

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

***A VANILLOID RECEPTOR-1 MOLEKULÁRIS
FARMAKOLÓGIÁJA IN VIVO MODELLEKBEN ÉS IN
VITRO SEJTES RENDSZEREKBEN***

Dr. Szabó Tamás



**DEBRECENI EGYETEM, ORVOS -ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI
CENTRUM, ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET ÉS GYERMEKKLINIKA**

**Debrecen
2006**

BEVEZETÉS

A nociceptív neuronok

A fájdalmas (azaz szöveti károsítást kiváltó fizikai, kémiai és termális) ingerek érzékelése speciális primer afferens szenzoros neuronok (ún. nociceptorok) perifériás végződésein keresztül történik. Ezen afferensek sejttestjei a hátsó gyöki ganglionokban (DRG), a trigeminális ganglionokban (TG), valamint a ganglion nodosaban helyezkednek el. A primer afferens neuronokon belül a nociceptorok két alcsoportja különíthető el: a kis átmérőjű, lassú vezetésű C-rosttal rendelkező idegsejtek és az A δ rosttal rendelkező, gyorsabb konduktanciájú axonnal bíró nociceptorok. A C-rosttal rendelkező neuron alcsoport tagjait polymodális nociceptoroknak is nevezik, minthogy mindhárom fő fájdalom ingerre (mechanikai, kémiai és hő) képesek válaszolni.

A kapszaicin-szenzitív neuronok

A polymodális nociceptorok igen jelentős és nagy szelektivitással jellemezhető érzékenységet mutatnak a csípős paprikából izolálható alkaloida, a kapszaicin (valamint számos egyéb rokon vanilloid vegyület, lásd alább) iránt, így ezen érzősejteket "kapszaicin-szenzitív neuronoknak" nevezték el. Az érzősejteknek kettős funkciójuk van. *Afferens* működésként, centrális nyúlványaikon keresztül szenzoros információt szállítanak a központi idegrendszerbe, mely *in vivo* a kapszaicin jól ismert fájdalmat kiváltó („csípős”) hatását eredményezi. Az *efferens* funkció során ugyanakkor az aktivált érző idegvégzódések a perifériás nyúlványaikban raktározott különféle (főként pro-inflammatórikus hatású) neuropeptidet (pl. P-anyag [SP], calcitonin génkapcsolt peptid [CGRP]) szabadítanak fel lokálisan. A felszabadult anyagok ezután az innervált szervek nem-neuronális sejtjein – pl. keratinocyták, hízósejtek – hatva résztvesznek a lokális trófikus, vazoregulatórikus és immunomodulatórikus

folyamatokban, amelyek kóros, kaszkád-szerű felerősödése a kapszaicin második fontos *in vivo* hatása, a neurogén gyulladás kifejlődéséhez vezet.

A kapszaicin celluláris hatásmechanizmusa

A kapszaicin és rokon vanilloid vegyületek celluláris hatásmechanizmusa a szenzoros neuronokon három egymást követő, bár gyakran egymástól függetlenül is megjelenő, továbbá az adott anyag hatását individuálisan is reprezentáló folyamattal jellemezhető. Az első a kapszaicin adagolása után azonnal kifejlődő *excitáció*. Ennek keretében a kapszaicin az érző idegsejtek membránját depolarizálva a sejtek Ca^{2+} és Na^{+} ionok iránti permeabilitását megnöveli, mely a sejtek depolarizációjához és akciós potenciálok kialakulásához vezet.

A kapszaicin által kiváltott aktivációt típusosan egy hosszabb refrakter periódus követ, melynek során *in vivo* relatív válaszképtelenség észlelhető. Ezen, a kapszaicin hatására bekövetkező második mechanizmust *deszenzitizáció*nak nevezzük, melynek két formáját különíthetjük el. Az ún. farmakológiai deszenzitizációt, ahol kapszaicin adagolását követően a sejtek elvesztik kapszaicin iránti érzékenységet (homológ deszenzitizáció), valamint az ún. funkcionális deszenzitizációt, amely során a sejtek egyéb fájdalomkeltő (kémiai, hő, mechanikai) ingerek iránt is érzéketlenné válnak (heterológ deszenzitizáció). Feltételezték, hogy míg a homológ deszenzitizációt a sejten belül megemelkedett intracelluláris kalciumkoncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) hozza létre, addig a heterológ deszenzitizáció a neuropeptid raktárak kiürülésének, valamint megváltozott membrán sajátosságoknak a következménye.

A kapszaicin celluláris hatását tanulmányozva megállapítható, hogy az alkaloida elég nagy koncentrációban, elég hosszú ideig alkalmazva, a sejteken egy harmadik jellegzetes folyamatot, a *neurotoxicitást* váltja ki. Ez leginkább a megemelkedett $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -nak, a mitokondriális kalcium-akkumulációnak és a kalcium-függő proteázok működésének tulajdonítható.

A vanilloid receptor-1 (VR1 vagy TRPV1)

Jancsó már 1968-ban felvetette egy ún. "fájdalom-receptor" meglétének szükségszerűségét. Később felismerték a kapszaicin funkcionális támadáspontját, amely egy nem-specifikus, nagyfokú Ca^{2+} -permeabilitást mutató kationcsatornának bizonyult. A receptor azonosítását és farmakológiai vizsgálatát megkönnyítette egy vanilloid csoportot hordozó ultrapotens kapszaicin analóg, az *Euphorbia resinifera* tejnedvéből izolált forboid alkaloida, a resiniferatoxin (RTX) (valamint radioaktívan jelzett formájának, [^3H]RTX) felfedezése, illetve előállítása.

A molekuláris biológiai technikák robbanásszerű fejlődésének köszönhetően 1997-ben - patkány species cDNS könyvtárát felhasználva - megklónozták az első kapszaicin-érzékeny specifikus molekulát, mely által a vanilloid (kapszaicin) receptor (VR1) molekuláris karakterizálása lehetővé vált. Struktúrális sajátosságai alapján a VR1 homológiát mutat a *Drosophila melanogaster* retinájában megtalálható TRP (transziens receptor potenciál) proteinnel, ezért a TRP receptor család egyik altípusának tekinthető (TRPV1). Megállapították, hogy a csatorna 6-transzmembrán doménnel rendelkezik, és valószínűleg tetramer formában van jelen a sejtek membránjában. Kiderült az is, hogy a molekula számos kötő és szabályozó hellyel bír: ezek az intracelluláris N-terminális szakaszon megtalálható három egymást követő ankyrin-szerű domén; az ugyancsak az intracellulárisan elhelyezkedő vanilloid kötőhely; valamint az extracelluláris oldalon található allosztérikus modulációs helyek. A klónozott VR1 is nem-specifikus, főként Ca^{2+} -ionokra permeábilis (relatív permeabilitása Ca^{2+} -ra nézve $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ közelítőleg 10) csatornaként működik.

A VR1-mediált sejtválaszok kalciumfüggése – a VR1 szubcelluláris lokalizációja

A VR1 aktiválódása után kialakuló komplex folyamatsor vizsgálata során az egyik legfontosabb cél a VR1-mediált jelenségek extracelluláris kalciumkoncentrációtól ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) való függésének elemzése volt. Kiderült, hogy

a vanilloid vegyületek által kiváltott membránáramok jellegzetességei csak kismértékben, míg a deszenzitizáció tulajdonságai jelentősen függték $[Ca^{2+}]_e$ -től. A kísérletek ugyanakkor nem szolgáltatottak egyértelmű választ a VR1-mediált $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés $[Ca^{2+}]_e$ -től való függését illetően. Számos munkacsoport arra a következtetésre jutott, hogy a nociceptív neuronokban található VR1 kizárólag a sejtek felszíni membránjába épül be; azaz a kapszaicin csak az extracelluláris térben lévő kalcium jelenlétében képes az $[Ca^{2+}]_i$ megemelésére. Ezzel ellentétben, mások azt találták, hogy a VR1-mediált sejtválaszok kalciummentes közegben is kiválthatók.

A VR1 központi integrátor szerepe a fájdalomérzés kialakításában

A VR1-t nemcsak az exogén vanilloid vegyületek, hanem számos endogén, főként a fájdalom kialakításában központi szereppel bíró molekula is képes aktiválni. Ezek közül a VR1 legfontosabb endogén aktivátorának tekinthető az alacsony küszöbű ($\sim 43^\circ\text{C}$) hőmérsékletemelkedés, a pH csökkenése (acidózis), számos, leginkább gyulladásos mediátornak tekinthető anyag. Ezen ágensek egyrészt direkt módon aktiválhatják a receptort, másrészt saját receptoraikhoz kötődve, intracelluláris jelátviteli útvonalak módosítása révén szabályozzák a VR1 működését. Ilyen allosztérikus módosító hatás lehet az, hogy ezek az anyagok a VR1 hőérzékenységi küszöbét lecsökkentik, azaz a receptor már fiziológiás testhőmérsékleten is aktiválódik és fájdalomérzést vált ki (szenzitizáció, termális hyperalgesia). Mindezek alapján feltételezzük, hogy a VR1 számos nociceptív stimulus egyfajta “központi integrátora”.

A VR1 különböző fajokban

A farmakológiai és molekuláris biológiai kísérletek ugyanakkor egy érdekes problémára is ráirányították a figyelmet, miszerint a vanilloidok által kiváltott biológiai válaszok különböző fajokban eltérőek. Megállapították, hogy a madár nem érzékeny kapszaicinre, melynek oka, hogy a madarakban található

VR1 homológból hiányzik a vanilloid szenzitivitásért felelős szekvencia. Hasonlóképpen, specifikus [^3H]RTX kötődést nyúl TG membrán preparátumon sem sikerült detektálni. VR1 szekvencia analízis a patkány, madár és nyúl VR1 vonatkozásában kritikus eltéréseket észlelt, mely a fenti különbségeket magyarázhatja. Az [^3H]RTX kötődési vizsgálatok hörcsög DRG membrán preparátumokon a patkánynál észlelthez hasonló affinitást és receptor denzitást jeleztek, ugyanakkor a húgyhólyagból, tracheából készült preparátumokon, eltérően a patkányoknál látottaktól, nem sikerült specifikus [^3H]RTX kötődést detektálni. A jelenség úgy magyarázható, hogy a nociceptív neuronok képesek a VR1 szintézisére, de a fehérje kijuttatása a perifériás terminálokra elégtelen. Érdekes ugyanakkor, hogy a jelenség ellenkezője is igaz; azaz a fokozott vanilloid-érzékenység nem feltétlenül magyarázható nagyobb affinitású receptorral vagy nagyobb receptor-denzitással, így a tengerimalac esetében sem. Úgy tűnik tehát, hogy az egyes fajok eltérő vanilloid érzékenysége mögött eltérő neurotranszmitter mintázat, a VR1 eltérő expressziós szintjei vagy eltérő szekvenciája állhat. Mindezek fontos következménye, hogy az állatkísérletek adatai csak nagy körültekintéssel extrapolálhatóak emberre, mind a hatás, mind az esetleges toxicitás megítélésében.

A VR1 kifejeződése a központi idegrendszerben

A VR1-ral kapcsolatos további probléma a VR1 szöveti eloszlásának pontos leírása. Teljes VR1-specifikus mRNS transzkriptet csak az érző ganglionok nociceptoraiban sikerült kimutatni. Ugyanakkor régóta ismert, hogy a központi idegrendszer különböző területeire adott kapszaicin biológiai választ eredményez és jellegzetes morfológiai változásokat okoz. A [^3H]RTX alkalmazásával nagy affinitású specifikus kötődést sikerült detektálni különböző agyi struktúrákhoz, amelyek primer érző afferentációt jelenlegi ismereteink szerint nem kapnak. Ugyanakkor ezek az eredmények korántsem tisztázták az „agy” VR1 biológiai szerepét.

A vanilloid vegyületekben rejlő potenciális terápiás lehetőségek

A vanilloid vegyületeket már évszázadok óta használják különféle betegségek terápiájában. Bebizonyosodott, hogy alapvetően a vanilloid vegyületek által kiváltott karakterisztikus hatások (az excitáció, az azt követő deszenzitizáció és neurotoxicitás) mindegyikének lehet terápiás értéke, főként lokális adagoláskor. Kimutatták például, hogy a húgyhólyag átöblítése kapszaicinnal (feltehetően a szenzoros idegvégződések deszenzitizációja révén) jelentősen növelte a hólyagkapacitást. Megállapították továbbá, hogy a kedvezőbb farmakológiai profillal (minimális kezdeti excitációt követő intenzív, tartós deszenzitizáció) rendelkező RTX már egyszeri, lokális adagoláskor jelentősen tartósan megnőtt a hyperreaktív hólyaggal rendelkező betegek hólyagkapacitása.

A másik, talán még szélesebb körben „megcélzott” szerv a bőr és a bőr alatti kötőszövetek. Az izom-ízületi fájdalmak enyhítésére világszerte használatosak kapszaicin tartalmú, vény nélkül is beszerezhető krémek. A kedvező (ellen-irritációt, azaz akut excitációt, majd következményes deszenzitizációt kiváltó) hatást a lokálisan, a C-rost végződésekből felszabaduló neuropeptidek mikrocirkulációt javító hatásával magyarázzák. A topicalisan alkalmazott kapszaicint, mint adjuváns analgetikumot, emellett számos neuropathiás fájdalommal járó állapotban is kipróbálták (pl. postherpeses neuralgia, diabeteses neuropathia, mastectomiát követő fájdalom).

A bőr vonatkozásában egy különösen érdekes, nagy klinikai relevanciával bíró tünet a viszketés. A pruritogén (azaz viszketést indukáló), főként kémiai természetű anyagok (pl. hisztamin, lipid peroxidációs termékek, prosztaglandinok, neuropeptidek) a bőrben lévő C-rostok egy speciális szubpopulációját stimulálják. Ezek a C-típusú neuronok csak részben azonosak a kapszaicin-szenzitív polymodális érzősejtekkel; azon belül egy eltérő neuronpopulációt reprezentálnak. Úgy tűnik, hogy a kapszaicin képes ezen neuronok neuropeptid-depléciójára is (deszenzitizáció), ami a szenzoros

modalitás megszűnéséhez vezethet. Nem meglepő tehát, hogy klinikai kísérletekben a topicalisan alkalmazott kapszaicin kedvező hatását észlelték számos viszketéssel járó megbetegedésben (pl. notalgia paresthetica, psoriasis, prurigo nodularis, uraemiás és cholestasisos pruritus).

További érdekes megfigyelés volt, hogy topicalis, intranasalisan adott kapszaicin jelentősen csökkentette a vasomotoros rhinitis tüneteit, míg egyszeri intranasalisan alkalmazott kapszaicin hatékonyan bizonyult pollen által kiváltott allergiás rhinitishez társuló orrdugulósos tünetek hosszan tartó enyhítésében.

Mindezek alapján a VR1-en ható szerek létjogosultsággal bírhatnak a fenti kórállapotok terápiájában. Természetesen további kísérletek szükségeltetnek annak feltérképezésére, hogy 1) milyen funkcionális sajátságokkal bír a számos egyéb sejtfeleségen (pl. bőr keratinocyták, hízósejtek, dendritikus sejtek) leírt ún. nem-neuronális VR1; 2) mi lehet a (gyakran fokozott kifejeződést mutató) VR1 szerepe a különböző gyulladásos kórképekben; 3) milyen egyéb adagolási mód (szisztémás, intrathecalis) állhat rendelkezésre. Mindezen kérdések megválaszolása tovább szélesítheti azon betegségek spektrumát, ahol a VR1-on ható vegyületek terápiás alkalmazhatósága valódi potenciállal bírhat.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink alapvető célkitűzése az volt, hogy az állatkísérletek során *in vivo* tapasztalt észleléseket *in vitro* sejtszinten is követhessük.

1. Az *in vivo* kísérletek során a következő kérdésekre kerestünk választ: Vajon epidurális RTX adásával kiváltható-e tartós regionális analgesia? A fájdalomcsillapító hatást megalapozó deszenzitizáció kialakulásának idő- és dózisfüggése hogyan alakul két eltérő kezelési mód (szisztémás, epidurális) esetén? Kellően tartós-e a hatás? Vajon a szegmentális hatás az *in vivo* teszteken túl a kötődési vizsgálattal is igazolható?

2. Az *in vitro* vizsgálatok során először a sejtfiziológiai változásokat kívántuk vizsgálni. Ennek során feltérképeztük a morfológiai és elektrofiziológiai változások közti kapcsolatot, mind heterológ VR1-expresszálo expressziós sejtes rendszerekben, mind natív DRG neuronokban. Vizsgáltuk azt is, hogy az extracelluláris kalcium jelenléte nélkül létrejövő sejtválaszok mivel magyarázhatók; azaz lehetséges-e, hogy a VR1 az intracelluláris membránokba is beépül. Kiváncsiak voltunk arra is, hogy van-e a „belső” membránokban lokalizálódó VR1-nek funkcionális kapcsolata az intracelluláris kalciumraktárakkal?

3. Végezetül kísérleteink harmadik részében, az agyban expresszáló VR1 farmakológiai vizsgálata során, a következőkre kerestünk választ: Melyek azok a régiók, ahol a legnagyobb sűrűségben expresszáldik a receptor? Az agyi VR1 a kötődési vizsgálatokkal észlelt farmakológiai tulajdonságai megegyezik-e a periférián észlelhető variánssal? A majom VR1 kötődési paraméterei hogyan viszonyulnak más fajokban észlelt hasonló értékekhez?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Az in vivo analgetikus hatás monitorizálása

A nociceptív válaszkészséget egy ún. plantáris analgémia-mérő segítségével vizsgáltuk, a Hargreaves által leírt módon (hot plate assay). A hátsó mancsokon mért lábviSSzahúzási latencia időket (lumbáris epidurális kezelés esetén a hatás elsődleges helye a hátsó végtagok) összevetettük az elülső végtagoknál mért hasonló időkkal (belső kontroll), valamint a vivőanyaggal kezelt kontroll állatok hasonló mérési adataival.

Epidurális kezelés során steril hatóanyag (RTX, 1-100 µg/kg) vagy vivőanyag 40 µl-ét injektáltuk az epidurális térbe helyezett katéterbe, melyet a katéter holtterének megfelelő mennyiségű (10 µl) sóoldattal bemostunk. A szubkután (szisztémás adagolás) kezelt állatokban az RTX dózisát 3-300 µg/kg közötti koncentrációtartományban alkalmaztuk, max. 250 µl összmennyiségben. A beadása előtt meghatároztuk az alap latenciaidőket, majd ezt követően (10-15 perccel később) beadtuk a teszt dózisokat. Dózis-hatás vizsgálatot végeztünk az idő függvényében, a deszenzitizáció kialakulásának és fennmaradásának megítélésére. A kapott adatokat átlagoltuk és szórást számoltunk (S.E.M). A statisztikai feldolgozáshoz kétoldalas ANOVA tesztet és független (unpaired) *t*-próbát alkalmaztunk. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ alatti értéken állapítottuk meg.

2. In vitro vizsgálatok

[³H]RTX kötődési vizsgálatok membrán preparátumokon

A DRG, gerincvelő és agyi régiók mikrodisszekált mintái Cynomolgus majmokból (n=8) kerültek eltávolításra. A membrán preparátumokat a laboratóriumunk által korábban közölt protokoll szerint készítettük. A sejtekhez különböző koncentrációjú [³H]RTX-t, valamint nem-radioaktív ligandot tartalmazó tápoldatot adtunk, majd 60 percig 37 °C-on inkubáltuk. A

kompetíciós kísérletekben a specifikus [³H]RTX kötődés, nem-radioaktív RTX, kapszaicin vagy kapszazepin általi gátlását mértük 500 pM [³H]RTX jelenlétében. A szabad és a sejtek által kötött (fmol/mg fehérje egységben kifejezett) radioaktivitást szcintillációs számolóval határoztuk meg.

A [³H]RTX kötődés vizsgálata során nyert dózis-hatás görbéket a Hill-egyenlettel illesztettük: $B = (B_{\max}^* L_H^n) / (K_d^n + L_H^n)$, ahol B a specifikusan kötött [³H]RTX-et, $B_{\max}$ a receptor denzitást, L_H a nem kötött [³H]RTX-et, míg a K_d érték azt a [³H]RTX koncentrációt jelenti, amelynél a receptorok fele köti ligandját. A kompetíciós kísérletekben a kötődésre jellemző paramétereket a következő egyenlettel határoztuk meg: $B = ((L_H + L_C * K_d / K_i)^{(n-1)} / (K_d^n + (L_H + L_C * K_d / K_i)^n)) / (L_H^{n-1} / (K_d^n + L_H^n))$, ahol L_C a nem-radioaktív ligand koncentrációját, K_i pedig a nem-radioaktív ligand azon koncentrációját jelenti, amely értéknél a receptorok fele köt ligandot.

Primer DRG kultúra készítése

Primer idegsejtek izolálása és tenyésztése patkány embriókból történt. A gerincvelő kivételét követően a ganglionokat mindkét oldalon levágtuk, majd 0,125%-os tripszin oldatban emésztettük 37 °C-on 20 percig. A sejteket 25 mm-es üveg tárgylemezekre vagy multiwell plate-re vittük, majd Dulbecco's Modified Eagle's Mediumban (DMEM) növeltünk, mely 20 mM HEPES, 7,5 % főtális borjú savó, 7,5 % lószérum, 2 mg/ml 5-fluouracil, valamint a sejtnövekedést és idegi differenciálódást elősegítendő 50 ng/ml idegi növekedési faktor kiegészítőket tartalmazott.

A patkány VR1-et kifejező heterológ expressziós rendszerek létrehozása

A VR1-t tartalmazó vektort a következőképpen készítettük: a VR1-t kódoló mRNS transzkripteket patkányok DRG-ból nyertük (teljes RNS izolálásával), majd RT-PCR alkalmazásával kettősszálú DNS-t állítottunk elő a VR1 XbaI és AflIII restrikciós hasító helyek közti szakaszán. A hiányzó 5'

szekvenciát (SacI és XbaI) hasonló módon amplifikáltuk és illesztettük a fenti szakaszhoz. Az 5' (reverz) primerek esetében XbaI és SalI hasító helyeket inkorporáltunk. A következő lépésben a SacI-AflIII fragmentet és az AflIII-SalI RT-PCR produktumot a pEGFP-N3 vektorba illesztettük a SacI-és SalI restriktációs enzimek felhasználásával. Hasonló stratégiával egy másik konstrukciót is létrehoztunk, melynek során egy 12 aminosavból álló ún. epsilon (ϵ) tag (KGFSYFGEDLMP, mely a protein kináz C ϵ egy szakasza) került a VR1-re a metallothionein promoterrel működő pEMTH vektor felhasználásával. Az üveg fedőlemezen tenyésztett COS7, NIH3T3 vagy HEK 293 sejteket 1-2 μ g, a VR1-t tartalmazó plazmiddal vagy kontrollként üres vektorral transzfektáltunk, LipofectAMINE transzfekciós reagens felhasználásával. A transzfektált sejteket további 48 órán át 10 % FBS-val, 2 mM glutaminnal és antibiotikumokkal (50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 1,25 μ g/ml fungizon, Sigma) kiegészített DMEM tápoldatban, a VR1 hőaktivációját elkerülendő, 35 °C-on tenyésztettük.

[³H]RTX kötődési vizsgálatok sejteken

A sejteket 10 mM HEPES (pH 7.4) pufferben reszuszpendáltuk, majd megfelelő denzitásban (10^5 sejt/lyuk) kimérve 96-lyukú filtrációs edényekbe szélesztettük. Ezt követően 60 percig 200 pM [³H]RTX-nal 37 °C-on inkubáltuk, majd az edényt jégre helyezve a kísérletet a korábban leírtak szerint leállítottuk.

⁴⁵Ca felvétel vizsgálata

A sejtszuspenziót (kb. 5×10^4 sejt/ml) 1 μ Ci/ml ⁴⁵Ca-ot tartalmazó szérummentes DMEM-ben 96-lyukú filtrációs edénybe mértük. A sejteket a megfelelő ligand(ok) jelenlétében 35 °C-on 15 percig inkubáltuk, majd a radioaktív tartalmú oldatot kimostuk. Vákuum filtrációval a sejtek a filter felszínén maradtak, majd száradást követően szcintillációs folyadékba kerültek radioaktív mérés céljából. A ⁴⁵Ca²⁺-felvétellel arányos radioaktivitást dpm/well

egységben mértük, majd az így nyert dózis-hatás görbéket a Hill-egyenlettel illesztettük.

Western (immuno) blot analízis

A VR1 specifikus antitest előállítása nyúlban történt, egy N-terminális MEQRASLDSEESPPQE peptid szekvencia alkalmazásával, melyet az immunogén kagyló hemocyaninhez konjugáltak. Az immun-szérumot az immobilizációra alkalmazott fehérje segítségével tisztítottuk (affinity-purified).

A Western blot analízis során a sejteket hideg foszfát-pufferrel (PBS) mostuk, majd lízis-pufferben homogenizáltuk és a proteintartalmat meghatároztuk. Ezután SDS poliakrilamid gélelektroforézissel mintánként 20-30 µg proteint választottunk szét 7,5%-os gélen, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membrán szabad kötőhelyeit 5% sovány tejport tartalmazó PBS-ben (5% tej-PBS) 30 percig blokkoltuk, majd a membránokat 5 %-os tej-PBS-ben hígított elsődleges, patkány VR1 (1:500) ellenes; a GFP-taget felismerő eGFP ellenes (1:500); illetve az ε-taget felismerő PKCε ellenes (1:500) antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át. A membránokat ezt követően megfelelő másodlagos, torma-peroxidázzal kapcsolt antitesttel inkubáltuk, végül az immunreakciók eredményét kemilumineszcens módszerrel, ECL Western blot detektáló kittel tettük láthatóvá. Az expresszió kvantitatív meghatározását denzitométer, valamint megfelelő szoftver segítségével végeztük, az endogén kontrollként használt cytochrome c immunreaktivitására normalizálva.

Fluoreszcens konfokális mikroszkópia

Az 1-2 µg VR1eGFP plazmiddal transzfektált, majd üveg fedőlemezen további 48 órát tenyésztett VR1eGFP-COS-7 sejteket MRC-1024 Bio-Rad konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A kiválasztott sejteket az x-y síkban szkenneltük 1 másodpercen át 30 s-onként, 0,2 µm-es lépésekkel, a z tengely mentén. Az élő sejtek különböző szubcelluláris részleteinek jelölésére

fluoreszcens markereket használtunk. Az endoplazmatikus retikulum (ER) szelektív jelölésére tranziens transzekcióval bejuttatott eGFP-KDEL markert, míg a mitochondriumok jelölésére MitoTracker fluoreszcens festéket használtunk.

Ca²⁺-imaging mikrofluorimetriával

A fedőlemezre szélesztett sejteket 2 µg VR1eGFP plazmiddal transzfektáltuk, majd 24 óra múlva kalciumérzékeny fluoreszcens Fura-2 festék acetoximetilészter formájával (fura 2-AM, Invitrogen) 30 percig inkubáltuk 37 °C-on. A VR1-t expresszáló egyedi sejteket az eGFP fluoreszcenciáját kihasználva választottuk ki (minden esetben közepesen zöld fluoreszcenciájú sejtet mérve). Az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm között változtattuk kettős monokromátor, valamint on-line kapcsolt számítógép segítségével, majd a fluoreszcens emissziót egy fotoelektron-sokszorozóval 510 nm-en detektáltuk 10 Hz-es mintavételi frekvenciát és 0,5 s-os integrációs időintervallumot használva. Az [Ca²⁺]_i-ban bekövetkezett változásokat Grynkiewicz és mtsai (1985) által kidolgozott módszerrel vizsgáltuk.

Konfokális mikroszkópos Ca²⁺-imaging Indo-1 AM festékkel

A tenyésztett sejteket Indo-1 AM festékkel töltöttük fel (34 °C, 30 perc), majd – a *zerus* extracelluláris Ca²⁺ állapotának rögzítéséhez – a sejteket 5 alkalommal mostuk 1 mM EGTA-t tartalmazó CaCl₂-mentes oldatban. VR1eGFP-expresszáló sejteket, illetve a kis átmérőjű neuronokat a mikroszkóp látóterében vizuálisan szelektáltunk. A fluoreszcens emisszió kvantitálására a sejtek perikarion régióját kijelölve (LaserSharp software, 40x objektívet használva) UV-lézer konfokális mikroszkópos méréseket végeztünk 10 másodperces intervallumokban. A fluoreszcens emisszió intenzitás-értékeit a 405/485 nm-en mért hányados értékekből határoztuk meg.

Feszültség-clamp elektrofiziológiai vizsgálatok

A vizsgálatokhoz a VR1eGFP-expresszálo COS7 és HEK293 sejteket a transzfekciót követően 6-lyukú tenyésztőedényben 48 óráig inkubáltunk, majd a fluoreszcens proteint expresszálo sejteket kiválasztottuk a vizsgálatra. A feszültség-clamp vizsgálatokat Krebs pufferben végeztünk, Axopatch 200B erősítőt alkalmazva. A mérésekhez 2-10 M Ω -os patch-elektrodokat használtunk, melyek 10 mM-os HEPES pufferral voltak feltöltve. Két adagolás között az alkalmazott vegyületeket 10 perces mosással (egy gyors perfúziós rendszer segítségével) távolítottuk el a mérőkádból.

EREDMÉNYEK

1. Az ultrapotens VR1 agonista RTX *in vivo* (analgetikus) hatásának vizsgálata

In vivo kísérleteink célja azon hipotézisünk bizonyítása volt, hogy a lumbális gerincbe epiduralisan beadott RTX alkalmazásával regionális VR1 deszenzitizáció (azaz anesztézia) hozható létre. Megállapítottuk, hogy szisztémás (szubkután) alkalmazás esetén (egy iniciális, dózisfüggő aktivációt követően) a latencia idők a beadás után kb. 4-5 órával egy plató értéket értek el, mely a VR1 deszenzitizációt reprezentálta. Az RTX (300 µg/kg, melyet a maximális tolerálható adagnak tekintettük) szisztémás alkalmazása esetén a latencia idő maximális növekedése $19,7 \pm 0,6$ s volt. Az 6. órában mért ED₅₀ érték $39,2 \pm 3,9$ µg/kg RTX-nek adódott, míg a görbe Hilloefficiense $1,38 \pm 0,26$ volt, ami a receptorok közötti közepes fokú kooperativitást feltételez.

Kimutattuk, hogy a lumbális epidurális RTX adásakor a hátsó lábakon mért latencia idők lassabban (kb. 6 óra múlva) érték el a plató értéket. Ugyancsak eltérően a szisztémás adagolásnál megfigyeltekkel, az epidurális RTX kezelés esetén a latencia idők megnyúlásának jelentkezése az alkalmazott dózisoktól nagyjából függetlenül, hasonló időfüggést mutatott. A latencia idők maximális növekedése 100 µg/kg RTX alkalmazásakor $33,4 \pm 2,6$ s-nak adódott. A hátsó lábak elhúzásának latencia ideje szignifikánsan magasabb volt a szisztémás kezelés esetén mért értéktől ($p < 0,001$). A 6. órában mért adatok alapján megállapított ED₅₀ érték epidurális RTX alkalmazása esetén $6,3 \pm 0,3$ µg/kg RTX volt. A Hill-koefficiens mérsékelt fokú kooperativitásra utalt, értéke $1,22 \pm 0,10$ volt.

A lumbális epidurális RTX kezelés során a mellső lábakon mért latencia időket is folyamatosan monitoroztuk. Bebizonyosodott, hogy az epidurális kezelés során a mellső lábakon észlelt dózis-függő hatás hasonló (vagy kevésbé kifejezett) volt a szisztémás kezelés kapcsán akár a mellső vagy a hátsó lábakon

mért latencia időkhöz. Az epiduralis RTX kezelés során észlelt szisztémás hatás (mellső lábak) elhanyagolható mértékű volt a jóval kifejezettebb lokális, regionális hatáshoz képest, amit a hátsó lábakon mért latencia időkkal követhettünk.

Korábbi közleményekből ismert, hogy szisztémás RTX kezelést követően mind a perifériás idegrendszer jellemző helyein, mind a központi idegrendszerben a vanilloid vegyületekre specifikus kötőhelyek száma dózisfüggően csökken. Az állatokból származó gerincvelői mintákon végzett [^3H]RTX kötődési kísérletek során kimutattuk, hogy az epidurális RTX alkalmazás esetén (a sokkal kifejezettebb regionális hatás eredményeképpen) a lumbalis régióban [^3H]RTX specifikus kötődés dózisfüggő (100 $\mu\text{g/kg}$ RTX dózis esetében közel 100 %-os) csökkenését észleltük. Ezzel ellentétben a cervicalis régióban 100 $\mu\text{g/kg}$ -os dózissal a kontrollhoz képest is csak 42 %-kal csökkent a specifikus [^3H]RTX kötődés.

2. Az RTX hatása sejtes rendszerekben – a deszenzitizáció molekuláris mechanizmusának vizsgálata

A VR1 kiméra-fehérjék expressziójának és funkcionalitásának vizsgálata

Kísérleteink következő részében a különféle vanilloid vegyületek sejtszintű hatásait vizsgáltuk. A vizsgálatokhoz kétféle VR1 konstrukciót hoztunk létre; egyszer a VR1 C-terminális végét egy 27-kDa molekulásúlyú zöld fluoreszcens fehérjével jelöltük (VR1eGFP), illetve hasonlóképpen a C-terminálison egy 12 aminosavból álló ϵ -epitópot fejeztünk ki (VR1 ϵ). A VR1 ϵ és VR1eGFP plazmidokat tranziens transzfekcióval COS7, HEK293 és NIH3T3 sejtekben expresszáltuk. A Western blot analízis a fúziós fehérjék adekvát expresszióját jelezte a várt molekulaméretben. Megállapítottuk, hogy a VR1eGFP-t expresszáló sejteken mind a kapszaicin, mind az RTX azonnali nagy sejtáramot indukált. Az elektrofiziológiai kísérletekkel összhangban az RTX dózis-függő $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influxot generált VR1-t expresszáló sejteken. Az ED_{50} érték RTX

esetében 100 ± 50 pM, míg ugyanez a kapszaicin esetében $0,5 \pm 0,15$ μ M volt. Kimutattuk, hogy mindkét jelölt rekombináns fehérje, a vad típushoz mérhetően, nagy affinitással, dóziszfüggően kötötte a [3 H]RTX-et ($K_d \sim 150 \pm 10$ pM). A Hill koefficiens értéke 1,5-2 volt, mely a kötőhelyek közti pozitív kooperativitásra utalt. Ezen hatások VR1-specifikusak voltak, hiszen a kompetitív antagonistá kapszazepin hatékonyan gátolta az agonisták által kiváltott hatást. Megfigyeléseink szerint a C-terminális jelölés (tag) szignifikánsan nem változtatta meg a VR1 molekula elektrofiziológiai és farmakológiai paramétereit.

A VR1eGFP intracelluláris lokalizációjának vizsgálata – az RTX hatására bekövetkező celluláris változások dinamikájának és morfológiájának „real-time” követése

A VR1eGFP konstrukció fluoreszcens tulajdonsága lehetővé tette a VR1 szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatát is. Konfokális mikroszkóp alkalmazásával VR1eGFP fluoreszcens szignált észleltünk mind a plazmamembránnak megfelelően, mind a sejtek belső membránrendszerein, így az endoplazmatikus retikulumon (ER) és annak folytatásaként a sejtmag körül. Kettős jelölést alkalmazva kiderült, hogy a VR1eGFP-specifikus fluoreszcencia nem található meg a sejtek mitochondriumaiban. Eredményeink jó összhangban voltak azokkal a korábbi megfigyelésekkel, miszerint natív VR1-pozitív nociceptív neuronokban immuncitokémiai vizsgálattal intenzív festődést észleltek a neuronális cytoplasmában.

Ezt követően az [Ca^{2+}]_i megemelkedésének hatását vizsgáltuk a sejtek morfológiájára. Kontroll kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a sejtek plazmamembránjának kationokra való átjárhatóságát jelentősen megnövelő ionomycin az intracelluláris membránok (főként az ER) fragmentációját okozza. RTX kezelés ezen változásokkal gyakorlatilag megegyező morfológiai átrendeződést váltott ki; azaz kialakult az ER fragmentáció és a filamentózus

mitochondriumok alakváltozása. Fontos megfigyelésünk volt emellett, hogy a kontroll (az „üres” eGFP-t expresszáló) sejteknél vanilloid kezelés hatására nem észleltünk morfológiai változást az ER, illetve a mitochondriumok szerkezetében, mely egyértelműen igazolta a fenti változások VR1-specifitását.

A VR1-expresszáló sejtekben észlelt celluláris változások kalciumfüggése

A fenti, konfokális mikroszkóppal nyert eredmények felvetették, hogy 1) a VR1 intracelluláris kompartmentek membránjába is beépülhet; 2) a VR1-mediált válaszok az $[Ca^{2+}]_i$ megemelkedésének következményeként alakulnak ki. Ezen utóbbit vizsgálva kimutattuk, hogy az RTX hozzáadását követően gyors, átlagosan kb. 10 s alatt kifejlődő, igen jelentős (közel tízszeres) $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés következett be. Jó összhangban a konfokális mikroszkópos vizsgálatok során észlelt irreverzibilis struktúrális változásokkal, a továbbiakban a megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ nem tért vissza a nyugalmi értékre. Hasonló $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést nem észleltünk a kontroll sejteken.

„Real-time” konfokális mikroszkópiával (az intracelluláris változások időbeliségét követve) megállapítottuk, hogy – az $[Ca^{2+}]_i$ növekedésével párhuzamosan – az RTX hatására már 30 s belül beindult az ER membrán-vesiculumok képződése a sejtmagmembrán körül. Ezt követően progresszíven jelentkező membránlefűződéseket észleltünk a sejtmag körül, majd általában 1 órán belül (a belső membránok után) a plazmamembrán is megsemmisült. Alacsonyabb RTX dózisok esetében a változások kinetikája elhúzódóbb volt, de a sejtek lízise mindannyiszor bekövetkezett az adagolást követően 3 órával.

Az intracelluláris kalciumraktárak membránjába beépült VR1 funkcionalitásának vizsgálatára ratiometriás alapú fluoreszcens konfokális mikroszkópos méréseket végeztünk heterológ expressziós rendszerben és primer szenzoros DRG neuronokon, indo-1 AM fluoreszcens festék alkalmazásával, kalciummentes közegben. Az RTX adását követően mindkét sejttypuson jelentős

$[Ca^{2+}]_i$ emelkedést észleltünk. A kontroll sejtek nem válaszoltak az RTX kezelésre, hasonlóan a natív szenzoros neuronok egy csoportjához, melyek feltehetően nem expresszálták a VR1-t. Az extracelluláris kalcium hiányában az RTX által kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés mindkét sejttypusban később, kb. 20-60 sec múlva jelentkezett. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy az intracelluláris lokalizációjú VR1 funkcióképes; valamint, hogy az RTX receptor-specifikus módon (azaz a VR1-t nem expresszáló sejteket megkímélve) képes ezen VR1 populáció aktiválására.

Megerősítve korábbi eredményeinket kimutattuk, hogy a VR1eGFP-expresszáló sejteken az RTX extracelluláris kalcium hiányában is képes jellegzetes morfológiai változások (ER vezikuláció, mitochondriális diszrupció) kiváltására, azonban kalcium-mentes közegben a változások létrejöttéhez jóval hosszabb időre volt szükség. A típusos morfológiai változások átlagosan mintegy 3 perccel később jelentkeztek az RTX adását követően. Teljes mértékben megegyező eredményre jutottunk primer szenzoros neuronok vizsgálata során is. Adataink így arra utalnak, hogy az ER-lokalizált VR1 valóban képes kalciumot mobilizálni az ER-ből.

Kíváncsiak voltunk ugyanakkor arra is, hogy a DRG neuronok hogyan viselkednek hosszabb RTX expozíció esetén. Megállapítottuk, hogy a neuronok egy csoportja azonnali, másodperceken belüli kialakuló $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéssel válaszoltak RTX hatására. Az RTX-re ily módon reagáló neuronok sejtmagjában (az RTX adását követően kb. 40 perccel) intenzív, a sejtek elhalását jelző propidium-jodid (PI) akkumuláció volt megfigyelhető. A vizsgált látótérben ugyanakkor voltak RTX-re nem reagáló neuronok is, amelyek esetében PI festődést nem tudtunk kimutatni, még akár 2 órával az RTX expozíciót követően sem.

Ezen megfigyelések megerősítették elképzelésünket, hogy az észlelt változások a neuronokban is VR1 függőek. A vázolt mechanizmus szerint, VR1-expresszáló nociceptív neuronok szelektív depléciója hozható létre RTX

adásával. A hipotézis sejtszintű tanulmányozására primer DRG tenyészeteket resiniferatoxinnal (RTX), valamint egy hosszú C-láncú szintetikus vanilloid vegyülettel, olvanillal (OLV) kezeltünk. Western blot technikával kimutattuk, hogy az OLV kezelés majdnem teljes mértékben (99%), míg a jóval kisebb koncentrációban alkalmazott RTX is jelentősen (~80%) lecsökkentette a VR1 immunjelölés intenzitását, azaz feltehetően „eliminálta” a VR1-expresszáló neuronokat. Megfigyelésünk szerint az egyéb jelenlévő sejtípusokat a fenti kezelés nem érintette, amint azt egy közöséges szöveti fehérjére (cytochrom-c) újrajelölt Western blot-ok jelezték.

3. A VR1-expresszió a központi idegrendszerben - a VR1 molekuláris farmakológiai vizsgálata majom agyban (szöveti disztribúció, farmakológiai paraméterek)

Specifikus [³H]RTX kötődés vizsgálata gerincvelői és hátsó gyöki ganglion (DRG) mintákon

Kísérleteink utolsó részében a majom agyban expresszálódó VR1 molekuláris farmakológiai jellemzését végeztük el [³H]RTX kötődési vizsgálattal. Különböző agyi régiókból származó mintákon mért kötődési paramétereket hasonlítottuk össze a gerincvelőből és DRG-ből nyert membrán preparátumok hasonló adataival.

A kontroll kísérletekben nagy affinitású, specifikus, telíthető [³H]RTX kötődést észleltünk mind a gerincvelő hátsó szarvában, mind a DRG-ban. A gerincvelői hátsó szarvból, illetve a DRG-ből származó mintákon mért kötődési paraméterek az alábbiak voltak: a maximális kötődési kapacitás (B_{max}) $244,4 \pm 19,6$ és $240 \pm 26,6$ fmol/mg fehérje (az adott sorrendben), míg a K_d értékek 312 ± 14 pM és 289 ± 15 pM. A P értékekre $1,4 \pm 0,04$ és $1,5 \pm 0,08$ kaptunk, melyek a kötőhelyek közti pozitív kooperativitásra utaltak.

A specificitás további vizsgálata során kompetíciós kísérletekben kimutattuk, hogy a nem-radioaktív RTX hatásosan (és pozitív kooperativitást

mutatva) gátolta az 500 pM [^3H]RTX specifikus kötődését a következő K_i értékekkel: 349 ± 25 pM a gerincvelői membrán preparátumokon, 309 ± 14 pM a DRG mintáin volt. Az RTX-hez hasonlóan, a kapszaicin is gátolta a [^3H]RTX specifikus kötődését: a K_i érték $4,7 \pm 0,26$ μM a DRG, míg $4,3 \pm 0,32$ μM a gerincvelő hátsó szarvából készült membrán preparátumokon. Végezetül megállapítottuk, hogy a kompetitív antagonistá kapszazepin ugyancsak hatásosan függesztette fel a [^3H]RTX specifikus kötődését: K_i $3,1 \pm 0,23$ μM a DRG-ban és $3,7 \pm 0,35$ μM a gerincvelői hátsó szarvban.

Specifikus [^3H]RTX kötődés vizsgálata majom agy különböző régióiban

Specifikus [^3H]RTX kötődést észleltünk emellett különböző agyi régiók membrán preparátumain, így a locus ceruleusban (LC), az area preoptican (AP), a hypothalamus medialis-basalis része (MBH), a hídi formatio reticularisban, a thalamus ventralis részén, valamint a cerebellaris cortex szenzoros- és motoros területein. A kötődés (B) értékei (a fent megnevezett régiókat sorrendbe állítva): 140 ± 11 , 129 ± 17 , $143,4 \pm 8,4$, $66,6 \pm 4,8$, $21,2 \pm 4,5$, $48,4 \pm 6,2$, $57,7 \pm 5,3$ és $59,2 \pm 6,3$ fmol/mg fehérje voltak. A magas receptorsűrűséget mutató agyi mintákon a specifikus [^3H]RTX kötődés ugyancsak szigmoidális szaturációs kinetikát és pozitív kooperativitást követett, mely az alábbi K_d értékekkel volt jellemezhető: 601 ± 28 pM a LC/AP régiókban és 561 ± 41 a MBH mintákon. Megállapítottuk emellett, hogy a kapszaicin és a kompetitív antagonistá kapszazepin hatásosan gátolták a specifikus [^3H]RTX kötődést mind a hypothalamusból (K_i sorrendben $1,0 \pm 0,1$ μM és $0,9 \pm 0,11$ μM), mind a LC/AP régiókból (K_i sorrendben $1,1 \pm 0,22$ μM és $1,3 \pm 0,2$ μM) készült membrán preparátumokon.

MEGBESZÉLÉS

1. Epidurális RTX által kiváltott hatásos regionális analgészia

A különféle vanilloid vegyületek (pl. kapszaicin, RTX) széles terápiás potenciállal rendelkező nem-narkotikum jellegű analgetikumok. Korábbi kutatások ugyanakkor jelentős mennyiségi és minőségi különbségeket tártak fel *in vivo* és *in vitro* hatásaikat illetően. Humán vizsgálatokban például kiderült, hogy húgyhólyag hyperreflexiás betegeknél az intravesicalisan végzett RTX öblítés – a kapszaicinnal ellentétben – iniciális fájdalom kiváltása nélkül deszenzitizálta a C-rostokat, így az urgens incontinens panaszokat jelentősen mérsékelte. Mindezen adatok azt sugallták, hogy az RTX (a kapszaicin hatásához viszonyítva) sokkal előnyösebb terápiás profillal rendelkezik.

A szisztémás adagolással összefüggő mellékhatások mérséklésére ugyanakkor az utóbbi időszakban előtérbe kerültek a lokális alkalmazás (topikális, intratechalis vagy epidurális) lehetőségei, melyek kiváló stratégiát reprezentálnak a regionális fájdalom csillapítására. Farmakológiai szempontból az epidurális adagolás jól ismert előnye a cél-szövetek anatómiai közelsége és az elhanyagolható szisztémás hatás. Jelen disszertációban bemutatott kísérleteink szerint az epidurális térbe adott RTX hosszú hatású, regionális termális analgésziát eredményez, melyet minimális szisztémás hatás kísér. Eredményeink emellett azt is igazolták, hogy az epidurális RTX relatív fájdalomcsillapító hatékonysága jelentősen nagyobb a szisztémás (szubkután) alkalmazáshoz képest. Az ED₅₀ értékek alapján ez azt jelenheti, az epidurális adagolás mintegy 6,5-szer hatékonyabb. Ha ugyanakkor a latencia idő háromszoros megnyúlását eredményező RTX dózisokat hasonlítjuk össze, akkor arra következtethetünk, hogy az epidurális adagolás valójában mintegy 25-ször hatékonyabb a szisztémás adagolásnál.

2. A vanilloid vegyületek által kiváltott, VR1-mediált szelektív citotoxicitás jelentősége

Az epidurális RTX kezelés során tapasztalt [^3H]RTX kötőhely vesztés azt sugallta, hogy a vanilloid vegyület képes a VR1-t expresszáló sejtek szelektív depléciójára. Ezért a következőkben *in vitro* sejtes rendszerekben elemeztük a VR1-mediált celluláris válaszok jellegzetességeit. Molekuláris biológiai módszerek felhasználásával heterológ expressziós rendszereket állítottunk elő, melyekről bebizonyosodott, hogy bennük a VR1 expressziója, valamint farmakológiai és elektrofiziológiai tulajdonságai nagyon hasonlóak a szenzoros neuronokon natív módon kifejeződő VR1 paramétereire.

A VR1eGFP kiméra fluoreszcens tulajdonsága emellett lehetővé tette, hogy „*in vivo*” és „real-time” vizsgáljuk a VR1 szubcelluláris lokalizációját, valamint a VR1 aktivációját követő celluláris események kinetikáját. Konfokális mikroszkóp alkalmazásával az irodalomban elsőként mutattuk ki, hogy a VR1eGFP szignál nemcsak a sejtek plazma membránban, hanem az ER-nak megfelelő intracelluláris membránstruktúrákban kifejeződik. Megállapítottuk ugyanakkor azt is, hogy a VR1 nem fejeződik ki a sejtek mitochondriumában.

Bebizonyosodott továbbá, hogy az RTX hozzáadására a VR1-t expresszáló sejtekben kb. 10-szeres $[\text{Ca}^{2+}]_i$ akkumuláció következett be. Kiderült az is, hogy a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedéssel időben párhuzamosan az ER struktúrája a citoplazma teljes kiterjedésében megbomlott, és körkörös vesiculaképződés jelentkezett. Fontos volt továbbá, hogy RTX adagolásakor egyéb membránkompartmentek változását is észleltük, így a VR1-t nem expresszáló mitochondriumok fragmentációját, a magmembrán lefűződéseit, majd végül a sejtmembrán ruptúráját is. Mindezen megfigyelések azt sugallták, hogy az RTX hatására a VR1-t kifejező sejtek halála következett be.

Az ER-lokalizált VR1-populáció szerepének további tisztázására, kalciummentes médiumban is vizsgáltuk a vanilloid-specifikus $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásokat. Jó összhangban máshol publikált eredményeinkkel – miszerint a

VR1-expresszáló sejteken az RTX adagoláskor extracelluláris Ca^{2+} hiányában is bekövetkezett az intracelluláris membrán-remodeling – kimutattuk, hogy a VR1 aktiváció, habár lassabb kinetikát mutatva, kalciummentes közegben is képes az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ megemelésére. Kimondható tehát, hogy a plazmamembránban lokalizált VR1 mellett, egy újonnan felismert, funkcionális, intracelluláris (ER-ban található) VR1-populáció is létezik mind a heterológ expressziós rendszerekben, mind a DRG neuronokban.

Ezen eredményeink, valamint az, hogy 1) a VR1-et nem expresszáló COS7 sejtekben az RTX nem emelte meg az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t és nem okozott morfológiai változásokat; 2) DRG tenyészetekben (melyek nemcsak a VR1-t expresszáló, kis méretű neuronokat, hanem más idegsejteket és glia elemeket is tartalmaznak) az RTX csak a sejtek egy részén váltott ki $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -növekedést; 3) a VR1 antagonistá kapszazepin hatásosan kivédte az RTX által beindított celluláris hatások mindegyikét; azt sugallta, hogy az általunk létrehozott heterológ expressziós rendszerekben az RTX-indukált Ca^{2+} -mediált sejthalál a VR1-on keresztül, specifikus módon valósul meg.

Ezt a feltételezést tovább bizonyítandó megállapítottuk, hogy RTX kezelést követően a kis átmérőjű nociceptív neuronokon hasonló morfológiai változások észlelhetők, mint a tranziens transzfektált VR1-expresszáló sejteken. Habár a korai morfológiai elváltozások apoptózisra emlékeztetnek, apoptózisra specifikus kromatin fragmentációt, apoptotikus testképződést, illetve kaszpáz aktivációt 24 óras követés során sem észleltünk. Hosszabb időintervallumban vizsgálva a vanilloidok hatását, ugyanakkor legalább három vitális sejt-organellum károsodott irreverzibilisen; azaz intracelluláris membrán-fragmentációt, mitochondriumok ultrastrukturális változát és a magmembrán dezorganizációját tapasztaltuk. Fontos megállapításunk volt ugyanakkor az is, hogy (várakozásainknak megfelelően) RTX kezelésre csak a neuronok egy adott szubpopulációja (kisméretű, VR1-pozitív, nociceptív idegsejtek) válaszolt, míg a glia elemek és közepes-nagy átmérőjű neuronok nem reagáltak.

A fenti sejt-organellumok VR1-specifikus károsodása egyaránt okozhat deszenzitizációt, valamint (ha a változások megfordíthatatlanok) az idegsejt pusztulását is eredményezheti. Megfigyeléseink így egy potenciálisan új terápiás eljárást körvonalaztak, melynek során VR1 agonista vegyületekkel a primer nociceptív afferensek szelektív ablációja („kémiai mikrosebészet”) válik lehetővé anélkül, hogy az érző idegsejtek teljes spektrumát elpusztítanánk.

Ennek modellezésére egy, a deszenzitizáció kiváltásában igen potens agonista vegyületet, az olvanilt (OLV) választottuk. Eredményeink azt mutatták, hogy 50 μ M dóziséig az OLV nem volt toxikus a VR1-et nem expresszáló sejtekre, ugyanakkor primer DRG tenyészetekben ekkora koncentrációban a VR1-pozitív neuronok csaknem teljes deplécióját váltotta ki. Ha ehhez hozzákapcsoljuk, hogy az epidurális alkalmazás során igen jelentős [3 H]RTX kötőhely-vesztést tapasztaltunk, eredményeink azt sugallják, hogy VR1 agonistákat speciálisan célhelyekre bejuttatva regionális fájdalomcsillapításra nyílik mód, egyéb szenzoros modalitások megkímélésével.

A fenti hipotézis helyességét bizonyítandó, a disszertációban bemutatott kísérletek elvégzése óta, kollégáink inoperábilis csonttumoros kutyákban igazolták a lokálisan adott RTX hosszantartó, VR1-specifikus regionális analgéziát kiváltó hatását. Így (reményeink szerint) valóban ésszerű antinociceptív terápiás stratégia lehet a vanilloid-szenzitív nociceptorok szelektív depléciója olyan, kifejezetten súlyos fájdalommal járó kórképekben, mint például daganatos megbetegedésekhez társuló ún. kismencedei-fájdalom, az alsó végtagi csont-és lágyrész daganatok, osteoarthritis, illetve a végtagamputációt követően jelentkező fantom-fájdalom.

3. Az agyban expresszálódó VR1 lokalizációja és molekuláris farmakológiája

A különböző fajok igen eltérő vanilloid-szenzitivitást mutatnak, mely jelentősen megnehezíti az állatkísérletek adatainak emberre történő extrapolációját. Kísérleteink során az irodalomban elsőként írtunk le VR1-

specifikus, szigmoidális szaturációs kinetikát mutató [³H]RTX kötődést majmok gerincvelői és DRG mintáiban. Adatainkat összehasonlítva más fajokon mértékekkel megállapítottuk, hogy a majom gerincvelőben észlelt receptor-affinitás megközelítőleg 3-szor nagyobbak bizonyult, mint hasonló érték humán mintákban, de 7-8-szor kisebb volt, mint a patkány gerincvelőben.

Kimutattuk emellett, hogy a majom agy számos területén a specifikus [³H]RTX kötődés adekvát farmakológiai specifitással detektálta a VR1-t. Magasabb receptor sűrűséget észleltünk a LC, AP és hypothalamus területén, mely szöveti disztribúció jó egyezést mutatott a korábban más speciesekben leírtakkal. A VR1-specifikus kötődési karakterisztika ugyancsak szigmoidális telítési kinetikát és pozitív kooperativitást jelzett. A struktúra-hatás profil (a különféle vegyületek K_d és K_i értékei) tekintetében ugyanakkor diszkrét különbségeket észleltünk a centrális (agy terület) és perifériás (gerincvelő, DRG) receptorokban, mely arra utalhat, hogy a centrális és perifériás VR1 eltérően modifikációval rendelkezik.

Ismereteink szerint primer szenzoros afferentációt az érintett agyi területek nem kapnak, így feltételezhetően a VR1 autonóm expreszióját észleltük. A legnagyobb receptordenzitást mutató területek ugyanakkor szerepet játszanak különböző szenzoros és autonóm funkciókban, így a fájdalom érzékelésében és az endogén fájdalom-modulációs szabályozásban. A locus ceruleus egyes neuron-csoportjai emellett résztvesznek a speciális CO₂-és pH-dependens chemopercepcióban is. Leírták emellett, hogy a kapszaicin képes a locus ceruleus neuronok aktivációjára, mely kapszaicin előkezeléssel (így a VR1-specifikus kötőhelyek depléciójával) kivédhető volt.

A hypothalamus preopticus részében a neuronok egy csoportja a képes a lokális hőmérséklet változásait észlelni, ezáltal központi szerepet tölt be a termoreguláció centrális kontrolljában. Korai vizsgálatok szisztémás vagy intrahypothalamikus kapszaicin injekció hatására hypothermiát, valamint a mitochondriumok jellegzetes ultrastruktúrájának megváltozását észlelték. Mivel

az acidózis és a nociceptív termális stimulusok a VR1 közismert aktivátorai, így könnyen elképzelhető, hogy a VR1-expresszálo agyi neuronok szerepet játszanak a termális-kémiai nocicepció centrális szakaszában.

4. A mechanizmustól a terápiáig: agonista, antagonistá és parciális agonista?

Tekintve, hogy a disszertáció részét nem képező egyéb tudományos munkám során kb. 200 vanilloid vegyület farmakológiai hatását vizsgáltam, bizonyosan állíthatom, hogy hasonló vegyületek ezreit tesztelik ipari méretekben. A disszertációban felvázolt, *in vivo* sejt és szervezet szintjén vizsgált terápiás stratégia így (feltehetően) csak egy a sok lehetséges közül. Ennek során a cél az, hogy az agonista hatású vegyületek alkalmazásával a nociceptorok szelektív ablációját érjük el, s lehetőleg mindezt minimális kezdeti irritáció és fájdalom kiváltásával (RTX, olvanil).

Felmerül ugyanakkor számos más lehetőség is. Az utóbbi időben a VR1-mediált folyamatok szerepét valószínűsítik számos, főként a gastroenterológia területéről ismert gyulladásos betegségben. Így amennyiben bizonyos gyulladásos állapotokban a VR1-mediált neurogén gyulladás, mint definitív (pathognomicus) mechanizmus bizonyítást nyer, akkor a receptor reverzibilis gátlása, vagyis az antagonisták használata célszerűbb lehet.

Emellett érdekes terápiás alternatívát nyújt a parciális agonisták alkalmazása is. Ezen vegyület-csoport esetében a kezdeti gátló hatás – melyet dózis-függő aktiváció követ – kedvező lehet az iniciális fájdalom elkerülésére, ami az agonista vegyületek nagy többségénél (lásd kapszaicin) megfigyelhető. Mindezek alapján szilárd meggyőződése, hogy a (remélhetően nagyon) közeli jövőben előnyös farmakológiai hatásspektrummal rendelkező vanilloidok kerülhetnek a klinikai vizsgálatok fókuszába, elsősorban gyulladásos állapotok és a konvencionális gyógyszerelésre nem reagáló, nehezen tolerálható fájdalmak kezelésére.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. *In vivo* kísérleteinkben az epidurális resiniferatoxin (RTX) adásával tartós, dózis-függő, a szisztémás adagolás hatékonyságát jóval meghaladó regionális analgéziát sikerült létesítenünk, minimális szisztémás hatás mellett. Gerincvelői szinten ezzel arányos vanilloid receptor-1 (VR1) depléciót észleltünk.
2. *In vitro* kísérleteinkben igazoltuk, hogy az általunk létrehozott heterológ VR1-expressziós rendszerek alkalmasak a receptor molekuláris farmakológiájának vizsgálatára.
3. Mind a heterológ VR1-expressziós sejtes rendszerekben, mind a natív VR1-t kifejező szenzoros neuronokban kimutattuk, hogy a VR1 lokalizáció (szignál) a belső membránokon is észlelhető.
4. Bebizonyosodott, hogy a kalcium-mentes közegben létrejövő VR1-dependens aktiváció során az intracelluláris kalciumemelkedés az endoplazmatikus retikulum (ER) kalcium raktáraiból történik; azaz az intracelluláris lokalizációjú VR1 is funkcionális, kalicumpermeabilis csatornaként működik.
5. Kimutattuk továbbá, hogy a VR1 aktiválódása során specifikus, dózis-függő, szelektív neuron depléció (neurotoxicitás) alakul ki, mely jól magyarázhatja az *in vivo* észlelt tartós antinociceptív hatást.
6. A majom agyban telíthető szaturációs kinetikával jellemezhető VR-t detektáltunk, melynek farmakológiai tulajdonságai jó egyezést mutattak a periférián észlelt VR1-el.
7. Az agyban leírt VR esetén majomban is hasonló szöveti megoszlást észleltünk, mint humán, illetve patkány mintákban.
8. A majom VR1 7-8-szor kisebb affinitással köti az RTX-et, mint a patkány variáns, így farmakológiai tulajdonságai jól közelítik a humán VR1-en mért értékeket.

KÖZLEMÉNYEK

AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ *IN EXTENSO* KÖZLEMÉNYEK

1. **Szabó T**, Oláh Z, Iadarola MJ, Blumberg PM (1999): Epidural resiniferatoxin induced prolonged regional analgesia to pain. *Brain Res* **840**: 92-98. **IF: 2,3**
2. Oláh Z*, **Szabó T***, Kárai L, Hough CR, Fields D, Caudle RM, Blumberg PM, Iadarola MJ (2001): Ligand-induced dynamic membrane changes and cell deletion conferred by vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* **276(14)**: 11021-11030. **IF: 7,25**
*megosztott elsőszersőség
3. **Szabó T**, Bíró T, Gonzalez AF, Palkovits M, Blumberg PM (2002): Pharmacological characterization of vanilloid receptor located in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* **98 (1-2)**: 51-57. **IF: 2,3**
4. Bíró T, Ko MC, Bromm B, Wei ET, Bigliardi P, Siebenhaar F, Hashizume H, Misery L, Bergasa NV, Kamei C, Schouenborg J, Roostermann D, **Szabó T**, Maurer M, Bigliardi –Qi M, Meingassner JG, Hossen MA, Schmelz M, Steinhoff M (2005): How best to fight that nasty itch – from new insights into the neuroimmunological, neuroendocrine, and neurophysiological bases of pruritus to novel therapeutic approaches. *Exp Dermatol* **14(3)**:225-40. **IF: 2,1**

EGYÉB *IN EXTENSO* KÖZLEMÉNYEK

5. Szállási Á, Bíró T, **Szabó T**, Modarres S, Petersen M, Klusch A, Blumberg PM, Krause JE, Sterner O (1999): A non-pungent triphenyl phenol of fungal origin, scutigerol, stimulates rat dorsal root ganglion neurons via interaction at vanilloid receptors. *Br J Pharmacol* **126(6)**: 1351-1358. **IF: 3,72**
6. Szállási Á, **Szabó T**, Bíró T, Modarres S, Blumberg PM, Krause JE, Cortright DN, Appendino G (1999): Resiniferatoxin-type phorboid vanilloids display capsaicin-like selectivity at native vanilloid receptors on rat DRG neurons and at the cloned vanilloid receptor VR1. *Br J Pharmacol* **128(2)**:428-434. **IF: 3,72**
7. Lee J, Lee J, Kim J, Kim SY, Chun MW, Cho H, Hwang SW, Oh U, Park YH, Marquez VE, Beheshti M, **Szabó T**, Blumberg PM (2001): N-(3-Acyloxy-2-benzylpropyl)-N'-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl) thiourea derivatives as potent vanilloid receptor agonists and analgesics. *Bioorg Med Chem* **9(1)**:19-32. **IF: 1,8**
8. Kedei N, **Szabó T**, Lile JD, Treanor JJ, Oláh Z, Iadarola MJ, Blumberg PM (2001): Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* **276(30)**:28613-28619. **IF: 7,25**
9. Kuzhikandathil EV, Wang H, **Szabó T**, Morozova N, Blumberg pM, Oxford GS (2001): Functional analysis of capsaicin receptor (vanilloid receptor subtype 1) multimerization and agonist responsiveness using a dominant negative mutation. *J Neurosci* **21(22)**:8697-8706. **IF: 8,18**

10. Tóth A, Kedei N, **Szabó T**, Wang Y, Blumberg PM (2002): Thapsigargin binds to and inhibits the cloned vanilloid receptor-1. *Biochem Biophys Res Commun* **293(2)**:777-782. **IF: 2,93**
11. Wang Y, Tóth A, Tran R, **Szabó T**, Welter JD, Blumberg PM, Lee J, Kang SU, Lim JO, Lee J (2002): High-affinity partial agonists of the vanilloid receptor. *Mol Pharmacol* **64(2)**:325-333. **IF: 5,48**
12. Wang Y, **Szabó T**, Welter JD, Toth A, Tran R, Lee J, Kang SU, Suh YG, Blumberg PM, Lee J (2002): High affinity antagonists of the vanilloid receptor. *Mol Pharmacol* **62(4)**: 947-956. **IF: 5,48**
13. Lázár J, **Szabó T**, Kovács L, Blumberg PM, Bíró T (2003): Distinct features of recombinant rat vanilloid receptor-1 expressed in various expression systems. *Cell Mol Life Sci* **60(10)**:2228-2240. **IF: 4,995**
14. Lee J, Kang SU, Lim JO, Choi HK, Jin MK, Tóth A, Pearce LV, Tran R, Wang Y, **Szabó T**, Blumberg PM (2004): N-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues as vanilloid receptor antagonists: analysis of structure-activity relationships for the "C-Region". *Bioorg Med Chem* **12(2)**:371-385. **IF: 2,0**
15. Lee J, Kim SY, Park S, Lim JO, Kim JM, Kang M, Lee J, Kang SU, Choi HK, Jin MK, Welter JD, **Szabó T**, Tran R, Pearce LV, Tóth A, Blumberg PM (2004): Structure-activity relationships of simplified resiniferatoxin analogues with potent VR1 agonism elucidates an active conformation of RTX for VR1 binding. *Bioorg Med Chem* **12(5)**:1055-1069. **IF: 2,0**
16. Lázár J, **Szabó T**, Marincsák R, Kovács L, Blumberg PM, Bíró T (2004): Sensitization of recombinant vanilloid receptor-1 by various neurotrophic factors. *Life Sci* **75(2)**:153-163. **IF: 2,15**
17. Pearce LV, Petukhov PA, **Szabó T**, Kedei N, Bizik F, Kozikowski AP, Blumberg PM (2004): Evodiamine functions as an agonist for the vanilloid receptor TRPV1. *Org Biomol Chem* **2(16)**:2281-2286. **IF: 2,2**
18. Lee J, Jin MK, Kang SU, Kim SY, Lee J, Shin M, Hwang J, Cho S, Choi YS, Choi HK, Kim SE, Suh YG, Lee YS, Kim YH, Ha HJ, Tóth A, Pearce LV, Tran R, **Szabó T**, Welter JD, Lundberg DJ, Wang Y, Lázár J, Pavlyukovets VA, Morgan MA, Blumberg PM (2005): Analysis of structure-activity relationships for the 'B-region' of N-(4-t-butylbenzyl)-N'-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]-thiourea analogues as TRPV1 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **15(18)**:4143-4150. **IF: 2,0**
19. Lee J, Kang SU, Kil MJ, Shin M, Lim JO, Choi HK, Jin MK, Kim SY, Kim SE, Lee YS, Min KH, Kim YH, Ha HJ, Tran R, Welter JD, Wang Y, **Szabó T**, Pearce LV, Lundberg DJ, Toth A, Pavlyukovets VA, Morgan MA, Blumberg PM (2005): Analysis of structure-activity relationships for the 'A-region' of N-(4-t-butylbenzyl)-N'-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues as TRPV1 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **15(18)**:4136-4142. **IF: 2,0**