

CAPSAICIN ÉS ANANDAMID HATÁSAINAK VIZSGÁLATA PATKÁNY
TRIGEMINÁLIS GANGLIONSEJTEKEN

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

SZÓKE ÉVA

Neurofarmakológia Program

Programvezető: Prof. Dr. Szolcsányi János

Témavezető: Prof. Dr. Szolcsányi János

Prof. Dr. Czéh Gábor

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET
MTA NEUROFARMAKOLÓGIAI KUTATÓCSOPORT, PÉCS

2002

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

A CAPSAICIN-ÉRZÉKENY SZENZOROS NEURONOKRÓL, AZ ANANDAMID SZENZOROS NEURONOKRA GYAKOROLT HATÁSÁRÓL

Az elsődleges érzőneuronok vizsgálatában fontos szerepe van a paprika (*Capsicum annuum*) csípőanyagának, a *capsaicinnek* (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide), melynek első farmakológiai vizsgálata magyar tudósok nevéhez fűződik (Hőgyes, 1878, Jancsó Miklós, 1955). A capsaicin szelektív hatására már ezek a korai vizsgálatok is felhívták a figyelmet, és különösen fontos volt Jancsó Miklósnak az a megfigyelése, mely szerint capsaicin nagy dózisai után a kémiai fájdalomkeltő anyagokkal szemben deszenzibilizáció alakul ki. További vizsgálatok bizonyították, hogy a capsaicin szelektíven izgatja majd károsítja a hátsó gyöki illetve a trigeminális elsődleges érzőneuronok egy csoportját (Joó és mtsai, 1969, Szolcsányi és mtsai, 1975). A capsaicin-érzékeny primer afferens neuronoknak (Szolcsányi, 1982) ehhez a populációjához tartoznak a C-polimodális nociceptorok, az A δ -polimodális nociceptorok, melyek forró ingerekkel, kémiai fájdalomkeltő anyagokkal és mechanikai ingerekkel egyaránt aktiválhatóak.

Érződúcokban a szenzoros neuronok két fő csoportját szövettani festődési tulajdonságaik alapján meg tudjuk különböztetni (Andres, 1961, Lieberman, 1976). Az egyik csoportba nagyobb (25-80 μ m), világosan festődő sejtek tartoznak, ezeket A típusú sejteknek hívjuk. Az ezekhez tartozó axonok vastagabbak és velőhüvelyesek. A másik csoportba a kisebb (10-25 μ m), sötéten festődő B-típusú sejtek tartoznak. Axonjaik velőtlen, C-típusú, vagy vékony velőhüvelyű A δ rostok. A festődésbeli különbségek onnan erednek, hogy a nagyobb A-típusú sejtekben sok a világosan festődő neurofilamentum. Az endoplazmás retikulum rövidebb lamellákból áll és a mitokondriumok egyenletesen oszlanak el a citoplazmában. A kisebb B-típusú sejtek citoplazmája a sok szabad riboszóma, valamint kevesebb neurofilament miatt sötétebbre festődik. Az endoplazmás retikulum lamellái úgynevezett Nissl-testeket alkotnak, több bennük a Golgi apparátus, ezek jobban struktúráltak mint az A sejtekben. A mitokondriumok a sejtmag körüli régióban koncentrálnak.

A capsaicinnel végzett szerkezet-hatás vizsgálatok vetették fel először egy specifikus, capsaicinnel aktiválható farmakológiai receptor létezését (Szolcsányi és Jancsó-Gábor, 1975, 1976). Az erről megjelent első közlések után több mint 20 évvel sikerült a receptor létezését klónozással bizonyítani (Caterina és mtsai, 1997). A receptor a vanilloid receptor (VR1) nevet viseli, mely utal arra, hogy capsaicinen kívül egyéb vanilloid anyagok is képesek aktiválni. A

VR1 capsaicin receptor nem-szelektív kationcsatorna, mely leginkább a kalciumionra permeábilis (Bevan és Szolcsányi, 1990, Caterina és mtsai, 1997). Mivel a savas pH, vagyis magas protonkoncentráció és 48°C- nál magasabb fájdalmas hőinger is nyitja a VR1 kationcsatornát, így e két utóbbi inger a receptor természetes aktivátorának, a VR1 pedig a fájdalmas fizikai és kémiai ingerek molekuláris integrátorának tekinthető (Tominaga és mtsai, 1998). Újabban néhány adat utal arra is, hogy a szenzoros neuronok mellett az idegrendszer számos területén (a limbikus rendszer struktúrái, striátum, hipotalamusz preoptikus áréája, talamusz, kisagy, híd) sikerült VR1 receptort kimutatni. Napjainkban már több olyan anyagot ismerünk melyek képesek hatni a VR1 receptoron. Ezek között vannak szintetikus anyagok, mint az olvanil, nuvanil, valamint a természetben is előforduló anyagok, mint például a zingeron, piperin, resiniferatoxin, guajacol, eugenol, triprenyl fenolok és terpenoidok. A felsorolt anyagok különbözhetnek mind receptort izgató, mind deszenzitizáló hatásukban. Különösen érdekes az Euphorbia resinifera-ból nyert resiniferatoxin (RTX), mely különböző receptorkötési és deszenzitizációs vizsgálatokban több ezerszer mutatkozott hatásosabbnak mint a capsaicin (Blumberg és mtsai, 1993, Szallasi és Blumberg, 1990, 1999), és képes a pulmonális kemoreflexet előzetes aktiváció nélkül deszenzitizálni (Szolcsányi és mtsai, 1989). Korábban feltételezték, hogy a capsaicin és az RTX két külön receptor altípuson hatnak, C-típusú és R-típusú receptor altípusok létezéséről beszéltek. A VR1 receptor klónozása azonban bizonyította, hogy egyazon receptort aktiválja mindkét agonista vegyület.

A VR1 receptor klónozása óta megnövekedett az érdeklődés a vanilloid-kutatás területén, mivel a receptor inaktiválása előzetes izgatás nélkül elvezethet az első olyan fájdalomcsillapító gyógyszerhez, mely szelektíven a nociceptorokon fejti ki hatását. Azóta már több olyan molekulát találtak melyek nagyfokú hasonlóságot mutatnak a VR1-el. Ilyen a VRL1 (vanilloid receptor-like protein) melyet a magas hő aktivál, valamint a SIC (stretch-inhibitable channel) mely mechanoszenzitív tulajdonságokkal bír (Szallasi és Di Marzo, 2000). A VR1 receptoron kívül azonban továbbra sem találtak olyan rokon molekulát, mely capsaicinnel, RTX-el vagy más vanilloid struktúrával aktiválható lett volna.

Újszülöttkori capsaicin előkezelés után felnőtt állatban szignifikánsan kevesebb a B-típusú szenzoros neuronok és a velőhüvely nélküli rostok száma (Jancsó és mtsai, 1977, Nagy és mtsai, 1980, 1983, Jancsó és Király, 1981, Lawson, 1987, Sugimoto és mtsai, 1998). Ezzel szemben hasonló sejtpusztulást felnőttkori előkezelés után nem sikerült kimutatni és a hátsó gyöki C-típusú afferens rostok száma sem csökkent (Joó és mtsai, 1969, Szolcsányi és mtsai, 1975, Sugimoto és mtsai, 1998). Újszülött állatokban a capsaicin okozta károsodást akut neurotoxikus sejtpusztulásként írták le, mely fél óra alatt már manifesztálódik (Jancsó és

mtsai, 1977, Jancsó és Király, 1981, Jancsó és mtsai, 1987), ezért a szerzők a funkcionális károsodást az elpusztult neuronok hiányával magyarázzák. Felnőttkori capsaicin vagy RTX előkezelés után komoly mitokondriumkárosodás figyelhető meg egyes B sejtekben, mely napokkal sőt hetekkel az injekció után is látható, viszont a sejttest degenerációját a hátsó gyök axonszámainak csökkenésével (Tandrup és mtsai, 2000) vagy az érződúc neuronjainak akut pusztulásával nem sikerült alátámasztani (Joó és mtsai, 1969, Szolcsányi és mtsai, 1975, Szallasi és mtsai, 1989, Sugimoto és mtsai, 1998). Kvantitatív morfometriás bizonyítékot találtak viszont az idegvégződés degenerációjára változatlan számú axon jelenléte mellett (Tandrup és mtsai, 2000). Az újszülöttkori és felnőttkori előkezelés celluláris hatásai közötti kvalitatív különbségek magyarázata nem ismert. A VR1 receptoron ható fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztésénél lényeges szempont, hogy az új vegyületek szintéziséhez használatos vezetőmolekulák, mint a capsaicin, RTX esetleg az anandamid rendelkeznek-e akut sejtpusztulást kiváltó neurotoxikus hatással vagy sem. Az újszülöttkori capsaicin előkezelés gyors sejtpusztulást kiváltó hatását azonban csak egyes neuronok ultrastrukturális elváltozásaival bizonyították, és a kezelést követően kvantitatív morfometriás mérésekre érdekes módon a jelenség leírása óta eltelt több mint két évtized óta nem került sor.

A VR1 receptor sikeres klónozása megújította az endogén ligand azonosítására tett erőfeszítéseket is. A 2000. és 2001. években közölt bizonyítékok sora szól amellett, hogy az *anandamid* (N-arachidonilethanolamide) viszont közvetlenül a VR1 receptort aktiválja, így felmerült annak a lehetősége, hogy ez a molekula lenne a VR1 endogén ligandja (Zygmunt és mtsai, 2000, Szolcsányi, 2000a, Smart és Jerman, 2000, Szolcsányi, 2000b). Az anandamid az elsőként megismert endogén cannabinoid, melynek kimutatásával az agyban igazolták egy endogén cannabinoid szabályozó rendszer létezését (Devane és mtsai, 1992). Az anandamid az endocannabinoidok két ismert receptor altípusa (CB1 és CB2) közül a CB1 altípushoz kapcsolódik nagyobb affinitással. CB1 receptorok agyi struktúrákon mutathatók ki, míg a CB2 receptorok jelenléte inkább az immunrendszerre jellemző. A CB1 receptor aktiváció anandamid hatására az adenil cikláz valamint a feszültségfüggő kalciumcsatornák gátlásához vezet. Transzmitter felszabadulást gátló hatása van, és számos idegrendszeri folyamat neuromodulátora. *In vivo* kísérletekben az anandamid csökkenti a spontán motoros aktivitást, hipotermiát, immobilitást okoz, valamint analgetikus hatása is van (DiMarzo és mtsai, 1998, 2001). Az anandamid és egy szintetikus capsaicin analóg, az olvanil kémiai hasonlósága miatt kezdték vizsgálni, hogy a vanilloidok képesek-e hatni a CB receptorokon. Az olvanilról kiderült, hogy parciális CB1 receptor agonistaként viselkedik, és akárcsak az anandamid transzport inhibitor AM404, az olvanil is képes gátolni a [³H]anandamid akkumulációt humán

astrocytoma sejtekben (Beltramo és Piomelli, 1999). Ez után kerültek az érdeklődés középpontjába a vanilloid kutatás területén is a cannabinoidok és az anandamid. Az anandamid feltehetően képes a cannabinoid és a capsaicin receptorok közti interakcióra mind az idegrendszeri mind a kardiovaszkuláris struktúrákon (Zygmunt és mtsai, 1999). A 2001. évben megjelent közlések bizonyítottak vélik, hogy az anandamid a cannabinoid receptorok mellett a VR1 receptort is aktiválja, a viták inkább a VR1 aktiváció fiziológiai szerepéről folynak (Zygmunt és mtsai, 2000, Szolcsányi, 2000a, Smart és Jerman, 2000, Szolcsányi, 2000b). Mivel az anandamid ellentétes hatásokat közvetít a CB1 valamint a VR1 receptor aktiváción keresztül (például a CB1 receptor aktiváció a feszültségfüggő kalciumcsatornák gátlásához vezet, míg a VR1 receptor aktiválása kalciumion-beáramlást okoz a sejtekbe) ezért azokon a struktúrákon ahol mindkét receptor megtalálható, két nagyságrenddel nagyobb affinitása a CB1 receptorhoz nem engedi fiziológiás körülmények között manifesztálódni a VR1 agonista hatást (Szolcsányi 2000a, 2000b). Feltételezik azt is, hogy az anandamid fiziológiai szerepe az intracelluláris szignál mechanizmusok finom szabályozása lenne (DiMarzo és mtsai, 2000, Szallasi, DiMarzo, 2000).

AZ ÉRTEKEZÉS CÉLKITŰZÉSEI

I. Célunk volt kvantitatív morfológiai vizsgálattal ellenőrizni újszülöttkori capsaicin előkezelés hatásait patkány trigeminális ganglion sejteken. Elektronmikroszkópos vizsgálatokat és nociceptív tesztet (capsaicin szembe cseppentésével kiváltott védekező magatartás vizsgálata) végeztünk, hogy a sejtek ultrastrukturális állapotát valamint a nocicepció változását figyelemmel tudjuk követni. Vizsgáltuk idegnövekedési faktor ("nerve growth factor" (NGF)) kezelés hatásait capsaicin-kezelt állatok trigeminális ganglionsejtjeire.

II. Patkány trigeminális ganglionsejt-tenyészetben vizsgáltuk 3 anyag, a capsaicin, anandamid és RTX neuronokra kifejtett hatását. Intracelluláris kalciumionszint-mérést végeztünk fura-2 AM fluoreszcens festéket használva. Célunk volt a capsaicin és az anandamid, mint VR1 receptor külső és endogén ligandok ganglionsejtekre kifejtett hatásainak összehasonlítása.

III. Kísérleteinkben újszülöttkori anandamid és capsaicin előkezelés tartós hatásait kívántuk összevetni. A forró ingerekre adott nociceptív választ tail-flick teszttel vizsgáltuk. Ellenőriztük az előkezelés hatását az érződúcok ganglionsejtjeinek ultrastrukturájára a kezelés után különböző időpontokban.

IV. Patkány trigeminális ganglionsejt-tenyészetben fel akartuk tárni a mitokondriumok szerepét a capsaicin és RTX hatásának kialakulásában. A mitokondriumok részvételét a capsaicin intracelluláris kalciumionszintre gyakorolt hatása alapján vizsgáltuk mitokondriumpotenciált befolyásoló szerek jelenlétében.

I. ÚJSZÜLÖTTKORI SZISZTÉMÁS CAPSAICIN KEZELÉS HATÁSÁNAK ELEKTRONMIKROSKÓPOS ÉS FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA PATKÁNY TRIGEMINÁLIS GANGLIONSEJTEKEN. NGF HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA CAPSAICIN-KEZELT PATKÁNYOK TRIGEMINÁLIS GANGLIONSEJTJEIN.

Újszülöttkori szisztémás capsaicin vagy RTX kezelés csökkenti a perifériás idegek C-típusú, velőhüvely nélküli rostjainak valamint az érző ganglionok B sejteinek számát patkányban. Újszülött állatokban a capsaicin okozta károsodás jellemzőjének tartják, hogy az nagyon gyorsan, 30 perc alatt vagy néhány óra alatt lezajlik. Felnőtt korban kezelt patkányokban capsaicin vagy RTX kezelés után sem hasonló sejtszámcsökkenést sem a hátsó gyöki C-típusú afferens rostok számának redukcióját nem észlelték, ellenben komoly mitokondriumkárosodást figyeltek meg a hátsó gyöki és trigeminális ganglionok egyes B sejtjeiben.

Módszerek

1. *Újszülött patkányok előkezelése capsaicinnel:* Újszülött Wistar patkányokat a második napon 50 mg/kg (s.c.) capsaicinnel kezeltünk. A patkányok egy csoportja a capsaicin kezelés utáni naptól számított 10 napon keresztül NGF injekciót kapott (NGF fiziológiás sóoldatban 10×100 µg/kg, s.c.), egy másik csoportnak csak a sóoldatot adtuk. Kontroll állatokat is használtunk, ezek a capsaicin oldószerét (10% etanol, 10% Tween 80 fiziológiás sóoldatban, s.c.) kapták.

2. *Perfúzió:* A patkányokat ketaminnal altattuk, transzkardiálisan 0.1 M-os foszfát pufferrel (PB, pH=7.4), majd 4%-os paraformaldehid és 1% glutáraldehid keverékével (0.1 M PB-ben) perfundáltuk. A perfúzió különböző időpontokban történt, egy nappal a capsaicin kezelés után, tehát 3 napon, majd 1, 2, 3, 6, 10, 12, 14, 20 hetes korban. A capsaicin+NGF-kezelt állatok esetében a perfúziót 3 hetes korban végeztük.

3. *Fénymikroszkópos vizsgálatok:* Négy kontroll, 4-6 capsaicin-kezelt vagy capsaicin+NGF-kezelt állat trigeminális ganglionját kimetszettük, dehidráltuk, majd paraffinba ágyaztuk és 8 µm vastag sorozatmetszeteket készítettünk belőlük. 1%-os Cresyl ibolya festékkel megfestettük majd DePexszel fedtük a metszeteket.

4. *Kvantitatív analízis:* A sejtszámolást és a sejtméret meghatározását számítógéphez csatlakoztatott Nikon mikroszkóppal, és a Neurolucida 2.0 szoftverrel végeztük. 1100-1200 sejt méretét határoztuk meg 2 kontroll és 2 capsaicin-kezelt állat ganglionjában 6 hetes korig minden korcsoportban, így az A és B sejtek arányát is megkaptuk. Csak azokat a sejteket számoltuk, melyek nukleolusza is látszott. Teljes sejtszám meghatározást is végeztünk a nukleoláris számolási módszerrel és egy korrekciós faktor (Königsmark, 1970) segítségével 1 hetes (4 kontroll, 6 capsaicin-kezelt) és 3 hetes (4 kontroll, 4 capsaicin-kezelt, 5 capsaicin+NGF-kezelt) patkányok ganglionjaiban. Az adatok statisztikai értékelése nem-parametrikus Mann-Whitney teszttel történt. Statisztikailag szignifikánsnak $p < 0,05$ érték esetén tekintettük az adatokat.

5. *Elektronmikroszkópos vizsgálatok:* Minden korcsoportból 2 kontroll és 2 capsaicin-kezelt állat, valamint 2 capsaicin+NGF-kezelt 3 hetes állat trigeminális ganglionját vizsgáltuk. A perfúzió után a ganglionokat kipreparáltuk, 1 mm³-es darabokat metszettünk belőlük, és 1-2 órán át posztfixáltuk paraformaldehid és glutáraldehid keverékben. Ezután ozmium-tetroxiddal folytattuk a fixálást, majd dehidráció után Durcupanba ágyasztuk a gangliondarabokat. Leica ultramikrotómmal 0.5 µm vastag félvékony metszeteket vágunk, toluidin-kékkel megfestettük. Az ultravékony (1-2 nm vastag) metszeteket ólommal kontrasztoltuk, majd JEOL 1200 elektronmikroszkóp alatt vizsgáltuk.

6. *Kemonocicepció vizsgálata:* 3 és 6 hetes kontroll, capsaicin-kezelt és capsaicin+NGF-kezelt állatokat vizsgáltunk. 10⁻⁵ g/ml capsaicint (1%-os capsaicin törzsoldatból fiziológias sóoldatban hígítva) cseppentettünk az állatok szemébe, majd a mellső lábakkal végzett törülő mozdulatokat számoltuk („wiping teszt”).

7. *Neurogén gyulladás vizsgálata plazma extravazáció mérésével:* Hat hetes kontroll (n=7), capsaicin-kezelt (n=7) és capsaicin+NGF kezelt (n=8) patkányokat használtunk a kísérlethez. Az állatokat natrium-thiopentállal (Trapanal, 50 mg/kg, i.p.) altattuk, majd neurogén gyulladást váltottunk ki a láb hátsó bőrében paraffinolajban oldott 1 %-os mustárolaj helyi ecsetelésével. A gyulladás okozta plazma extravazációt Evans kék akkumulációs módszerrel határoztuk meg. Ez a festék kötődik a plazma albuminhoz, tehát az állatoknak adva (50 mg/kg dózisban) a gyulladás helyén kilép az érpályából és a gyulladt szövetben történő akkumulációja arányos a plazma extravazáció mértékével. A mustárolajecsetelés után

20 perccel a lábhati bőröket lemetszettük, majd 72 órás formamid extrakció után 620 nm-en meghatároztuk az extravazálódott festék mennyiségét $\mu\text{g/g}$ egységben megadva.

Eredmények, következtetések

Huszonnégy órával a capsaicin kezelés után csak a B sejtek közül néhányban az endoplazmás retikulum, a mitokondriumok és a Golgi apparátus membránjai szakadozottak. A sejtmagban a kromatinállomány kondenzálódott, a sejtek nekrotikusak. Egy héttel a kezelés után a nekrotikus B sejtek már nem láthatók, viszont néhány B sejtben duzzadt mitokondriumokat találtunk hiányzó belső krisztákkal, ezeknek a sejteknek a száma nő a 2. héten. Három és hat héttel a kezelés után már olyan kifejezett a mitokondriumkárosodás, hogy a legsúlyosabban érintett B sejtek már félvékony metszeten is láthatók. Az érintett B sejtek szinte összes mitokondriuma károsodott, az összes belső kriszta hiányzik belőlük. A citoplazma más organelumai és a sejtmag, valamint az A sejtek és a szatellita sejtek minden korcsoportban érintetlenek. Apoptotikus illetve nekrotikus sejteket sem lehet felfedezni a 20. hétig. A 14.-től a 20.-dik hétig a károsodott mitokondriumú sejtek százalékos aránya a normál sejtekhez képest csökkent, utalva arra, hogy ezek a sejtek lassan eltűnnek a ganglionokból.

A capsaicin beadása után kezdett rendszeres, 10 napon át tartó NGF kezelés nem akadályozta meg a mitokondriális elváltozásokat a sejtekben. A 3 hetes capsaicin+NGF-kezelt állatok ganglionsejtjeiben a mitokondriumok ugyanolyan elváltozásai figyelhetők meg, mint amilyenek a csak capsaicinnal kezelt állatok hasonló korcsoportjában láthatók.

A capsaicin kezelés után 5 nappal nem volt csökkenés az A és B sejtek számában a trigeminális ganglionokban a kontrollhoz képest. A teljes neuronális sejtszám 26.103 ± 1310 a kontroll állatokban ($n=4$) és 24.386 ± 1613 ($n=6$) a kezeltékben, ugyanilyen kis eltérés mutatkozott a B sejtek számában, 19.115 ± 1344 volt a kontroll és 18.277 ± 1322 a capsaicin-kezelt állatokban. Három héttel a kezelés után a B sejtek számának csökkenését tapasztaltuk (kontroll 20.348 ± 1609 , kezelt 12.369 ± 543). Az A sejtek számában nem találtunk eltérést.

Habár az NGF kezelés nem hatott a capsaicin okozta ultrastrukturális elváltozásokra, a sejtszámcsökkenést kivédte a capsaicin-kezelt állatok ganglionjaiban. A kontroll állatokban a B sejtek száma 20.348 ± 1609 volt 3 hetes korban, ugyanez capsaicin+NGF-kezelt állatoknál 21.496 ± 3948 ($n=5$, $p=0.4$).

A sejtméretek a kezelés után 1 és 5 nappal nem mutattak különbséget a kontroll és capsaicin kezelt csoportokban, míg 3 és 6 héttel a capsaicin kezelés után a nagyobb méretek felé tolódtak el.

Szisztémás capsaicin kezelés deszenzitizációt okoz 3 és 6 hetes, újszülött korban capsaicinnel kezelt állatoknál. Capsaicin szembe cseppentése jóval kevesebb védekező törülő mozdulatot eredményezett (0.86 ± 0.86 és 0.14 ± 0.11) mint a kontroll csoportokban (10.9 ± 1.9 és 6.9 ± 1.9). A capsaicin+NGF kezelt 3 és 6 hetes állatoknál a mozdulatok száma 3.9 ± 0.8 és 2.1 ± 1 . A deszenzitizáció mértéke tehát kisebb azoknál az állatoknál melyek a capsaicin után NGF kezelést is kaptak mint azoknál, akik csak capsaicin injekciót kaptak.

Újszülöttkori szisztémás capsaicin kezelés 85%-al csökkentette a plazma extravazáció mértékét a kezelt állatokban a kontroll állatokhoz képest. A capsaicin+NGF-kezelt állatok esetén ez az érték hasonló volt, 86%. Az újszülöttkori NGF kezelés tehát nem befolyásolja a capsaicin kezelés plazma extravazációt gátló hatását.

Kísérleteinkben 24 órával a capsaicin előkezelés után apoptotikus sejteket nem találtunk, viszont ozmiofil, nekrotikus sejtek előfordultak, melyek sejtmagja és sejtorganellumai károsodottak. Azonban a capsaicin subcutan injekciója után apnoe, bradykardia és hipotenzió lép fel, melyet az állatok mesterséges lélegeztetés nélkül nem élnek túl. Feltehető, hogy ischémia alakul ki, mely néhány sejt esetében akár apoptotikus akár nekrotikus sejthalálhoz vezethet. Öt nappal a kezelés után azonban nem találtunk szignifikáns sejtszámcsökkenést. Tehát a három hét után jelentkező redukción a B sejtek számában nem tekinthetjük korai, akut sejthalál következményének.

A későn jelentkező sejthalált valószínűleg a perifériás és centrális idegvégződések degenerálódása következtében fellépő NGF felvétel hiánya okozta újszülöttkori előkezelés esetén. Felnőttkori előkezelés után ez a hatás nem jár együtt sejtpusztulással. Az NGF nélkülözhetetlen a nociceptív afferensek prenatális és korai posztnatális fejlődési periódusában.

A capsaicin megnyitva a VR1 receptor kation csatornáját megnöveli az intracelluláris kalciumion-koncentrációt, a mitokondriumok kalciummal telítődnek, ez pedig strukturális károsodáshoz vezet. Megválaszolatlan az a kérdés, hogy ez miért nem vezet azonnali sejtpusztuláshoz, vagy miért nem követi restitúció. Ilyen mitokondriumokat hetekkel a kezelés után is láthatunk. Az NGF kezelés a sejtszámcsökkenést megakadályozta, de a mitokondriumok dezorganizációjára nem volt hatással.

Tehát az elektronmikroszkópos vizsgálatok és a kvantitatív adatok azt bizonyítják, hogy újszülöttkori capsaicin előkezelés az érző ganglionok B sejtjeiben lassan kialakuló mitokondriumkárosodást és lassan bekövetkező sejtszámcsökkenést okoz. Kvantitatív morfometriai adatokkal nem támasztható alá a capsaicin korai neurotoxikus hatása.

II. A CAPSAICIN ÉS ANANDAMID HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PATKÁNY TRIGEMINÁLIS GANGLIONSEJT-TENYÉSZETEN INTRACELLULÁRIS KALCIUMIONSZINT-MÉRÉSSSEL

Az endocannabinoid anandamid tenyésztett endothél sejteken kalciumion-akkumulációt okoz, melyet a szelektív CB1 receptor antagonistá SR 141716A blokkolni tudott. Az anandamid képes csökkenteni a capsaicin által kiváltott CGRP felszabadulást a hátsó gyöki ganglionból a nociceptív afferensek CB1 receptorain keresztül. Ugyanakkor sikerült igazolni az anandamid izgató hatását a VR1 receptort expresszáló HEK293 sejteken, ahol befelé folyó áramot váltott ki, melyet a capsaicin antagonistá capsazepin kivédett. Izolált ér-preparátumon az anandamid vazodilatációt hoz létre CGRP felszabadításán keresztül, mely szintén blokkolható volt a capsaicin antagonistá capsazepinnel. A CB1 receptorok jelenlétét kimutatták központi és perifériás idegrendszerben, a capsaicin érzékeny rostokon is. Tenyésztett hátsó gyöki ganglionsejtekben a CB1 és VR1 immunpozitív sejtek nagymértékű átfedéséről számoltak be.

Módszerek

1. *Patkány trigeminális ganglionsejt-tenyésztés készítése:* 2-5 napos Wistar patkányokat éteres altatás mellett dekapitáltuk, kétoldali trigeminális ganglionjukat steril foszfát pufferben (PBS) kiperaráltuk és 1 mm³-es darabokra vágtuk. A gangliondarabokat 40 percig 2 % kollagenázt tartalmazó PBS-ben inkubáltuk 37°C-on, 5% CO₂ tartalom mellett. Ezután deoxiribonukleáz I-et tartalmazó PBS-ben inkubáltunk 8 percen keresztül. Triturálás után a sejteket steril 24 lukú tenyésztőedényekbe helyeztük, melyek fenekén poly-D-lysinnel előkezelte üveg lemezek voltak. A tenyésztő médium a következő összetevőkből állt: 180 ml Dulbecco's-Modified Eagle Medium (D-MEM), 5% ló szérum, 5% újszülött kecske szérum, 5% BSA, 100 µl penicillin, 100 µl sztreptomycin. A tápoldathoz 200 ng/ml NGF-t adtunk, a tápoldatot kétnaponta cseréltük, a kísérletekhez 3-8 napos tenyészeteket használtunk.

2. *Intracelluláris kalciumionszint-mérés fluoreszcens módszerrel:* A 3-8 napos tenyészeteket 1 µM fura-2-acetoxy-metilészter (AM) fluoreszcens kalcium-indikátor festéket tartalmazó oldatba helyeztük át 15 percre 37°C-os hőmérsékleten. Az inkubálás után 20

perces mosás következett tápoldatban, melynek összetétele a következő (mM-ban): NaCl, 160; KCl, 2.5; CaCl₂, 1; MgCl₂, 2; HEPES, 10; glükóz, 10; pH 7.3. A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük Olympus BX50WI fluoreszcens mikroszkóppal. A sejtekre folyamatosan friss tápoldatot áramoltattunk. A fluoreszcens képet egy 20×-os nagyítású vízimmerziós objektív és egy számítógéphez csatlakoztatott digitális kamera (CCD, SensiCam PCO) segítségével rögzítettük. A sejteket alternálva 340 és 380 nm hullámhosszú fényel világítottuk meg egy monochromator (Polychrome II, Till Photonics) segítségével, az emittált fényt 510 nm hullámhosszúságon mértük. A két hullámhosszon gerjesztett fluoreszcencia intenzitás arányát (ráciometrikus érték, $R=F_{340}/F_{380}$) az idő függvényében az Axon Imaging Workbench 2.2 software-el mértük, a kapott függvényeket a Microcal Origin 6.0 software segítségével értékeltük.

3. *Capsaicin, KCl és anandamid hatás vizsgálata.* A sejtekre folyamatosan tápoldat áramlott, e mellett még 3 másik anyagot tudunk tesztelni a kísérleti elrendezésben. A különböző kísérletekben eltérő ideig alkalmaztuk az anandamidot, capsaicint és KCl-t. A capsaicint 100 nM, 330 nM 1 μ M koncentrációban, az anandamidot 200 nM és 10 μ M koncentrációban használtuk.

4. *Az anandamid capsaicin-választ gátló hatásának vizsgálata.* Az első capsaicin válasz kiváltása után a tápoldat áramlását leállítottuk, és a kamrába pipettával anandamidot adtunk, úgy, hogy ott annak végső koncentrációja 200 nM legyen. Az inkubáció sötétben zajlott 5 percig, ezután elindítottuk a tápoldat áramlását, és fél percen belül elvégeztük a második capsaicin tesztet is, a két eredményt összehasonlítva, a másodikat az elsőhöz viszonyítva következtettünk a gátlás hatásfokára.

5. *Az SR 141716A szelektív CBI receptor antagonistá hatása az anandamid válaszra.* Az SR 141716A tesztelése előtt két alkalommal adtunk anandamidot (200 nM, 5 másodperc) a sejtekre, majd a tápoldat áramlását leállítottuk 5 percre, és a kamrába pipettával SR 141716A-t adtunk, hogy ott a végső koncentráció vagy 300 nM vagy 10 μ M legyen. Ezután az tápoldat áramlását újraindítottuk, a harmadik anandamid tesztet fél percen belül elvégeztük, majd a második és harmadik teszt eredményét hasonlítottuk össze, az eredményeket az első válaszhoz viszonyítottuk.

6. Az SR 141716A szelektív CB1 receptor antagonista hatásának vizsgálata az anandamid capsaicin-választ gátló hatására. Ebben az esetben a sejtek egy csoportja 3 ízben ismételt (2 másodperces) 330 nM koncentrációjú capsaicint kapott. Ez volt a kontroll csoport. A sejtek másik csoportjánál a második és a harmadik capsaicin adás között 200 nM-os anandamid inkubálást alkalmaztunk (4. pont). A sejtek harmadik csoportja esetén az anandamidos inkubálás mellett egyidőben 300 nM SR 141716A-t is a kamrába juttattunk.

Eredmények, következtetések

Azonosítottuk a capsaicin-érzény sejteket, a sejtek 47,4%-a válaszolt intracelluláris kalciumionszint növekedéssel 100 nM capsaicin alkalmazásakor, 45,3%-a 330 nM capsaicin, 70,4%-a 1 μ M capsaicin sejtekre juttatására. A válaszok kinetikája és időtartama jelentősen eltért. Az átlag R érték 100 nM capsaicin esetén 0.293 ± 0.32 volt, 330 nM hatására 0.683 ± 0.23 , 1 μ M capsaicin alkalmazásakor pedig 0.758 ± 0.24 értéknek adódott.

Ha a 330 nM capsaicin adása előtt 200 nM-os anandamiddal inkubáltuk a sejteket, a fluoreszcencia növekedés körülbelül 20%-ára csökkent ($R=0.04 \pm 0.07$). Az anandamid tehát nanomoláris koncentrációban gátolta a második capsaicin reakció kialakulását.

Kísérleteinkben először igazoltuk, hogy az anandamid képes szenzoros neurontenyészetben a capsaicinhez hasonló intracelluláris kalciumionszint emelkedés kiváltására. A sejtek 17%-a válaszolt intracelluláris kalciumionszint növekedéssel 200 nM anandamid használatkor ($R=0.2 \pm 0.13$). Ezeket a sejteket is beleértve, csupán a sejtek 27%-ában nőtt meg a kalciumionszint 10 μ M anandamid alkalmazásakor ($R=0.16 \pm 0.12$).

A capsaicin-érzékeny sejtek közel 50%-a válaszolt 10 μ M anandamidra kalciumionszint növekedéssel. Újra capsaicint adva a sejtek 39,4%-a reagált capsaicinre azok közül, amelyek anandamidra is reagáltak, a sejtek 13%-a csak capsaicinre reagált, a sejtek 10,5%-ában a capsaicin hatása eltűnt az anandamid okozta kalciumionszint-növekedés után.

10 μ M SR 141716A adását követően 27 sejtől 12 sejtben figyeltük meg a válasz növekedését. Vizsgálataink tehát azt bizonyítják, hogy a gátló CB1 receptorok blokkolása SR141716A-val a sejtek mintegy 50 %-ánál fokozta az anandamiddal kiváltott kalcium-választ jelezve, hogy a sejtek ezen csoportjában a CB1 receptorális gátlás és VR1 receptorális izgatás egyaránt szerepet játszik. Érdekes, hogy a sejtek másik csoportjában ez a CB1 receptorális gátlás nem volt megfigyelhető és 7 esetben hatáscsökkenést figyeltünk meg, 6 esetben pedig a válasz nem volt kiváltható. További vizsgálatot igényel annak kiderítése,

hogy ezeknél a sejteknél a VR1 receptor deszenzitizációja milyen szerepet játszik a hatás csökkenésében.

Kétszáz nM anandamid jelentősen gátolta a capsaicinnel kiváltott kalciumionszint emelkedést. A gátló hatás nagysága CB1 antagonistá jelenlétében is változatlanul megfigyelhető. Ez az adat arra utal, hogy a VR1 receptoriális deszenzitizáció kialakulását az anandamid CB1 receptort izgató hatása nem befolyásolja.

Az anandamid mint endocannabinoid izgatja a CB1 receptorokat és ez gátolja a szenzoros neuronok aktiválhatóságát és analgetikus hatását. Újabb eredmények alapján az anandamid CB1 agonista gátló hatásán kívül a VR1 receptor agonistájaként depolarizációt is kivált a szenzoros neuronokon. Az anandamid VR1 aktivációval kiváltott kalciumion-beáramlást előzetes aktiváció után, vagy anélkül gátolni is képes, mivel nanomoláris koncentrációban képes a capsaicin hatását antagonizálni, vagy anandamid jelenlétében gátolt a capsaicin reakció kialakulása. Ez a gátló hatás az anandamid parciális VR1 receptor antagonistá hatásával, vagy az anandamid kiváltotta cannabinoid receptor aktivációjával is magyarázható. A capsaicin-érzékeny idegvégződésekből az anandamid által kiváltott CGRP-felszabadulás gátlása szintén az anandamid VR1 receptoriális antagonizáló hatására utal. A szelektív CB1 receptor antagonistá SR141716A-val végzett vizsgálataink bizonyították, hogy a receptorok blokkolása a sejtek mintegy felénél megnövelte az anandamiddal kiváltott kalcium-választ. A gátlásban tehát a CB1 receptor izgatásának szerepét sikerült kísérletesen bizonyítanunk a VR1 receptoriális izgatás mellett is, ami a CB1 és a VR1 receptorok koexpresszióját mutatja egyes neuronokban. Találtunk azonban olyan sejteket is, ahol az antagonistá adása után az anandamid válasz gátlása volt látható, CB1 antagonistá jelenlétében is. Így a VR1 parciális antagonistá hatás szerepe is feltételezhető. Más kutatócsoportok is hasonló diverzitásról számoltak be.

III. ÚJSZÜLÖTTKORI ANANDAMID KEZELÉS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PATKÁNY TRIGEMINÁLIS GANGLIONSEJTEKEN ÖSSZEHASONLÍTVÁ A CAPSAICIN KEZELÉS KÖVETKEZMÉNYEIVEL.

A II. fejezetben leírt kísérletek értékelésekor felmerült, hogy az anandamid hatására kialakuló válaszban a VR1 receptor aktiválása valószínűsíthető. Érdekes volt tehát megvizsgálni azt, hogy vajon az anandamidnak vannak-e a capsaicinhez hasonló morfológiai hatásai a szenzoros ganglionok sejtjein és okoz-e hasonló, hetekig tartó antinociceptív hatást.

Ezek a jelenségek újabb bizonyítékok lennének arra, hogy az anandamid a VR1 receptor endogén ligandja és érdekes példáját képezhetnék annak, hogy egy endogén ligand is képes kiváltani a capsaicinhez hasonlóan tartós funkcionális és morfológiai hatásokat.

Módszerek

1. Újszülött patkányok kezelése anandamiddal: Két napos Wistar patkányokat kezeltünk anandamiddal 1 mg/kg dózisban (s.c.). Az injekciót nem követte sem asphyxia, sem apnoe, melyek a capsaicin kezelés velejárói. A kontroll állatokat az anandamid oldószerét kapták (1% etanol fiziológias sóoldatban).

2. Perfúzió: A ketaminnal elaltatott patkányokat transzkardiálisan 0.1 M-os foszfát pufferrel (PB, pH=7.4), majd 4%-os paraformaldehid és 1% glutáraldehid keverékével (0.1 M PB-ben) perfundáltuk vagy egy nappal az anandamid kezelés után, tehát 3 naposan, vagy 1, 2, 3, 6, 10, 12, 14 illetve 20 hetes korokban.

3. Kombinált VR1 immun-elektronmikroszkópia: Két 6 hetes, anandamiddal kezelt Wistar patkányt transzkardiálisan 0.1 M-os foszfát pufferrel (PB, pH=7.4), majd 4%-os paraformaldehiddel perfundáltunk. A trigeminális ganglionokat 1 órán keresztül posztfixáltuk a paraformaldehidben. Két órára 15%-os szukróz oldatba (0.1 M PB-ben) majd éjszakára 30%-os szukróz oldatba helyeztük a gangliondarabokat. A perfúziót követő napon a ganglionokat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Ezután fagyasztó mikrotómmal 15 µm vastagságú metszeteket készítettünk. TRIS pufferben (pH=7.6) történő mosás után a metszeteken háttérgátlást végeztünk (Vector P6200 Universal Kit), majd egy éjszakán át szobahőmérsékleten TRIS pufferben (pH=7.6) hígított VR1 antitesttel inkubáltuk (1:500, Chemicon). Másnap Tris pufferes mosás után 2 órás inkubálás következett a szekunder antitesttel (Vector P6200 Universal Kit), majd 2 órás inkubálás avidin-biotin-peroxidáz komplexben (Vector P6200 Universal Kit). Újabb mosást követően DAB-os hívást végeztünk. A metszetek ezután kerültek 2 %-os glutáraldehidbe 1-2 órára. Ezután rutin elektronmikroszkópos beágyazás történt az I. fejezetben ismertetett módon úgynevezett „flat embedding” módszerrel.

4. *Elektronmikroszkópos vizsgálatok:* A perfúzió után minden korcsoportból 2 kontroll és 2 kezelt állat trigeminális ganglionját, valamint a 3 hetes állatok hippocampusát kivettük, és szintén az I. fejezetben ismertetett módon processzáltuk, az ultravékony metszeteket JEOL 1200 elektronmikroszkóp alatt vizsgáltuk át.

5. *Módosított tail-flick teszt:* A kezelt és kontroll állatokkal 3-14 hetes korukig hetente végeztük el a következő tesztet. Az állatok farkát olyan vízfürdőbe lógattuk, a víz hőmérsékletét 45°C-tól fokenként emeltük maximum 53°C-ig. A nociceptív küszöb hőmérsékletet úgy állapítottuk meg, hogy meghatároztuk azt a minimális hőmérsékletet, melynél az állat 5 másodperc alatt a farkát a vízből kirántotta.

Eredmények, következtetések

Huszonnégy órával a kezelés után a ganglionsejteken nem láttuk a capsaicin kezelés után látható nekrotikus B sejteket. Megjegyzésre méltó, hogy anandamid adás nem váltott ki apnoe választ a patkányokon. Egy héttel az előkezelés után a kis B sejtekben található mitokondriumok károsodása, a kriszták dezorganizációja. A két hetes állatokban már több mitokondrium volt érintett. A három hetes állatok esetében az érintett sejtek szinte összes mitokondriuma károsodott. A kriszták némelyikben teljesen eltűnnek, a mitokondriumok mérete megnő, duzzadt. 20 hétig a sérült B sejtek megtalálhatók a ganglionokban. Az A sejtek és a szatellita sejtek épek. Sem apoptózisra, sem nekrozisra utaló jelek nem detektálhatók egyik korcsoportban sem.

Három héttel a kezelés után, amikor a trigeminális sejtekben a mitokondrium károsodása már szembetűnő, a hippocampusz fő sejtjei és interneuronjai egészségesnek tűnnek elektronmikroszkópban. Sem a gyrus dentatusban, sem az Ammon szarvban nem láttunk elváltozásokat.

A 6 hetes előkezelt állatok trigeminális ganglionsejtjeinek körülbelül 35-40%-a volt VR1 immunpozitív. A jelölt sejtek a kis B típusú sejtek mérettartományába estek. Elektronmikroszkópban megvizsgálva a jelölt sejteket, megtaláltuk bennük a duzzadt, sérült mitokondriumokat a hiányzó krisztákkal. A VR1 pozitív sejtek mellett láthatók nem jelölt A és B sejtek, melyekben a mitokondriumok épek.

Tehát nem mindegyik B sejt VR-immunpozitív, és csak a VR1 pozitív sejtek mutatnak érzékenységet újszülöttkori anandamid kezelésre. Az összes VR1-immunpozitív sejtben megtaláltuk a károsodott mitokondriumokat.

A harmadik héten a kontroll csoportban (n=6) 47°C volt a nociceptív hőküszöb átlagosan, az anandamiddal előkezelt állatoknál (n=5) 48°C. A különbség csak az ötödik héten lett szignifikáns a kontroll állatok és az előkezelt állatok között. A hőküszöb szignifikáns eltolódását egészen a 13. hétig tapasztaltuk az anandamiddal kezelt patkányok esetén.

Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy az újszülöttkori szisztémás anandamid kezelés az érző ganglionokban szelektív és hosszan elhúzódó mitokondriális elváltozásokat okoz, csakúgy mint a capsaicin. Kísérleti eredményeink bizonyítják elsőként, hogy az anandamid egyszeri szisztémás adás esetén feltehetően VR1 receptor izgatását követően a capsaicinhez hasonlóan hetekig tartó antinocicepciót is ki tud váltani.

Mind a mitokondriumkárosodás ultrastrukturális jelei, mind annak időbeli lefutása hasonló a capsaicin okozta változásokhoz. Az egyetlen eltérés az, hogy anandamid kezelés után 24 órával nem találtunk nekrotikus sejteket a ganglionokban. Az anandamid kezelést sohasem követi a capsaicin kezelés utáni asphyxia és apnoe. Így ez a két megfigyelés alátámasztja feltételezésünket, mely szerint a capsaicinnel kezelt állatokban a respiratorikus stressz miatt kialakuló ischémia okozza a nekrotikus sejtek előfordulását, és nem a capsaicin akut neurotoxikus hatása.

Ahluwalia és munkatársai (2000) leírták, hogy a nociceptív elsődleges érző neuronokban a CB1 és VR1 receptorok együttes expressziója igen gyakori. Természetesen ahhoz, hogy teljes biztonsággal tudjuk állítani, hogy az anandamid kezelés hatására létrejövő változások a VR1 vagy a CB1 receptoron történtek, olyan sejteken kellene a hatást megvizsgáljunk, mely csak az egyik típusú receptort expresszálja. Az egész hippocampusz területén nagy számban vannak jelen CB1 immunreaktív sejtek. Az a tény, hogy a hippocampusz területén az anandamid kezelés semmiféle ultrastrukturális elváltozást nem okoz arra utal, hogy az anandamid nem a CB1 receptoron keresztül, hanem a VR1 receptor aktiválását követően fejti ki a mitokondriumkárosító hatását. Ezt a következtetést támasztja alá az a másik eredményünk is, hogy újszülöttkori capsaicin előkezelés sem okoz a hippocampuszban mitokondriális duzzadást. Az eddig elvégzett *in vitro* kísérletek mellett az *in vivo* kísérleteink eredményei alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az anandamid az érző ganglionok B sejtjeinek mitokondriumait károsító hatásában a VR1 capsaicin receptor nagy valószínűséggel szerepet játszik.

IV. A MITOKONDRIUMOK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A CAPSAICIN HATÁSMECHANIZMUSÁNAK KIALAKULÁSÁBAN PATKÁNY TRIGEMINÁLIS GANGLIONSEJT-TENYÉSZETEN INTRACELLULÁRIS KALCIUMIONSZINT-MÉRÉS MÓDSZERÉVEL.

Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a mitokondriumok kalciumion-akkumulációs képességének FCCP-vel történt felfüggesztése a feszültségfüggő kalciumcsatornákon, vagy a VR1 capsaicin receptor aktiváción keresztül kiváltott intracelluláris kalciumionszint-emelkedést. (FCCP hatására a mitokondriális belső membrán protonok számára átjárhatóvá válik, a mitokondriumban raktározott kalciumionok az intracelluláris cytosolba jutnak, ahol a jelenlévő fura-2 miatt fluoreszcencia növekedést láthatunk.) Ezen adatok összevetéséből információt nyerhetünk arra vonatkozóan, hogy milyen lényeges a szerepe a mitokondriumoknak a VR1 aktivációt követő intracelluláris magas kalciumionszint lecsökkentésében.

Módszerek

1. Capsaicin, resiniferatoxin, KCl és anandamid hatás vizsgálata: A capsaicint 100 nM, 330 nM és 3,3 μ M koncentrációban, az RTX-et 1 nM, az anandamidot 200 nM koncentrációban használtuk. Máskor a tápoldat NaCl tartalmát csökkentettük, viszont a KCl koncentrációját 50 mM-ra növeltük.

4. A protonofór FCCP (1 μ M) kiváltotta intracelluláris kalciumionszint-növekedés vizsgálata:

a. Hatásvizsgálat kontroll körülmények között, 5 másodperces FCCP áramoltatás alatt ilyenkor csupán a mitokondriumok alap kalciumion tartalma ürül a citoplazmába, a kalcium-fluoreszcencia jel rendszerint nagyon kicsi.

b. Hatásvizsgálat valamilyen megelőző, a sejtekben kalciumion-akkumulációt keltő stimulus (capsaicin, RTX, anandamid vagy KCl adás) után alkalmazva. Az FCCP adagolás különböző időpontokban, vagy a stimuláló hatás lecsengése után, vagy annak fennállása közben, szintén 5 másodperces időtartamban történt. A figyelt változó a stimulus előtt mért és a rövid, kontroll FCCP adással keltett kalcium jelhez viszonyított fluoreszcencia növekedés volt. Az észlelt különbséget a stimuláló anyagnak a mitokondrium-kalciumpuffert befolyásoló effektusaként értékeltük.

Eredmények és következtetések

33 nM capsaicin 3 másodperces adása esetén az átlagos fluoreszcencia arány értékek a következőképpen alakultak: $R=0.33\pm 0.04$ (n=14 érzékeny sejt a 49-ből), 330 nM esetén $R=0.54\pm 0.24$ (n=48/120), és 3.3 μM hatására $R=0.81\pm 0.29$ (n=25/50). Két másodpercig adott 1 nM RTX után az átlagos fluoreszcencia érték $R=0.29\pm 0.19$ (n=44/109), 50 mM KCl szintén 2 másodperc alatt pedig nagyobb: $R=0.54\pm 0.21$ (n=107/120) kalcium-jelet okoz.

FCCP hatására az átlagos fluoreszcencia arány $R=0.098\pm 0.08$ (n=271). Míg a capsaicinnél és RTX-nél a sejtek többségében a válasz 20 másodpercen belül lezajlott, az FCCP által kiváltott kisebb kalciumionszint növekedés átlagosan 10 másodperc után érte el a tetőpontját, és egy 20-50 másodperces lassú csökkenés volt megfigyelhető. Ez magyarázható azzal, hogy a hatás alatt a mitokondrium nem képes visszavenni a belőle felszabadult kalciumot.

Amennyiben az FCCP adását megelőzte egy olyan stimulus, amely megnövelte az intracelluláris kalciumionszintet, legyen az capsaicin, anandamid, RTX vagy KCl, az FCCP lényegesen nagyobb kalciumionszint-növekedést okozott. Ez az adat arra utal, hogy a kalciumion-homeosztázisban a mitokondriumok szerepe a trigeminális ganglionsejtenyészetekben is jelentős mértékű. Eredményeink szerint nincs összefüggés az FCCP által kiváltott jel nagyságának növekedése és a megelőző kalciumion-akkumulációt előidéző stimulus természete között, tehát hogy capsaicin receptorhoz kötött vagy feszültségfüggő kalciumcsatornához kötött a kalciumnövekedés. Összefüggés mutatkozott azonban az időintervallum és az FCCP jel nagysága között. Amennyiben a megelőző stimulus hatása még nem zajlott le, sokkal nagyobb jeleket mérhettünk FCCP adásakor, mint fél perccel, vagy percekkel a reakció lezajlása után. Eszerint a mitokondriumok kalciumpufferelő hatása különösen a magas kalciumion-koncentrációknál jelentős, és az intracelluláris kalciumionszint csökkenésével párhuzamosan a mitokondriális kalciumionok kipumpálása is megkezdődik.

Ha a capsaicint és RTX-et közvetlenül az FCCP után adtuk, akkor a válaszok sokkal kisebbek lettek mint ha csak a capsaicint vagy RTX-et egyedül adtuk volna, holott még nagyobb fluoreszcens jelekre számítottunk, mert a mitokondrium az FCCP hatás miatt képtelen pufferelő feladatát ellátni, a beáramló kalciumionok sokáig kötetlen szabad ionként vannak jelen és növelik a fluoreszcens jelet. Capsaicin (330 nM, n=18) adásakor a

fluoreszcencia arány értékek a következőképp alakultak: capsaicin először- $R=0,4\pm 0,17$, FCCP után- $R=0,19\pm 0,1$, harmadik capsaicin- $R=0,21\pm 0,11$. RTX (1 nM, n= 34) esetén az FCCP után adva a fluoreszcens értékek átlagosan 33.5%-ra estek vissza, majd ismételtén önmagában adva 112 %-ot ért el a kalcium-jel. Az FCCP hasonló gátló hatását a KCl adás esetében nem tapasztaltuk.

A kísérletek összefüggést igazoltak a kalciumion-akkumuláció és a mitokondriumok működése között. Kísérleteinkben először mutattuk ki, hogy az FCCP gátolni képes a szenzoros neuronokban a capsaicin és RTX hatására bekövetkező kalciumion-akkumulációt. E hatás mechanizmusa ismeretlen és további vizsgálatokat igényel. Valószínű, hogy FCCP adása után a mitokondriális funkció csökkenésével az ATP-szint is csökken, a VR1 receptor defoszforilálódik, ami irodalmi adatok szerint az ioncsatorna nyitási valószínűségének csökkenéséhez, vagyis deszenzitizációhoz vezet.

A LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Újszülöttkori capsaicin előkezelés a trigeminális ganglionok B sejtjeiben lassan kialakuló mitokondriumkárosodást és lassan bekövetkező sejtszámcsökkenést okoz. Az egy hetes kezelt állatokban sejtszámcsökkenés nem tapasztalható, ez csak a három hetes patkányoknál látható, tehát a kialakuló sejtszámcsökkenés lassan bekövetkező folyamat, és nem a capsaicin okozta akut neurotoxikus sejthalál eredménye.
2. NGF kezelés a capsaicin okozta sejtszámcsökkenést és a kemonociceptív deszenzitizációt kivédi, míg a capsaicin okozta mitokondriumkárosodásra és plazma extravazációra nincs hatással.
3. Először igazoltuk kísérleteinkben, hogy az anandamid a capsaicinhez hasonló intracelluláris kalciumionszint-növekedés kiváltására képes szenzoros neurontenyészetben.
4. Igazoltuk, hogy az anandamid nanomoláris koncentrációban gátolni képes a capsaicin hatására kialakuló kalciumion-akkumulációt a neurontenyészetben mely hatásban vagy parciális VR1 receptor antagonistá hatása vagy cannabinoid receptor aktiváció játszik szerepet.
5. Kísérleteinkkel elsőként igazoltuk, hogy az újszülöttkori szisztémás anandamid kezelés az érző ganglionokban a capsaicin hatásához hasonlóan szelektív és hosszan elhúzódó mitokondriális elváltozásokat okoz, melyet hosszan tartó antinocicepció kísér. A hatás kialakulásában a VR1 receptornak nagy valószínűséggel szerepe van. A mitokondriumkárosodás mind ultrastrukturális jeleiben, mind az időbeli lefutásában hasonló a capsaicin okozta változásokhoz.
6. Anandamid kezelés hatására mitokondriumkárosodást mutató sejteken sikerült kimutatni VR1 receptorok jelenlétét.
7. A VR1 agonisták hatásában sikerült igazolnunk a mitokondriumok közreműködését a szenzoros neurontenyészetben. Elsőként mutattuk ki a protonofór FCCP gátló hatását a capsaicin és RTX által kiváltott intracelluláris kalciumionszint emelkedésre.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

KÖZLEMÉNYEK

É. Szőke, L. Seress, J. Szolcsányi: Reevaluation of the neurotoxic effect of neonatal capsaicin treatment on the basis of morphometrical studies. 1998, *Neurobiology* 6 (4) pp. 477-478.

É. Szőke, Zs. Balla, L. Csernoch, G. Czéh, J. Szolcsányi: Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurones. 2000, *Neuroreport* 11 (9) pp. 1949-52.

L. Seress. **É. Szőke**, G. Czéh: Age related mitochondrial damage in the B-type cells of the rat trigeminal ganglia. 2002, *Acta Biologica Hungarica* 53(1-2) pp. 167-175.

Zs. Balla, **É. Szőke**, G. Czéh, J. Szolcsányi: Effect of capsaicin on voltage-gated currents of trigeminal neurones in cell culture and slice preparations. 2002, *Acta Physiologica Hungarica* 88 (3-4), pp. 173-196.

É. Szőke, L. Seress, J. Szolcsányi: Neonatal capsaicin treatment results in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of the B cells of the rat trigeminal ganglia. 2002, *Neuroscience* 113 (4), pp. 925-937.

É. Szőke, G. Czéh, J. Szolcsányi, L. Seress: Neonatal anandamide treatment results in prolonged mitochondrial damage of the B cells of the rat trigeminal ganglia. 2002, *Neuroscience* 115 (5), pp. 805-814.

FOLYÓIRATOKBAN MEGJELENT ELŐADÁSKIVONATOK

Zs. Balla, **É. Szőke**, J. Szolcsányi and G. Czéh: Changes of free calcium ion concentration in sensory neurons. 1999, *Neurobiology* 7 (3) pp. 280.

É. Szőke, Zs. Balla, J. Szolcsányi and G. Czéh: Capsaicin-sensitive voltage-gated ionic currents in sensory neurons. 1999, *Neurobiology*, 7 (3) pp. 392-393.

Becze Zs., **Szőke É.**, Szolcsányi J., Czéh G.: Ultrastructure and electrophysiology of sensory neurons in capsaicin-pretreated rats. 1999, *Neurobiology* 7 (3) pp. 284.

É. Szőke, L. Seress, J. Szolcsányi: Capsaicin-induced cell death of sensory neurons of the neonatal rat are prevented by in vivo NGF treatment. 1999, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13.

Zs. Balla, **É. Szőke**, J. Szolcsányi, G. Czéh: Capsaicin in low concentration modulates voltage-gated ionic currents in vanilloid sensitive trigeminal nerve-cells in slice preparation. 1999, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13.

G. Czéh, Zs. Balla, **É. Szőke**, J. Szolcsányi : Membrane current and intracellular calcium changes induced by capsaicin and anandamide in the rat's isolated trigeminal neurones J. Physiol. London, 2000, 526. P.

É. Szőke, G. Czéh, Zs. Balla, J. Szolcsányi: Capsaicin and anandamide induced current and calcium changes in sensory neurones
Eur. J. Neurosci. 12, p308, 2000

Zs. Balla, **É. Szőke**, G. Czéh , J. Szolcsányi: Effects of capsaicin on voltage-gated currents of trigeminal neurones in cell culture and slice preparations
Eur. J. Neurosci. 12, p309, 2000

ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK JEGYZÉKE

Becze Zs., **Szőke É.**, Szolcsányi J., Czéh G.: Trigeminal ganglion neuronok intracelluláris vizsgálata és biocytin jelölése
MÉT LXII. Vándorgyűlése, 1997, Pécs, előadás

Szőke É., Seress L., Szolcsányi J.: Újszülöttkori capsaicin előkezelés neurotoxikus hatásának ártértékelése morfológiai vizsgálatok alapján
MITT V. Konferenciája, 1998, Debrecen, poszter

Balla Zs., **Szőke É.**, Czéh G., Szolcsányi J.: Capsaicin-indukált kation áramok trigeminalis ganglion B-típusú sejtjeiben
II. Országos Ph.D. Konferencia, 1998, Debrecen, előadás

Szőke É., Balla Zs., Czéh G., Szolcsányi J.: Capsaicin-indukált kation áramok trigeminalis ganglion B-típusú sejtjeiben
II. Országos Ph.D. Konferencia, 1998, Debrecen, poszter

J. Szolcsányi, **É. Szőke**, L. Seress: Reevaluation of the neurotoxic effect of neonatal capsaicin treatment on rat's trigeminal sensory neurons
Society for Neuroscience, 28th annual meeting , Los Angeles, California, 1998, poszter

Zs. Balla, **É. Szőke**, J. Szolcsányi and G. Czéh: Changes of free calcium ion concentration in sensory neurons
MITT VI. Konferenciája, 1999, Harkány, előadás

É. Szőke, Zs. Balla, J. Szolcsányi and G. Czéh: Capsaicin-sensitive voltage-gated ionic currents in sensory neurons
MITT VI. Konferenciája, 1999, Harkány, előadás

Becze Zs., **Szőke É.**, Szolcsányi J., Czéh G.: Ultrastructure and electrophysiology of sensory neurons in capsaicin-pretreated rats
MITT VI. Konferenciája, 1999, Harkány, poszter

É. Szőke, L. Seress, J. Szolcsányi: Capsaicin-induced cell death of sensory neurons of the neonatal rat are prevented by in vivo NGF treatment
Second European congress of Pharmacology, 1999, Budapest, előadás

Zs. Balla, **É. Szőke**, J. Szolcsányi, G. Czéh: Capsaicin in low concentration modulates voltage-gated ionic currents in vanilloid sensitive trigeminal nerve-cells in slice preparation
Second European congress of Pharmacology, 1999, Budapest, poszter

É. Szőke, L. Seress, J. Szolcsányi: On the toxicity of neonatal capsaicin treatment
The primary Nociceptive Neuron, Official Meeting of the 9th World Congress on Pain, 1999, Prague, Czech Republic, poszter

Zs. Balla, **É. Szőke**, J. Szolcsányi, G. Czéh: Depression of voltage-gated sodium and potassium currents by capsaicin
The primary Nociceptive Neuron, Official Meeting of the 9th World Congress on Pain, 1999, Prague, Czech Republic, poszter

L. Vyklicky, V. Vlachova, A. Lyfenko, **É. Szőke**: Membrane currents induced by noxious heat and capsaicin in cultured DRG neurons
The primary Nociceptive Neuron, Official Meeting of the 9th World Congress on Pain, 1999, Prague, Czech Republic, előadás

Szőke É., Balla Zs., Czéh G., Szolcsányi J.: Capsaicin által kiváltott calciumszint változás sejtszintű vizsgálata fluoreszcens módszerrel
IBRO-MITT Millenniumi Konferencia 2000, Budapest, poszter

G. Czéh, Zs. Balla, **É. Szőke**, J. Szolcsányi : Membrane current and intracellular calcium changes induced by capsaicin and anandamide in the rat's isolated trigeminal neurones
The Joint Meeting of the Physiological Society with the Hungarian Physiological Society, 2000, Budapest, előadás

É. Szőke, G. Czéh, Zs. Balla, J. Szolcsányi: Capsaicin and anandamide induced current and calcium changes in sensory neurones
Forum of European Neuroscience, Millennium Meeting, 2000, Brighton, UK., poszter

Zs. Balla, **É. Szőke**, G. Czéh , J. Szolcsányi: Effects of capsaicin on voltage-gated currents of trigeminal neurones in cell culture and slice preparations
Forum of European Neuroscience, Millennium Meeting, 2000, Brighton, UK., poszter

Szőke É., Czéh G., Szolcsányi J.: Mitokondrium és kalcium szignál
MITT VIII. Konferenciája, 2001, Szeged, előadás

Gábrriel, R., Dénes, V., **Szőke, É.**, Czéh, G.: Calcium-kötő fehérjék hátsó gyöki dúc primer tenyészetekben
MITT VIII. Konferenciája, 2001, Szeged, poszter

Szőke É., Czéh G., Seress L., Szolcsányi J.: Anandamid által kiváltott elhúzódó mitokondrium-károsodás vizsgálata patkány trigeminális ganglionsejtekben
MÉT LXVI. Vándorgyűlése, 2001, Szeged, poszter

Pethő G., Almási R., **Szőke É.**, Szolcsányi J.: Anandamid, resiniferatoxin és analgetikumok hatása a nociceptív hőküszöbre
MÉT LXVI. Vándorgyűlése, 2001, Szeged, poszter

Varga A., **Szőke É.**, Czéh G., Szolcsányi J.: Effect of protein kinase inhibitors on capsaicin-evoked desensitization
IBRO International Workshop on Signalling Mechanisms in the Central and Peripheral Nervous System, 2002, Debrecen, poszter

