

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

PhD-tézisek

Dr. Peitl Barna

Témavezető: Dr. Pethő Gábor

Programvezető: Prof. Dr. Szolcsányi János

PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

2001

Általános bevezetés

A primer afferensek néhány alapvető farmakológiai tulajdonsága

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Célok

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

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

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

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

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

II. VR1-agonisták termális antinociceptív hatásának vizsgálata a hőküszöbmérésre alkalmas emelkedő-hőmérsékletű forró lap módszerrel

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

Az egyes kísérletsorozatok részletes ismertetése

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

Általános megfontolások

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

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

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

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

A n. trigeminus szerepe a fájdalom kialakulásában

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

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

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

Anyagok és módszerek

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

A dura mater elektromos ingerlése és a meningeális véráramlás változás mérése

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

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

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

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

Kapszaicin/resiniferatoxin (RTX) előkezelés

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

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

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

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

A trigeminus-dűc elektromos ingerlésével kiváltott szöveti plazma extravazáció vizsgálata

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

afferensek közvetítik-e, vagy hasonlóan az értágulathoz fennáll hasonló különbség a két innervációs terület között. ¹²⁵I-vel jelzett bovine szérum albumin beadását RTX (3 µg/kg i.v.) vagy a kontroll csoport esetében oldószer (1 ml 0.9% fiziológiás sóoldat) intravénás infúziója követte, majd a trigeminus-dücot elektromosan ingereltük (25 V, 5 Hz, 0.5 ms, 5 perc). Az ingerlés befejezését követően 10 perccel az állatot kivégeztettük, s a vett szövetminták száraz súlyra viszonyított radioaktivitását meghatároztuk. Az ingerelt oldal aktivitását összehasonlítottuk a nem ingeret oldal aktivitásával. Az így kapott arányszámot (ER) használtuk az eredmények kiértékelésére.

Eredmények és következtetések

A dura mater felszíni ingerlése

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

A trigeminus-dúc ingerlése és a kapszaicinre való érzékenység vizsgálata

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

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

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

RTX (1-3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.) adása a nazális vazodilatációt teljesen megszüntette, s a hatás hosszan tartónak bizonyult, 60-90 perc eltelte után sem volt semmilyen jele az érválasz visszatérésének. Ezzel szemben az RTX ezen dózisa, sőt még a csak néhány alkalommal alkalmazott nagyobb dózisa (10 és 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.) sem voltak képesek a meningeális válasz csökkentésére.

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

A meningeális vazodilatáció, akár a perivaszkuláris idegek, akár a trigeminus-dúc ingerlésével váltjuk ki, nagyon hasonló a kinetikáját és a kapszaicin-érzékenységét tekintve. Ez azt jelzi, hogy a kétféle ingerlési technika a meningeális trigeminális afferensek azonos populációját stimulálja. Ugyanakkor összehasonlítva a nazális válasszal lényeges különbségek vannak a frekvencia optimumot, a válasz latenciaidejét és időtartamát, valamint a kapszaicin illetve a CGRP₈₋₃₇ iránti érzékenységet tekintve.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Általános megfontolások

Az előző kísérlet sorozat során kimutattuk, hogy a Gasser-dúc elektromos ingerlésével kiváltott neurogén vazodilatáció a trigeminus ideg intrakraniális és extrakraniális innervációs területén a kapszaicinre való érzékenység szempontjából eltérő primer afferensek révén közvetített. Továbbá, amellet, hogy különbség adódott a hCGRP₈₋₃₇ iránti szöveti érzékenységben, nem sikerült a kiváltott értágulat teljes mértékű gátlását elérni még az antagonista dózisékat tovább emelve sem (200 µg/kg i.v.). Ez pedig felveti más mediátor szerepét a trigeminus-dúc elektromos ingerlésével kiváltott válaszban. Miután korábban már a P anyagot, a VIP-et és az acetilcolint (Ach) kizártuk, mint a meningeális vasodilatáció lehetséges mediátorait, figyelmünk a nitrogén monoxid (NO) felé terelődött.

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

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

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

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

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

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

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

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

Anyagok és módszerek

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

Eredmények

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

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

A bethanecol hatása a regionális véráramlásra intraarteriális adás után

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

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

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

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

Az eredmények megbeszélése

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

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

Arra vonatkozóan is vannak eredmények, hogy a fennem említett neuropeptidek liberalizációját NO módosíthatja. Ezenkívül az NO önmaga is, mint értágító hatású molekula ismert, mivel az erek simaizomsejtjeiben a cGMP termelés fokozása révén

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

- 1.) A NOS gátlók adásmódja: úgy gondoljuk, hogy ezen anyagok intravénás adása biztosabb hatást eredményez, mint a lokális, gézcsíkra való cseppentés, mivel az általunk alkalmazott esetben nincs felszívódási fázis, így a plazmában elérhető farmakon-koncentráció független a környezet fiziko-kémiai jellemzőitől, mint amilyen a pH, a diffúzió vagy a szöveti perfúzió. Egy olyan anyagnál pedig, -és ilyenek a használt idegi NOS gátlók- mely oldatba vitele kellő odafigyelést és megfelelő speciális eljárásokat igényel még hangsúlyozotabban fontos, hogy a lehető legmegfelelőbb módot találjuk meg az anyag szervezetbe való juttatására. És ez véleményünk szerint ebben az esetben az intravénás alkalmazás.
- 2.) Az artéria meningea médiát beidegző trigeminális szenzoros idegek ingerlése: az irodalomban fellelhető adatok alapján két módszer terjedt el. Az egyik, -melyet Messlinger és mtsai is használtak- a dura felszínének ingerlésén alapul. Ezen módszer előnye, hogy az elektromos ingerléssel kiváltott meningeális áramlásfokozódás nem jár együt a szisztémás vérnyomás emelkedésével, így az esetleges tenzióemelkedés okozta szöveti perfúzió fokozódással nem kell számolni. A hátránya viszont, hogy nem csak a trigeminus-dűcből érkező primer afferens rostokat stimulálja, hanem a ganglion pterygopalatinumból eredő paraszimpatikus idegrostokat is, mely dűc elektromos ingerlésével pedig ugyancsak értágulat

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

3.) Endothél szerepe: a szervezet egyes szöveteiben a kialakuló értágulat létrejöhet az endothéltől függő mechanizmusok alapján. Az Ach alkalmas endothél-függő vazodilatáció kiváltásához. Ebben az esetben az Ach az érendothél felszínén jelenlévő muszkarin (M_3) receptoron keresztül NO képződéshez vezet, ami pedig vazodilatációt eredményez. Vannak azonban olyan, állatkísérletekből származó bizonyítékok is, melyek azt mutatják, hogy kialakulhat az erek tágulata az endothél eltávolítását követően, vagyis az endothéltől független mechanizmusok alapján is. A mi kísérleti elrendezésünkben, közvetlenül az artéria carotis internában juttatuk az M_3 -receptor agonista bethanecolt, hogy vizsgálhassuk a meningeális vazodilatáció endotheliális komponensét. Meglepetésre azonban azt tapasztaltuk, hogy a meningeális erek felett nem jön létre értágulat bethanecol adását követően, ugyanakkor a kísérleti állatunk egy távolabbi pontján, ami esetünkben a talp bőre volt kialakult a vazodilatáció. Ezekből az eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az artéria meningeális média értágulatában endothél-függő mechanizmusok nem vesznek részt. Ez pedig azt az elképzelést látszik alátámasztani, hogy a NOS gátlók alkalmazásával elért eredmények az enzim idegsejtre specifikus formájának a gátlásából származik.

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

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

II. VR1-receptor agonisták hosszú távú hatásának vizsgálata a nociceptív hőküszöbire emelkedő hőmérsékletű forró lap módszerrel (15. Saját közlemény)

Általános megfontolások

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

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

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

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

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

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

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

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

Anyagok és módszerek

A nociceptív hőküszöb mérése emelkedő hőmérsékletű forró lap módszerrel

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

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

A kemonociceptív küszöb meghatározása xilol-teszttel

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

A rektális hőmérséklet mérése

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

Anyagok

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

Statisztikai analízis

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

Eredmények

A szisztémásan adott RTX ill. kapszaicin hatása a nociceptív hőküszöbre

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

A szisztémásan adott RTX ill. kapszaicin hatása a kemonociceptív küszöbre

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

A szisztémásan adott RTX hatása a rektális hőmérsékletre

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

Az eredmények megbeszélése

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

Mind a RTX mind a kapszaicin magasabb dózisainak hatására megemelkedett a nociceptív hőküszöb és a xilollal vizsgált kemonociceptív küszöb. Mindkét anyag hatása dóziszfüggő volt: magasabb dózis(ok) adása esetén a küszöbemelkedések (termális ill. kémiai) maximuma nagyobb, tartama pedig hosszabb volt. Kísérleteink megerősítették azt az irodalmi adatot is, hogy a deszenzibilizáló hatást illetően a RTX a kapszaicinhez viszonyítva nagyságrendekkel potensebb. Mind a RTX (10 ug/kg) mind a kapszaicin (30 mg/kg) esetében találtunk egy olyan dózist, amely a hőküszöböt és a kemonociceptív küszöböt egyértelműen, de 2-4 napnál nem hosszabb ideig emelte meg. Tekintettel arra, hogy a xilol nem hat a VR1-receptoron, a xilollal szembeni kisebb érzékenység nem magyarázható a VR1-receptor deszenzibilizációjával. Sokkal valószínűbb, hogy ennek hátterében a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződések deszenzibilizációja áll. Feltételezhető, hogy a VR1-receptor aktiválódása során beáramló kationok (Na^+ és Ca^{2+}) olyan biokémiai hatásokat indítanak el a kapszaicin-érzékeny neuronokban, amelyek eredményeképpen azok érzékenysége mind a hő- mind a kémiai ingerekkel szemben lecsökken, küszöbemelkedést eredményezve. Ez a küszöbemelkedés nehezen magyarázható a szenzoros idegvégződések degenerációjával, mivel igen valószínűtlen, hogy 2-4 napon belül lezajlik az idegelemek degenerációja és

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

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

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

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

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

Legfontosabb eredményeim összefoglalása

1. A Gasser-dúc elektromos ingerlésével a trigeminális primer afferensek közvetlen és szelektív antidrómos izgatása váltható ki, mely együtt jár értágulat és plazma extravazáció kialakulásával mind az interoceptív, mind az exteroceptív trigeminális beidegzési területen.
2. Az alkalmazott kísérleti modellek alkalmasak a meningeális mikrocirkulációra ható farmakonok vizsgálatára.
3. A trigeminus ganglion elektromos ingerlésével kiváltott meningeális vazodilatációt kapszaicin-érzékeny primer afferensek közvetítik. Ennek jelentőségét az adja, hogy minden eddig vizsgált szenzoros efferens válasz kapszaicin-érzékeny bizonyult. Tehát ez az első, és mindaddig egyetlen ismert szenzoros-efferens funkció, mely kapszaicinre nem érzékeny afferensek útján jön létre. Mindez különösen érdekes annak fényében, hogy a trigeminális ingerléssel kiváltott meningeális plazma extravazáció ill. a nazális vazodilatáció és plazma extravazáció kapszaicin-érzékeny rostokon keresztül valósul meg.
4. A trigeminus-dúc elektromos ingerléssel kiváltott vazodilatáció a szenzoros rostok idegvégződéseiből felszabaduló CGRP által mediált, de az egyes szövetek között eltérés áll fenn a különböző receptor altípusok előfordulási arányát tekintve. Mert míg a nazális értágulat hCGRP₉₋₃₇-el gátolható, addig a meningeális válasz nem. Ez pedig azt a feltételezést támasztja alá, hogy az orr nyálkahártyájában főként CGRP-1 receptorok vannak jelen, addig a meningeális szövetekben CGRP-2 receptoroknak, vagy más mediátornak a szerepe merül fel.
5. A különböző támadáspontú NOS gátlók alkalmazásával kapott eredményeink alátámasztják azt az elképzelést, hogy az artéria meningealis média értágulata - legalábbis részben- az NO által mediált, illetve az NO-cGMP jelátviteli mechanizmus részt vesz a meningeális és nazális értágulat kialakulásában.
6. Az újonnan kifejlesztett, hőküszöbmérésre alkalmas emelkedő hőmérsékletű forró lap megfelelő módszer a VR1-receptor agonistákkal kiváltott termális antinociceptív hatás vizsgálatára. Mind a RTX mind a kapszaicin esetében sikerült találni egy

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

I. EREDETI KÖZLEMÉNYEK:

1. Barna Peitl, Gábor Pethő, Róbert Pórszász, János Szolcsányi. Capsaicin-insensitive sensory-efferent meningeal vasodilatation evoked by electrical stimulation of the trigeminal nerve fibres of the rat. *British Journal of Pharmacology*. 1999, **127**, 457-467.
2. Barna Peitl, Róbert Pórszász, József Németh, János Szolcsányi. The effects of nNOS inhibitors on the antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation of the dura mater in the rat. (közlés előtt).
3. Gábor Pethő, Róbert Pórszász, Barna Peitl, János Szolcsányi. Spike generation from dorsal roots and cutaneous afferents by hypoxia or hypercapnia in the rat in vivo. *Experimental Physiology*. 1999, **84**, 1-15.
4. József Németh, Márta Thán, Réka Sári, Barna Peitl, Gábor Oroszi, Beatrix Farkas, János Szolcsányi, Zoltán Szilvássy. Impairment of neurogenic inflammatory and anti-inflammatory responses in diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*. 1999, **386**, 83-88.
5. József Németh, Márta Thán, Barna Peitl, Gábor Oroszi, János Szolcsányi, Zoltán Szilvássy. Impaired anti-inflammatory response and decreased sensory neuropeptide release in streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Physiology London*. 2000, **526**, 156P-157P.

II. FOLYÓIRATBAN MEGJELENT ELŐADÁSKIVONATOK:

6. Barna Peitl, Gábor Pethő, Róbert Pórszász, János Szolcsányi. Capsaicin-insensitive sensory-efferent meningeal vasodilatation evoked by electrical stimulation of the trigeminal nerve fibres of the rat. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 1999, **13**, 126.
7. Barna Peitl, Róbert Pórszász and János Szolcsányi. The effect of NOS inhibitors on vasodilatation of the dura mater of the rat. *Regulatory Peptides*. 1999, **80**, 107-154.
8. Barna Peitl, Róbert Pórszász and János Szolcsányi (1999). The effect of 7-nitroindazole and N^ω-nitro-L-arginine on vasodilatation of the dura mater of the rat. *Neurobiology*. **7**, 370.
9. Róbert Pórszász, Miklós Százados, Barna Peitl, Gábor Oroszi, Zoltán Szilvássy, János Szolcsányi. The role of sensory fibres in capsaicin-induced vasoconstriction

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

III: ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK:

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