egy ligandum-vezérelt kationcsatorna, amely nyitott állapotában Na⁺ és Ca²⁺ számára egyaránt permeabilis. Mint korábban említettük, a VR1-receptor nemcsak kapszalcinnel és RTX-nal aktiválható, hanem fájdalmas intenzitású hőingerekkel és alacsony pH-val is. A VR1-receptor agonistákkal végzett vizsgálatok zöme ezen anyagok izgató hatását tanulmányozta főbnyire *in vitro* rendszerekben, VR1-receptort expresszálo nem-neurális sejtekben. A VR1-agonisták

deszenzibilizáló hatásának jellegzetességeire ill. mechanizmusára vonatkozóan lényegesen kevesebb vizsgálatot végeztek, azokat is zömmel *in vitro* körülmények között. A VR1-agonistákkal kiváltott deszenzibilizáció azonban több figyelmet érdemel, hiszen ez nem egyszerűen a VR1-receptoron ható ágensekkel szembeni csökkent válaszkészésgét (VR1-receptor deszenzibilizációja) jelenti, hanem azt, hogy a VR1-receptort hordozó idegvégződés válik minden ingerrel szemben - beleértve a nem VR1-receptoron hatókat is - refrakterré. Ez utóbbi folyamat potenciálisan új típusú analgetikus hatásmechanizmus alapja lehet, ami indokolja mindazokat a vizsgálatokat, amelyek ennek mechanizmusára irányulnak. Kísérleteimben a VR1-agonistákkal kiváltott deszenzibilizáció jellegzetességeit tanulmányoztam *in vivo* körülmények között, éber állatokban a nociceptív hőküszöb mérésével. Konkrétan azt vizsgáltam, hogy RTX és kapszalcin magasabb dózisaiknak szisztémás adása után hogyan változik az emelkedő hőmérsékletű forró lapon mérhető hőküszöb: kimutatható-e termális antinociceptív hatás, ill. milyen annak a kinetikája. A nociceptív hőküszöbbel párhuzamosan vizsgáltam a RTX ill. kapszalcin hatását a kemonociceptív küszöbre egy egyszerű xilol-ecseteléses teszt alkalmazásával. Ezen kívül mértük a RTX rektális hőmérsékletre kifejtett akut hatását is. Ismert ugyanis, hogy a VR1-agonisták a hypothalamicus hődetektorok izgatása révén akutan a testhőmérséklet csökkenését váltják ki.

Fontos célja volt ezen kísérleteknek egy olyan dózistartomány megtalálása, amelyben adva a RTX ill. kapszalcin okozta hőküszöb-emelkedés még reverzibilis, hiszen ez alkalmas *in vivo* modell lehet a VR1-agonisták funkcionális neuronblokkoló hatásának a vizsgálatára. Kísérleteimben elsősorban a RTX hatásaira koncentráltam, a kapszalcint a deszenzibilizáció technikai nehézsége (kardiorespiratorikus hatás) miatt inkább csak összehasonlítás céljából és kisebb mélységben vizsgáltam. Szeretném megjegyezni, hogy a RTX ill. kapszalcin akut izgató hatását - ami a nociceptív hőküszöb csökkenésében, azaz termális hiperalgéziában nyilvánul meg -, nem vizsgáltam, mert ez egy másik folyamatban levő doktori munkám témáját képezi.

Anyagok és módszerek

A nociceptív hőküszöb mérése emelkedő hőmérsékletű forró lap módszerrel

A kísérleteinkhez 150-200 g-os nőstény Wistar patkányokat használtam (a hím állatoknál a scrotum nyalása zavarja a reakció megítélését). Az állatokat konstans környezeti körülmények között tartottuk. Az emelkedő hőmérsékletű forró lap módszer

lényege, hogy a fémlap hőmérsékletét számítógépes vezérléssel szobahőmérsékletről egyenletes ütemben (6 °C/min) emeltük mindaddig, míg az állat valamelyik hátsó lábát meg nem nyalta. Ezt a hőmérsékletet tekintettük a nociceptív hőküszöbnek. A kísérlet előtti napon adaptáció céljából egy kondicionáló mértést végeztünk, amelynek az eredményét nem vettük figyelembe. Másnap két kontroll mértést végeztünk a RTX ill. kapszsaicin adása előtt, és ezek átlagát vettük a kontroll hőküszöbnek. Ezt követően az anyagok beadása után 6 órával, majd a továbbiakban az anyagbeadáستól számított 1, 2, 3 stb. nap múlva határoztuk meg a nociceptív hőküszöböt. Abban az esetben, ha az állat 50°C-ig nem nyalta meg a lábát, levettük az állatot a lapról a talp szöveti károsodásának elkerülése céljából, és az 50°C-os értéket vettük hőküszöbnek.

A kemonociceptív küszöb meghatározása xilol-teszttel

A teszt során az állatok egyik hátsó lábának dorzális felszínét xilol emelkedő koncentrációjú (15, 20, 25, 30, 40, 50, 70 és 100%) etanolos oldataival bekentük és meghatároztuk azt a koncentrációt, amely után az állat 3 percen belül nocifenzor reakciót mutatott, ami lehetett a láb emelése, rázása vagy nyalása. Azt a legalacsonyabb xilol-koncentrációt, ami az említett reakciók egyikét kiváltotta, tekintettük a kemonociceptív küszöbnek. A xilol-tesztet elvégeztük közvetlenül az anyagok adása előtt (kontroll kemonociceptív küszöb meghatározása), majd az anyagadás után naponta a hőküszöb meghatározását követően. Egy hetes vizsgálati periódus alatt, naponta egyszeri tesztelés esetén a küszöbkonzentráció azonosnak bizonyult a kontroll, előkezeletlen állatoknál.

A rektális hőmérséklet mérése

A rektális hőmérséklet digitális hőmérővel való mérésére a következő időpontokban került sor: a RTX beadása előtt közvetlenül, ill. 30, 60, 90, 120 180 és 240 perccel az anyagadást követően.

Anyagok

Mind a RTX-t (3, 10 és 30 µg/kg) mind a kapszsaicint (10 és 30 mg/kg) 0.3 ml/100 g volumenben adtuk be szubkután a patkányok nyakbőre alá. A RTX-t 1 mg/ml-es etanolos törzsolatból, a kapszsaicint 10 mg/ml-es törzsolatból (10% etanol, 10% Tween 80, 80% 0,9% NaCl) hígítottuk fiziológias sóoldattal.

Statistikai analízis

A különböző időpontokban mért hőküszöbértékeket és rektális hőmérsékleteket varianciaanalízist követően a Tukey-féle post hoc teszttel (Tukey HSD) hasonlítottuk össze, míg a kemonociceptív küszöböket diszkrét eloszlásuk miatt chi-négyzet próbával vizsgáltuk.

Eredmények

A szisztémásan adott RTX ill. kapszsaicin hatása a nociceptív hőküszöb-re

A patkányok kontroll hőküszöb értéke $44,98 \pm 0,27^\circ\text{C}$ ($n=66$) volt. A szolvenssel kezelt állatcsoportban a különböző időpontokban mért hőküszöbök csak kisfokú ingadozást mutattak, ami a statisztikai szignifikancia szintjét nem érte el. A szubkután adott RTX és kapszsaicin dóziszfüggő módon megemelte a hőküszöböt. A RTX 3 µg/kg-os dózisa csak a 6 órás mérésnél mutatott hőküszöbemelő hatást. A 10 µg/kg RTX hatása az első napon érte el maximumát, és még további 1 napig volt kimutatható. Ezzel szemben a RTX 30 µg/kg-os dózisének hatására a hőküszöb a 6. órai maximumot követően enyhén csökkenő tendenciát mutatva 12 napon át szignifikánsan magasabb volt a kontroll értékénél, és ezután sem tért vissza egészen a kiindulási szintre. A kapszsaicin kisebb dózisa (10 mg/kg) 6 órás maximum után csak az 1. napon okozott szignifikánsan magasabb hőküszöböt, míg a magasabb dózis (30 mg/kg) hatása a 2. napon volt maximális, a 4. napon még szignifikánsan magasabb volt és a 9.-ik napra tért vissza az eredeti szintre. Az anyagadás után 1 nappal mért hőküszöbök alapján szerkesztett dózis-hatás görbék egyértelműen mutatják mindkét anyag hőküszöbemelő hatásának dóziszfüggését, a RTX több mint 3 nagyságrenddel nagyobb hatásereőségét, valamint azt, hogy a 10 µg/kg RTX és 30 mg/kg kapszsaicin hatása reverzibilis.

A szisztémásan adott RTX ill. kapszsaicin hatása a kemonociceptív küszöb-re

A szolvens hatására a vizsgálati periódus alatt a kemonociceptív küszöb nem mutatott szignifikáns változást. A RTX két magasabb ill. a kapszsaicin nagyobb dózisének hatására megemelkedett a xilol-ecseteléssel vizsgált kemonociceptív küszöb is. A 10 µg/kg RTX küszöbemelő hatása 2 napig volt kimutatható, míg a 30 µg/kg-os dózis 4 napon át volt hatásos. A 30 mg/kg kapszsaicin csak 1 napig tartó küszöbemelkedést okozott.

A szisztémásan adott RTX hatása a rektális hőmérsékletre

Kísérleteinkben a RTX mindhárom vizsgált dózisban csökkentette az állatok rektális hőmérsékletét. A rektális hőmérséklet legalacsonyabb értékét mindhárom dózis esetében az anyagadás után fél órával érte el, és a RTX hőcsökkentő hatása a 2. óra után már nem volt kimutatható. A kapszaicin rektális hőmérsékletre kifejtett hatását korábbi vizsgálatok részletesen leírták, ezért azt nem vizsgáltuk.

Az eredmények megbeszélése

Az újonnan kifejlesztett emelkedő hőmérsékletű forró lappal mért kontroll hőkűszőb értéke patkányon jól egyezik a homlokon sugárzó hővel emberen meghatározott fájdalomkűszőbvel. A szolvenssel előkészített állatok naponként mért hőkűszőbének enyhé, statisztikailag nem szignifikáns ingadozása nemcsak azt mutatja, hogy a vizsgált anyagok szolvenciái nem befolyásolták a nociceptív hőkűszőböt, hanem megerősíti azokat a korábbi vizsgálatokat is, melyek szerint az emelkedő hőmérsékletű forró lapon ismételt mérések során a hőkűszőb reprodukálható. A vizsgált RTX mindhárom dózisban csökkentette az állatok rektális hőmérsékletét, de az a hőkűszőb mérések időpontjában már a kontroll tartományban volt.

Mind a RTX mind a kapszaicin magasabb dózisaiknak hatására megemelkedett a nociceptív hőkűszőb és a kiollal vizsgált kemonociceptív kűszőb. Mindkét anyag hatása dózistfüggő volt: magasabb dózis(ok) adása esetén a kűszőbemelkedések (termális ill. kémiai) maximuma nagyobb, tartama pedig hosszabb volt. Kísérleteink megerősítették azt az irodalmi adatot is, hogy a deszenzibilizáló hatást illetően a RTX a kapszaicinhez viszonyítva nagyságrendekkel potensebb. Mind a RTX (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) mind a kapszaicin (30 mg/kg) esetében találtunk egy olyan dózist, amely a hőkűszőböt és a kemonociceptív kűszőböt egyértelműen, de 2-4 napnál nem hosszabb ideig emelte meg. Tekintettel arra, hogy a kiollal nem hat a VR1-receptoron, a kiollal szembeni kisebb érzékenység nem magyarázható a VR1-receptor deszenzibilizációjával. Sokkal valószínűbb, hogy ennek hátterében a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésiek deszenzibilizációja áll. Feltételezhető, hogy a VR1-receptor aktiválódása során beáramló kationok (Na^+ és Ca^{2+}) olyan biokémiai hatásokat indítanak el a kapszaicin-érzékeny neuronokban, amelyek eredményeképpen azok érzékenysége mind a hő- mind a kémiai ingerekkel szemben lecsökken, kűszőbemelkedést eredményezve. Ez a kűszőbemelkedés néha magyarázható a szenzoros idegvégződésiek degenerációjával, mivel igen valószínűtlen, hogy 2-4 napon belül lezajlik az idegsejtek degenerációja és

az azt követő regeneráció. Sokkal inkább arról lehet szó, hogy egy rövid távon reverzibilis, funkcionális szenzoros neuronblokkoló hatás áll a termális ill. kemonociceptív kűszőb emelkedésének hátterében.

A legnagyobb RTX dózis által kiváltott, 12 napon át szignifikáns, de tendenciájában azután is fennmaradó hőkűszőb-emelkedés hátterében elvileg nem zárható ki a kapszaicin-érzékeny neuronok végződéseinek degenerációja. Az a tény azonban, hogy a kiollal vizsgált kemonociceptív kűszőb már az 5. naptól a kontroll tartományba került vissza, felhívja a figyelmet a VR1 pozitív kapszaicin-érzékeny afferentáció ingertől függő resztitúciós képessége, mely szintén ellentmond egy egyszerű afferentáció hiánnyal magyarázható mechanizmusnak. Arra, hogy a kemonociceptió a termonocicepcióhoz viszonyítva rövidebb ideig csökken, két feltételezés említhető meg magyarázatként. Az egyik lehetőség, hogy a végződéseikben a beáramló kationok által indukált biokémiai folyamatok a termonocicepcióra tartósabb gátló hatást fejtenek ki, mint a kemonocicepcióra. Az sem zárható ki azonban, hogy a termonocicepció tartósabb károsodásában – a végződés funkcionális blokkját eredményező biokémiai folyamatok mellett – a hőérzékeny VR1-receptor farmakológiai deszenzibilizációja is szerepet játszik.

A VR1-receptorok megtalálhatók a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuron teljes hosszában, azaz a perifériás és centrális végződéseken, a sejttesten és az axonok mentén egyaránt. Azt, hogy a kísérleteinkben a szisztémásan adott RTX ill. kapszaicin által kiváltott termális ill. kémiai antinociceptív hatás közvetítéséért a primer afferens neuron mely része felelős, a kísérleti paradigma alapján nem lehet meghatározni. Tekintettel arra, hogy a szisztémásan adott kapszaicin izgató hatásában a perifériás és centrális végződés egyenrangú támadáspontot képvisel, ill. az axonál lényegesen nagyobb érzékenységet mutat a szer iránt, valószínűsíthető, hogy a jelen kísérleteinkben a mért antinociceptív hatásokat elsődlegesen a perifériás és/vagy a centrális végződés közvetíti.

Összefoglalva elmondható, hogy az újonnan kifejlesztett, hőkűszőbmérésre alkalmas emelkedő hőmérsékletű forró lap készülék alkalmas a VR1-receptor agonistákkal kiváltott termális antinociceptív hatás kimutatására, dózistfüggésének és kinetikájának vizsgálatára. Mind a RTX mind a kapszaicin esetében sikerült találni egy olyan dózist, ami még reverzibilis, mindössze néhány napig tartó termális és kémiai kűszőbemelkedést vált ki. Ez a hatás alkalmas *in vivo* modellként szolgálhat a VR1-agonistákkal kiváltott funkcionális szenzoros neuronblokkoló hatás biokémiai

háttérnek tanulmányozását célzó további kísérletekhez, és ennek alapján hozzájárulhat új hatásmódú analgetikumok kifejlesztéséhez.

Legfontosabb eredményeim összefoglalása

1. A Gasser-dúc elektromos ingerlésével a trigeminális primer afferensek közvetlen és szelektív antinórmos izgatása váltható ki, mely együtt jár értágulat és plazma extravazáció kialakulásával mind az interoceptív, mind az exteroceptív trigeminális beidegzési területen.
2. Az alkalmazott kísérleti modellek alkalmasak a meningeális mikrocirkulációra ható fármakonok vizsgálatára.
3. A trigeminus ganglion elektromos ingerlésével kiváltott meningeális vazodilatációt kapszalcin-érzéketlen primer afferensek közvetítik. Ennek jelentőségét az adja, hogy minden eddig vizsgált szenzoros efferens válasz kapszalcin-érzéketlennek bizonyult. Tehát ez az első, és mindaddig egyetlen ismert szenzoros-efferens funkció, mely kapszalcinre nem érzékeny afferensek útján jön létre. Mindez különösen érdekes annak fényében, hogy a trigeminális ingerléssel kiváltott meningeális plazma extravazáció ill. a nazális vazodilatáció és plazma extravazáció kapszalcin-érzékeny rostokon keresztül valósul meg.
4. A trigeminus-dúc elektromos ingerlével kiváltott vazodilatáció a szenzoros rostok idegvégződéseiből felszabaduló CGRP által mediált, de az egyes szövetek között eltérés áll fenn a különböző receptor altípusok előfordulási arányát tekintve. Mert míg a nazális értágulat hCGRP₃₋₃₇-el gátolható, addig a meningeális válasz nem. Ez pedig azt a feltevélezt támasztja alá, hogy az ott nyálkahártyájában főként CGRP-1 receptorok vannak jelen, addig a meningeális szövetekben CGRP-2 receptoroknak, vagy más mediátornak a szerepe merül fel.
5. A különböző támadáspontú NOS gátlók alkalmazásával kapott eredményeink alátámasztják azt az elképzelést, hogy az artéria meningea média értágulata - legalábbis részben - az NO által mediált, illetve az NO-cGMP jelátviteli mechanizmus részt vesz a meningeális és nazális értágulat kialakulásában.
6. Az újonnan kifejlesztett, hőküszöbmérésre alkalmas emelkedő hőmérsékletű forró lap megfelelő módszer a VR1-receptor agonistákkal kiváltott termális antinociceptív hatás vizsgálatára. Mind a RTX mind a kapszalcin esetében sikertült találni egy

olyan dózist, ami még reverzibilis, mindössze néhány napig tartó termális és kémiai küszöbemelkedést vált ki. Ez a hatás alkalmas *in vivo* modellként szolgálhat a VR1-agonistákkal kiváltott funkcionális szenzoros neuronblokkoló hatás további vizsgálatához.

PUBLIKÁCIÓK

I. EREDETI KOZLEMENYEK:

1. Barna Peil, Gábor Pethó, Róbert Pórszász, János Szolcsányi. Capsaicin-insensitive sensory-efferent meningeal vasodilatation evoked by electrical stimulation of the trigeminal nerve fibres of the rat. *British Journal of Pharmacology*. 1999, **127**, 457-467.
 2. Barna Peil, Róbert Pórszász, József Németh, János Szolcsányi. The effects of nNOS inhibitors on the antihromic vasodilatation and neurogenic inflammation of the dura mater in the rat. (közlés előtti).
 3. Gábor Pethó, Róbert Pórszász, Barna Peil, János Szolcsányi. Spike generation from dorsal roots and cutaneous afferents by hypoxia or hypercapnia in the rat *in vivo*. *Experimental Physiology*. 1999, **84**, 1-15.
 4. József Németh, Márta Thán, Réka Sári, Barna Peil, Gábor Oroszi, Beatrix Farkas, János Szolcsányi, Zoltán Szilvássy. Impairment of neurogenic inflammatory and anti-inflammatory responses in diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*. 1999, **386**, 83-88.
 5. József Németh, Márta Thán, Barna Peil, Gábor Oroszi, János Szolcsányi, Zoltán Szilvássy. Impaired anti-inflammatory response and decreased sensory neuropeptide release in streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Physiology London*. 2000, **526**, 156P-157P.
- II. FOLYÓIRTÁSBAN MEGJELENT ELŐADÁSKIVONATOK:
6. Barna Peil, Gábor Pethó, Róbert Pórszász, János Szolcsányi. Capsaicin-insensitive sensory-efferent meningeal vasodilatation evoked by electrical stimulation of the trigeminal nerve fibres of the rat. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 1999, **13**, 126.
 7. Barna Peil, Róbert Pórszász and János Szolcsányi. The effect of NOS inhibitors on vasodilatation of the dura mater of the rat. *Regulatory Peptides*. 1999, **80**, 107-154.
 8. Barna Peil, Róbert Pórszász and János Szolcsányi (1999); The effect of 7-nitro-indazole and N^ω-nitro-L-arginine on vasodilatation of the dura mater of the rat. *Neurobiology*. **7**, 370.
 9. Róbert Pórszász, Miklós Százados, Barna Peil, Gábor Oroszi, Zoltán Szilvássy, János Szolcsányi. The role of sensory fibres in capsaicin-induced vasoconstriction

in the rat hindlimb blood perfusion system in vivo and in rabbit femoral rings in vitro. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 1999, **13**, 126.

III: ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK:

10. Peitl Barna, Pethó Gábor, és Szolcsányi János: A n. trigeminus szerepe a dura mater mikrocirculációjának szabályozásában. I. Korányi Frigyes Tudományos Fórum, Budapest, 1997.
11. Barna Peitl, Gábor Pethó, Róbert Pórszász and János Szolcsányi: Effect of electrical stimulation of the trigeminal nerve fibres on microcirculation of the rat dura mater. 7th Annual Meeting of the European Neuropeptide Club, Marburg, 1997.
12. Peitl Barna, Pethó Gábor, Pórszász Róbert és Szolcsányi János: A nervus trigeminus elektromos ingerlésének hatása a dura mater mikrocirculációjára. MÉT LXII. Vándorgyűlés, Pécs, 1997.
13. Peitl Barna, Pethó Gábor, és Szolcsányi János: A capsaicinre érzéketlen trigeminus afferensek ingerlésével kiváltott vazodilatáció patkány dura materén. MITT. V. Konferencia, Debrecen, 1998.
14. Barna Peitl, Róbert Pórszász, János Szolcsányi. The effect of different NOS inhibitors on the neurogenic inflammation evoked by electrical stimulation of the rat trigeminal ganglion. CNS Injury Pannonian Symposium, Pécs, 17-20. August, 2000.
15. Peitl B., Bölcskei, K., Pethó, G., Szolcsányi, J. Long-term effects of VR1-receptor agonists on noxious thermal threshold in the rat. IBRO International Workshop on Signalling Mechanisms in the Central and Peripheral Nervous System, Debrecen, Hungary. 24-26 January 2002.
16. József Németh, Márta Thán, Barna Peitl, Gábor Oroszi, János Szolcsányi, Zoltán Szilvássy: Impairment of neurogenic inflammation elicited by systemic anti-inflammatory response in experimental diabetes. MITT VII. Konferencia, Budapest, 2000 jan 19 - 22.
17. József Németh, Márta Thán, Barna Peitl, Gábor Oroszi, János Szolcsányi, Zoltán Szilvássy: Impaired anti-inflammatory response and decreased sensory neuropeptide release in streptozotocin-induced diabetes. Joint meeting of the Physiological Society and the Hungarian Physiological Society, Budapest, 2000. May, 27-29.