

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

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

Dr. Szabó Tamás

Témavezető:
Dr. Bíró Tamás, egyetemi docens



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

**Debrecen
2006**

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS.....	3
A nociceptív neuronok	3
A kapszaicin-szenzitív neuronok.....	4
A kapszaicin celluláris hatásmechanizmusa.....	5
A vanilloid receptor-1 (VR1 vagy TRPV1)	6
A VR1-mediált sejtválaszok kalciumfüggése – a VR1 szubcelluláris lokalizációja.....	9
A VR1 központi integrátor szerepe a fájdalomérzés kialakításában.....	9
A VR1 különböző fajokban.....	10
A VR1 kifejeződése a központi idegrendszerben.....	12
A vanilloid vegyületekben rejlő potenciális terápiás lehetőségek	12
CÉLKITŰZÉSEK.....	16
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17
1. Az <i>in vivo</i> analgetikus hatás monitorizálása	17
Katéter behelyezés	17
A nociceptív válasz vizsgálata	17
2. <i>In vitro</i> vizsgálatok.....	19
^{[3]H} JRTX kötődési vizsgálatok membrán preparátumokon.....	19
Primer DRG kultúra készítése.....	21
A patkány VR1-et kifejező heterológ expressziós rendszerek létrehozása.....	21
^{[3]H} JRTX kötődési vizsgálatok sejteken	22
⁴⁵ Ca felvétel vizsgálata.....	23
Western (immuno) blot analízis	23
Fluoreszcens konfokális mikroszkópia.....	25
Ca ²⁺ -imaging mikrofluorimetriával.....	26
Konfokális mikroszkópos Ca ²⁺ -imaging Indo-1 AM festékkel	26
Feszültség-clamp elektrofiziológiai vizsgálatok.....	27
EREDMÉNYEK.....	28
1. AZ ULTRAPOTENS VR1 AGONISTA RTX <i>IN VIVO</i> (ANALGETIKUS) HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA	28
2. AZ RTX HATÁSA SEJTES RENDSZEREKBE – A DESZENZITIZÁCIÓ MOLEKULÁRIS MECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA	33
A VR1 kiméra-fehérjék expressziójának és funkcionalitásának vizsgálata.....	33
A VR1eGFP intracelluláris lokalizációjának vizsgálata – az RTX hatására bekövetkező celluláris változások dinamikájának és morfológiájának „real-time” követése	36
A VR1-expresszálok sejtekben észlelt celluláris változások kalciumfüggése	39
3. A VR1-EXPRESSZIÓ A KÖZPONTI IDEGRENDszerben - A VR1 MOLEKULÁRIS FARMAKOLÓGIAI VIZSGÁLATA MAJOM AGYBAN (SZÖVETI DISZTRIBÚCIÓ, FARMAKOLÓGIAI PARAMÉTEREK)	45
Specifikus ^{[3]H} JRTX kötődés vizsgálata gerincvelői és hátsó gyöki ganglion (DRG) mintákon	45
Specifikus ^{[3]H} JRTX kötődés vizsgálata majom agy különböző régióiban.....	47
MEGBESZÉLÉS.....	50
1. Epidurális RTX által kiváltott hatásos regionális analgészia	50
2. A vanilloid vegyületek által kiváltott, VR1-mediált szelektív citotoxicitás jelentősége.....	52
3. Az agyban expresszáldó VR1 lokalizációja és molekuláris farmakológiája.....	56
4. A mechanizmustól a terápiáig: agonista, antagonisták és parciális agonisták?	59
ÖSSZEFOGLALÁS.....	60
IRODALOMJEGYZÉK.....	61
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	70
KÖZLEMÉNYEK	71

BEVEZETÉS

A nociceptív neuronok

A fájdalmas (azaz potenciálisan vagy valóban szöveti károsítást kiváltó fizikai, kémiai és termális) ingerek érzékelése speciális primer afferens szenzoros neuronok (ún. nociceptorok) perifériás végződésein keresztül történik. Ezen afferensek sejttestjeinek elhelyezkedése három fő reprezentációs területet rajzol ki: i) a hátsó gyöki ganglionok (DRG) nociceptorai a végtagok, a törzs és a viscerális lemezek innervációját ellátva a gerincvelő hátsó szarvának interneuronjaihoz szállítanak érző információt; ii) a trigeminális ganglionok (TG) nociceptorainak perifériás nyúlványai a fej, szájüreg és a nyak innervációját biztosítják és a centrális nyúlványaik az agytörzsi trigeminális magba érkeznak; iii) ganglion nodosa perifériás nyúlványai a viscerális szövetek beidegzését biztosítják, míg centrális nyúlványai az agytörzsi trigeminális magba érkeznak (Millan, 1999; Snider *et al.*, 1998).

A primer afferens neuronokon belül a nociceptorok két alcsoportja különíthető el: 1) a kis átmérőjű C-rosttal rendelkező idegsejtek ($<30\ \mu\text{m}$), melyek velőshüvely nélküli lassú vezetésű axonnal rendelkeznek; 2) az A δ rosttal rendelkező nociceptorok sejttestjei közepes átmérőjűek, axonjuk gyorsabb konduktanciájú, mérsékelten velőshüvelyes. A C-rosttal rendelkező neuron alcsoport tagjait polymodális nociceptoroknak is nevezik, minthogy mindhárom fő fájdalom ingerre (mechanikai, kémiai és hő) képesek válaszolni, míg más primer érzősejtek csak ezek egy részére (Lang *et al.*, 1990; Lynn és Carpenter 1982). Megállapították, hogy C-típusú idegrostokban gazdag a bőr (Szolcsányi, 1977), a cornea, a száj nyálkahártya (Szolcsányi és Jancsó, 1975), az izmok (Kaufman *et al.*, 1982), ízületek (He *et al.*, 1988), valamint a kardiovaszkuláris, respiratorikus és genitourinális rendszerek is (Maggi *et al.*, 1986; Szolcsányi, 1993).

A kapszaicin-szenzitív neuronok

Már Jancsó (Jancsó, 1968) is felismerte, hogy ezen polymodális (C-típusú) 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 (Bevan *et al*, 1990; Holzer 1991; Szállási és Blumberg 1999). 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 érző idegvégződés (a neuronok aktiválódása után) a perifériás nyúlványaikban raktározott különféle (főként pro-inflammatorikus hatású) neuropeptidet (mint pl. a P-anyag [SP], a calcitonin génkapcsolt peptid [CGRP] és egyéb neuroaktív anyagokat (Holzer, 1988)) szabadítanak fel lokálisan. A felszabadult anyagok ezután az innervált szervek (bőr, szív, zsigerek, húgyhólyag, nyálkahártyák stb.) nem-neuronális sejtjein – pl. keratinocyták, hízósejtek, makrofágok, glia sejtek – hatva résztvesznek a lokális trófikus, vazoregulátorikus és immunomodulátorikus folyamatokban, amelyek kóros, kaszkád-szerű felerősödése a kapszaicin második fontos *in vivo* hatása, a neurogén gyulladás kifejlődéséhez vezet (Geppeti és Holzer, 1996).

Felmerül a kérdés, mi lehet a fiziológiás szerepe az érző sejtek efferens funkciójának? A felszabaduló peptidek gyulladásos sejteket (hízósejtek, makrofágok stb.), szérum faktorokat modulálnak, melyek a gyulladásban, sebgyógyulásban fontos szerepet játszanak. A neurogén peptidek és egyéb vezikuláris elemek felszabadulása a perifériás végződésekből emellett non-inflammatorikus válaszokat (szekréció, simaizom összehúzódás stb.) is beindíthatnak. Ugyanakkor patológiás körülmények között a fent említett neuropeptidek kóros mennyiségű felszabadulása hozzájárulhat bizonyos, a gyulladásos adaptáció kisiklásaival jellemezhető

kórképek (asthma bronchiale, colitis ulcerosa, interstitiális cystitis, arthritis stb.) kialakulásához, vagy súlyosbodásához (Campbell *et al*, 1993; Lundberg, 1993; Yiangou *et al*, 2001). Ennek jelentősége – a patofiziológiai folyamatok megismerésén túl – a fenti kórképek kezelésében alkalmazható új terápiás stratégiák kidolgozásában lehet (lásd később).

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 ionok sejtbe áramlása azok depolarizációjához vezet (Marsh *et al*, 1985), valamint megváltoztatja a sejt feszültség-vezérelt K^{+} -, Na^{+} - (Petersen *et al*, 1987), valamint Ca^{2+} -csatornáinak (Docherty *et al*, 1991) aktivitását. A DRG neuronokon végzett teljes sejt feszültség-clamp kísérletek azt is megmutatták, hogy a kapszaicin elsősorban a divalens kationok beáramlását segíti elő (Bevan és Docherty, 1993; Liu és Simon, 1994). A kifejezett kationpermeabilitás növekedést számos egyéb módszerrel is demonstrálták, így ^{45}Ca -felvétellel (Wood *et al*, 1988), valamint Ca^{2+} -szenzitív fluoreszcens festékek alkalmazásával is (Bleakman *et al*, 1990).

A kapszaicin által kiváltott aktiváció (excitáció) során *in vivo* először nociceptív ingerekre észlelhető fokozott érzékenység (hyperalgesia vagy allodynia) észlelhető. Az aktivációt típusosan egy hosszabb refrakter periódus követ, melynek során *in vivo* relatív válaszképtelenség észlelhető kapszaicin és egyéb fájdalomingerek iránt. Ezen mechanizmust Jancsó nyomán mindmáig deszenzitizációnak nevezzük (Jancsó *et al*, 1977), mely a kapszaicin hatására bekövetkező második celluláris válasz. A szenzoros neuronok kapszaicin

által kiváltott deszenzitizációjának két formáját különítették el. Az ún. farmakológiai deszenzitizációt, ahol kapszaicin hosszantartó vagy ismételt adagolását követően a sejtek elvesztik kapszaicin iránti érzékenységüket (homológ deszenzitizáció) (Szolcsányi 1977; Winter *et al*, 1990), valamint az ún. funkcionális deszenzitizációt vagy defunkcionalizációt, amely során a sejtek nemcsak kapszaicin, hanem egyéb fájdalomkeltő (kémiai, hő, mechanikai) ingerek iránt is érzéketlenné válnak (heterológ deszenzitizáció) (Holzer 1991). Feltételezték, hogy míg a homológ deszenzitizációt a sejten belül megemelkedett intracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_i$), illetve az általa kiváltott folyamatok hozzák létre, addig a heterológ deszenzitizáció a neuropeptid raktárak kiürülésének, a depolarizáció következtében kialakuló megváltozott membrán sajátosságoknak, valamint a kalcium által kiváltott intracelluláris károsodásnak a következménye (Jancsó *et al*, 1984, Docherty *et al*, 1991).

A kapszaicin celluláris hatását talmányozva végezetül megállapítható, hogy az alkaloida elég nagy koncentrációban, elég hosszú ideig alkalmazva, a sejteken egy harmadik jellegzetes folyamatot, a neurotoxicitást váltja ki. Ezen folyamat leginkább a megemelkedett intracelluláris kalciumszintnek, a mitokondriális kalciumakkumulációnak és a kalcium-függő proteázok fokozott működésének tulajdonítható (Wood *et al*, 1988, Winter *et al*, 1990, Holzer 1991).

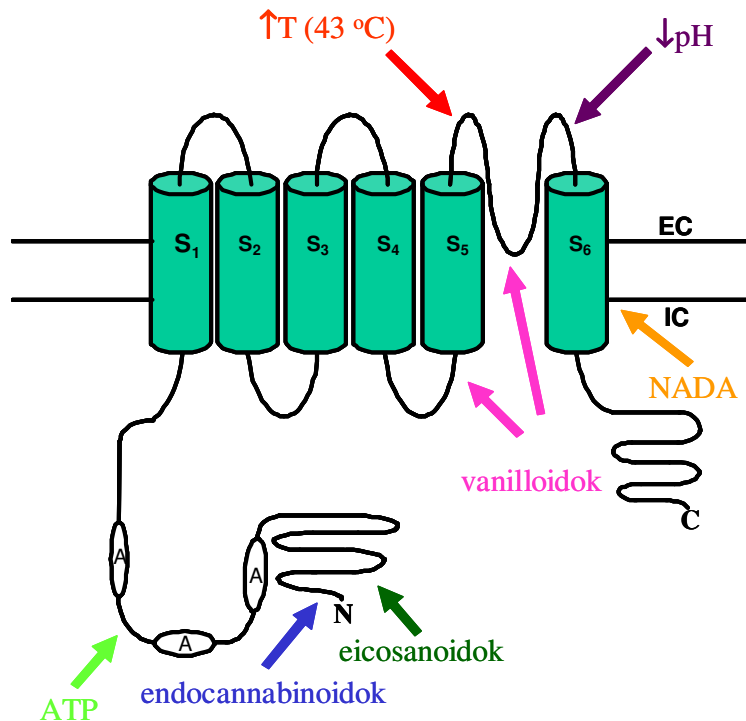
A vanilloid receptor-1 (VR1 vagy TRPV1)

Jancsó már 1968-ban felvetette egy ún. "fájdalom-receptor" meglétének szükségszerűségét (Jancsó 1968), melyet a szenzoros neuronok fent bemutatott populációjának szelektív kapszaicin-érzékenységével magyarázott. A technikai eszköztár fejlődésével (patch-clamp technika, intracelluláris ionmérés) felismerték a kapszaicin funkcionális támadáspontját, amely egy nem-specifikus kationcsatornának bizonyult (Wood *et*

al, 1988, Winter *et al*, 1990, Oh *et al*, 1996). Kiderült továbbá az is, hogy a csatorna nagyfokú Ca^{2+} -permeabilitást mutat, így aktivációja következményeként jelentősen megemelkedik az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Bleakman *et al*, 1990, Cholewinski *et al*, 1993).

A receptor farmakológiai vizsgálatát nagymértékben megkönnyítette a vanilloid csoportot hordozó ultrapotens kapszaicin analóg, az *Euphorbia resinifera* tejnedvéből izolált forboid alkaloida, a resiniferatoxin (RTX) (valamint radioaktívan jelzett formájának, $[3\text{H}]\text{RTX}$) felfedezése, illetve előállítása (Hergenhahn *et al*, 1975; Szállási és Blumberg, 1990). Kiderült, hogy az RTX alig mutatja phorbol-észterekre jellemző biológiai tulajdonságokat (a protein-kináz C-hez is igen alacsony affinitással kötődik), ugyanakkor a C-20-as pozícióban homovanillyl csoporttal észterifikált, melynek nagy jelentőséget tulajdonítanak a kapszaicin és rokon vegyületek irritatív tulajdonságában (részletesen Szállási és Blumberg, 1989).

A molekuláris biológiai technikák robbanásszerű fejlődésének köszönhetően végül 1997-ben megtörtént az első kapszaicin-érzékeny specifikus molekula, a vanilloid (kapszaicin) receptor (VR1) molekuláris karakterizálása (Caterina *et al*, 1997), először patkány species cDNS könyvtárát felhasználva. A patkány VR1 egy 2514 nukleotidból, azaz 838 aminosavból álló, 95 kDa tömegű fehérje, mely 6-transzmembrán doménnel rendelkezik (Caterina *et al*, 1997) (1. **ábra**). Struktúrális sajátosságai alapján a VR1 homológiát mutat a *Drosophila melanogaster* retinájában megtalálható TRP (transient receptor potential) proteinnel, ezért a TRP receptor család egyik altípusának tekinthető. Ezen receptorokat a non-szelektív kationcsatornák nagycsaládjába sorolják, melynek tagjai a TRPV (vanilloid), TRPC (canonical), TRPM (melastatin), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin), TRPA (ankyrin) és TRPN (NOMP) csoportok (Montell *et al*, 2002). Ezen besorolás alapján a szakirodalomban a VR1-t TRPV1-nek (transient receptor potential vanilloid-1) nevezik (Montell *et al*, 2002; Gunthorpe *et al*, 2002).



1. ábra A VR1 sematikus szerkezete és működését befolyásoló molekulák összefoglalása

A VR1 szerkezetét tanulmányozva megállapították, hogy a csatorna 6-transzmembrán doménnel, valamint intracelluláris N- és C-terminálissal rendelkezik, és valószínűleg tetramer formában van jelen a sejtek membránjában (Kedei *et al*, 2001; Kuzhikandhatil *et al*, 2001). 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 (potenciális protein kináz A foszforilációs helyek) (Caterina *et al*, 1997; Kwak *et al*, 2000; Bhawe *et al*, 2002, 2003); az ugyancsak az intracellulárisan elhelyezkedő vanilloid (azaz a kapszaicint és ultrapotens analógiát, az RTX-et felismerő) kötőhely; valamint az extracelluláris oldalon található allosztérikus modulációs helyek (Garcia-Martinez *et al*, 2000; Jordt *et al*, 2000). Kimutatták végül, hogy hasonlóan a szenzoros neuronokon megtalálható VR-hoz, a klónozott VR1 is funkcionális, nem-specifikus, főként Ca^{2+} -ionokra permeábilis (relatív permeabilitása Ca^{2+} -ra nézve $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ közelítőleg 10) csatornaként működik (Caterina *et al*, 1997).

A VR1-mediált sejtválaszok kalciumfüggése – a VR1 szubcelluláris lokalizációja

A VR1 aktiválódása után kialakuló komplex folyamatsor vizsgálata során az egyik legfontosabb cél – a különféle vanilloid vegyületek heterogenitásának megállapításán túl (Ács *et al*, 1997; Szállási, 1999) – a VR1-mediált jelenségek extracelluláris kalciumkoncentrációtól ($[Ca^{2+}]_e$) való függésének elemzése volt. Főként a patch-clamp technika alkalmazása során kiderült, hogy a vanilloid vegyületek által kiváltott membránáramok jellegzetességei csak kismértékben (Tominaga *et al*, 1998), míg a tachyphylaxis (deszenzitizáció) tulajdonságai a legtöbb kísérletes elrendezésben jelentősen függték $[Ca^{2+}]_e$ -től (Docherty *et al*, 1996; Koplas *et al*, 1997).

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 (Cholewinski *et al*, 1993; García-Hirschfeld *et al*, 1995; Savidge *et al*, 2001). Ezzel ellentétben, mások azt találták, hogy a VR1-mediált sejtválaszok kalciummentes közegben is kiválthatók (Ács *et al*, 1997; Eun *et al*, 2001).

A VR1 központi integrátor szerepe a fájdalomérzés kialakításában

A VR1 molekuláris biológiai leírását követően elvégzett nagyszámú kísérletnek köszönhetően kiderült az is, hogy ezen receptort nemcsak az exogén vanilloid vegyületek, hanem számos, a szervezetben képződő (azaz endogén), főként a fájdalom kialakításában központi szereppel bíró molekula is képes aktiválni. Ezek közül a VR1 legfontosabb endogén aktivátorának („ligandjának”) tekinthető az alacsony küszöbű ($\sim 43^\circ C$) hőmérsékletemelkedés, valamint a pH csökkenése (acidózis) (Caterina *et al*, 1997; Tominaga *et al*, 1998) (**1. ábra**). Megállapították ugyanakkor azt is, hogy e hatások mellett számos,

leginkább gyulladáshoz közlő mediátornak tekinthető anyag (pl. bradikinin, extracelluláris ATP, arachidonsav-származékok, leukotriének, lipid-peroxidáció termékei, stb.) is képes a VR1 működését pozitívan befolyásolni (Hwang *et al*, 2000; Tominaga *et al*, 2001; Premkumar *et al*, 2001). Ezen ágensek egyrészt direkt módon (azaz a VR1-hez közvetlenül kapcsolódva) aktiválhatják a receptort (pl. hő, acidózis), másrészt (főként metabotróp) saját receptoraikhoz kötődve, intracelluláris jelátviteli útvonalak (kináz-rendszerek, intracelluláris hírvivők) módosítása révén szabályozzák a VR1 működését. Ilyen allosztérikus módosító hatás lehet az, hogy ezek az anyagok a VR1 hőérzékenységi küszöbét (43 °C) lecsökkentik, azaz a receptor már fiziológiás hőmérsékleten (37 °C) is aktiválódik és fájdalomérzést vált ki (termális hyperalgesia) (Tominaga *et al*, 1998; Caterina *et al*, 2000). A szenzitizáció mechanizmusának köszönhetően így lehetővé válik a fájdalom *in vivo* percepciója (azaz az egyed létét fenyegető “noxa” érzékelése), emellett pl. gyulladáshoz közlő állapotokban az effektor sejtek mozgósítása is eredményesebb lehet. A VR1 szerepét bizonyítja a fenti folyamatokban a VR1 knock-out egerekkel végzett kísérletek eredménye is, miszerint ezen állatokban (a természetesen hiányzó vanilloid-érzékenység mellett) főként a termális-gyulladáshoz közlő hyperalgesia jelensége hiányzik (Tominaga *et al*, 1998; Caterina *et al*, 2000). 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; azaz, vajon mi az oka annak, hogy a vanilloidok által kiváltott biológiai válaszok különböző fajokban eltérőek? Gyakran említett példa, hogy adott kapszaicin dózist, ami egy tengeri malaccal vagy patkánnyal másodpercek alatt végezne, igen jól tolerálhatnak a hüllők vagy madarak. Megállapították, hogy a madár nem érzékeny kapszaicinre (Jancsó, 1968) és radioaktív [³H]RTX ligandot sem köt (Szállási, 1999).

Ugyanakkor az alacsony küszöbű hőérzékelés képessége prezervált nociceptoraiban, mely arra utal, hogy a madarakban található VR1 homológból hiányzik a vanilloid szenzitivitásért felelős szekvencia (Nagy és Rang, 2000). A csirke VR1 klónozása igazolta a várakozásokat; a kutatók (a faj-specifikus szekvencia eltérésekre fókuszálva) a 3. transzmembrán doménon azonosítottak egy 8 aminosavból álló részletet, mely a vanilloid szenzitivitásért felelős (Jordt *et al*, 2002).

Az emlősök közül a nyúlban észleltek hasonló marginális érzékenységet vanilloidokra. Ezzel összhangban specifikus [^3H]RTX kötődést nyúl TG membrán preparátumon nem sikerült detektálni. VR1 szekvencia analízis a patkány, madár és nyúl VR1 vonatkozásában kritikus eltéréseket észlelt, mely a fenti különbségeket magyarázhatja (saját nem publikált vizsgálataink). Ugyanakkor a hörcsögben megfigyelt relatív vanilloid inszenzitivitás háttérében más mechanizmust találtak. 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 (Szállási *et al*, 1993 a, b). 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 (Szállási *et al*, 1995).

Úgy tűnik tehát, hogy az egyes fajok eltérő vanilloid érzékenysége mögött eltérő neurotranszmitter mintázat, a VR1 eltérő expressziós szintjei vagy eltérő szekvenciája (vanilloid kötő képtelensége) állhat. Számos példa bizonyítja, hogy mindhárom felvázolt mechanizmus releváns lehet a fajok közt megfigyelhető eltérő vanilloid hatás háttérében. Mindezek fontos következménye, hogy az állatkísérletek adatai csak nagy körültekintéssel

extrapolálhatóak emberre, mind a hatás, mind az esetleges toxicitás megítélésében. A klónozott humán VR1 részletes farmakológiai jellemzése ezt szintén megerősítette (Hayes *et al*, 2000; Smart *et al*, 2001).

A VR1 kifejeződése a központi idegrendszerben

A VR1-ral kapcsolatos további probléma, melynek „megoldásában” talán még máig sem született egységes álláspont, a VR1 szöveti eloszlásának pontos leírása. A VR1 molekuláris karakterizálása során (Caterina *et al*, 1997) a teljes VR1-specifikus mRNS transzkriptet Northern blot vizsgálattal csak az érző ganglionok nociceptoraiban sikerült kimutatni (Tominaga *et al*, 1998; Guo *et al*, 1999). Ugyanakkor régóta ismert, hogy a központi idegrendszer különböző területeire adott kapszaicin biológiai választ eredményez és jellegzetes morfológiai változásokat okoz (Hajós *et al*, 1987, 1988). Ennek megfelelően a [³H]RTX alkalmazásával nagy affinitású specifikus kötődést sikerült detektálni különböző agyi struktúrákhoz, amelyek primer érző afferentációt jelenlegi ismereteink szerint nem kapnak (Ács *et al*, 1996). A vanilloid receptor klónozása emellett lehetővé tette, hogy DNS, mRNS és fehérje szinten is megerősítsék a korábbi megfigyeléseket. Így VR1-specifikus immunreaktivitást észleltek az agy kiterjedt területein (Mezey *et al*, 2000) valamint, RT-PCR és in situ hybridizációs detekciós módszerekkel, VR1 expressziót észleltek az agyban (Sasamura *et al*, 1998). Mindezen eredmények – habár igazolják a VR1 autonóm expresszióját az agyban – az „agy” VR1 biológiai szerepét még korántsem tisztázták.

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. A következőkben néhány, a disszertációban részletezendő kísérletekhez szorosan kapcsolódó terápiás alkalmazást mutatunk be.

A vanilloid-szenzitív idegvégződések számos reflexműködésben, így a micturációs (vizelési) reflex kialakításában is fontos szerepet játszanak (Maggi *et al*, 1988, 1989). A micturációs reflex a leszálló supraspinalis pályák inhibitoros kontrollja alatt áll. Amennyiben pathológiás körülmények között (pl. trauma, sclerosis multiplex) ezek a gátló pályák sérülnek, akkor a hólyagműködés autonómmá válik és már igen kis hólyagkapacitásnál urgens vizelési inger jelentkezik. Ezt az állapotot detrusor hyperreflexiának nevezik. Kimutatták, hogy a hólyag átöblítése lokálisan adagolt kapszaicinnal (feltehetően a szenzoros idegvégződések deszenzitizációja révén) jelentősen javította a hólyag motorikáját (Cruz *et al*, 1998). A kapszaicinnal végzett kezdeti próbálkozások eredményességét ugyanakkor jelentősen rontotta a gyakran igen jelentős fájdalom (azaz a neuronok excitációja). Így a kutatók figyelme a kedvezőbb farmakológiai profillal (minimális kezdeti excitációt követő intenzív, tartós deszenzitizáció) rendelkező vegyületek felé fordult. E molekulák legkiemelkedőbb képviselője a RTX, mely *in vivo* kísérletek alapján mintegy 1000-szer potensebb deszenzitizáló ágens (részletesen Szállási és Blumberg, 1999). Sikeres klinikai vizsgálatok sora indult tehát, intravesicalis resiniferatoxint alkalmazva, detrusor hyperreflexiás betegekben (Lazzeri *et al*, 1997; Cruz *et al*, 1997). Megállapították, hogy már egyszeri, lokális RTX adagoláskor is jelentősen nőtt a hyperreaktív hólyaggal rendelkező betegek hólyagkapacitása, a kezdeti irritáció minimális volt, a hatás pedig hetekig eltartott (Cruz *et al*, 1997).

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 (pl. SP, CGRP) mikrocirkulációt javító hatásával magyarázzák (lásd korábban) (Szállási és Blumberg, 1996). A topicalisan alkalmazott kapszaicint, mint adjuváns analgetikumot, emellett számos neuropathiás fájdalommal járó állapotban is kipróbálták, így pl. postherpeses neuralgiában, diabeteses neuropathiában, mastectomiát követő fájdalom esetében (összefoglalva Bíró *et al*, 1997).

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 (Schmelz *et al*, 2000, 2001). 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 chelstatisis pruritus, stb) (Ellis *et al*, 1993; Wallengren *et al*, 1995; Tarng *et al*, 1996; Steinhoff *et al*, 2006; Paus *et al*, 2006).

További érdekes megfigyelés, hogy topicalis, intranasalisan adott kapszaicin jelentősen csökkentette a vasomotoros rhinitis tüneteit (La Croix *et al*, 1991; Blom *et al*, 1997), míg egyszeri intranasalisan alkalmazott kapszaicin hatékonynak bizonyult pollen által kiváltott allergiás rhinitishez társuló orrdugulósos tünetek hosszan tartó enyhítésében (Stjärne *et al*, 1998).

Mindezek alapján a VR1-en ható szerek létjogosultsággal bírhatnak a fenti kórállapotok terápiájában. Természetesen további kísérletek szükségeltetnek annak

feltérképezésére, hogy 1) milyen funkcionális sajátosságokkal bír a számos egyéb sejtfeleségen (pl. bőr keratinocyták, hízósejtek, dendritikus sejtek) leírt ún. nem-neuronális VR1 (Bíró *et al*, 1998; Bodó *et al*, 2004, 2005); 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 dóziszfüggése 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 sejtфизиológiai változásokat kívántuk vizsgálni. Ennek során feltérképeztük a morfológiai és elektrofiziológiai változások közti kapcsolatot, mind VR1-expresszálo heterológ sejt rendszerben, mind natív DRG neuronokban. Vizsgáltuk azt is, hogy az extracelluláris kalcium jelenléte nélkül létrejövő sejt válaszok mivel magyarázhatók; azaz lehetséges-e, hogy a VR1 az intracelluláris membránokban is beépül. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy van-e a „belső” membránokban lokalizálódó VR1-nek funkcionális kapcsolata az intracelluláris kalciumraktárakkal?

3. Végezetül kísérleteink harmadik részében, az agyban expresszálo VR1 farmakológiai vizsgálata során, a következőkre kerestünk választ: Melyek azok a régiók, ahol a legnagyobb sűrűségben expresszálo 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

Katéter behelyezés

Az epidurális katéter beültetése a korábbi ajánlások szerint (Durant *et al.*, 1986) történt. Steril körülmények között, az L3-L5 csigolyák magasságában ejtett 1-2 cm-es feltárásból 22G-s méretű polyurethan katéterek (Braintree Scientific, Braintree, MA, USA) kerültek beültetésre caudális irányban kb. 1-1,5 cm-rel felvezetve az epidurális térbe. A behelyezést követően a katéterek heparinos-sós atmoszája, majd subcután csatornán történő átvezetésére, végül a lezárt katétervég sebzárást követő kiültetésére került sor.

A nociceptív válasz vizsgálata

A nociceptív válaszkésztséget egy ún. plantáris analgémia-mérő segítségével vizsgáltuk, a Hargreaves által leírt módon (Hargreaves *et al.*, 1988). A mérő alkalmas arra, hogy tizedmásodperc pontossággal mérjük a mancs visszahúzásának latencia idejét, fájdalmas hőinger alkalmazását követően. Ez lehetőséget nyújtott arra, hogy a hátsó mancsokon mért latencia időket (lumbális epidurális kezelés esetén a hatás elsődleges helye a hátsó végtagok) összevessük az elülső végtagoknál mért hasonló időekkel (belső kontroll), valamint a vivőanyaggal kezelt kontroll állatok hasonló mérési adataival. A kísérletek kezdetekor ellenőriztük, hogy a katéter behelyezés kapcsán az állatoknál neurológiai deficit nem alakult-e ki. A mérő ketrecbe helyezett állatnak kb. 5 perc állt rendelkezésére, hogy környezetéhez hozzászokjon. Ezt követően a hőforrást az állat mancsa alá irányítva megkezdtük a mérést. A hőforrás aktiválódásakor egy elektromos stopper is automatikusan működésbe lépett és detektálta a latenciaidőt, vagyis a láb elhúzásáig eltelt időt, 0,1 másodperces pontossággal. A hő okozta sérülés elkerülésére a hőforrás 35 sec elteltével automatikusan kikapcsolódott (cut off time). A fenti kísérleti körülmények között látható szövetsérülést nem észleltünk.

Epidurális kezelés során a hatóanyag (RTX) vagy vivőanyag 40 µl-ét injektáltuk a katéterbe, melyet a katéter holtterének megfelelő mennyiségű (10 µl) sóoldattal bemostunk. Az RTX-ből 1, 3, 10, 30, 100 µg/kg hatóanyagot adtunk 10 % etanol, 10 % Tween-80 és 80% 0,15 M NaCl összetételű vivőoldatban. Az oldatok bejuttatására Hamilton HPLC üveg fecskendőket használtunk (25-100 µl, 22-gauge tűk, Phenomenex, Torrance, CA, USA). A szubkután (szisztémás adagolás) kezelt állatokban az RTX dózisát 3-300 µg/kg közötti koncentrációtartományban alkalmaztuk, max. 250 µl összmennyiségben. Az oldatokat minden esetben steril körülmények között készítettük el. Az oldatok beadása során az állatokat 60-90 másodpercre oxygen/isofluran gázkeverékkel elbódítottuk. A beadás előtt meghatároztuk az alap latenciaidőket, majd ezt követően (10-15 perccel később) beadtuk a teszt dózisokat. Minden állatot vizsgáltunk neurológiai deficit kizárása céljából. Hat állatot kezeltünk minden hatóanyag koncentrációval, míg 6 állat csak vivőanyagot kapott (vivőanyag kontroll). Dózis-hatás vizsgálatot végeztünk az idő függvényében, a deszenzitizáció kialakulásának és fennmaradásának megítélésére. Az első 6 órás periódusban (deszenzitizáció kialakulása) méréseket végeztünk kezdetben 30 perces gyakorisággal mind a mellső-és hátsó mancsokon. Ezt követően a mérésekre 9, 12, 20, 24 órával később, majd egy hétig naponta került sor. A mérések végeztével az állatokat eutanizáltuk. A katéter megfelelő pozíciójának bizonyítására a kísérlet végén (az eutanázia előtt) minden állat epidurális katéterébe 20 µl metilénkék festékoldatot injektáltunk. Öt állatot – nem megfelelő katéter pozíció miatt – kizártunk a statisztikai feldolgozásból. 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 [³H]RTX kötődési vizsgálatokat gerincvelőből, DRG-ből és különböző agyi régiókból származó minták membrán preparátumain végeztük. A DRG, gerincvelő és agyi régiók mikrodisszekált mintái *Cynomolgus* majmokból (n=8) kerültek eltávolításra. A majmokból – melyek más vizsgálatok kontroll állatai voltak – származó idegszövetek Dr. U. Thorgeirsson (National Cancer Institutes) nagylelkű adományaként kerülhettek feldolgozásra. A membrán preparátumokat a korábban közölt protokoll szerint készítettük (Ács *et al*, 1994). A kísérleti állatokból eltávolított szövetmintákból homogenizátumot készítettünk jéghideg puffer A-ban (10 mM HEPES, 5 mM KCl, 5,8 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,75 mM CaCl₂, 12 mM glükóz, 137 mM szukróz, pH 7,4, minden anyag a Sigma-Aldrich-től vásárolva, St. Louis, MO, USA). A homogenizált mintákat először 1000 x g sebességgel 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk, majd a felülúszó eltávolítását követően a pelletet puffer A-ban reszuszpendáltuk. A mintákat ezt követően ismét centrifugáltuk 35000 x g-vel 40 percig 4 °C-on. A pelletet ismét puffer A-ban reszuszpendáltuk és a kötési kísérletekhez 2 mg/ml körüli fehérje koncentrációra hígítottuk. A felhasználásig az elkészített membrán preparátum mintákat –70 °C-on tároltuk.

A kötődési vizsgálat során 100 µg membrán proteint 200 pM [³H]RTX-nal (Chemical Synthesis. and Analysis Laboratory, NCI-FCRDC Frederick, MD, USA) inkubáltunk 60 percig 37 °C-on összesen 300 µl puffer A-ban, melyet 0,25 mg/ml borjú szérum albuminnal (BSA, Sigma) kiegészítettünk. A BSA hozzáadásának célja az volt, hogy az RTX nem-specifikus kötődését a felszínhez csökkentsük. Az inkubációs periódus végén a csöveket jégre helyeztük és a mintákhoz a nem-specifikus [³H]RTX kötődés további csökkentésére 100 µg α₁-acid glycoproteint (AGP, orosomucoid, Sigma) adtunk 50 µl térfogatban. A kötött és szabad [³H]RTX elválasztásához a mintákat 10000 x g-vel 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk.

A specifikus kötődés meghatározásához a pelletet tartalmazó műanyag tubusok (Eppendorf tubus, Eppendorf, Westbury, NY, USA) végét, amely a membránhoz kötött radioaktív anyagot tartalmazta, levágtuk.

A humán-és majom idegszövetekből készült membránpreparátumok esetében a nem-specifikus kötődés meghatározása 1 μ M nem-radioaktív RTX (LC Laboratories, Woburn, MA, USA) jelenlétében történt. Ehhez minden tubusból a felülúszó 100 μ l-es mennyisége is mérésre került. A kötődési paraméterek meghatározásához használt [3 H]RTX koncentrációja 10-3000 pM volt. A kompetíciós kísérletekben a specifikus [3 H]RTX kötődés, nem-radioaktív RTX, kapszaicin (Sigma) vagy kapszazepin (LC Laboratories) általi gátlását mértük 500 pM [3 H]RTX jelenlétében. A kötődési vizsgálatok minden kísérletben, minden egyes mintavételi pont esetében három edény átlagából határoztuk meg. Minden kísérletet legalább három alkalommal végeztünk. Mind a szabad, és a kötött radioaktivitást (10 órás egyensúlyi idő leteltével, 5 percig mérve) szcintillációs számolóval határoztuk meg.

A kötődés egységét fmol/mg fehérje egységben fejeztük ki. A [3 H]RTX kötődés vizsgálata során nyert dózis-hatás görbéket a Hill-egyenlettel illesztettük, a korábban közöltek szerint (Endrényi *et al*, 1976; Ács *et al*, 1996). $B = (B_{\max}^* L_H^n) / (K_d^n + L_H^n)$, ahol B a specifikusan kötött [3 H]RTX-et, $B_{\max}$ a receptor denzitást, L_H a nem kötött [3 H]RTX-et, míg a K_d érték azt a [3 H]RTX koncentrációt jelenti amelynél a receptorok fele köti ligandját. Az egyenletben szereplő n érték a kooperativitás jellemzésére alkalmas ún. Hill koefficiens. Ha $n=1$, a receptorok egymástól függetlenek; az $n>1$ érték kooperativitást jelez a receptorok vagy kötőhelyek közt; míg $n<1$ negatív kooperativitást jelöl (Davis *et al*, 1977). Azokban a kísérletekben, ahol a kötőhelyeken a [3 H]RTX-t emelkedő koncentrációjú nem-radioaktív ligand (RTX, kapszaicin, kapszazepin) szorította le, 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 (a meninxekkel együtt), majd 0,125%-os tripszin oldatban emésztettük 37 °C-on 20 percig. A leoltáshoz a mechanikai triturálás segítségével nyert disszociált sejteket Minimal Essential Mediumba (MEM) helyeztük, amely 5%-os lószérumot (HS, Sigma) és 50 ng/ml nerve growth factort (NGF, Promega, Madison, WI, USA) tartalmazott. A sejteket 25 mm-es üveg tárgylemezekre vagy multiwell plate-re vittük, majd Dulbecco's Modified Eagle's Mediumban (DMEM, Sigma) növeltünk, mely 20 mM HEPES, 7,5 % főtális borjú savó (FBS), 7,5 % HS-t, 2 mg/ml 5-fluouracil (mind Sigma), valamint a sejtnövekedést és idegi differenciálódást elősegítő 50 ng/ml NGF kiegészítőket tartalmazott. A primer DRG kultúrákat átlagosan egy héttel a leoltás után használtuk fel, amikor a nem-osztódó neuronális elemek domináltak a tenyészetben.

A patkány VR1-et kifejező heterológ expressziós rendszerek létrehozása

Az üveg fedőlemezen tenyésztett COS7, NIH3T3 vagy HEK 293 sejteket 1-2 µg VR1eGFP plazmiddal vagy kontrollként használt üres vektorral (eGFP plazmid) transzfektáltunk, LipofectAMINE (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) transzfekciós reagens felhasználásával, a gyártó által javasolt protokollnak megfelelően. A VR1-t tartalmazó vektort a következőképpen készítettük: a VR1-t kódoló mRNS transzkripteket patkányok (12 db Sprague-Dawley patkány) DRG-ból nyertük, teljes RNS izolálásával, TRI REAGENT (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA) segítségével a gyári protokoll szerint. RT-PCR alkalmazásával kettősszálú DNS-t állítottunk elő a VR1 XbaI és AflIII restrikciós

hasító helyek közti szakaszán Access RT-PCR (Promega) segítségével, majd BlueScript vektorban (Stratagene, La Jolla, CA, USA). A hiányzó 5' szekvenciát (SacI és XbaI) hasonló módon amplifikáltuk és illesztettük a fenti szakaszhoz. A „primer” párokba inkorporált restriktós enzimhasító helyek a 3' primereknél a következők voltak (sorrendben): AGATCTCGAGCTCAAATGGAACAACGGGCTAGCTTAGACTC és CTGTATTCCACATGTCTGGAGCTGTTCAAGTTC. Az 5' (reverz) primerek esetében XbaI és SalI hasító helyeket inkorporáltunk (aláhúzás): ACTGAGTCCCGGGCGCTGATGTCTGCAGGCT és CACACAGTCGACTTTCTCCCCT-GGGACCATGGAATCCTT. A következő lépésben a SacI-AflIII fragmentet és az AflIII-SalI RT-PCR produktumot a pEGFP-N3 vektorba (Clontech, Palo Alto, CA, USA) illesztettük a SacI-és SalI restriktós enzimek felhasználásával. A vektorban lévő „korai” CMV promoter az immár zöld fluoreszcens fehérjével (eGFP) jelölt teljes VR1 fehérje átírását biztosította. Az expresszió hatékonyságát Western blot technikával, valamint konfokális mikroszkópiával ellenőriztük.

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 pMTH vektor (Oláh *et al*, 1994) 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, mind Sigma) kiegészített DMEM tápoldatban, a VR1 hőaktivációját elkerülendő, 35 °C-on (Caterina *et al*, 1997) tenyésztettük, majd a sejteken különféle vizsgálatokat végeztünk.

[³H]RTX kötődési vizsgálatok sejteken

A sejteket 1 mmol EDTA (Sigma) tartalmú szérum-mentes DMEM oldattal az edény faláról eltávolítottuk, majd mostuk és reszuszpendáltuk 10 mM HEPES (pH 7.4) pufferrel,

ami 5 mM KCl-ot, 5,5 mM NaCl-ot, 2 mM MgCl₂-ot, 0,75 mM CaCl₂-ot, 12 mM glükózt és 137 mM szukrózt (mind Sigma) tartalmazott. Ezt követően a sejteket megfelelő denzitásban (10⁵ sejt/lyuk) kimérve 96-lyukú filtrációs edényekbe (Multiscreen-DV, Millipore, Marlborough, MA, USA) szélesztettük, 60 percig 200 pM [³H]RTX-nal 37 °C-on inkubáltuk, majd az edényt jégre helyezve a kísérletet a korábban leírtak szerint leállítottuk (Ács *et al*, 1996). Azaz, a radioaktív inkubációs oldatot többszöri mosással eltávolítottuk, majd a nem-specifikus kötődés csökkentésére BSA tartalmú orosomucoidot alkalmaztunk. Az adatokat a korábban ismertetettek szerint értékeltük.

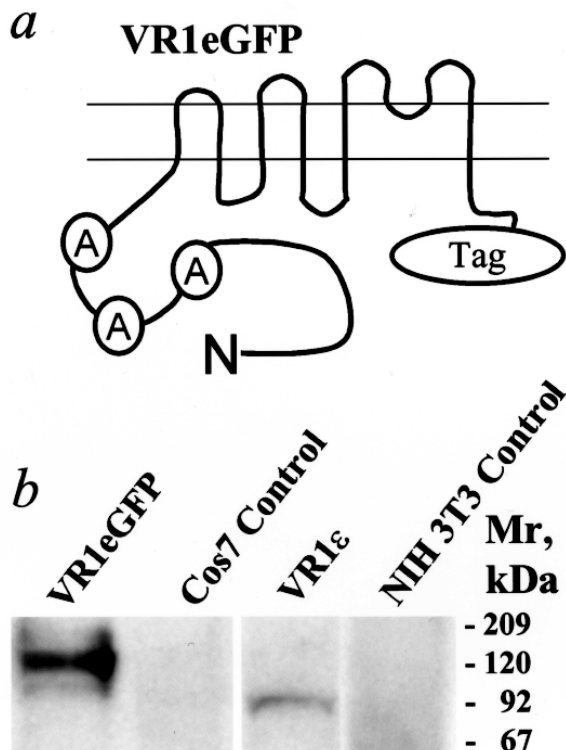
⁴⁵Ca felvétel vizsgálata

A sejteket 1 mmol EDTA tartalmú DMEM segítségével összegyűjtöttük, majd EDTA-mentes DMEM-ben reszuszpendáltuk. Ezt követően a sejt szuszpenziót (kb. 5×10⁴ sejt/ml) 1 μCi/ml ⁴⁵Ca-ot (DuPont-New England Nuclear, Boston, MA, USA) tartalmazó szérummentes DMEM-ben 96-lyukú filtrációs edénybe (Multiscreen-DV, Millipore) mértük oly módon, hogy az alkalmazott ligand(ok) és a sejtszuszenzió teljes térfogata 200 μl legyen. A sejteket a megfelelő ligand(ok) jelenlétében 35 °C-on 15 percig inkubáltuk, majd a radioaktív tartalmú oldatot kimostuk (4x szérum-mentes DMEM). Vákuum filtrációval a sejtek a filter felszínén maradtak, majd száradást követően szcintillációs folyadékba kerültek radioaktív mérés céljából. Minden egyes mintavételi pont esetében 4 edény átlagát vizsgáltuk. A ⁴⁵Ca²⁺- felvétellel arányos radioaktivitást dpm/well egységben mértük. Az így nyert dózis-hatás görbéket a Hill-egyenlettel illesztettük (Ács *et al*, 1996).

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 tisztított antitest frakciót eluáltuk és 1:1000 arányban hígítottuk tovább, hogy immunhisztokémiai és Western-blot vizsgálatokkal specifikitását bizonyítsuk. A kapott tisztított frakció a natív VR1-t felismeri, akárcsak az eGFP vagy epsilon taggal rendelkező variánsokat (lásd alább).



2. ábra A VR1 kifejeződésének vizsgálata Western blot technikával

a) C-terminális jelölések (tag) sematikus ábrázolása. Jelölések: A – intracelluláris ankyrin ismétlődések; Tag – eGFP ill. ε-jelölő fehérjék; N- a VR1 N-terminális végét reprezentálja.

b) A kiméra-fehérjék Western blot analízise látható. A VR1-eGFP és VR1ε megalkotásához, a vad típusú VR1 stop kodonját deletáltuk és a molekula C-terminális részét kiegészítettük a jelölő fehérjékre specifikus cDNS szakaszokkal. VR1eGFP és VR1ε plazmidokat COS7 és NIH3T3 sejtekbe transziens transzfekcióval bejuttattunk. 48 órával később 35 µg protein extractumot SDS pufferben előkészítettünk és eGFP-tag (1. és 2. oszlopok, várható méret: kb. 120 kDa), illetve ε-tag (3. és 4. oszlopok, várható méret: kb. 93 kDa) immunoreaktivitást vizsgáltunk, Western blot analízissel, eGFP ill. ε-tag specifikus antitestek alkalmazásával (részletesen lásd a Módszerek fejezetben).

A Western blot analízist a laboratóriumunkban már régóta alkalmazott protokollnak megfelelően (Oláh *et al*, 1994) a következő módon végeztük (**2. ábra**). A sejteket hideg foszfát-pufferrel (PBS) mostuk, majd lízis-pufferben (20 mM TRIS-HCl, 5 mM EGTA, 1 mM 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid, 20 µM leupeptin, pH 7.4 (Sigma)) homogenizáltuk, végül jégen ultrahangos feltárást végeztünk. Az így nyert lizátum proteintartalmát módosított BCA protein assay-vel (Pierce, Rockford, IL, USA) határoztuk meg, a fehérjetartalmat 2 mg/ml-re állítottuk be (a minta végtérfogatában 5 % β-merkaptóetanol, 10 % glicerin, 2% SDS, 0.062 M TRIS, 20 mM dithiothreitol, 0.002% brómfenolkék volt; mind Sigma), majd 10

perces főzéssel denaturáltuk, végül felhasználásig -20°C -on tároltuk. Kísérleteink során SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), mintánként 20-30 μg proteint választottunk szét 7,5 %-os gélen 100 V konstans feszültséggel. Ezután a fehérjéket nitrocellulóz membránra (BioRad, Wien, Austria) transzferáltuk, 2x45 percen keresztül, 100 V konstans feszültséggel. A membrán szabad kötőhelyeit 5 % sovány tejport tartalmazó PBS-ben (5 % tej-PBS) 30 percig blokkoltuk. Ezután a membránokat 5 %-os tej-PBS-ben hígított elsődleges, patkány VR1 (1:500) ellenes; a GFP-taget felismerő eGFP ellenes (1:500, Clontech); illetve az ε -taget felismerő PKC ε ellenes (1:500, Invitrogen) antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át. A membránok 30 perces mosását (PBST, 0,1 % Tween-20 PBS-ben Sigma) követően megfelelő másodlagos, torna-peroxidázzal kapcsolt antitesttel (1:1000, BioRad) 45 percen keresztül inkubáltuk. Újabb, PBST-ben elvégzett mosást követően az immunreakciók eredményét kemilumineszcens módszerrel, ECL Western blot detektáló kittel (Amersham, Little Chalfont, UK) tettük láthatóvá, amit röntgenfilmen rögzítettünk (AGFA, Brussels, Belgium). Az expresszió kvantitatív meghatározását denzitométer, valamint megfelelő szoftver (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Inc. Georgia, USA) segítségével végeztük.

A minták egyenletes felvitelének ellenőrzésére a membránokat 200 ml – 2%-os SDS -t és 0.1% β -merkaptotetanolt tartalmazó – 50 mM Tris-HCl pufferben (pH 7.5) 65°C -on 1 órán keresztül kezeltük, és újrajelöltük őket egérben termeltetett anti-cytochrome c antitesttel (Transduction Laboratories, San Diego, CA, USA), majd pedig az előbb leírtakhoz hasonlóan láthatóvá tettük az immunreaktív sávokat.

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 szubcellularis részleteinek jelölésére fluoreszcens markereket használtunk. Az endoplazmatikus retikulum (ER) szelektív jelölésére tranziens transzfekcióval bejuttatott eGFP-KDEL markert használtunk (Clontech). A mitochondriumok jelölésére MitoTracker (Molecular Probes, Invitrogen) fluoreszcens festéket használtunk, úgy hogy a sejteket 30 percig inkubáltunk 250 nM-os oldatban, majd a fluoreszcens anyagot fiziológiás pufferrel (HBSSH) kimostuk a rendszerből.

Ca^{2+} -imaging mikrofluorimetriával

A fedőlemezre szélesztett sejteket 2 μg VR1eGFP plazmida 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban bekövetkezett változásokat Grynkiewicz és mtsai (1985) által kidolgozott módszerrel vizsgáltuk.

Konfokális mikroszkópos Ca^{2+} -imaging Indo-1 AM festékkel

A poli-D-lizin (Sigma) borítású tárgylemezeken tenyésztett sejteket 5 μM Indo-1 AM festékkel töltöttük fel. A 34 °C -on történő 30 perces inkubációt követően a sejteket 3 alkalommal HBSSH oldattal (Sigma) átmostuk a felesleges festék eltávolítása céljából. A *zerus* extracelluláris Ca^{2+} állapotának rögzítéséhez a sejteket 5 alkalommal mostuk 1 mM EGTA-t tartalmazó CaCl_2 -mentes HBSSH-ben (Sigma), majd ugyanabban a médiumban

végeztünk a méréseket. VR1eGFP-expresszálo sejteket ill. 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 laminin-borítású tárgylemezeken (Sigma) a transzfekciót követően 6-lyukú tenyésztőedényben 48 óráig inkubáltunk, majd a fluoreszcens proteint expresszálo sejteket kiválasztottuk a vizsgálatra. A feszültség-clamp vizsgálatokat Krebs pufferben (NaCl 124 mM, KCl 4.9 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 2.4 mM, CaCl_2 2.5 mM, NaHCO_3 25.6 mM és glükóz 10 mM, mind Sigma) végeztünk, Axopatch 200B erősítőt használva (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). A mérésekhez 2-10 M Ω -os patch-elektrodokat használtunk, melyek 10 mM-os HEPES pufferral (pH: 7.4, CsCl 120 mM, tetraetilammónium klorid 20 mM, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 2 mM, EGTA 10 mM, ATP 4 mM és GTP 0,5 mM, mind Sigma) voltak feltöltve. Két adagolás között az alkalmazott vegyületeket 10 perces mosással (egy gyors perfúziós rendszer segítségével) távolítottuk el a mérőkádból.

EREDMÉNYEK

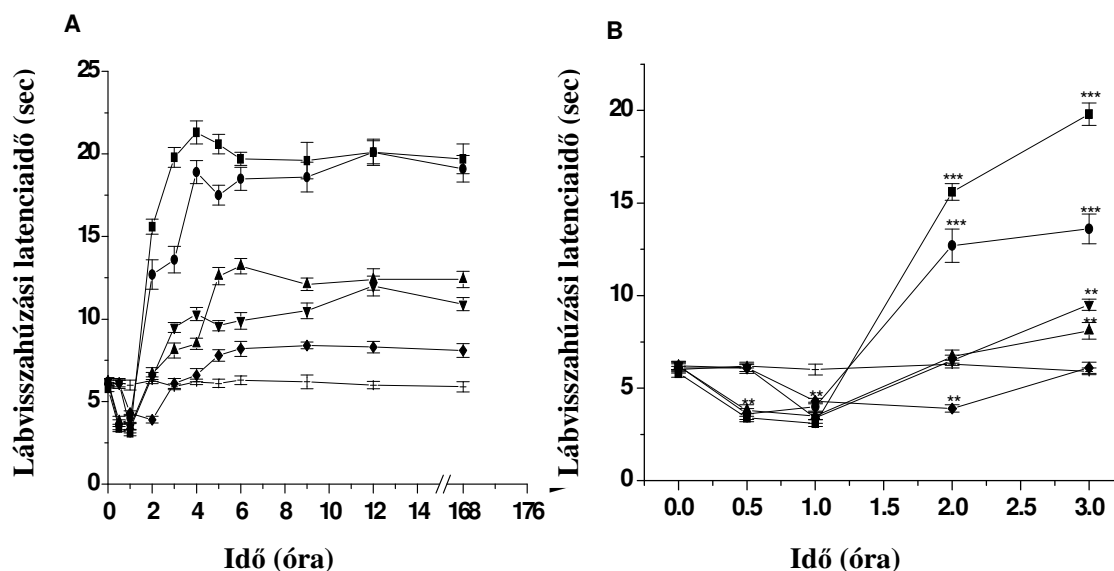
1. Az ultrapotens VR1 agonista RTX *in vivo* (analgetikus) hatásának vizsgálata

In vivo kísérleteink célja azon hipotézisünk bizonyítása volt, hogy a lumbális gerincbe epiduralisan beadott RTX alkalmazásával regionális VR1 deszenzitizáció (azaz anesztézia) hozható létre. A korábban részletezettek szerint, standardizált körülmények mellett megmérve egy termális stimulus által kiváltott védekezési reakció (láb visszahúzás) latencia idejét, következtethetünk a beadott RTX dózis hatására. Az epidurális beadás esetén a hátsó lábak elhúzásáig eltelt időt összehasonlítva a mellső lábakon mért értékekkel lehetőség nyílt a regionális hatás megítélésére, tekintve, hogy a fenti adagolási mód esetén elvileg a mellső lábakon mért hatás (belső kontroll) elhanyagolható. Az epidurális és szisztémás (szubkután) alkalmazás összehasonlítása egy második megközelítési mód, ahol az epidurális kezelés adott régióra kifejtett hatásának szelektivitását vizsgálhattuk. Az RTX hatását a latencia idők mérésével jellemeztük a dózis és a beadás után eltelt idő függvényében.

Szisztémás (szubkután) alkalmazás esetén a latencia idők a beadás után kb. 4-5 órával egy plató értéket értek el (**3a. ábra**), azaz a latencia értékek közel azonos szinten maradtak a kísérletek teljes időtartama alatt. Ennek megfelelően a mérési görbe plató fázisa a VR1 deszenzitizációt reprezentálja, melyet az első órákban észlelhető iniciális aktiváció (a VR1 aktivációjának következményeként kialakuló fájdalom és lecsökkent lábvisszahúzási latencia idő, részletesen lásd alább) vezetett be (**3b. ábra**). Nagyobb RTX dózisok esetében a latencia idők megnövekedése korábban jelentkezett, mely különösen a beadást követő 2. órában volt a legkifejezettebb. Az RTX szisztémás alkalmazása esetén a latencia idő maximális növekedése $19,7 \pm 0,6$ s volt (két kísérlet átlaga alapján) a 300 $\mu\text{g/kg}$ RTX alkalmazása esetén. Ezt a dózist tekintettük a maximális tolerálható adagnak. Az ED_{50} szisztémás adagolás mellett, a 6. órában mért értékek alapján $39,2 \pm 3,9$ $\mu\text{g/kg}$ RTX volt, két független kísérlet átlagaként

meghatározva (**5. ábra**) A görbe Hill koefficiense $1,38 \pm 0,26$ volt, ami a receptorok közötti közepes fokú kooperativitást feltételez.

Mint fentebb említettük, az első órákban, a csak vivőanyaggal kezelt állatokon mért láb visszahúzási időkhöz képest, rövidebb latencia idők egy hyperalgesziás fázist jeleztek (**3b. ábra**). A hyperalgesziás fázis időben elnyújtottabb volt alacsonyabb RTX dózisok esetében, és – különösen a legalacsonyabb ($3 \mu\text{g/kg}$ s.c.) adagnál – csak később jelentkezett.



3. ábra A láb visszahúzás latencia ideje szubkután RTX kezelés után

A kísérleti állatok vivőanyagot, illetve 3-300 $\mu\text{g/kg}$ RTX- et kaptak szubkután (s.c.) Jelölések: (+) vivőanyag, (♦) 3 $\mu\text{g/kg}$, (▼) 10 $\mu\text{g/kg}$, (▲) 30 $\mu\text{g/kg}$, (●) 100 $\mu\text{g/kg}$, (■) 300 $\mu\text{g/kg}$. Minden időpontban megmértük a láb visszahúzásának latencia idejét. Az egyes pontok átlag $\pm$ S.E.M. értéket jelölnek ($n=6$ állat).

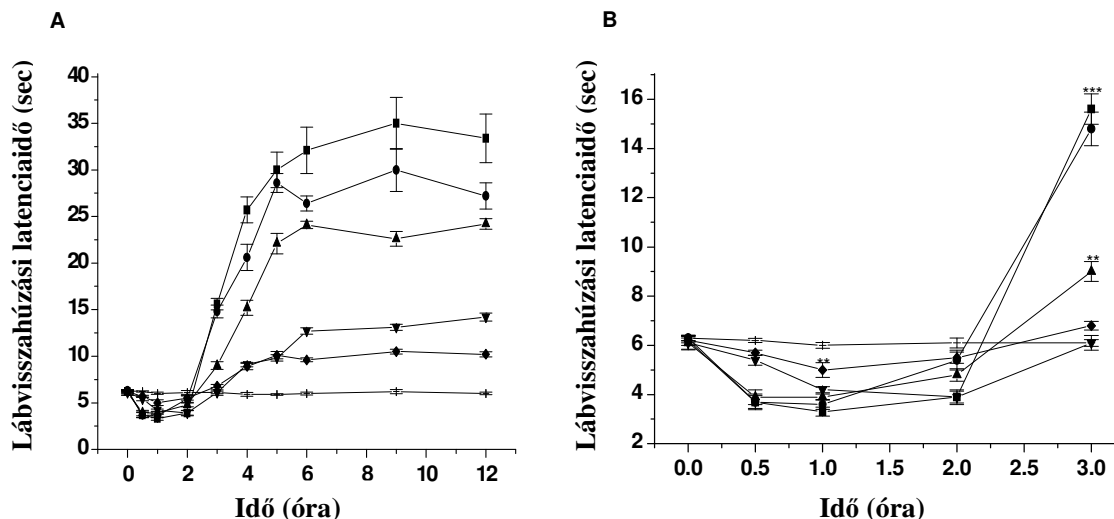
A) Dózis-hatás görbék a kezelést követő 168 órájára. ANOVA szignifikáns különbséget jelzett az RTX-szel ill. vivőanyaggal kezelt csoportok közt ($p < 0.0001$), valamint az RTX időfüggő hatását tekintve is ($p < 0.0001$). Független (unpaired) t -próba alapján a latencia idők az RTX kezelés után 5 órával a kontrollhoz képest (vivőanyag) szignifikánsan nőttek ($p < 0.001$).

B) Az A panel kiterjesztése a kezelést követő első 3 órára. Az RTX és vivőanyag kezelt csoportok összehasonlítása független t -próbával történt, ahol $**p < 0.05$ és $***p < 0.001$.

Egy második független kísérlet hasonló eredményt adott.

A lumbális epidurális RTX adása esetén a hátsó lábakon mért latencia idők lassabban érték el a plató értéket, mint szisztémás adagolás esetén (**4a. ábra**); a plató értékek csak kb. a kezelést követő 6. órában voltak mérhetőek. Ezt követően azonban – a szisztémás adagoláshoz hasonlóan – az értékek közel állandóak voltak a továbbiakban. Eltérően ugyanakkor a szisztémás adagolásnál megfigyeltékkel, az epidurális RTX kezelés esetén a

latencia idők megnyúlásának jelentkezése az alkalmazott dózisoktól nagyjából függetlenül, hasonló időfüggést mutatott. A latencia idők maximális növekedését 100 µg/ kg RTX alkalmazása esetén mértük és $33,4 \pm 2,6$ sec-nak adódott (két kísérlet átlaga alapján).



4. ábra A láb visszahúzás latencia ideje epidurális RTX kezelés után

A kísérleti állatok vivőanyagot, illetve 3-100 µg/kg RTX- et kaptak epiduralisan. Jelölések: (+) vivőanyag, (♦) 1 µg/kg, (▼) 3 µg/kg, (▲) 10 µg/kg, (●) 30 µg/kg, (■) 100 µg/kg. Minden időpontban megmértük a láb visszahúzásának latencia idejét. A pontok átlag $\pm$ S.E.M. értéket jelölnek (n=6 állat).

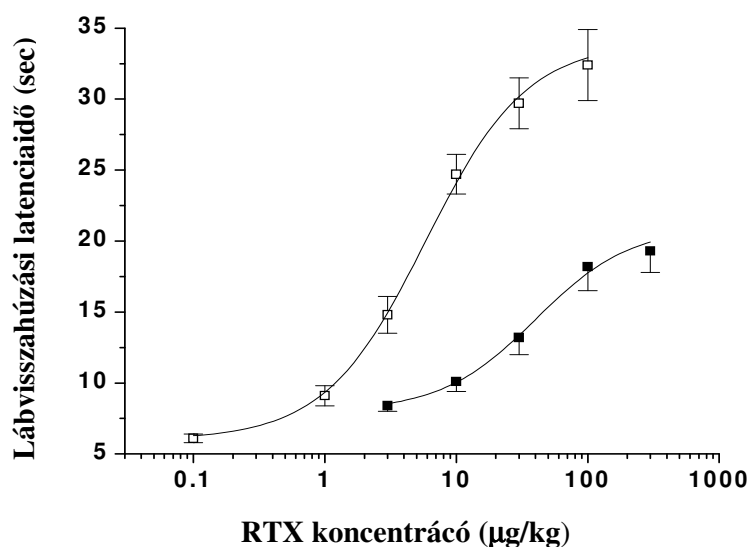
A) Dózis-hatás görbék a kezelés első 168 órájára. ANOVA szignifikáns különbséget jelzett az RTX ill. vivőanyag kezelt csoportok közt ($p < 0.0001$), valamint az RTX időfüggő hatását tekintve is ($p < 0.0001$). Független (unpaired) t -próba alapján a latencia idők a kontrollhoz képest (vivőanyag) szignifikánsan nőttek az RTX kezelés után 4 órával ($p < 0.0001$).

B) Az A panel kiterjesztése a kezelést követő első 3 órára. Az RTX-és vivőanyag-kezelt csoportok összehasonlítása ANOVA és független t -próbával történt. A latencia idők szignifikáns csökkenését észleltük minden RTX koncentrációnál a beadást követően 30 perccel a kontrollhoz (vivőanyag) képest (** $p < 0.05$ és *** $p < 0.001$).

Egy független második kísérlet hasonló eredményt adott.

A hátsó lábak elhúzásának latencia ideje szignifikánsan magasabb volt, a szisztémás kezelés esetén mért értéktől ($p < 0,001$). Megjegyzendő, hogy az égési sérülések elkerülése miatt bevezetett 35 sec-os megszakítási idő (cut off) miatt ez a különbség akár nagyobb is lehet, mint azt a mérési eredmények tükrözik. A 6. órában mért adatok alapján megállapított ED_{50} érték epidurális RTX alkalmazása esetén $6,3 \pm 0,3$ µg/kg RTX volt, két egymástól független mérésorozat eredményeként (5. ábra). A Hill-koefficiens ez esetben is mérsékelt fokú kooperativitásra utalt, értéke $1,22 \pm 0,10$ volt. Fontos megjegyeznünk, hogy hasonló

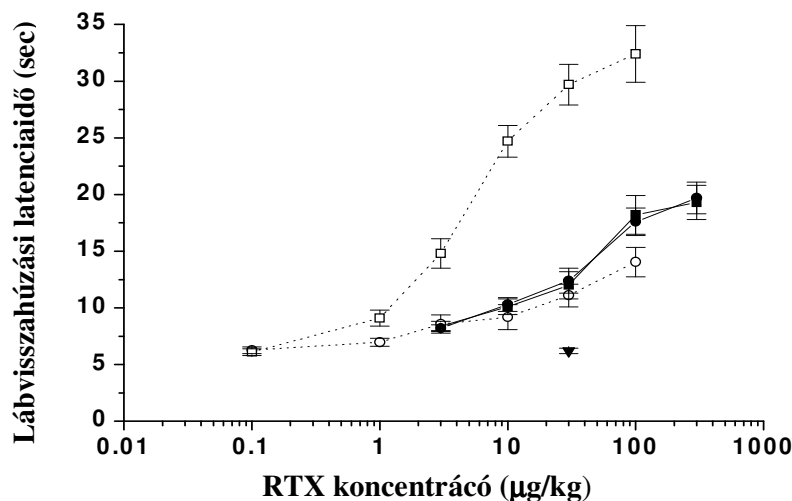
dózis-hatás összefüggést észleltünk a deszenzitizációt reprezentáló plató fázis más időpontjaiban is, vagyis a kezelést követő 6. órán túl.



5. ábra. Az epidurálisan (□) vagy szubkután (■) alkalmazott RTX dózis-hatás görbéi

A latencia időket a kezelést követően 6 órával regisztráltuk. A pontok átlag értékek $\pm$ S.E.M. jelölnek. ED_{50} érték epidurális RTX esetén $5,9 \pm 0,3$ µg/kg, míg subcutan adagolás esetén $40,3 \pm 3,6$ µg/kg volt ebben a kísérletben. Egy ismételt kísérlet hasonló eredményt hozott.

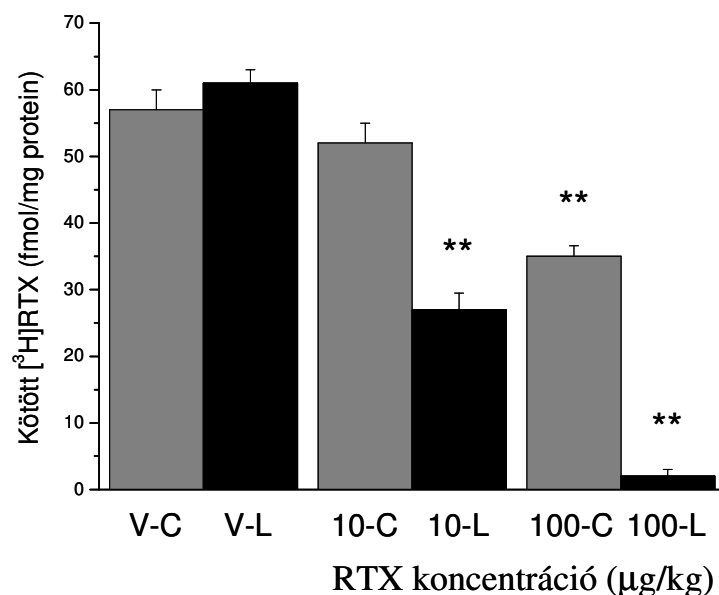
A lumbáris epidurális RTX kezelés során a mellső lábakon mért latencia időket is folyamatosan monitoroztuk. Az epidurális kezelés során a mellső lábakon észlelt dózis-függő hatás hasonló (vagy kevésbé kifejezett) volt a szisztémás kezelés kapcsán akár a mellső vagy a hátsó lábakon mért latencia időkhöz (6. ábra). Megállapítottuk továbbá, hogy 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. Ugyanakkor szisztémásan alkalmazott RTX esetén (mintegy reprezentálva az adagolási mód kevésbé hatásos voltát), a dózis-hatás görbék tanúsága szerint, a két mérési pont közötti különbség elhanyagolható volt (6. ábra).



6. ábra A mellső és hátsó lábakon mért láb visszahúzási latencia idők összehasonlítása egymással, valamint a vivőanyag (▼) kontrollhoz

A folytonos vonalak a szubkután kezelést reprezentálják ((●) mellső lábak, (■) hátsó lábak), míg a szaggatott vonalak az epidurális kezelés ((○) mellső lábak, (□) hátsó lábak)) adatait jelzik. Az ábrán a kezelés után 6 órával észlelt latencia idők átlagai vannak feltüntetve, eltérő RTX koncentrációk adása mellett, vivőanyag kontrollal összehasonlítva. A pontok átlag $\pm$ S.E.M. értékeket jelentenek. Egy független második kísérlet hasonló eredményt hozott.

Korábbi közleményekből ismert, hogy szisztémás RTX kezelést követően mind a perifériás idegrendszer jellemző helyein, mind a központi idegrendszerben a vanilloid vegyületekre specifikus kötőhelyek száma dózis-függően csökken, amit [3 H]RTX kötődési kísérletek eredményei bizonyítottak (Goso *et al*, 1993; Szállási *et al*, 1992). Az eltérő kezelési modalitások kapcsán észlelt deszenzitizáció, illetve az azzal kapcsolatos „receptor-vesztés” bizonyítására kötődési kísérleteket végeztünk. Feltevésünk szerint epidurális alkalmazás esetén a regionális hatás eredményeképpen, a lumbalis régióban dózisfüggő csökkenést észlelünk a [3 H]RTX specifikus kötődésében. A [3 H]RTX specifikus kötődés kvantitatív értékeit hasonlítottuk össze a nyaki és lumbalis gerincvelői régiókban, RTX-el kezelt, illetve vivőanyaggal kezelt kontroll állatokban 7 nappal a kezelést követően (7. ábra).



7. ábra Specifikus [³H]RTX kötődés gerincvelői membrán preparátumok

Epidurális RTX kezelést (10 és 100 µg/kg) követően a patkányok cervikális (C) és lumbális (L) gerincvelői szegmentumából, valamint a vivőanyaggal (V) kezelt állatok hasonló mintáin specifikus [³H]RTX kötődést mértünk 200 pM [³H]RTX jelenlétében. A feltüntetett értékek átlag ± S.E.M. (n=3). (**, szignifikáns különbséget jelöl a vivőanyag kontrollhoz képest, p < 0.05). Két további kísérlet azonos eredményt adott.

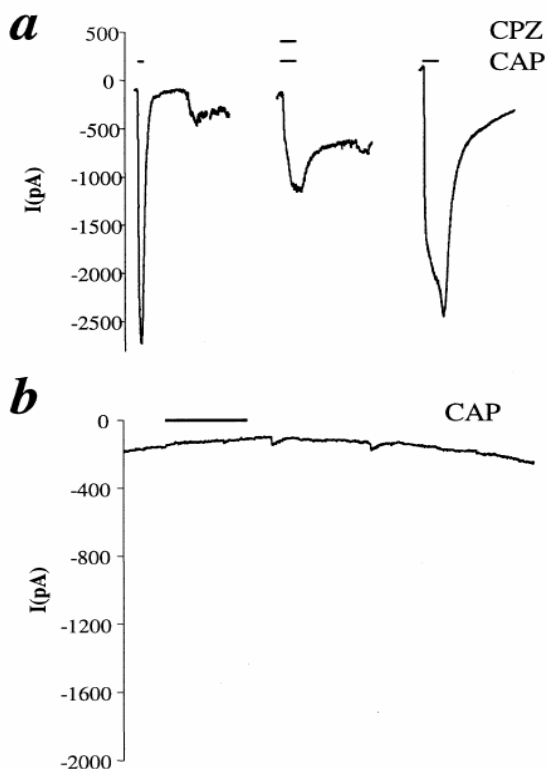
Epidurális RTX adagolást követően jelentősen nagyobb kötőhely-vesztést mértünk a lumbális gerincvelő szakaszon mind 10 µg/kg, mind 100 µg/kg RTX dózisok esetén. Megfigyeltük azt is, hogy – arányosan a 6. ábrán bemutatott, a mellső lábakon mért latenciaidő-növekedéshez – 100 µg/kg-os dózissal a kontrollhoz képest 42 %-kal csökkent a specifikus [³H]RTX kötődés a cervikális gerincvelői szakaszon. Hasonló RTX dózis a lumbális gerincvelői szakaszon a kötőhelyek (szinte) teljes deplécióját okozta (7. ábra).

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 (aktiváció, deszenzitizáció, fiziológiai és morfológiai változások, szelektív neuronális depléción) vizsgáltuk. A vizsgálatokhoz kétféle VR1 konstrukciót hoztunk létre (részletesen

lásd az Anyagok és módszerek fejezetben); 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, így a VR1eGFP kb. 120 kDa, míg a VR1 ϵ kb. 93 kDa méretű volt (**2. ábra 1. és 3. oszlop**). A nem-transzfektált kontroll sejtekben tag-specifikus immunreaktivitás nem volt észlelhető (**2. ábra 2. és 4. oszlop**), valamint nem tapasztaltuk a kiméra-fehérjék proteolitikus degradációját sem (ábrán nem mutatva).



8. ábra A VR1eGFP-t expresszáló sejtek elektrofiziológiai vizsgálata

VR1eGFP (a) és kontroll eGFP (b) transzfektált HEK293 sejtek közül közepes intenzitással fluoreszkáló sejteket szelektáltunk voltage-clamp vizsgálatokhoz.

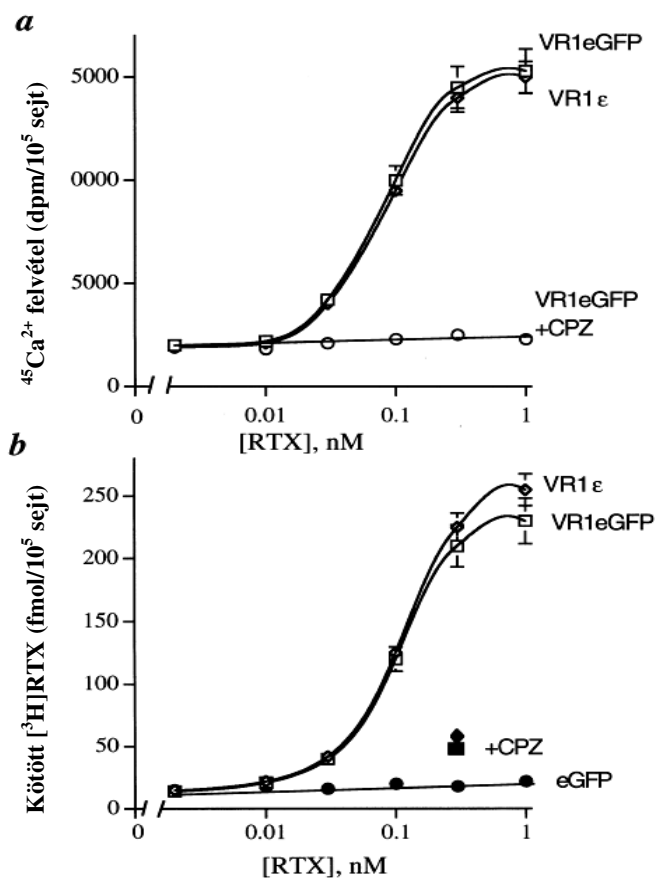
a) 10 μ M kapszaicin (CAP) perfundáltunk a mérőkádban először 30 sec-ig, majd ezt percenként ismételtük a VR1eGFP expresszáló sejtek aktivációjához. Az első CAP adagolás rövidebb volt a receptor-deszenzitizáció gyors kialakulásának elkerülésére. Az antagonista kapszazepin (CZP, 10 μ M) gátolta a CAP hatását (n=4 sejt). Az egymást követő applikációk közti 10 percben a hatóanyagot kimostuk a rendszerből.

b) A CAP (10 μ M) nem aktiválta a kontroll (eGFP) HEK293 sejteket.

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a jelölt VR1 konstrukciók elektrofiziológiai, ion-transzport és ligandkötő tulajdonságai a jelölés nélküli vad típussal megegyeznek-e. Elektrofiziológiai vizsgálataink során VR1eGFP és eGFP (kontroll) plazmidokat HEK293

sejtekben tranziens transzfekció révén expresszáltunk, majd közepes fluoreszcens intenzitású sejteket választva voltage-clamp vizsgálatot végeztünk.

A VR1eGFP-t expresszáló sejteken mind a kapszaicin (10 μM), mind az RTX (125 pM, ábrán nem mutatva) azonnali nagy sejtáramot indukált (**8a. ábra**). Ezen hatás VR1-specifikusnak volt mondható, hiszen a kompetitív antagonistá kapszazepin 10 μM -os koncentrációban hatékonyan gátolta a kapszaicin által kiváltott hatást (**8a. ábra**). A kontroll, eGFP-t expresszáló sejteken sejtaktivációt nem észleltünk egyik agonista alkalmazásakor sem (**9. ábra b**).



9. ábra A kiméra fehérjét expresszáló sejtek $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétele és [^3H]RTX kötő képessége

a) RTX által kiváltott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel dózis-hatás görbe VR1eGFP (□) és VR1ε (◇) konstrukciókat kifejező HEK293 sejteken, a transzfekció után 48 órával. A kapott adatokat a Hill egyenlet segítségével illesztettük. Az antagonistá kapszazepin (CZP, 10 μM) alkalmazásával az RTX hatása gátolható volt (○).

b) Az ábra a kiméra konstrukciók – VR1eGFP (□), VR1ε (◇) – [^3H]RTX kötő képességét ábrázolja. A kötési kísérleteket a transzfekciót követően 48–72 órával végeztük. A görbéket az adatpontok Hill egyenlethez illesztésével nyertük. A kapszazepin (CZP, 10 μM) mindkét esetben – VR1ε (◇), VR1eGFP (■) – kivédte a 0.5 nM [^3H]RTX által kiváltott kötődést. Nem-specifikus (háttér) kötődés látható a kontroll, eGFP plazmida transzfektált, sejteken (●). Két további kísérlet hasonló eredményt adott.

Az elektrofiziológiai kísérletekkel összhangban az RTX dózis-függő $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influxot generált VR1eGFP-expresszáló COS7 (ábrán nem mutatva) és HEK293 sejteken (**9a. ábra**). Az ED_{50} érték RTX esetében 100 ± 50 pM, míg ugyanez a kapszaicin esetében $0,5 \pm 0,15$ μM volt. Hasonló eredményt kaptunk a VR1ε plazmida transzfektált sejtekkel (adatokat nem

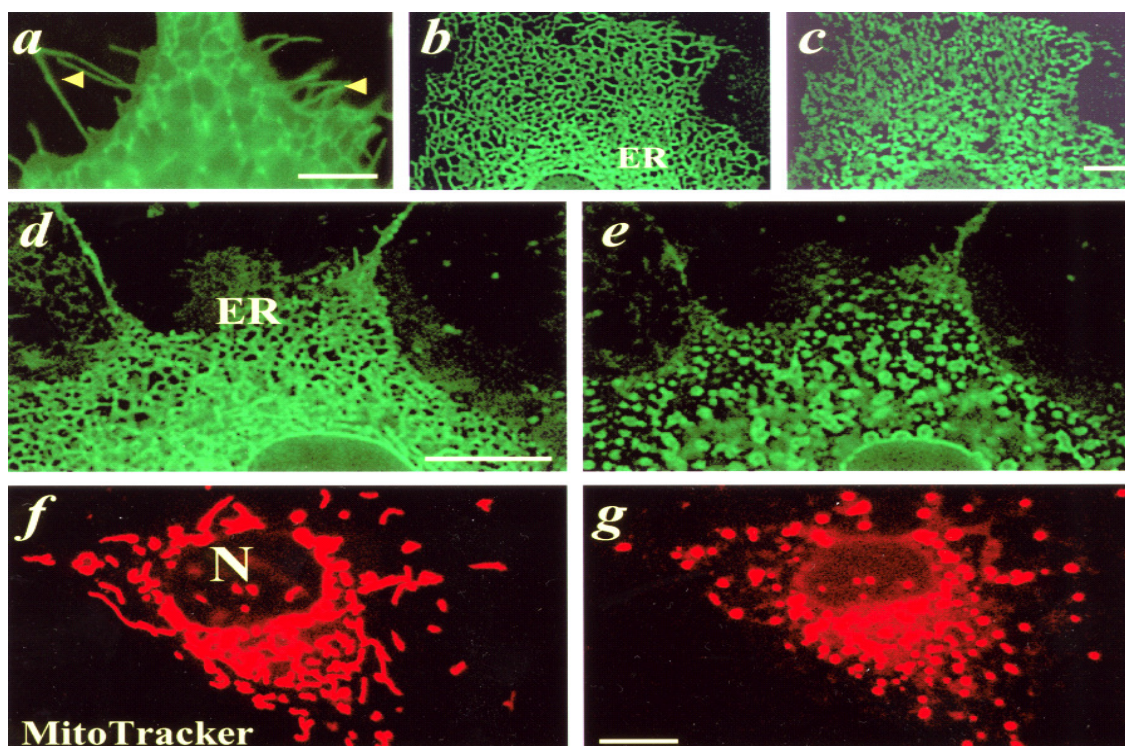
mutatjuk). Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a C-terminális jelölés (tag) szignifikánsan nem változtatta meg a VR1 molekula elektrofiziológiai és Ca^{2+} transzport képességeit. Az RTX által kiváltott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételt a kompetitív antagonistá kapszazepin ($10\ \mu\text{M}$) – mind a VR1eGFP-t, mind a VR1ε-t expresszáló sejteken (**9a. ábra**) – teljes mértékben felfüggesztette, rámutatva a hatás receptor-specifikus voltára.

Ehhez hasonlóan, mindkét jelölt rekombináns fehérje, a vad típushoz mérhetően, nagy affinitással, dózisfüggően kötötte a $[^3\text{H}]\text{RTX}$ -et ($K_d \sim 150 \pm 10\ \text{pM}$, $n=6$) (**9b. ábra**). A Hill együttható értéke 1,5-2 volt, mely a kötőhelyek közti pozitív kooperativitásra utalt. A specifikus $[^3\text{H}]\text{RTX}$ kötődést a $10\ \mu\text{M}$ kapszazepin ez esetben is majdnem teljesen gátolta, valamint nem észleltünk szignifikáns $[^3\text{H}]\text{RTX}$ kötődést a kontroll, csak eGFP-t expresszáló sejteken.

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

A VR1eGFP konstrukció fluoreszcens tulajdonsága nemcsak az egyedi sejt szintű celluláris elektrofiziológiai kísérletek számára „azonosította” a VR1-t kifejező sejteket, de lehetővé tette a VR1 szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatát is. Konfokális mikroszkóp alkalmazásával az üvegfelületre kitapadt sejtek optikai szekcióin VR1eGFP fluoreszcens szignált észleltünk mind a plazmamembránnak megfelelően (**10a. ábra**), mind a sejtek belső membránrendszerében, így az endoplazmatikus retikulumon (ER) és annak folytatásaként a sejtmag körül (**10b. és d. ábra**). Az ER lokalizáció megerősítésére COS7 sejteket egy ER retenciós szignállal (KDEL motív, **10b. ábra**) kiegészített eGFP-vel transziensen transzfektáltunk. Az így kapott eGFP-KDEL kiméra-fehérjét COS7 sejtekben expresszálva, láthattuk, hogy a VR1eGFP szignál valóban az ER kompartmentet jelölte a citoplazmában és a sejtmag körül (**11b. és d. ábra**). Hasonló ER kollokalizációt kaptunk azokban a

kísérletekben, amikor a VR1eGFP-expresszáló sejteket egy ER-ra specifikus vitális festékekkel párhuzamosan megfestettünk (ER-tracker, ábrán nem mutatva). A **10. ábrán** COS7 sejt, illetve sejtrészeket láthatók, de hasonló szignál-lokalizációt észleltünk más vizsgált sejttípusokban (HEK293, NIH3T3) is, amely arra utalt, hogy nem sejttípus-specifikus „anomáliáról” van szó (ábrán nem mutatva).



10. ábra A VR1eGFP szubcelluláris lokalizációja, valamint az RTX hatására beinduló korai változások.

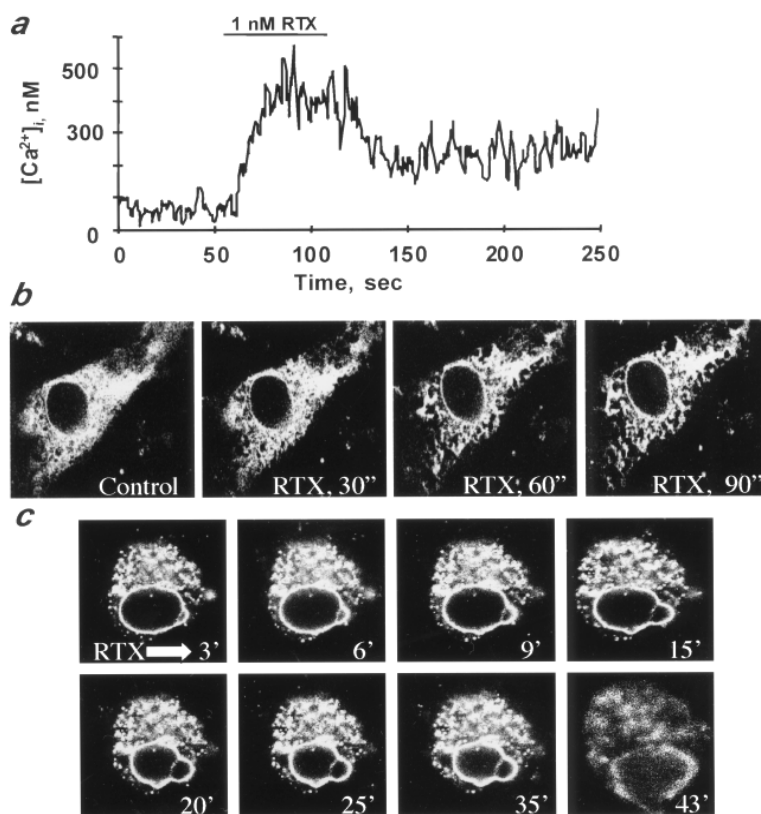
A VR1eGFP szignál lokalizációja *in vivo* (a, d, e). Az eGFP-KDEL (b, c) és MitoTracker vitális festék (f, g) lokalizációja 24 órával a transzekciót követően. A sejt alapjához közeli optikai szekcióban a legkifejezettebb VR1eGFP szignálintenzitás a plazmamembrán mikrovillusaiban volt (a). A nyílak a plazmamembrán kitüremkedéseiben észlelt erős jelintenzitást jelzik a sejt széleken. A középső optikai szekciókban, a sejtmag szintjén, a VR1eGFP szignál az endoplazmatikus retikulumra (ER) emlékeztető intracelluláris membrán hálózat mentén a legkifejezettebb (d). Ebben az optikai szekcióban észlelhető hasonlóság az eGFP-KDEL és VR1eGFP szignálban megerősíti azt, hogy intracellulárisan a VR1 valóban az ER kompartmentre lokalizálódik. Az ionomycin (4-bromo-A23187) intracelluláris membránokra kifejtett hatását vizsgálva ugyanazon eGFP-KDEL ER-markert expresszáló sejtet (b, c) vizsgáltuk az adagolás előtt (b) és 10 másodperccel a 4 μ M ionomycin hozzáadása után (c). Az RTX hatását a VR1eGFP expresszáló (d, e) valamint a Mitotracker-festett sejten (f, g) vizsgáltuk a hozzáadás előtt (d, f), valamint 1 nM RTX kezelést követően 20 másodperccel (e, g). Mindkét esetben hasonló volt az ER struktúrát érintő változások dinamikája és morfológiája (c, e). Hasonló mechanizmusra utaló változásokat észleltünk a mitochondriumok morfológiájában is (g). (Marker hossza 5 μ M).

Fontos megállapításunk volt emellett, hogy hasonló ER lokalizációt észleltünk eltérő transzfekciós hatékonyság széles tartományában (azaz eltérő expressziós szinteken is), valamint, hogy a szignál megoszlása a plazmamembrán és ER között közel azonos volt. Végezetül kettős hullámhosszon végzett vizsgálataink során egyértelműen bebizonyosodott, hogy az észlelt VR1eGFP szignál (zöld) különbözik a mitochondriumokat jelölő (MitoTracker festék) jóval erőteljesebb piros szignáltól (**10f. ábra**). Mindezen eredményeink jó összhangban voltak azokkal a korábbi megfigyelésekkel, miszerint natív VR1-pozitív nociceptív neuronokban immuncitokémiai vizsgálattal intenzív festődést észleltek a neuronális cytoplasmában (Tominaga *et al.*, 1998). Úgy tűnik tehát, hogy fenti észleléseink nem a rekombináns overexpresszióval magyarázhatóak.

Ezt követően az intracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) megemelésének hatását vizsgáltuk a sejtek morfológiájára. Kontroll kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a sejtek plazmamembránjának kationokra való átjárhatóságát jelentősen megnövelő ionomycin az eGFP-KDEL konstrukciót expresszáló sejteken az intracelluláris membránok (főként az ER) fragmentációját okozza (**10b. és c. ábra**). RTX (1 nM) kezelés ezen változásokkal gyakorlatilag megegyező morfológiai átrendeződést váltott ki; azaz 20 sec-os RTX expozíció már elegendő volt az ER fragmentáció kialakulásához (**10d. és e. ábra**) és, ezzel párhuzamosan, a filamentózus mitochondriumok alakváltozásához (**10f. és g. ábra**). A kapszaicin (1 μ M) hatására az ER fragmentáció jelensége szintén demonstrálható volt, és a változások hasonló dinamikával alakultak ki, mint az RTX (1 nM) esetében (ábrán nem mutatva). 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 (ábrán nem mutatva), 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 intracelluláris ionkoncentrációk (jelesül a Ca^{2+}) megváltozásának következményeiként alakulnak ki. Ezt vizsgálva ezért további kísérleteinkben az RTX hatását az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ra mikrofluorometriás módszerrel is vizsgáltuk, ahol Fura-2AM festékkel inkubáltunk VR1-transzfektált COS7 sejteket.



11. ábra A VR1 aktiváció hatása $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ra és a sejtek morfológiájára

a) VR1eGFP-expresszáló COS7 sejteket Fura-2AM fluoreszcens festékkel inkubáltuk 30 percig, majd mértük az 1 nM RTX hatására létrejövő $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változást. Egymást követő 5 mérési érték átlagai ábrázoltuk. **b)** Élő sejt „real-time” imaging VR1eGFP-expresszáló COS7 sejteken 24-32 órával a transzfekciót követően konfokális mikroszkóppal. Az RTX (1 nM) kezelés után 1 sec-os intervallummal 90 sec-ig készültek felvételek (rövid távú monitorozás). **c)** Az RTX-el kezelt sejtek hosszú távú (1 óra) *in vivo* monitorozása. 3 perccel az RTX adagolását követően egy reprezentatív VR1eGFP-expresszáló sejtet vizsgáltunk 1 perces intervallumban 45 percig.

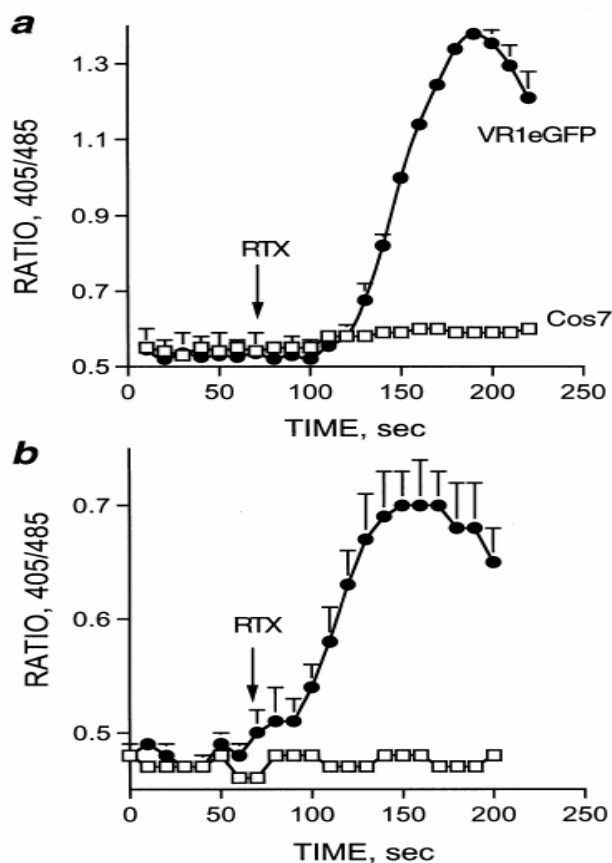
A nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ érték (~ 50 nM) hasonló volt mind a VR1eGFP és kontroll eGFP plazmiddal transzfektált sejtekben. Az RTX (1 nM) hozzáadását követően gyors, átlagosan

kb. 10 s alatt kifejlődő $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés következett be, melynek során a legmagasabb $[Ca^{2+}]_i$ érték elérte az 500 nM-t (kb. az RTX adagolást követően 1 perccel) (**11a. ábra**). Jó összhangban a konfokális mikroszkópos vizsgálatok során észlelt irreverzibilis struktúrális változásokkal (**10e. és g. ábra**), a továbbiakban a megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ nem tért vissza a nyugalmi értékre (**11a. ábra**). Hasonló $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést nem észleltünk az eGFP plazmidot expresszáló kontroll sejteken (n=3).

Az intracelluláris kalcium-változásokkal párhuzamosan zajló, a sejt belső struktúráját érintő változások pontosabb követésére, 1 s-os intervallumban konfokális mikroszkópos képeket készítettünk élő VR1eGFP expresszáló sejtekről. Vanilloid expozíciót követően ezekben a kísérletekben is észleltük a már leírt korai változásokat, azaz az intracelluláris remodelling lépéseit (30 sec-on belül 13/15 vizsgált sejt) (**11b. ábra**). Az RTX adását követően emellett a nukleáris membrán erősödő VR1eGFP szignálját is észleltük, valamint ER membrán-vesiculumok megjelenését tapasztaltuk a sejtmagmembrán körül (**11c. ábra**). Ezt követően progresszíven jelentkező membránlefűződéseket észleltünk a sejtmag körül (9/10 sejt) 10 percen belül), majd általában 1 órán belül (a belső membránok után) a plazmamembrán is megsemmisült (**11c. ábra**). Alacsonyabb RTX dózisok esetében (<0,1 nM) a változások kinetikája elhúzódóbb volt, de a sejtek lízise mindannyiszor bekövetkezett az adagolást követően 3 órával. A sejtpusztulás nem lehetett az ismételt felvételt készítéseket követő eredménye, minthogy az RTX adagolás után 30 perccel készített egyetlen felvételen az intracelluláris sejtstruktúrák identikus változását észleltük (8/8 sejt) (ábrán nem mutatva).

A belső membránokból történő kalciumfelszabadulás kvantitatív megközelítésére (azaz az intracelluláris kalciumraktárak membránjába beépült VR1 funkcionalitásának vizsgálatára) ratiometriás alapú fluoreszcens konfokális mikroszkópos méréseket végeztünk heterológ expressziós rendszerben (VR1eGFP-COS7 sejtek) és primer szenzoros DRG neuronokon, indo-1 AM fluoreszcens festék alkalmazásával, kalciummentes közegben (**12. ábra**). Az 1 nM RTX adását követően mindkét sejt típuson jelentős emelkedést észleltünk 405/485 hányadosban, amely hányados a festék által kötött kalciummal arányosan emelkedik.

A kontroll (nem-transzfectált) sejtek nem válaszoltak az RTX kezelésre (**12a. ábra**), hasonlóan a natív szenzoros neuronok egy csoportjához (**12b. ábra**), melyek feltehetően nem expresszálták a VR1-t. Összevetve a kalciummentes médiumban kapott eredményeinket a **11a. ábrán** bemutatott, „normál” kalciumtartalmú oldatban mért adatainkkal bebizonyosodott továbbá, hogy 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 (mint lipidoldékony ultrapotens agonista) receptor-specifikus módon (azaz a VR1-et nem expresszáló sejteket megkímélve) képes ezen VR1 populáció aktiválására.



12. ábra RTX által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -mobilizáció az extracelluláris kalcium hiányában

A ratiometriás fluoreszcens konfokális mikroszkópos vizsgálathoz a VR1eGFP expresszáló COS7 sejteket (**a**) és DRG neuronokat (**b**) 5 μ M Indo-1 AM festékkel inkubáltuk. Ezt követően a sejteket EGTA (1 mM) tartalmú oldatban vizsgáltuk. Az RTX végső koncentrációja 1 nM volt. A kibocsátott fluoreszcencia intenzitás hányadosainak meghatározása a 405 nm és 485 nm-en mért értékek alapján történt. A mérések 10 sec-os intervallumban történtek.

a) Három VR1eGFP expresszáló (●) és 3 nem-transzfectált (kontroll, □) COS7 sejtet tartalmazó látótér mérési adatai.

b) Primer szenzoros neuronokon hasonló Ca^{2+} -mobilizáció észlelhető: 3 neuron válaszolt (●), 2 neuron esetén nem észleltünk $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést RTX hatására (□). A fenti észleléseket három további kísérletben sikerült reprodukálni.

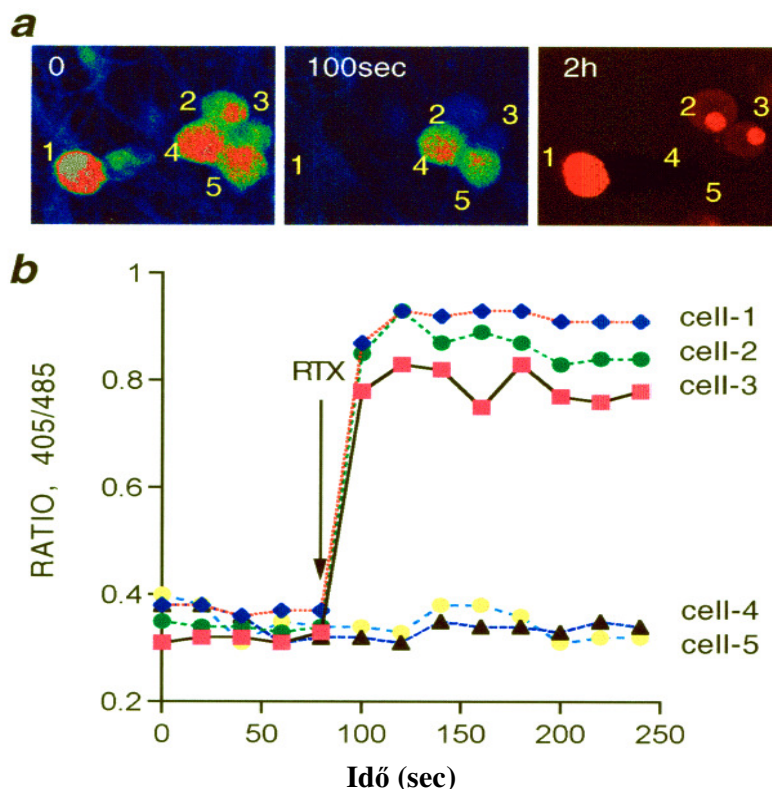
A fent bemutatott adataink jó egyezést mutattak azon máshol közölt (így a jelen disszertáció részét nem képező) eredményeinkkel (Lázár *et al*, 2003), amikor kimutattuk, hogy VR1eGFP-expresszáló sejteken 1 nM RTX extracelluláris kalcium hiányában is képes

jellegzetes (a 10. és 11. ábrákon bemutatottakhoz igen hasonló) morfológiai változások (ER vezikuláció, mitochondriális diszrupció) kiváltására. Megállapítottuk ugyanakkor, hogy kalcium-mentes közegben a változások létrejöttéhez jóval hosszabb időre volt szükség; a típusos morfológiai változások átlagosan mintegy 3 perccel jelentkeztek az RTX adását követően. Fontos jelenség volt emellett, hogy amennyiben az RTX folyamatos jelenlétében az extracelluláris Ca^{2+} koncentrációt visszaállítottuk az eredeti 1 mM-ra, az azonnali ER fragmentációt okozott, demonstrálva a kalcium kulcsszerepét ebben a folyamatban. Mivel teljes mértékben megegyező eredményre jutottunk primer szenzoros neuronok vizsgálata során is (ábrán nem mutatva), mindezen adataink (összevetve a jelen disszertációban bemutatottakkal) arra utalnak, hogy az ER-lokalizált VR1 valóban képes kalciumot mobilizálni az ER-ből, de az így létrejövő „toxikus” $[\text{Ca}^{2+}]_i$ akkumuláció kialakulásához hosszabb időre volt szükség.

Kíváncsiak voltunk ugyanakkor arra is, hogy a DRG neuronok hogyan viselkednek hosszabb RTX expozíció esetén. Ezért kettős-hullámhosszú fluoreszcens konfokális mikroszkópos vizsgálatot végeztünk, melynek során a neuron-tenyészeteket először Indo-1 AM oldattal inkubáltuk (30 min) 1 mM CaCl_2 -ot tartalmazó pufferben, majd ezt követően (közvetlenül a konfokális mikroszkópos vizsgálat előtt) propidium-jodid (PI) oldatot adtunk a sejtekhez. Megállapítottuk, hogy egy adott látótérben számos neuron azonnali, másodperceken belüli kialakuló $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedéssel válaszolt 25 nM RTX hatására (**13. ábra**). Kimutattuk azt is, hogy az RTX-re ily módon reagáló neuronok sejtmagjában (az RTX adását követően kb. 40 perccel) intenzív PI akkumuláció volt megfigyelhető, ami időfüggését tekintve kiváló összhangban volt a plazmamembrán integritás elvesztésének jelentkezésével a VR1eGFP-t expresszáló COS7 sejtekben (**11b. és c. ábra**).

Ugyanabban a látótérben ugyanakkor voltak RTX-re nem reagáló, a VR1 agonista hatására $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést nem mutató neuronok is, amelyek esetében PI festődést sem tudtunk kimutatni, még akár 2 órával az RTX expozíciót követően sem (**13a. ábra**). Ezen

megfigyelések megerősítik azt az elképzelésünket, hogy az észlelt vanilloid-specifikus változások neuronokban is VR1 függőek, így a vanilloid receptort nem expresszáló neuronok az RTX igen magas dózisára sem reagáltak.



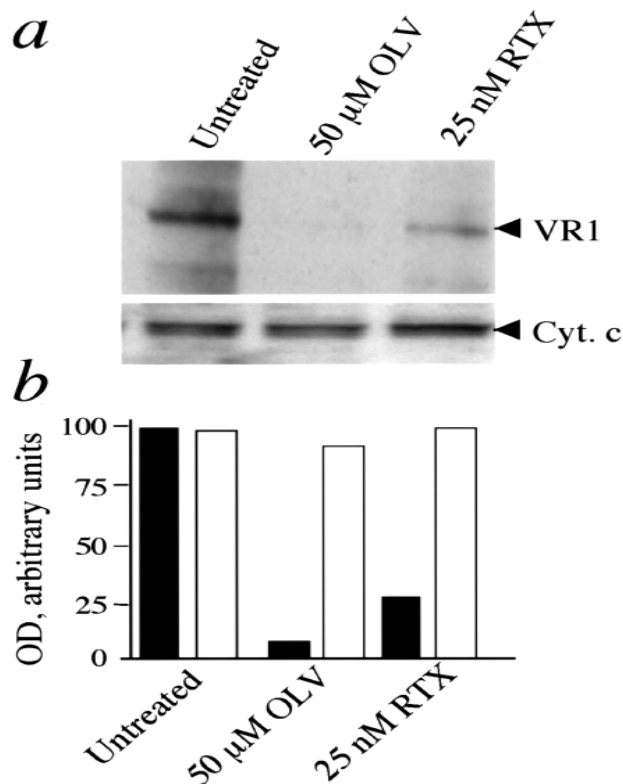
13. ábra Az RTX által kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ akkumuláció és sejtelhalás közti összefüggés DRG neuronokban

A sejteket konfokális mikroszkóppal különböző hullámhosszokon vizsgáltuk. A DRG tenyészeteket Indo-1 AM fluoreszcens festékkel 30 percig inkubáltunk, majd pufferral mostunk, végül a sejteket 1 mM $CaCl_2$ tartalmú oldatba helyeztük. Propidium-jodid (PI) a mérések megkezdése előtt került a sejtekre (40x objektív). Először a 405/485 nm-en ratiometriás konfokális képeket készítettünk (a), ahol a 485 nm-es csatornán készített felvételek (a, 0 és 100 sec) segítenek a sejtek helyzetét megítélni. Az individuális sejteket számoztuk (a), míg az egyes neuronokon mért számszerű Indo-1 hányadosokat a (b) ábrarészen tüntettük fel. A PI fluoreszcenciát a vörös csatornán (585 nm) keresztül rögzítettük a két órás időpontban (a, 2h). Az RTX-t (25 nM) a kísérlet 70. másodpercénél hozzáadva jelentős $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést észleltünk. Néhány neuronban (sejt 1, 2, 3) a vörös szín gyorsan kékbe megy át, jelezve a gyors és jelentős $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést (másodpercek alatti változások). Más neuronokban (sejt 4, 5) a minimális színváltozás, a nyugalmi, alacsony $[Ca^{2+}]_i$ fennmaradását jelzi. Ugyanazok a sejtek (sejt 1, 2, 3), amelyek RTX-re jelentős $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéssel válaszoltak, sejtmagjukban a 2 órás felvétel tanúsága szerint intenzív PI akkumulációt mutattak, jelezve a plazmamembrán károsodását (a). Az RTX-re rezisztens neuronok sejtmagjában PI akkumulációt nem észleltünk (sejt 4, 5).

A DRG tenyészetek többszöri vizsgálata, valamint a változások időbeli követése megmutatta, hogy a szelektív sejt-deplécio kialakulásának dinamikája hasonló a natív VR1 expresszáló neuronok és heterológ expressziós rendszerek esetében; azaz a tartósan magas

$[Ca^{2+}]_i$ a VR1 expresszáló sejtekben sejthalált okoz. Ezen megfigyelés azt az igen izgalmas lehetőséget vetette fel, hogy az RTX alkalmazása akár terápiás stratégiát is kínálhat, amennyiben specifikus nociceptív neuronok szelektív ablációja a kívánatos.

Ezen hipotézis sejtszintű tanulmányozására 7 napos primer DRG neuron tenyészeteket 25 nM RTX-nal, valamint egy hosszú C-láncú szintetikus vanilloid vegyülettel, 50 μ M Olvanillal (OLV) (Szállási *et al*, 1999b) kezeltünk 48 óráig. A kísérlet végén a sejteket lizáltuk, protein extraktumot nyertünk, majd Western blot technikával vizsgáltuk a VR1 kifejeződését. VR1-specifikus antitest alkalmazásával bizonyosodott, 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 (**14. ábra**). Úgy tűnt emellett, hogy egyéb jelenlévő sejttípusokat a fenti kezelés nem érintette, amint azt egy közös szöveti fehérjére (cytochrom-c) újrjelölt Western blot-ok jelezték (**14. ábra**).



14. ábra A VR1 hosszantartó aktivációjának hatása a VR1 kifejeződésére

A 7 napos, 24-well edényekben tenyésztett DRG neuronokat 50 μ M Olvanil (OLV) és 25 nM RTX agonistákkal kezeltük 48 órán keresztül. Ezt követően teljes sejtextraktumot készítettünk SDS pufferben, majd Western blot analízist végeztünk. A patkány VR1-specifikus immunreaktivást a fehérje N-terminális 18 aminosava ellen termeltetett antitesttel detektáltuk.

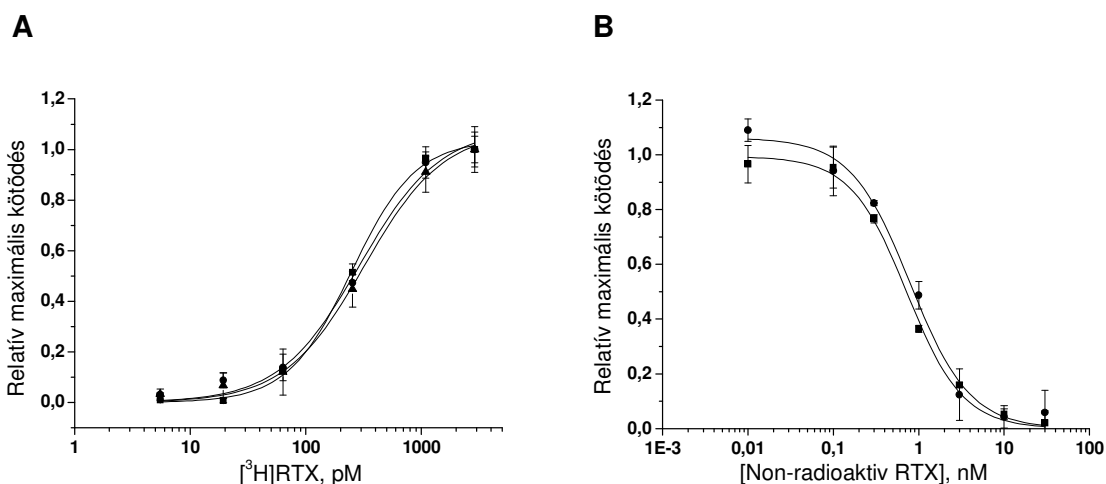
a) Annak bizonyítására, hogy a vanilloid kezelés csak a VR1-expresszáló sejteket érintette, a VR1-pozitív sávokat tartalmazó mintákat újra blottoltuk a cytochrom-c (Cyt. c) ellenes antitesttel. Az immunreaktív csíkok optikai denzitását NIH Image (1.61 verzió) szoftverrel elemeztük.

b) Az oszlopdiagram (ugyaneből a mintasorból) egy reprezentatív kísérlet optikai denzitás értékeit tünteti fel. Egy második függetlenül elvégzett kísérletben hasonló eredményt kaptunk. Fekete oszlop: VR1 immunreaktivitás intenzitása; fehér oszlop: Cyt.c immunreaktivitás intenzitása.

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 – kihasználva a [³H]RTX igen nagy affinitású specifikus kötődését a VR1-hez (Szállási *et al*, 1989) – a majom agyban expresszáldó VR1 molekuláris farmakológiai paramétereit határoztuk meg. Ennek során a majom agy különböző régióiból származó mintákon mért kötődési paramétereket összehasonlítottuk a gerincvelőből és DRG-ből nyert membrán preparátumok hasonló adataival.



15. ábra *Specifikus [³H]RTX kötődés különféle majom szöveten*

A) Specifikus [³H]RTX kötődést észleltünk majomból származó teljes gerincvelői mintákon (▲), a gerincvelő hátsó szarv mintáin (●) és a hátsó gyöki ganglionokból készült membrán preparátumokon (■). A pontok három meghatározás átlag ± S.E.M. értékeit jelölik. Az összehasonlíthatóság érdekében a kötődés értékeit normalizáltuk a 3000 pM [³H]RTX koncentrációnál mért kötődési értékekhez. Két további kísérlet hasonló eredményt adott. A nem-specifikus kötődést 1 μM nem-radioaktív RTX jelenlétében határoztuk meg. A görbét a mért értékek Hill egyenlethez való illesztésével nyertük.

B) Specifikus [³H]RTX (500 pM) kötődés gátlása a gerincvelői hátsó szarvból (●) illetve a hátsó gyöki ganglionokból (■) származó membrán preparátumokon nem-radioaktív RTX növekvő koncentrációinak jelenlétében. A pontok három meghatározás átlag ± S.E.M. értékeit jelölik.

Először kontroll kísérleteket végeztünk, melynek során nagy affinitású, specifikus, telíthető [³H]RTX kötődést észleltünk mind a gerincvelő hátsó szarvában, mind a hátsó gyöki ganglionokban (**15a. ábra**). A nem-specifikus kötődés, melyet 1 μM nem-radioaktív RTX jelenlétében határoztunk meg, lineárisan növekedett a jelölt vegyület jelenlétében (ábrán nem mutatva). A gerincvelői hátsó szarvból, illetve a hátsó gyöki ganglionokból 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 (a receptorok 50%-át telítő ligand koncentrációkat reprezentálva) 312 ± 14 pM és 289 ± 15 pM (mindkét esetben három kísérlet átlagaként számolva, átlag $\pm$ S.E.M.) (**1. táblázat**). A P értékek $1,4 \pm 0,04$ és $1,5 \pm 0,08$ adódtak, melyek a kötőhelyek közti pozitív kooperativitásra utaltak. A nem-specifikus kötődés mértéke, a K_d értéknek megfelelő ligand koncentrációnál a teljes kötődés értékének kevesebb mint 40%-a volt.

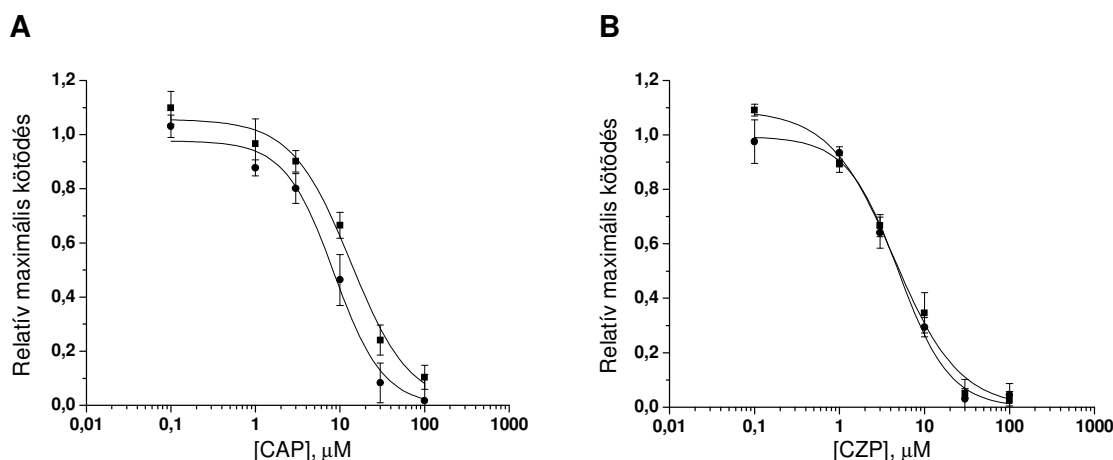
1. táblázat [^3H]RTX kötődés jellemző paraméterei majomból származó gerincvelői, DRG és szelektált agyi régiók membrán preparátumain.

Lokalizáció	[^3H]RTX kötés K_d (pM)	RTX K_i (pM)	Kapszaicin K_i (μM)	Kapszazepin K_i (μM)
Gerincvelő (SC)	371 ± 18	402 ± 39	$5,5 \pm 0,41$	$3,3 \pm 0,21$
Gerincvelő hátsó szarv (DHSC)	312 ± 14	349 ± 25	$4,3 \pm 0,32$	$3,7 \pm 0,35$
Hátsó gyöki ganglion (DRG)	289 ± 15	309 ± 14	$4,7 \pm 0,26$	$3,1 \pm 0,23$
Hypothalamus (MBH)	561 ± 41	729 ± 80	$1,0 \pm 0,10$	$0,9 \pm 0,11$
Locus ceruleus (LC) és Area preoptica (AP)	601 ± 28	nem vizsgálva	$1,1 \pm 0,22$	$1,3 \pm 0,20$

Az adatok három meghatározás átlag $\pm$ S.E.M. értékeit jelölik

A specificitás további vizsgálata során kompetíciós kísérletekben kimutattuk, hogy a nem-radioaktív RTX hatásosan 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 (három kísérlet átlaga alapján $\pm$ S.E.M.) (**15b. ábra, 1. táblázat**). A P értékek, az előzőekhez hasonlóan, pozitív kooperativitást jeleztek (**15b. ábra**). 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-n, $4,3 \pm 0,32$ μM a gerincvelő hátsó szarvából készült membrán preparátumokon. A P értékek ezekben a kísérletekben $1,47 \pm 0,2$ és $1,39 \pm 0,3$ voltak, melyek ezekben is pozitív kooperativitást jeleztek (**16a. ábra, 1. táblázat**). Végezetül megállapítottuk, hogy a kompetitív antagonist kapszazepin ugyancsak hatásosan függesztette fel a [^3H]RTX specifikus kötődését: K_i $3,1 \pm$

0,23 μM a DRG-ban és $3,7 \pm 0,35 \mu\text{M}$ a gerincvelői hátsó szarvban (mindkét mérés 3 kísérlet átlagából számolva) (**16b. ábra, 1. táblázat**).



16. ábra Kompetíciós kísérletek

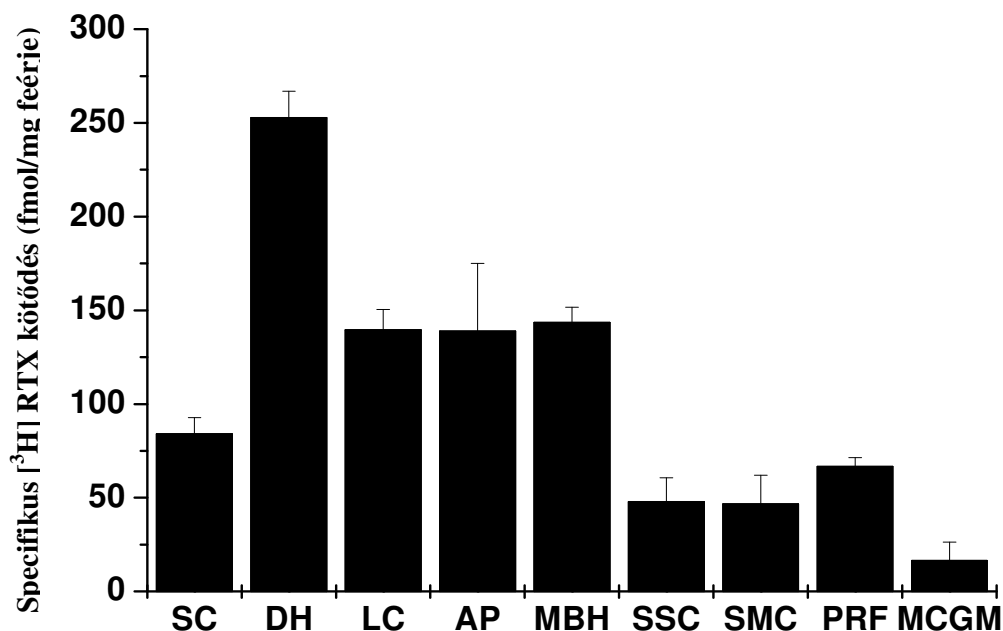
A specifikus [^3H]RTX (500 pM) kötődés gátlása a gerincvelői hátsó szarvból (●) illetve a hátsó gyöki ganglionokból (■) származó membrán preparátumokon kapszaicin (CAP, **A**) és kapszazepin (CPZ, **B**) növekvő koncentrációival. A pontok három meghatározás átlag $\pm$ S.E.M. értékeit jelölik. A görbéket a mért értékek Hill egyenlethez való illesztésével nyertük. Két további kísérlet hasonló eredményt adott.

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

Molekuláris farmakológiai vizsgálatainkat kiterjesztve specifikus [^3H]RTX kötődést észleltünk emellett különböző agyi régiók membrán preparátumain, így a locus ceruleusban, az area preopticanban, a hypothalamusban, a hídi formatio reticularisban, a thalamus ventralis részén, valamint a cerebellaris cortex szenzoros- és motoros területein (**17. ábra**). Ezekben a kísérletekben egyszeri 1,5 nM [^3H]RTX-t használtunk a VR1 kötődés szöveti disztribúciójának vizsgálatára, mely radioaktív ligandkoncentráció kb. 3-4-szer magasabb volt, mint a DRG szövetekben vagy a gerincvelőben mért K_d értékek.

A kötődés (B) értékei (az előző bekezdésben 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 (**17. ábra**). A fenti kísérleti körülmények közt a specifikus [^3H]RTX

kötődés értéke meghaladta a teljes kötődés 50%-át, és az értékek szignifikánsan különböztek a háttér nem-specifikus kötődéstől (Student-féle *t*-próba, $p < 0,05$).



17. ábra Specifikus [^3H]RTX kötődés majom idegrendszer különböző régióiból származó membrán preparátumokon

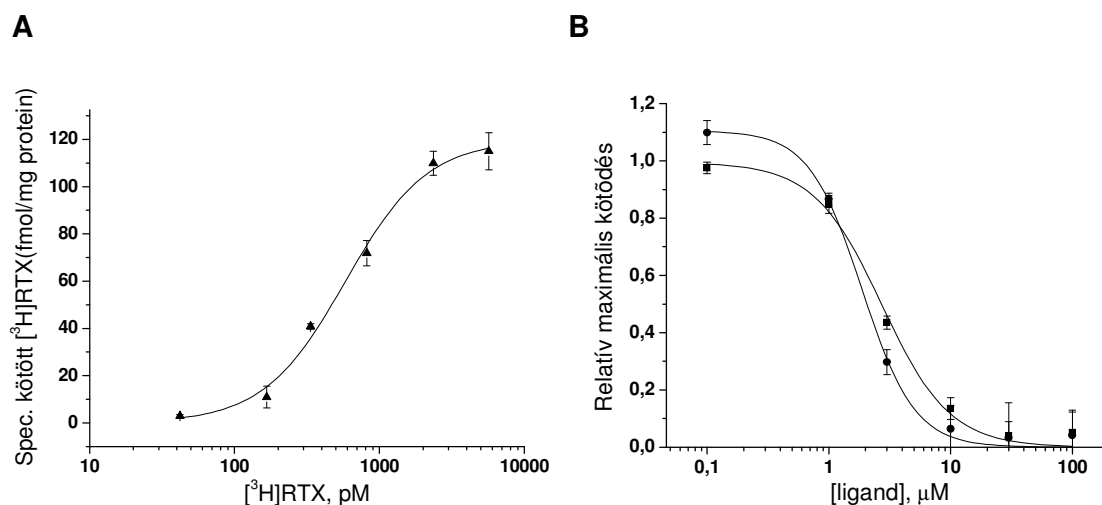
Rövidítések: SC: gerincvelő, DH: hátsó szarv, LC: locus ceruleus, AP: area preoptica, MBH: medialis-basalis hypothalamus, SSC: somatosensoros cortex, SMC: somatomotoros cortex, PRF: pons formatio reticularis, MCGM: középagyi szürke állomány.

A fenti értékeket 1.5 nM [^3H]RTX koncentráció mellett határoztuk meg, $10 \mu\text{M}$ phorbol 12,13-dibutyrate jelenlétében. Utóbbival a radioaktív ligand protein kináz C-hez való kötődését akadályoztuk meg. A feltüntetett adatok három független kísérlet átlag értékei $\pm \text{S.E.M.}$

Az agyi receptorok további karakterizálására azokat a régiókat választottuk, ahol magas (azaz a gerincvelői mintákkal összevethető, lásd 1. táblázat) receptorsűrűséget észleltünk, így a locus ceruleus (LC) és area preoptica (AP) és a hypothalamus medialis-basalis (MBH) területét. Minthogy a rendelkezésre álló preparátum mennyisége mindhárom terület feldolgozását nem tette volna lehetővé, a LC és AP mintákat a továbbiakban egyként kezeltük.

A vizsgált agyi mintákon a specifikus [^3H]RTX kötődés, hasonlóan a gerincvelői mintákhoz (**15a. ábra**), szigmoidális szaturációs kinetikát követett, mely az alábbi paraméterekkel volt jellemezhető: K_d értékek: $601 \pm 28 \text{ pM}$ a LC/AP régiókban és 561 ± 41 a

hypothalamikus mintára (három független kísérlet átlaga). A P értékek pozitív kooperativitást jeleztek: $1,4 \pm 0,09$ és $1,2 \pm 0,1$ a megadott sorrendben (**18A. ábra, 1. táblázat**). Megállapítottuk végezetül, hogy a kapszaicin és a kompetitív antagonistá kapszazepin hatásosan gátolták a specifikus [^3H]RTX kötődést mind a hypothalamusból (K_i $1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ és $0,9 \pm 0,11 \mu\text{M}$), mind a LC/AP régiókból (K_i $1,1 \pm 0,22 \mu\text{M}$ és $1,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$) készült membrán preparátumokon (mindkét érték három kísérlet átlaga $\pm$ S.E.M.) (**18b. ábra, 1. táblázat**).



18. ábra Specifikus [^3H]RTX kötődés vizsgálata majom hypothalamus mediális-basalis részéből készült membrán preparátumokon

A) Specifikus [^3H]RTX kötődés növekvő radioaktív ligandkoncentrációk (▲) mellett. A pontok három meghatározás átlag $\pm$ S.E.M. értékeit jelölik. Két további kísérlet hasonló eredményt adott. A nem-specifikus kötődést $1 \mu\text{M}$ nem-radioaktív RTX jelenlétében határoztuk meg. A görbét a mért értékek Hill egyenlethez való illesztésével nyertük.

B) Specifikus [^3H]RTX (500 pM) kötődés gátlása a hypothalamusban kapszaicin (■), illetve kapszazepin (●) növekvő koncentrációival. A pontok három meghatározás átlag $\pm$ S.E.M. értékeit jelölik. A görbéket a mért értékek Hill egyenlethez való illesztésével nyertük. Két további kísérlet hasonló eredményt adott.

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. Patkányok vizsgálata során bebizonyosodott, hogy a kapszaicin hatékonyabb volt a kémiai fájdalom kiváltásában, míg az RTX jóval potensebbnek bizonyult a deszenzitizáció létrehozásában (Szállási *et al*, 1989). Megállapították továbbá, hogy a kapszaicin aktiválta a pulmonáris kemoreflexet, míg az RTX megelőző aktiváció nélkül deszenzitizálta azt, vagyis tartós refrakter állapotot hozott létre (Szolcsányi *et al*, 1990). Humán vizsgálatokban emellett 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 (Cruz F *et al*, 1998, Lazzeri *et al*, 1998). Mindezen adatok azt sugallták, hogy az RTX (a kapszaicin hatásához viszonyítva) sokkal előnyösebb terápiás profillal rendelkezik (Szállási *et al*, 1989, Szállási *et al*, 1993).

A szisztémás adagolással összefüggő mellékhatások (Szállási, 1999) mérséklésére ugyanakkor az utóbbi időszakban előtérbe kerültek a lokális alkalmazás (topikális, intratecalis vagy epidurális) lehetőségei, melyek kiváló stratégiát reprezentálnak a regionális fájdalom csillapítására. Így például, epidurálisan adott analgetikumok használhatóak krónikus tumoros fájdalom kezelésére, genitourinális és nőgyógyászati esetleg alsó végtagi lágyrész tumorok esetében, vagyis amikor a regionális hatástól effektív fájdalom-kontroll várható.

Farmakológiai szempontból az epidurális adagolás jól ismert előnye a cél-szövetek anatómiai közelsége és az elhanyagolható szisztémás hatás. Habár az intratecalisan adott kapszaicin hatásossága ellentmondásosnak tűnik az irodalmi adatok alapján (Szállási és Blumberg, 1999), jelen disszertációban bemutatott kísérleteink szerint az epidurális térbe

adott RTX hosszú hatású, regionális termális analgéziát eredményez (**3. és 4. ábra**), mely eljárás a C-rostok által közvetített nociceptív fájdalom mérésének általánosan eloadott módszere (Nolano *et al*, 1999; Atanassoff *et al*, 1997). Eredményeink emellett azt is igazolták, hogy az epidurális RTX relatív fájdalomcsillapító hatékonysága jelentősen nagyobb a szisztémás (szubkután) alkalmazáshoz képest. A fokozott hatást jól jelezte az epidurális adagolás esetén az is, hogy a dózis-hatás görbe balra, az alacsonyabb dózisok felé eltolódott (**3-5. ábra**). Az utóbbiakból számolható ED₅₀ értékek alapján (**5. ábra**), az epidurális adagolás mintegy 6,5-szer hatékonyabbnak bizonyult a szisztémás adagoláshoz képest. Ha ugyanakkor a latencia idő háromszoros megnyúlását eredményező RTX dózisokat hasonlítjuk össze a kétféle adagolás esetén (**3. és 4. ábra**), akkor arra következtethetünk, hogy az epidurális adagolás valójában mintegy 25-ször hatékonyabb a szisztémás adagolásnál.

Fontos, a potenciális klinikai felhasználás során mindenképpen figyelembe veendő megfigyelésünk volt továbbá, hogy az epidurális alkalmazás során (az igen kiváló regionális hatás mellett) szisztémás hatásra utaló jeleket is észleltünk, különösen magasabb RTX dózisok esetén. Mindezt jól mutatta a mellső lábakon mért (a hátsó lábakon mértékhez viszonyítva csak mérsékelten) fokozott termális nociceptív küszöb kialakulása (**6. ábra**), valamint a részleges [³H]RTX kötőhely vesztés a cervikális régióban (**7. ábra**).

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 olyan heterológ expressziós rendszereket állítottunk elő, melyek a VR1 C-terminálisán specifikus azonosító szekvenciákat („tagok”) hordoznak (**2. ábra**). Megállapítottuk, hogy sem a 27 kD tömegű zöld fluoreszcens protein tag (eGFP), sem az ϵ tag nem változtatta meg a heterológ módon expresszált VR1 elektrofiziológiai tulajdonságait (**8. ábra**). A kötődési kísérletek emellett igazolták, hogy mind a VR1eGFP, mind a VR1 ϵ kimera-fehérje nanomoláris affinitással kötötte a [³H]RTX-et (**9. ábra**). A kötődési és ⁴⁵Ca-transzport kísérletekben megállapítottuk, hogy a natív VR1-t kifejező DRG neuronokon (Ács *et al*, 1997; Szallasi *et al*, 1999) és a heterológ módon expresszált VR1-en mért farmakológia paraméterek nagy hasonlóságot mutatnak. Bebizonyosodott továbbá, hogy mindezen hatások VR1-specifikusak, hiszen mind a [³H]RTX kötődés, mind az RTX által kiváltott ⁴⁵Ca-felvétel hatásosan gátolható volt a VR1 kompetitív antagonistá kapszazepin alkalmazásával (**8. és 9. ábra**).

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 (intracelluláris ionkoncentrációk, morfológiai változások) 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 (**10. ábra**); mindezen elhelyezkedést számos heterológ rendszerben (COS7, HEK293, NIH3T3 sejtek), az ER-tracker és eGFP fluoreszcens festékek ko-lokalizációjával is bizonyítottuk. Kimutattuk ugyanakkor azt is, hogy a VR1 nem fejeződik ki a sejtek mitochondriumában.

Kinetikai vizsgálatainkban (Ca^{2+} -imaging alkalmazásával) megállapítottuk továbbá, hogy az RTX hozzáadására a VR1-t expresszáló sejtekben kb. 10-szeres $[\text{Ca}^{2+}]_i$ akkumuláció következett be (**11. ábra**). „Real-time” konfokális mikroszkópiával kiderült az is, hogy ezen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedéssel időben párhuzamosan az ER struktúrája a citoplazma teljes kiterjedésében megbomlott, és körkörös vesiculaképződés jelentkezett (**11. ábra**). Ez a morfológiai változás nagyon hasonló volt az ionomycin alkalmazásakor megfigyelt Ca^{2+} -mediált citotoxicitás legkorábban azonosítható jellegzetességeihez, ugyanakkor nyilvánvalóan eltért az agonista-mediált endocitózistól (Subramanian *et al*, 1997). Fontos volt továbbá, hogy RTX adagolásakor (az ER-on túl) egyéb membránkompartmentek változását is észleltük, így a VR1-t nem expresszáló mitochondriumok fragmentációját, a magmembrán lefűződéseit, majd végül a plazmamembrán ruptúráját is (**11. ábra**). Mindezen megfigyelések azt sugallták, hogy az RTX hatására a VR1-t heterológ módon 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 másból publikált eredményeinkkel (Lázát *et al*, 2003) – miszerint a VR1-expresszáló sejteken az RTX adagoláskor extracelluláris Ca^{2+} hiányában is bekövetkezett az intracelluláris membránremodeling – kimutattuk, hogy a VR1 aktiváció kalciummentes közegben is képes az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ megemelésére. Bebizonyosodott ugyanakkor, hogy az RTX az adagolás megkezdése után csak jóval később eredményezett $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedést. A késést aligha magyarázhatjuk a vanilloidok lassabb penetrációjával a plazmamembránon keresztül, minthogy kifejezetten zsíroldékony vegyületek (Szállási és Blumberg, 1996). Véleményünk szerint ezen jóval lassabb kinetikával kialakuló változások hátterében éppúgy állhat eltérő VR1 orientáció, illetve „folding”, mint eltérő intracelluláris kalcium-pufferoló kapacitás (pl. mitochondriális Ca^{2+} -felvétel), valamint az intracelluláris raktárakból történő kalciummobilizáció többlépcsős (tehát időigényes) aktivációs folyamata (Subramanian *et al*, 1997; Berridge *et al*, 1998).

Megfigyeléseink alapján mindenesetre kimondható, 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. A kalciummentes közegben tapasztalt RTX-indukált (intracelluláris) Ca^{2+} -felszabadulás emellett az ER-lokalizált VR1-populáció jelentőségét is hangsúlyozza, illetve egy új vizsgálati célpontot jelöl meg, mely segítségével az egyes vanilloid vegyületek eltérő farmakológiája értelmezhető.

A konfokális mikroszkóppal nyert fent bemutatott 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 (**12. ábra**); 3) a VR1 antagonistá kapszazepin hatásosan kivédte az RTX által beindított celluláris hatások mindegyikét; igazolta azon feltevésünket, hogy az általunk létrehozott heterológ expressziós rendszerekben az RTX-indukált Ca^{2+} -mediált sejthalál a VR1-on keresztül specifikus módon valósul meg. A kalcium-mentes közegben is létrejövő vanilloid-mediált aktivációt különböző expressziós modellekben és natív szenzoros neuronokon mások is megerősítették (Liu *et al*, 1998, Ács *et al*, 1997);

Kíváncsiak voltunk ugyanakkor arra is, hogy hasonló VR1-specifikus citotoxicitás kimutatható-e a VR1-t natív módon expresszáló nociceptív neuronokban is. 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 – így a sejtmagmembrán lefűződésének jelentkezése és a propidium-jodid festődés a nucleusból (Earnshaw *et al*, 1995) –, apoptózisra specifikus kromatin fragmentációt, apoptotikus testképződést, illetve kaspáz aktivációt 24 órá

követés során sem észleltünk (nem mutatjuk). Hosszabb időintervallumban vizsgálva a vanilloidok hatását, ugyanakkor legalább három vitális sejt-organellum károsodott irreverzibilisen; azaz – másokhoz hasonlóan (Jancsó *et al*, 1990; Earnshaw *et al*, 1995 – intracelluláris membrán-fragmentációt, a mitochondriumok ultrastrukturális változását és a magmembrán dezorganizációját tapasztaltuk. Fontos megállapításunk volt ugyanakkor azt 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 (**13. ábra**).

A fenti sejt-organellumok VR1-specifikus károsodása egyaránt okozhat deszenzitizációt (melynek során az érző idegsejt ismételt ingerekre válaszképtelenné válik), valamint (ha a változások megfordíthatatlanok, „over the point of no return”) az idegsejt pusztulását is eredményezheti. Megfigyeléseink így egy potenciálisan új, pl. konvencionális fájdalomcsillapítókkal nem kontrollálható fájdalmak kezelésére alkalmas 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 elpusztítsuk.

Ennek modellezésére egy, a deszenzitizáció kiváltásában igen potens agonista vegyületet, az olvanilt választottuk. Az olvanil (OLV), állatkísérletek tanúsága szerint, az RTX-hez hasonlóan elhanyagolható iniciális irritációt okoz, így a kapszaicinnél kedvezőbb farmakológiai adottságokkal rendelkezik (Dickenson *et al*, 1990). 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 deplációját váltotta ki (**14. ábra**).

Ha ehhez hozzákapsoljuk, hogy az epidurális alkalmazás során igen jelentős [3 H]RTX kötőhely-vesztést tapasztaltunk (**7. ábra**), eredményeink azt sugallják, hogy VR1

agonistákat speciálisan célhelyekre (például intraganglionáris, epidurális, vagy intrathecalis adagolással) bejuttatva regionális fájdalomcsillapításra nyílik módot, egyéb szenzoros modalitások megkímélésével. A fenti hipotézis helyességét bizonyítandó, a disszertációban bemutatott kísérletek elvégzése óta, kollégáink sikeres preklinikai vizsgálatokat végeztek, melynek során inoperábilis csonttumoros kutyákban igazolták a lokálisan adott RTX hosszantartó, VR1-specifikus regionális analgéziát kiváltó hatását (Kurai *et al*, 2004; Tender *et al* 2005). 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. kismedencei-fájdalom, az alsó végtagi csont-és lágyrész daganatok, osteoarthritis, illetve a végtagamputációt követően jelentkező fantom-fájdalom.

3. Az agyban expresszáldó VR1 lokalizációja és molekuláris farmakológiája

Mint azt a Bevezetésben említettük, a különböző fajok igen eltérő vanilloid-szenzitivitást mutatnak, mely jelentősen megnehezíti az állatkísérletek adatainak emberre történő extrapolációját, s így a pontos terápiás hatásspektrum megállapítását (Szállási *et al*, 1994; Szállási *et al*, 1999). Ezért a disszertációban bemutatott kísérletek harmadik részében – kihasználva a [³H]RTX kötődés VR1-specifikus voltát (Szállási *et al*, 1989; Szállási *et al*, 1999b) – főemlősökben tanulmányoztuk a VR1 farmakológiai jellegzetességeit, valamint agyi lokalizációját. Kísérleteink során az irodalomban elsőként karakterizáltuk *Cynomolgus* majmok gerincvelői és DRG mintáiból készült membránpreparátumain a kifejeződő VR1-t. Specifikus, szigmoidális szaturációs kinetikát mutató (azaz a receptorok közti pozitív kooperativitásra utaló) [³H]RTX kötődést mértünk a fenti mintákon (**15. ábra**). A VR1 expresszióját azok a kompetíciós kísérletek is megerősítették, ahol a [³H]RTX-et különféle nem-radioaktív liganddal (RTX, kapszaicin, kapszazepin) szorítottuk le a kötőhelyekről (**15.**

és **16. ábra**). Fontos megállapításunk volt emellett, hogy RTX esetében a K_i értéke jól korrelált az ugyanazon vegyülettel mért K_d értékekkel (**1. táblázat**). Adatainkat összehasonlítva más specieseken mért értékekkel megállapítottuk, hogy a majom-gerincvelőben észlelt receptor-affinitás (~300 pM az RTX-ra) megközelítőleg 3-szor nagyobbak bizonyult, mint hasonló érték humán mintákban (~1 nM), de 7-8-szor kisebb volt, mint azt a patkány gerincvelőben találtuk (~40 pM) (Ács *et al*, 1994; saját nem közölt eredményeink).

Habár a VR1 kifejeződését korábbi kísérletek RT-PCR, *in situ* hibridizáció, valamint (VR1-specifikus antitestet alkalmazva) immunhisztokémia technikákkal leírták patkány és humán agy különböző területein (Mezey *et al*, 2000; Schumacher *et al*, 2000), az agyi receptorok részletes farmakológiai leírása azonban eddig nem történt meg. Így kísérleteinkben, specifikus [3 H]RTX kötődés alkalmazásával, ezt is vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy majom agy számos területén a specifikus [3 H]RTX kötődés adekvát farmakológiai specifitással detektálta a VR1-t (**17. ábra**). Magasabb receptor sűrűséget észleltünk a locus ceruleus, az area preoptica és a hypothalamus területén, mely szöveti disztribúció jó egyezést mutatott a korábban más fajokban leírtakkal (Ács *et al*, 1996). A fenti területeken a kötődési karakterisztika ugyancsak szigmoidális telítési kinetikát és pozitív kooperativitást jelzett (**18. ábra**), mely a VR1 specifikus jelenlétére utalt. Megállapítottuk továbbá, hogy a specifikus antagonistá kapszazepin és a kapszaicin a kompetíciós kísérletekben képesek voltak a radioaktív ligand teljes leszorítására (**18. ábra**), mely tovább erősíti azon következtetésünket, hogy VR1-t detektáltuk és írtuk le majom agyban. 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 (**1. táblázat**), mely arra utalhat, hogy a centrális és perifériás VR1 eltérően modifikációval (esetleg különböző reguláló fehérjékkel kapcsolódva) rendelkezik.

Kísérletes adataink alapján felmerül a kérdés: mi lehet az agyi területeken kifejeződő VR1 élettani szerepe? Ismereteink szerint primer szenzoros afferentációt az érintett agyi területek nem kapnak, így feltételezhetően a VR1 autonóm expreszióját észleltük. A legnagyobb receptordenzitást mutató a locus ceruleus, area preoptica és medialis-basalis hypothalamus területek ugyanakkor (jól dokumentált) szerepet játszanak különböző szenzoros és autonóm funkciókban, így a fájdalom érzékelésében és az endogén fájdalom-modulációs szabályozásban (Svensson, 1987). A locus ceruleus egyes neuron-csoportjai emellett – az agytörzsi respirációs hálózat részét képezve – résztvesznek a speciális CO₂-és pH-dependens chemopercepcióban is (Oyamada *et al*, 1998; Pineda *et al*, 1997). Állatkísérletekben emellett leírták, hogy a kapszaicin képes a locus ceruleus neuronok aktivációjára, mely hatás kapszaicin előkezeléssel (így a VR1-specifikus kötőhelyek depléciójával) kivédhető volt (Hajós *et al*, 1987).

A hypothalamus preopticus részében a neuronok egy csoportja a képes a lokális hőmérséklet változásait észlelni, ezáltal központi szerepet tölt be a termoreguláció centrális kontrolljában, részben a test különböző részeiről beérkező specifikus afferens ingerületek integrációjával (Hori *et al*, 1991; Osaka *et al*, 2000). Korai vizsgálatok szisztémás vagy intrahypothalamikus kapszaicin injekció hatására hypothermiát, valamint (nagyobb kapszaicin dózisok alkalmazásakor) a mitochondriumok jellegzetes ultrastruktúrájának megváltozását észlelték, mind a perifériás, mind a központi idegrendszeri neuronokban (Jancsó *et al*, 1970). Emellett patkányokban bebizonyosodott, hogy kapszaicin-szenzitív glutaminerg terminálok vesznek részt különféle hypothalamicus funkciók szabályozásában (Sasamura *et al*, 1998). Mivel az acidózis és a nociceptív termális stimulusok a VR1 közismert aktivátorai (Caterina *et al*, 1997; Tominaga *et al*, 1998), így könnyen elképzelhető, hogy a VR1-expresszáló 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 – mely a VR1 agonista vegyületek fegyvertárára alapozva fejti ki analgetikus hatását – 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 (Geppetti *et al*, 2004). Ez nem csoda, hisz tudjuk a vanilloidok alig szívódnak fel a béltraktusból, s gyakran jelentős disszkomfortot okozva távoznak a szervezethől. 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 (még ha teljesen más adagolási protokoll szükségességét feltételezi is, főként tartós hatás eléréséhez) 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, kalciumpermeabilis 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.

IRODALOMJEGYZÉK

Acs G, Palkovits M, Blumberg PM (1994): Comparison of [³H]Resiniferatoxin binding by the vanilloid (capsaicin) receptor in dorsal root ganglia, spinal cord, dorsal vagal complex, sciatic and vagal nerve and urinary bladder of the rat. *Life Sci* **55**: 1017-26.

Acs G, Lee J, Marquez V, Blumberg PM (1996): Distinct structure-activity relations for stimulation of ⁴⁵Ca uptake and for high affinity binding in cultured rat dorsal root ganglion neurons and dorsal root ganglion membranes. *Mol Brain Res* **35**: 173-182.

Acs G, Biro T, Acs P, Modarres S, Blumberg PM (1997): Differential activation and desensitization of sensory neurons by resiniferatoxin. *J Neurosci* **17**(14): 5622-8.

Atanassoff PG, Brull SJ, Printsev Y, Silverman DG (1997): The effect of intradermal administration of lidocaine and morphine on the response to thermal stimulation. *Anesth Analg* **84**: 1340-1343.

Berridge MJ (1998): Neuronal calcium signalling. *Neuron* **21**: 13-26.

Bevan SJ, Szolcsanyi J (1990): Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol Sci* **11**: 330-333.

Bevan SJ, Docherty RJ (1993): Cellular mechanisms of the action of capsaicin. In *Capsaicin in the study of pain*. Wood JN (ed), pp 27-44, Academic Press, London.

Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW 4th (2002): cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* **35**(4): 721-31.

Bhave G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW 4th (2003): Protein kinase C phosphorylation sensitizes but not activates the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(21): 12480-5.

Bíró T, Ács G, Ács P, Modarres S, Blumberg PM (1997): Recent advances in understanding of vanilloid receptors: A therapeutic target for treatment of pain and inflammation in skin. *J. Invest. Derm. Symp. P.* **2**:56-60.

Bíró T, Maurer M, Modarres S, Lewin NE, Brodie C, Ács G, Ács P, Paus R, Blumberg PM (1998): Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. *Blood* **91**(4):1332-1340

Bleakman D, Bronson JR, Miller RJ (1990): The effect of capsaicin on voltage-gated calcium currents and calcium signals in cultured dorsal root ganglion cells. *Br J Pharmacol* **101**: 423-431.

Blom HM, Van Rijswijk JB, Garrelds IM, Mulder PG, Timmermans T, Van Wijk R (1997): Intranasal capsaicin is efficacious in non-allergic, non-infectious perennial rhinitis. A placebo-controlled study. *Clin Exp Allergy* **27**: 796-801.

Bodó E, Kovács I, Telek A, Varga A, Paus R, Kovács L, Bíró T. (2004): Vanilloid receptor-1 is widely expressed on various epithelial and mesenchymal cell types of human skin. *J. Invest. Dermatol.* **123**(2):410-413.

Bodó E, Bíró T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Tóth IB, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Kovács L, Paus R (2005): A “hot” new twist to hair biology – Involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am. J. Pathol.* **166**(4):985-998.

Campbell E, Bevan S, Dray A (1993): Clinical applications of capsaicin and its analogues. In *Capsaicin in the study of pain*, Wood JN (ed), pp 256-272, Academic Press, London.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD and Julius D (1997): The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816-824.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000): Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**(5464): 241-2.

Cholewinski A, Burgess GM, Bevan S (1993): The role of calcium in capsaicin-induced desensitization in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **55**: 1015-1023.

Cruz F, Guimarães M, Silva C, Reis M (1997): Suppression of bladder hyperreflexia by intravesical resiniferatoxin. *Lancet* **350**: 640-641.

Cruz F (1998): Desensitization of bladder sensory fibers by intravesical capsaicin or capsaicin analogs. A new strategy for treatment of urge incontinence in patients with spinal detrusor hyperreflexia or bladder hypersensitivity disorders. *Int Urogynecol J* **9**: 214-229.

Davis ME, Akera T, Brody TM, Watson L (1977): Opiate receptor: cooperativity of binding observed in brain slices. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5764-66.

Dickerson A, Hughes C, Rueff A, Dray A (1990): A spinal mechanism of action is involved in the antinociception produced by the capsaicin analogue NE 19550 (olvanil). *Pain* **43**(3): 353-62.

Docherty RJ, Robertson B, Bevan S (1991): Capsaicin causes prolonged inhibition of voltage-activated calcium currents in adult rat dorsal root ganglion neuron in culture. *Neuroscience* **40**: 513-21.

Docherty RJ, Yeats JC, Bevan S, Boddeke HW (1996): Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Arch* **431**: 828-37.

Durant PA, Yaksh TL (1986): Epidural injections of bupivacaine, morphine, fentanyl, lofentanil, and DADL in chronically implanted rats: a pharmacologic and pathologic study. *Anesthesiology* **64**: 43-53.

Earnshaw WC (1995): Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **7**(3): 337-43.

Ellis CN, Berberian B, Sulica VI, Dodd WA, Jarratt MT, Katz HI, Prawer S, Kruger G, Rex IH Jr, Wolf JE (1993): A double-blind evaluation of topical capsaicin in pruritic psoriasis. *J Am Acad Dermatol* **29**: 438-442.

Endrényi L, Fajsz C, Kwong FH (1975): Evaluation of Hill slopes and Hill coefficients when the saturation binding or velocity is not known. *Eur J Biochem* **51**: 317-328.

Garcia-Hirschfeld J, Lopez-Briones LG, Belmonte C, Valdeolmillos M (1995): Intracellular free calcium responses to protons and capsaicin in cultured trigeminal neurons. *Neuroscience* **67**(1): 235-43.

Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Merino JM, Ferrer-Montiel A (2000): Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J Biol Chem* **275**(42): 32552-8.

Geppetti P and Holzer P (eds) (1996): Neurogenic Inflammation. *CRC press*, Boca Raton, FL.

Geppetti P, Trevisani M (2004): Activation and sensitization of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and function. *Br J Pharmacol* **141**(8): 1313-20.

Goso C, Piovacari G, Szallasi A (1993): Resiniferatoxin-induced loss of vanilloid receptors is reversible in the urinary bladder but not in the spinal cord of the rat. *Neurosci Lett* **162**: 193-200.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985): A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**:3440-3450

Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB (2002): The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci* **23**(4): 183-91.

Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R (1999): Immunocytochemical localization of [vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci* **11**: 946-58.

Hajos M, Jancso G, Enberg G (1987): Capsaicin-induced excitation of locus coeruleus neurons. *Acta physiol Scan* **129**: 415-420.

Hajos M, Engberg G, Nissbrandt H, Manusson T, Carlsson A (1988): Capsaicin-sensitive vasodilatory mechanisms in the rat substantia nigra and striatum. *J Neural Trans* **74**: 129-139.

Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Gloger IS, Davis JB (2000): Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* **88**(2): 205-15.

He X, Schmidt FR, Schmittner H (1988): Effects of capsaicin on articular afferents of the cat's knee joint. *Agents Actions* **25**: 222-24.

Hergenhahn M, Adolf W, Hecker E (1975): Resiniferatoxin and other esters of novel polyfunctional diterpenes from *Euphorbia resinifera* and *unispina*. *Tetrahedron Lett* **19**: 1595-1598.

Holzer P (1988): Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: Involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* **24**: 739-768.

Holzer P (1991): Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* **43**: 143-201.

Hori T (1991) In: Schoenbaum E, Lomax P (Eds.), *Thermoregulation: Pathology, Pharmacology and Therapy*, Pergamon Press, New York pp: 619-648.

Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. (2000): Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci USA* **97(11)**: 6155-60.

Jancsó G, Király E, Jancsó-Gábor A (1977): Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* **270**: 741-3.

Jancsó G, Karcsú S, Király E, Szebeni A, Tóth L, Básy E, Joó F, Párducz A (1984): Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium. *Brain Res* **295**: 211-216.

Jancsó N (1968): Desensitization with capsaicin and related acylamides as a tool for studying the function of pain receptors. In *Pharmacology of pain* (Lin K, Armstrong D and Pardo ED eds) pp 33-55, Pergamon, Oxford, UK.

Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J, Jancsó N (1970): Stimulation and desensitization of hypothalamic heat-sensitive structure by capsaicin in rats. *J Physiol (Lond)* **208**: 449-459.

Jancsó G, Lawson SN (1990): Transganglionic degeneration of capsaicin-sensitive C- fiber primary afferent terminals. *Neuroscience* **39(2)**: 501-511.

Jordt SE, Tominaga M, Julius D (2000): Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci USA* **97(14)**: 8134-9.

Jordt SE, Julius D (2002): Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* **108(3)**: 421-30.

Karai L, Brown DC, Mannes AJ, Connelly ST, Brown J, Gandal M, Wellisch OM, Neubert JK, Olah Z, Iadarola MJ (2004): Deletion of vanilloid receptor1-expressing primary afferent neurons for pain control. *J Clin Invest* **113(9)**: 1344-52.

Kaufman MP, Iwamoto GA, Longhurst JC, Mitchell JH (1982): Effects of capsaicin and bradykinin on afferent fibers with endings in skeletal muscle. *Circ Res* **50**: 133-139.

Keddi N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM (2001): Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* **276(30)**: 28613-9.

Koplas PA, Rosenberg RL, Oxford GS (1997): The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* **17**: 3525-37.

Kuzhikandathil EV, Wang H, Szabo 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)**: 8697-706.

LaCroix JS, Buvelot JM, Bolla BS, Lundberg JM (1991): Improvement of symptoms of non-allergic chronic rhinitis by local treatment with capsaicin. *Clin Exp Allergy* **21**: 595-600.

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(5259)**: 680-5.

Lang E, Novak A, Reeh PW, Handwerker HO (1990): Chemosensitivity of fine afferents from rat skin in vitro. *J Neurophysiol* **63**: 887-901.

Lázár J, Szabó T, Kovács L, Blumberg PM, Bíró T. (2003): Distinct features of recombinant vanilloid receptor-1 expressed in various expression systems. *Cell Mol Life Sci.* **60(10)**:2228-2240

Lazzeri M, Beneforti P, Turini D (1997): Urodynamic effects of intravesical resiniferatoxin in humans: Preliminary results in stable and unstable detrusor. *J Urol* **158**: 1093-96.

Liu L, Simon SA (1994): A rapid capsaicin-activated current in rat trigeminal ganglion neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 738-41.

Liu L, Simon SA (1998): The influence of removing extracellular Ca²⁺ in the desensitization responses to capsaicin, zingerone and olvanil in rat trigeminal ganglion neurons. *Brain Res* **809(2)**: 246-52.

Lundberg JM (1993): Capsaicin sensitive sensory nerves in the airways - implications for protective reflexes and disease. In Capsaicin in the study of pain, (Wood JN ed) pp 219-238, Academic press, San Diego, CA.

Lynn B, Carpenter SE (1982): Primary afferent units from the hairy skin of the rat hind limb. *Brain Res* **238**: 29-43.

Maggi CA, Santicioli P, Giuliani S, Furio M, Meli A (1986): The capsaicin-sensitive innervation of the rat urinary bladder: further studies on mechanisms regulating micturation threshold. *J Urol* **136**: 696-700.

Maggi CA, Meli A (1988): The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen Pharmacol* **19**: 1-43.

Maggi CA, Barbanti G, Santicioli P, Beneforti P, Misuri D, Meli A, Turini D (1989): Cystometric evidence that capsaicin-sensitive nerves modulate the afferent branch of micturation reflex in humans. *J Urol* **142**: 150-154.

Marsh SJ, Stansfield CE, Brown DA, Davey R, McCarthy D (1987): The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. *Neuroscience* **23**: 275-89.

Mezey E, Toth ZE, Corthright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A (2000): Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3655-3660.

Millan MJ (1999): The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* **57**: 1-164.

Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX (2002): A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* **9** (2): 229-31.

Nagy I, Rang H (2000): Comparison of currents activated by noxious heat in rat and chicken primary sensory neurons. *Regul Pept* **96(1-2)**: 3-6.

Ness TJ, Gebhat GF (1990): Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain* **41**: 167-234.

Nolano M, Simone DA, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T, Hazen E, Kennedy WR (1999): Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. *Pain* **81**: 135-145.

Oh U, Hwang SW, Kim D (1996): Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* **16**: 1659-1667.

Olah Z, Lehel C, Jakab G, Anderson WB (1994): A cloning and epsilon-epitope-tagging insert for the expression of polymerase chain reaction –generated cDNA fragments in Escherichia coli and mammalian cells. *Anal Biochem* **221(1)**: 94-102.

Osaka T, Kobayashi A, Lee TH, Namba Y, Inoue S, Kimura S (2000): Lack of integrative control of heat production and heat loss after capsaicin administration. *Pflugers Arch* **440**: 440-445.

Oyamada Y, Ballantyne D, Muckenhoff K, Scheid P (1998): Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J Physiol* **513**: 381-398.

Paus R., Schmelz M., Bíró T., and Steinhoff M. (2006): Scratching the brain for more effective “itch” therapy – Frontiers in pruritus research. *J Clin Invest.* **116(5)**:1174-1186

Petersen M, Pierau FK, Weyrich M (1987): The influence of capsaicin on membrane currents in dorsal root ganglion neurones of guinea-pig and chicken. *Phlugers Arch* **409**: 403-10.

Pineda J, Aghajanian GK (1997): Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus ceruleus neurons by modulating a proton-and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. *Neuroscience* **77**: 723-743.

Premkumar LS, Ahern GP (2000): Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* **408(6815)**: 985-90.

Sasamura T, Sasaki M, Tohda C, Kuraishi Y (1998): Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport* **9**: 2045-2048.

Savidge JR, Ranasinghe SP, Rang HP (2001): Comparison of intracellular calcium signals evoked by heat and capsaicin in cultured rat dorsal root ganglion neurons and in a cell line expressing the rat vanilloid receptor, VR1. *Neuroscience* **102(1)**: 177-84.

Smart D, Jerman JC, Gunthorpe MJ, Brough SJ, Ranson J, Cairns W, Hayes PD, Randall AD, Davis JB (2001): Characterization using FLIRP of human vanilloid VR1 receptor pharmacology. *Eur J Pharmacol* **417(1-2)**: 51-8.

Schmelz M, Schmid R, Handwerker HO, Torebjork HE (2000): Encoding of burning pain from capsaicin-treated human skin in two categories of unmyelinated nerve fibres. *Brain* **123(3)**: 560-71.

Schmelz M (2001): A neural pathway for itch. *Nat Neurosci* **4(1)**: 9-10.

Snider WD, MacMahon SB (1998): Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* **20**: 629-32.

Snyder SH (1977): Opiate receptors and internal opiates. *Sci Am* **236**: 44-56.

Steinhoff M, Bienenstock J, Schmelz M, Maurer M, Wei E, Bíró T (2006): Neurophysiological, neuroimmunological and neuroendocrine basis of pruritus. *J Invest Dermatol*. **126**:1705-1718.

Stucky CL, Abrahams LG, Seybold VS (1998): Bradykinin increases the proportion of neonatal rat dorsal root ganglion neurons that respond to capsaicin. *Neuroscience* **84**: 1257-1265.

Subramanian K, Meyer T (1997): Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell* **89(6)**: 963-71.

Svensson TH (1987): Peripheral, autonomic regulation of locus ceruleus noradrenergic neurons in brain: putative implications for psychiatry and psychopharmacology. *Psychopharmacology* **92**: 1-7.

Szállási Á, Blumberg PM (1989): Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* **30**: 515.

Szállási Á, Blumberg PM (1990): Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain Res* **524**: 106-111.

Szállási A, Blumberg PM (1992): Vanilloid receptor loss in rat sensory ganglia associated with long term desensitization to resiniferatoxin. *Neurosci Lett* **140**: 51-54.

Szállási Á, Blumberg PM (1993a): [³H]Resiniferatoxin binding by the vanilloid receptor: Species-related differences, effects of temperature and sulfhydryl reagents. *Naunin-Schmiedeberg Arch Pharmacol* **347**: 84-91.

Szállási Á, Conte B, Goso C, Blumberg PM, Manzini S (1993b): Vanilloid receptors in the urinary bladder: Regional distribution, localization on sensory nerves, and species-related differences. *Naunin-Schmiedeberg Arch Pharmacol* **347**: 624-629.

Szállási Á, Goso C, Manzini S (1995): Resiniferatoxin binding to vanilloid receptors in guinea pig and human airways. *Am J Respir Crit Care Med* **152**: 59-63.

Szállási Á, Blumberg PM (1996): Vanilloid receptors: new insights enhance potential as a therapeutic target. *Pain* **68**: 195-208.

Szállási Á, Blumberg PM (1999): Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* **51**: 159-211.

Szállási A, Blumberg PM, Annicelli LL, Krause JE, Cortright DN (1999b): The cloned rat vanilloid receptor VR1 mediates both R-type binding and C-type calcium response in dorsal root ganglion neurons. *Mol Pharmacol* **56**: 581-587.

Szolcsányi J (1977): A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. *J Physiol (Paris)* **73**: 251-9.

Szolcsányi J and Jancsó-Gábor A (1975): Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung* **25**: 1877-81.

Szolcsányi J, Szallasi A, Szallasi Z, Joo F, Blumberg PM (1990): Resiniferatoxin, an ultrapotent selective modulator of capsaicin sensitive primary afferent neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **255**: 923-928.

Szolcsányi J (1993): Actions of capsaicin on sensory receptors, in *Capsaicin in the study of pain* (Wood JN ed) pp1-26, Academic Press, San Diego.

Tarng D-C, Cho Y-L, Liu H-N, Huang T-P (1996): Hemodialysis-related pruritus: A double-blind, placebo-controlled, crossover study of capsaicin 0.025% cream. *Nephron* **72**: 617-622.

Tender GC, Walbridge S, Olah Z, Karai L, Iadarola M, Oldfield EH, Lonser RR (2005): Selective ablation of nociceptive neurons for elimination of hyperalgesia and neurogenic inflammation. *J Neurosurg* **102(3)**: 522-5.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H (1998): The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**: 1-20.

Tominaga M, Wada M, Masu M (2001): Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* **98(12)**: 6951-6.

Wallengren J, Klinker M (1995): Successful treatment of notalgia paresthetica with topical capsaicin: Vehicle-controlled, double-blind, crossover study. *J Am Acad Dermatol* **32**: 287-9.

Weisshaar E, Heyer G, Forster C, Handwerker HO (1998): Effect of topical capsaicin on the cutaneous reactionsw and itching to histamine in atopic eczema compared to healthy skin. *Arch Dermatol Res* **290(6)**: 306-11.

Winter J, Dray A, Wood JN, Yeats JC, Bevan S (1990): Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: a potent sensory neuron excitotoxin. *Brain Res* **520**: 131-140.

Wood JN, Winter J, James IF, Rang HP, Yeats J, Bevan S (1988): Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J Neurosci* **8**: 3208-20.

Yiangou Y, Facer P, Ford A, Brady C, Wiseman O, Fowler CJ, Anand P (2001): Capsaicin receptor VR1 and ATP-gated ion channel P2X3 in human urinary bladder. *BJU Int* **87** (9): 774-9.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is köszönettel tartozom Peter M. Blumbergnek, a National Institutes of Health LCCTP/MMTP laboratórium vezetőjének, a lehetőségért, hogy az általa vezetett laboratóriumban kutatómunkát végezhettem. Embersége, hatamas ismeretanyaga nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozom Dr. Bíró Tamásnak, aki barátomként rávett arra, hogy a tudomány és kutatás művelésének rögzös útjára lépjek. Kezdetektől önzetlenül segített, a munkámhoz szükséges kísérleti metodikákra megtanított és közös munkáinkban kreatív ötleteivel, tanácsaival segített. Kollaborációs munkánk gyümölcseként több közös hazai közleményünk is született.

Köszönöm külföldi kollegáimnak és kollaborátoraimnak segítségét és hozzájárulását munkámhoz.

Köszönöm Dr. Kovács László professzor úrnak a lehetőséget, hogy az Élettani Intézet keretein belül levelező PhD hallgató lehettem.

Köszönettel tartozom Dr. Balla György és Dr. Balla József professzoroknak, amiért laboratóriumukban a tudományos gondolkodás alapjait elsajátíthattam. Az ő alázatuk és elhivatottságuk a tudományhoz és kutatáshoz lenyűgözött, motivációt adott nekem is.

Köszönöm Dr. Oláh Éva professzor asszonynak, hogy támogatott ambíciómban, s a terminus leteltével a Gyermekklinikán ismét állást ajánlott.

Köszönöm páromnak, Dr. P.Szabó Gabriellának, hogy szeretetével, biztatásával minden nehézségen átvezetett, akaratot, lendületet adott.

Lányaimnak és szüleimnek ajánlom ezt a munkát nagy szeretettel!

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. Keddi 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**