

Szakmai zárójelentés „Az elsődleges fájdalomérző neuronok inzulin és IGF-I érzékenysége” című PD73259 számú OTKA pályázathoz

Bevezetés

A fájdalomérző rendszer működését alapvetően befolyásolják az elsődleges érző neuronok fenotípusát és funkcionális állapotát meghatározó extracelluláris szabályozó molekulák, a különböző neurotrofikus faktorok és a gyulladáshoz kapcsolódó mediátorok. Pályázatunk célja annak vizsgálata volt, hogy milyen szerepet játszhat a primer nociceptorok inzulin (és IGF-I) érzékenysége ezen neuronok működésében, ez mennyire járulhat hozzá gyakori betegségek kialakulásához és a fájdalom érző rendszer funkcionális zavaraihoz. A fájdalomérző elsődleges érző neuronok jelentős populációját alkotják a vanilloid 1 típusú transzient receptor potenciál receptort (TRPV1) expresszáló capsaicin érzékeny neuronok. Emlősökben ezek a sejtek alkotják a polymodális (kémiai- hő- és mechanoszenzitív) nociceptorok túlnyomó többségét, szerepük alapvető a szöveteket veszélyeztető kémiai és hő ingerek detektálásában, valamint a gyulladáshoz kapcsolódó fájdalom és termális hiperalgézia kialakulásában (Jancsó, 1977, 1980; Davis, 2000; Caterina, 2000). A capsaicin szelektív deszenzitizáló és neurotoxikus hatásainak felismerése jelentősen hozzájárult a primer nociceptorok morfológiai, neurokémiai, funkcionális és farmakológiai jellemzőinek tanulmányozásához, ezáltal a fájdalomérzés perifériás mechanizmusainak megértéséhez (Jancsó N., 1968, Jancsó, 1977, 1985). Tovább mélyítette ismereteinket a capsaicin receptor TRPV1 csatorna identifikálása, ami nem csupán a capsaicin hatás molekuláris szintű magyarázatát tette lehetővé, hanem utat nyitott más, nem vanilloid típusú kémiai irritánsok és ezek receptorainak, valamint a fájdalmas hőingerekre adott nociceptor aktiváció celluláris mechanizmusainak megismeréséhez (Caterina, 1997; Tominaga, 1998; Jordt, 2004; Bautista, 2006). Azóta számos mediátor és intracelluláris szignalizációs folyamatról igazolódott, hogy közvetlenül szabályozzák a TRPV1 (és más nociceptív transzducer receptor) működését, részben a gén-expresszió szintjén, részben poszt-transzlációs változásokkal (Chuang, 2001; Vellani, 2001; Bonnington és McNaughton, 2003). Korábbi vizsgálatainkban *in vitro* citokémiai és celluláris elektrofiziológiai eszközökkel igazoltuk, hogy az inzulin és az IGF-I a tirozin kináz szignalizációs úton potenciózza a capsaicinnal kiváltott TRPV1 aktivációt (Sathianathan, 2003; Sántha és Nagy, 2005; Sántha és Nagy, 2006). Pályázatunkban felvázolt kísérleteink célja az inzulin receptor (Inz-R) - TRPV1 közötti funkcionális kapcsolat további tanulmányozása volt kvantitatív morfometriai, *in vitro* sejtélettani és *in vivo* funkcionális vizsgálatokkal

A pályázat keretében elvégzett kutatómunka főbb eredményei

- Kimutattuk, hogy az inzulin receptort expresszáló elsődleges érző neuronok aránya jelentősen magasabb a viszcerális szenzoros neuronokban, mint a bőrt, illetve az izomzatot beidegző szomatikus afferensekben.
- A húgyhólyagot beidegző Inz-R-t expresszáló szenzoros neuronok jelentős része a TRPV1 pozitív capsaicin érzékeny neuronpopulációba tartozik
- Igazoltuk, hogy a húgyhólyag afferensek cholera toxin b-alegység (CTb) kötés (GM1 gangliozid tartalom) és TRPV1 expresszió szempontjából négy különböző csoportra bonthatók.
- Igazoltuk, hogy a mind a thorakolumbális, mind a vagális pankreasz afferensek jelentős populációja expresszál Inz-R-t, nagy arányban ko-lokalizációban a TRPV1 receptorral.
- A viszcerális Inz-R pozitív neuronok jelentős populációja peptiderg, substance P (SP) és/vagy kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) tartalmú érző neuron.
- A krónikus inzulin kezelés fokozza a szenzoros neuronok capsaicin érzékenységét *in vitro*, a kísérletes diabetes mellitus (*in vivo* inzulin hiány) viszont csökkenti a neuronok capsaicin érzékenységét akután izolált szenzoros neuron kultúrákon.
- Az inzulinnal és az IGF-fel hasonló celluláris mechanizmussal ható idegi növekedési faktor (NGF) krónikus növekedést serkentő, és akut szenzitivizáló hatását csökkenti a GM1 gangliozid szintézis gátlása.

A kutatómunka eredményeinek részletes ismertetése a pályázat célkitűzései alapján*1. Az inzulin (IGF-I) receptorok és a TRPV1/TRPM8 receptorok ko-lokalizációjának vizsgálata*

Az Inz-R, az IGF-I receptor és a TRPV1/TRPM8 receptorok között feltételezett funkcionális kapcsolat igazolására (Sántha és Nagy, 2006) vizsgáltuk ezen fehérjék jelenlétét a húgyhólyagot és más kismedencei szerveket beidegző L6-S1 spinális ganglionokban, valamint a pankreaszt beidegző Th10-L2 spinális és a n. vagus érző ganglionjában, a ggl. nodosum-ban. Mind a három szenzoros divízióban, az eddig ismert irodalmi adatokhoz (amelyek az L4-L5 ganglionokból származnak (Sathianathan, 2003; Baiou, 2007)) hasonlóan,

a ganglionsejtek jelentős hányada mutatott Inz-R (24-35%) és TRPV1 (42-54%) immunreaktivitást. További vizsgálataink szempontjából különösen fontos, hogy a vizsgált területeken jelentős volt az Inz-R/TRPV1 kettősen jelölt neuronok aránya: az L6-S1 ganglionokban: 23%, a Th10-L2 ganglionokban 12% és ggl. nodosum-ban: 10%. (Sántha, 2009; Sántha, 2010c) A TRPM8 expressziót elsősorban a húgyhólyagot ellátó L6-S1 ganglionokban vizsgáltuk, ahol az expresszió aránya igen alacsony, 10% alatti volt. A TRPM8 csatorna minimális ko-lokalizációját figyeltük meg a TRPV1 receptorral és az Inz-R-ral. Az IGF-I receptor vizsgálatára két különböző antitestet is kipróbáltunk, de az Inz-R-ral ellentétben nem sikerült egyértelmű lokalizációt, illetve eloszlási mintázatot kimutatni, ami feltételezhetően a receptor expressziójának nagyon alacsony szintjével, vagy a receptor expressziójának homogén, szenzoros neuron altípusokat nem preferáló megoszlásával magyarázható.

2. A különböző perifériás célszerveket beidegző inzulin receptort expresszáló primer szenzoros neuronok identifikálása retrográd jelölés technikával

A különböző szöveteket beidegző szenzoros neuronok azonosítására általánosan használt módszer a fluoreszcens jelölőmolekulákkal végzett retrográd jelölés. Első kísérleteinkben a diamidino-yellow (DY) jelölőanyagot használtunk, amit a perifériás axonok aspecifikusan vesznek fel és szállítják a szenzoros neuronok sejttestébe. Az aspecifitás mellett a tracer előnye, hogy a sejtmag kromatin állományában dúsul, ez megkönnyíti detektálását és a sejtszámolást. Ezzel az eljárással három különböző szenzoros célszervet (bőr, vázizom, húgyhólyag) vizsgáltunk a szenzoros beidegzést biztosító szomatikus illetve viszcerális afferensek Inz-R expressziójának szempontjából. Eredményeink rámutattak arra, hogy míg a szomatikus afferensek esetében az Inz-R immunreaktivitást mutató neuronok aránya alacsony volt (16-19%) addig a viszcerális afferensek esetében ez az arány lényegesen magasabbnak, 47%-nak adódott (Sántha, 2009). A DY használata azonban nem tette lehetővé a többes fluoreszcens jelölést igénylő ko-lokalizációs vizsgálatokat (ld. 1. részbeszámoló). Ezért két másik, specifikus retrográd jelölő anyagot alkalmaztunk további vizsgálataink során. A búzacsíra agglutinin (WGA) egy növényi lektin, ami specifikusan kapcsolódik a plazmamembrán N-acetyl- β -D-glucosaminyl kötőhelyeihez. Általánosan használt retrográd marker, előnye, hogy a szenzoros neuronok esetében elsősorban a vékony C-típusú rostok szállítják (Robertson és Grant, 1985), így különösen alkalmas a capsaicin-érzékeny szenzoros neuronok vizsgálatára. A másik retrográd tracer a cholera toxin-b alegység (CTb), ami nagy

affinitással kötődik a plazmamembrán GM1 gangliozid szénhidrát oldalláncaihoz (Robertson és Grant, 1989). Bár a CTb-t a perifériás (szomatikus) idegek esetében elsősorban a vastag, myelin hüvelyes A β szenzoros rostok kötik és szállítják, ismert, hogy ez a preferencia a vizscerális területen nem érvényesül: a húgyhólyagot innerváló nem myelinizált C-rostok is jelentős mértékben szállítják (Wang , 1998). A húgyhólyagot beidegző afferenseket a biotinilált WGA illetve FITC-konjugált CTb tracerekkel végzett retrográd jelölés után az L6-S1 spinális ganglionokban (Jancsó és Maggi, 1987) vizsgáltuk az Inz-R és a TRPV1 expresszió tekintetében. Eredményeink kimutatták, hogy a WGA kötő hólyag afferensek 52%-a, a CTb kötő hólyag afferensek 30%-a mutatott Inz-R pozitivitást. Az inzulin receptort expresszáló hólyag afferensek jelentős része mutatott TRPV1 pozitivitást: a WGA-val visszajelölt populáció 27%-a, míg a CTb-vel visszajelölt neuronok 15%-a volt TRPV1-InzR kettősen jelölt, ami arra utal, hogy az Inz-R-t expresszáló hólyag afferensek közel fele a capsaicin érzékeny populációba tartozik (Sántha, 2009). Az adatokból látható, hogy a WGA-nel visszajelölt neuronok között magasabb volt a TRPV1 pozitív neuronok aránya (ahogy ez a korábbi irodalmi adatokból és saját megfigyeléseinkből is várható volt), ugyanakkor a CTb jelölt neuronok között is jelentős mennyiségben találtunk TRPV1 pozitív sejtet. Korábbi CTb-HRP konjugátummal végzett kísérleteink (Sántha és Jancsó, 2003) és a később bemutatandó újabb vizsgálatainkból ismert, hogy a capsaicin érzékeny primer szenzoros neuronok CTb kötő képessége, azaz a neuronok GM1 expressziója, jellegzetes változásokat mutat a perifériás idegek sérülését követően, (Sántha és Jancsó, 2003; Jancsó és Sántha, 2004). Felmerült továbbá a GM1 gangliozid szerepe a neuronok capsaicin érzékenységének és nociceptor működésének szabályozásában (Jancsó, 2008; illetve lásd később). Ezen tények ismeretében figyelemre méltó, hogy a húgyhólyag (és feltehetően más vizscerális) afferensek között jelentős számban találtunk fiziológiás körülmények között is CTB kötő, magas GM1 tartalommal rendelkező neuronokat, amelyek egyúttal capsaicin érzékenyek is. Ez egyrészt egy olyan új morfológiai tulajdonsága a vizscerális afferenseknek, ami a szomatikus afferensekre nem, vagy csak korlátozottan jellemző, másrészt funkcionális következményekkel is járhat, tekintettel a GM1 gangliozid és az NGF (valamint más tirozinkináz) receptorok közötti kapcsolatra (lásd később, Mutoh , 1998). A továbbiakban tervezzük a vizscerális CTB \pm - TRPV1 \pm neuron populációk részletesebb vizsgálatát.

Retrográd jelöléssel vizsgáltuk a TRPM8 csatornát expresszáló hólyag afferensek morfológiai jellegzetességeit is. Megállapítottuk, hogy az irodalmi adatoknak megfelelően a vizsgált L6-S1 spinális ganglionokban ezen neuronok aránya jelentősen kisebb, mint a TRPV1 pozitív neuronok aránya (Hayashi, 2009). A WGA tracer-rel visszajelölt neuronok

kevesebb mint 3%-a mutatott TRPM8 immunreaktivitást, a CTB jelölt populációban nem találtunk ilyen neuront. A visszajelölt TRPM8 neuronok elenyésző hányada volt TRPV1 pozitív, ami szintén megegyezik azokkal a korábbi megfigyelésekkel, miszerint *in vivo* minimális az átfedés a két neuronpopuláció között. A rendelkezésre álló antitestek nem tették lehetővé a TRPM8/Inz-R ko-lokalizáció közvetlen vizsgálatát, azonban a rendelkezésünkre álló adatok nagyban valószínűsítik, hogy ha egyáltalán létezik Inz-R/TRPV1/TRPM8 neuron populáció, ezen sejtek a részaránya elenyésző lehet. Eredményünk arra utal, hogy a pályázatban felvetett hipotézis, miszerint a korábban megfigyelt inzulinnal kiváltott szenzoros neuron aktivációt a TRPV1/TRPM8 csatorna ko-aktivációja okozta volna, *in vivo* nem valószínű (ld. később).

A pankreaszt beidegző kemoszenzitív idegrostok szerepe az exokrin pancreas gyulladással megbetegedéseiben régóta ismert, kísérletesen többszörösen alátámasztott tény (Nathan, 2001). Az elmúlt években több publikáció jelent meg arra vonatkozóan, hogy az endokrin pancreasz szekréciós zavarainak, autoimmun eredetű megbetegedéseinek és a különböző típusú diabetes mellitus kialakulásában a szigetapparat szenzoros beidegzésének is szerepe lehet. Kollaborációban végzett korábbi vizsgálatainkban sikerült kimutatni TRPV1 pozitív peptiderg (CGRP) idegrostok jelenlétét patkány szigetapparatában (Gram, 2007). A Zucker-Diabetes Fatty (ZDF) állattörzsön végzett funkcionális kísérletek igazolták, hogy a kemoszenzitív neuronok szisztémás capsaicin kezeléssel kiváltott eliminációja jelentősen javítja az állatok szénhidrát anyagcseréjét és inzulinszekrécióját. A jelenség magyarázatára feltételeztük, hogy a csökkent inzulinszekréció az állatok szigetapparatában kialakuló inzulinitis, egy alacsony intenzitású („low grade”) gyulladással járó folyamat következménye lehet, aminek kimenetelét az aktivált idegvégződésekkel felszabaduló neuropeptidok befolyásolhatják (Gram, 2007). Egy másik független kutatócsoport az I. típusú diabetes mellitus modelljének tekintet NOD egértörzsön végzett kísérletei is részben hasonló eredményhez vezettek: kimutatták, hogy szigetapparatot beidegző kemoszenzitív TRPV1 pozitív idegvégződések eliminációja befolyással van a diabeteszes anyagcsere-zavar kialakulására, és igazolták a másik szenzoros neuropeptid, a SP szerepét a betegség pathogenezisében (Razavi, 2006). A fenti megfigyelések ismeretében időszzerűvé vált a pankreaszt beidegző szenzoros neuronok Inz-R expressziójának igazolása, és az Inz-R pozitív neuronok kémiai fenotípusának a vizsgálata. A húgyhólyagon végzett kísérleteink eredményeire alapozva a retrográd jelöléseket biotinilált WGA intrapancreatikus oltásával végeztük. A visszajelölt pancreatikus afferenseket a szervet ellátó két szenzoros divízió eredő

ganglionjaiban, a thorakolumbális átmenet (Th10-L2) spinális ganglionjaiban és a n. vagus szenzoros ganglionjában (ggl. nodosum) vizsgáltuk. Kvantitatív morfológiai módszerekkel meghatároztuk a visszajelölt ganglionsejtek méreteloszlását, többes jelöléses immunhisztokémiai módszerrel pedig a neurokémiai jellegzetességeiket. Megállapítottuk, hogy mind a thorakolumbális ganglionokban, mind a ggl. nodosum-ban a visszajelölt primer szenzoros neuronok jelentős része (46% illetve 49%) volt Inz-R pozitív. Kettős jelöléses immunhisztokémiai vizsgálataink jelentős átfedést mutattak az Inz-R és a TRPV1 expresszió között: a visszajelölt populációban a neuronok 23% (Th10-L2) illetve 35%-a (ggl. nodosum) volt kettősen jelölt. Megállapítható, hogy mind a kettő divízióban jelentős az inzulin receptort expresszáló, és a két receptort ko-lokalizáló pankreatikus afferensek aránya (Sántha, 2010c). Ez egyrészt ebben a szervben is felveti a nociceptív és helyi regulatórikus funkciók (TRPV1 aktiváció) inzulin által történő szabályozásának lehetőségét, másrészt arra utal, hogy az Inz-R pozitív neuronok nagy aránya nem csupán a hólyag afferensek különlegessége, hanem a viscerális afferensek általános jellegzetessége lehet.

Mint korábban említettük, a kemoszenzitív neuronok által termelt, és aktivációjuk során felszabaduló vasoaktív neuropeptidok alapvetők a szenzoros efferens funkciók közvetítésében. Mind a húgyhólyagot, mind a pankreaszt érintő a gyulladásozó kórfolyamatokban feltételezik a pro-inflammatórikus szenzoros neuropeptidok, elsősorban a CGRP és a SP közreműködését (Nathan, 2001; Nagy, 2004a). A korábban ismertetett irodalmi adatok a két neuropeptid szerepét feltételezik a szigetapparátust érintő gyulladásozó folyamatokban is (Razavi, 2006; Gram, 2007). Ezért vizsgáltuk, hogy az Inz-R-t expresszáló pankreatikus afferenseken belül milyen arányt képviselnek a peptiderg neuronok. Retrográd jelöléses vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a thorakolumbális divízióban az azonosított pankreasz afferensek több mint fele volt CGRP+ (61%) és ezek több mint negyede (a visszajelölt populáció 16%-a) volt Inz-R+. Ezzel szemben a n. vagus szenzoros ganglionjában a visszajelölt peptiderg neuronok aránya lényegesen alacsonyabb volt (23%), és csak elvétve találtunk CGRP/Inz-R kettős jelölést. A két divízió CGRP tartalma közötti jelentős különbség tükrözi a két különböző ganglion típus teljes populációjában megfigyelhető különbséget a CGRP+ neuronok tekintetében (43% vs. 23%). A visszajelölt hólyag afferensek 59%-a volt CGRP+, és ezek közel harmada (a visszajelölt populáció 20%-a) volt Inz-R+. A SP-vel végzett vizsgálatok hasonló tendenciákat mutattak, azzal a különbséggel, hogy ez a neuropeptid a vizsgált ganglionokban lényegesen kisebb neuronpopulációban van jelen. Eredményeink rámutatnak arra, hogy az inzulin esetleges regulátor hatása befolyásolhatja a

peptiderg neuronok érző és szenzoros-efferens funkcióit. Ugyanakkor ez a hatás erősségét tekintve regionális különbségeket mutathat, attól függően, hogy az adott szervben (területen) a spinális vagy a vagus eredetű szenzoros innerváció dominál.

3. Az inzulin/IGF-I receptor szerepének vizsgálata az inzulin nociceptor szenzitiváló hatásának közvetítésében

Primer szenzoros neuron kultúrákon végzett funkcionális vizsgálatainkban elsősorban az inzulin és az IGF-I szenzitiváló/aktiváló hatását közvetítő ionális mechanizmusok vizsgálatára történtek kísérletek. Korábbi whole-cell voltage clamp vizsgálataink eredményei arra utaltak, hogy a primer nociceptorok inzulinnal (és IGF-I-vel) kiváltott aktivációjában a hideg érzékeny TRPM8 ioncsatorna is szerepet játszhat (Sántha és Nagy, 2006). Ezt a feltételezésünket azonban el kell vetnünk, mert megfigyeltük, hogy hátsógyöki neuron kultúrákon a TRPM8 csatornák menthollal kiváltott szelektív aktivációja nem okoz kobalt felvételt, valamint ismert, hogy a menthollal kiváltott ionáram nem gátolható ruténium vörössel. Tekintettel arra, hogy egy másik hideg érzékeny csatorna, a TRPA1 receptor aktivációja kobalt akkumulációt vált ki, és ez gátolható ruténium vörös kezeléssel (két olyan tulajdonság, ami az inzulinnal kiváltott aktivációra is igaz), feltételezzük, hogy a TRPV1 csatorna mellett az Inz-R más kobalt-permeábilis TRP csatorna, legvalószínűbben a TRPA1 csatorna aktivációját is befolyásolhatja. Ez azért is érdekes, mert szövettani eredményeink alapján a szenzoros ganglionokban a TRPM8/TRPV1/InzR ko-lokalizáció meglehetősen ritka (ld. retrográd jelöléses vizsgálatok eredményeit), ugyanakkor a TRPV1/TRPA1/Inz-R ko-lokalizáció viszont sokkal gyakoribb, tekintettel a TRPV1 és a TRPA1 pozitív neuronpopuláció nagyfokú átfedésére (Jordt, 2004). A capsaicinnel kiváltott kobalt felvételes vizsgálatainkhoz hasonlóan tenyésztett szenzoros ganglionsejteken végzett kobalt felvétel előzetes eredményei igazolni látszanak, hogy az inzulin és az IGF fokozza a mustárolajjal kiváltott TRPA1 aktivációt, és kobalt akkumulációt.

4. A krónikus inzulin (IGF) kezelés hatásának vizsgálata a primer szenzoros neuronok kémiai- és hőérzékenységére és aktiválhatóságára

A hosszan tartó inzulin adminisztráció capsaicin-érzékeny primer szenzoros neuronokra kifejtett trofikus hatásait NGF mentes médiumban tenyésztett izolált szenzoros ganglionsejteken vizsgáltuk. Az inzulin hiányában, illetve különböző koncentrációjú

(100nM-10 μ M) inzulin jelenlétében tenyésztett (4-6 nap) kultúrákon meghatároztuk az érző ganglionsejtek kémiai érzékenységét capsaicinnal kiváltott kobalt felvétel technikával, illetve a neuronok TRPV1 expresszióját indirekt fluoreszcens immuncitokémiával. Eredményeink arra utalnak, hogy a tartós inzulin adás részben kivédi a szenzoros neuronok capsaicin érzékenységének és TRPV1 expressziójának NGF megvonással kiváltott csökkenését. A kemoszenzitív neuronok capsaicin érzékenységére az inzulin által kifejtett (neuro)trofikus hatást *in vivo* állatmodellen is vizsgáltuk. Patkányban szisztémás streptozotocin kezeléssel kiváltott diabetes mellitust, tartós inzulin hiányos állapotot idéztünk elő. A diabétesz tüneteinek megjelenése (hyperglükémia és glükózúria) után 4-6 héttel a szenzoros neuronok capsaicin érzékenységét *ex vivo* akkutan izolált szenzoros neuron kultúrákon kobalt-felvétel módszerével vizsgáltuk. Eredményeink szerint a tartós inzulin hiány a TRPV1 csatorna funkciójának szignifikáns, közel 40%-os csökkenésével járt, ami összhangban van az inzulin feltételezett trofikus/szupportív hatásával, ami a TRPV1 pozitív neuronok capsaicin érzékenységének fenntartásában is megnyilvánul. Eredményeink összhangban vannak azokkal a laboratóriumunkban korábban végzett kísérleteinknek az eredményeivel is, amelyek kísérletes diabetes mellitus-ban a capsaicinnal kiváltott durális érreakciók és a dura mater TRPV1 pozitív beidegzésének szignifikáns csökkenését igazolták (Dux, 2007; Dux, 2009).

5. Az inzulin (IGF) szabályozó hatásának igazolása a hólyag afferensek érző és szenzoros efferens funkcióira kontroll és hiperinzulinémiás patkányokban

Előkísérleteinkben vizsgáltuk, hogyan befolyásolja az epikután mustárolaj, illetve capsaicin applikációval kiváltott neurogén plazma fehérje extravazációt a vizsgált bőrterületbe injektált inzulin, illetve IGF-I. A plazma fehérje extravazáció kvantitatív Evans-kék kivonás módszerével határoztuk meg (Dux, 1996). Eredményeink azonban nem mutattak szignifikáns változást az extravazáció mértékében a legmagasabb inzulin koncentrációban (10 μ M) sem. A potencírozó hatás elmaradását feltételezésünk szerint a kután (kemoszenzitív) afferensek korábban kimutatott alacsony szintű Inz-R expressziója is magyarázhatja. Ugyanezzel a módszerrel a húgyhólyagon végzett kísérleteinkben a szerozális capsaicin applikációval kiváltott neurogén plazmafehérje extrvazációt vizsgáltuk lokális inzulin előkezelést követően. Bár eredményeink tendenciájukat tekintve a capsaicin válasz fokozódását mutatták inzulin kezelést követően, azonban ez sem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. Jelenleg a Sebészeti Műtéttani Intézettel együttműködve a húgyhólyagon végzünk *in vivo* fluoreszcens

mikroszkópos vizsgálatokat a capsaicinnel kiváltott neurogén gyulladási folyamatok mechanizmusára és azok farmakológiai befolyásolására vonatkozóan (Hartmann, 2011).

Az eredeti pályázatban nem szereplő, de a pályázat témájához szorosan kapcsolódó és részben a pályázati támogatásból finanszírozott kutatómunka eredményei

Az inzulin és az IGF receptorokhoz számos tekintetben hasonló, és szintén receptor tirozinkináz aktiváló NGF alapvető szerepe régóta ismert a kemoszenzitív szenzoros neuronok fenotípusának kialakításában és fenntartásában, valamint a nociceptor funkciók szabályozásában (Winter, 1988; Bonnington és McNaughton, 2003). A kemoszenzitív afferensek capsaicin érzékenységét az NGF mind hosszú távon, a TRPV1 expresszió szabályozásával, mind pedig rövid távon, a TRPV1 fehérje poszt-transzlációs modifikációjával és transzlokációjával is befolyásolja. A CTb kötéssel végzett korábbi funkcionális morfológiai kísérleteink során arra a következtetésre jutottunk, hogy a nociceptív neuronok gangliozid szintjének patológiás körülmények között megfigyelt változásai hatással lehetnek ezen neuronok működésére (Sántha és Jancsó, 2003; Jancsó és Sántha, 2004). Mutoh és munkatársai PC12 sejtvonalon kimutatták, hogy a GM1 gangliozid depléciója gátolja az NGF neurotrofikus hatásait ezekben a sejtekben (Mutoh, 1998). A fenti megfontolások alapján vizsgálatokat végeztünk arra vonatkozóan, hogyan befolyásolja a primer szenzoros neuron kultúrákban a sejtmembrán GM1 gangliozid szintjének csökkenése a neuronok capsaicin érzékenységét, az NGF trofikus, valamint nociceptor szenzitizáló hatását (Jancsó, 2008). A gangliozid szintézis kulcsenzimének, a glucosylceramide-szintáz (GCS) enzim gátlásával hatékonyan csökkentettük az elsődleges érző neuronokban sejtmembrán gangliozid tartalmát. Funkcionális vizsgálatokkal (kobalt felvétel, CGRP felszabadulás) és kvantitatív morfometriai eszközökkel kimutattuk, hogy a membrán gangliozidok depléciója jelentősen csökkentette a TRPV1 csatorna aktiválását és expresszióját. Igazoltuk, hogy a változások háttérben részben az NGF receptor szignalizációjának zavara áll, ugyanis a GCS gátlása csökkentette az NGF által kiváltott neurit növekedést és az NGF akut szenzitizáló hatását a capsaicinnal indukált kobalt felvételre (Sántha, 2010b). Nem neuronális sejteken már korábban igazolták, hogy az Inz-R a sejtmembrán koleszterinben és gangliozidban gazdag detergentis rezisztens mikrodomáinokban, a lipid raftok speciális al-típusában, a caveolákban helyezkedik el (Gustavsson, 1999; Ikonen és Vainio, 2005), és ezek dezintegrációja károsíthatja az inzulin szignalizációt (Gustavsson, 1999). A továbbiakban tervezzük a

neuronális Inz-R/IGF-I szignalizáció és a membrán mikrodomének kapcsolatának vizsgálatát izolált primer szenzoros neuronokon.

A primer szenzoros neuronokat érő perifériás eredetű trofikus hatások megszűnése leggyakrabban a sejtek perifériás axonjának mechanikus sérülése, vagy a retrográd axonális transzport gátlása következtében alakul ki. A C típusú, zömében polymodális nociceptív afferensek szelektív axonális transzport gátlását, és később ezek degenerációját előidéző perineurális capsaicin kezelés szelektív kemodenervációt, és következményes regionális kemo- és termális analgéziát idéz elő az érintett ideg által beidegzett felszínes (bőr) és mély szöveti innervációs területeken (Jancsó, 1980; Gamse, 1982). A különböző eredetű axonális léziók alapvető változásokat okoznak az eredő szenzoros ganglion sejtekben („phenotypic switch”), ami számos fehérje expressziójának változásával (csökkenésével vagy növekedésével) jár (Hokfelt, 1994). Bár a nociceptorok capsaicin érzékenységének és TRPV1 expressziójának perifériás idegsérülést követő változásait munkacsoportunk korábbi publikációi és irodalmi adatok is többszörösen megerősítették (Jancsó és Lawson, 1990; Michael és Priestley, 1999), a TRPV1 gén transzkripció és transláció hosszabb időtávon bekövetkező változásait leíró szisztematikus vizsgálat még nem történt meg. Ezért *in situ* hibridizáció, immunhisztokémia, Western blot és kvantitatív reverz-transzkriptáz PCR analízis felhasználásával összehasonlítottuk a TRPV1 expresszió mRNS és fehérje szintű változásait idegátmetzés és perineurális capsaicin kezelést követő különböző (3, 14, 30 nap) időpontokban. Eredményeink igazolták a TRPV1 expresszió drasztikus csökkenését a léziót követő korai időpontokban. Meglepő módon azonban a késői időpontokban a TRPV1 mRNA kismértékű, illetve a perineurális capsaicin kezelést követően szignifikáns visszatérését tapasztaltuk, amit azonban nem kísért a neuronok TRPV1 fehérje tartalmának növekedése. Eredményeink rámutatnak arra, hogy perifériás idegsérülést követően a szenzoros neuronok capsaicin érzékenységének drasztikus és irreverzibilis csökkenése nem csupán a TRPV1 gén transzkripciójának down-regulációja, hanem a transláció közelebbről még nem ismert gátlása is szerepet játszik (Szigeti, 2011). Ez a megfigyelés különösen érdekes lehet a magas koncentrációjú, potenciálisan neurotoxikus/neurodegeneratív hatású capsaicin és más TRPV1 analógok terápiás felhasználása és hatásmechanizmusa szempontjából (Jancsó és Lynn, 1987; Knotkova, 2008; Oszlacs, 2009; Jancsó, 2011).

Dr. Nagy István laboratóriumával (Section of Anaesthetics, Pain Medicine and Intensive Care, Department of Surgery and Cancer, Faculty of Medicine, Imperial College London)

folyó együttműködés keretében folytattuk a capsaicin érzékeny szenzoros neuronok aktivitás szabályozásának területén végzett közös kutatómunkát. Celluláris elektrofiziológiai (whole-cell voltage clamp) vizsgálatokkal igazoltuk a szenzoros neuronok által expresszált cannabinoid (CB1) receptoron ható CB1 agonisták közvetlen gátló hatását a TRPV1 csatorna aktivációjára (Sántha, 2010a). A kollaboráció keretében a későbbiekben vizsgálni kívánjuk a részben a primer szenzoros neuronok által termelt endogén CB1 agonista anandamid szintézis fő enzimének tekintett NAPE-PLD szerepét a nociceptív funkciók szabályozásában. Ebből a célból intézetünkben NAPE-PLD knock out egér tenyészállományt alapítottunk, amelynek genotípezálása céljából egy újszerű gyors PCR eljárást dolgoztunk ki az egyetem Mikrobiológiai Intézetének közreműködésével (Horváth, 2012).

Irodalomjegyzék

Baiou D, Sántha P, Avelino A, Charrua A, Bácskai T, Matesz K, Cruz F, Nagy I: Neurochemical characterization of insulin receptor-expressing primary sensory neurons in wild-type and vanilloid type 1 transient receptor potential receptor knockout mice. *J Comp Neurol* 503:334-347.2007.

Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D: TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124:1269-1282.2006.

Bonnington JK, McNaughton PA: Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. *J Physiol* 551:433-446.2003.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D: Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313.2000.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D: The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.1997.

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D: Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 411:957-962.2001.

Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA: Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183-187.2000.

Dux M, Jancsó G, Sann H, Pierau FK: Inhibition of the neurogenic inflammatory response by lidocaine in rat skin. *Inflammation Research* 45:10-13.1996.

Dux M, Rosta J, Pinter S, Sántha P, Jancsó G: Loss of capsaicin-induced meningeal neurogenic sensory vasodilatation in diabetic rats. *Neuroscience* 150:194-201.2007.

- Dux M, Rosta J, Sántha P, Jancsó G: Involvement of Capsaicin-Sensitive Afferent Nerves in the Proteinase-Activated Receptor 2-Mediated Vasodilatation in the Rat Dura Mater. *Neuroscience* 161:887-894.2009.
- Gamse R, Petsche U, Lembeck F, Jancsó G: Capsaicin Applied to Peripheral-Nerve Inhibits Axoplasmic-Transport of Substance-P and Somatostatin. *Brain Research* 239:447-462.1982.
- Gram DX, Ahren B, Nagy I, Olsen UB, Brand CL, Sundler F, Tabanera R, Svendsen O, Carr RD, Sántha P, Wierup N, Hansen AJ: Capsaicin-sensitive sensory fibers in the islets of Langerhans contribute to defective insulin secretion in Zucker diabetic rat, an animal model for some aspects of human type 2 diabetes. *Eur J Neurosci* 25:213-223.2007.
- Gustavsson J, Parpal S, Karlsson M, Ramsing C, Thorn H, Borg M, Lindroth M, Peterson KH, Magnusson KE, Stralfors P: Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB J* 13:1961-1971.1999.
- Hartmann P, Varga R, Zobolyak Z, Heger J, Csosz B, Nemeth I, Razga Z, Vizler C, Garab D, Sántha P, Jancsó G, Boros M, Szabo A: Anti-inflammatory effects of limb ischaemic preconditioning are mediated by sensory nerve activation in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 383:179-189.2011.
- Hayashi T, Kondo T, Ishimatsu M, Yamada S, Nakamura K, Matsuoka K, Akasu T: Expression of the TRPM8-immunoreactivity in dorsal root ganglion neurons innervating the rat urinary bladder. *Neurosci Res* 65:245-251.2009.
- Hökfelt T, Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z: Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. *Trends Neurosci* 17:22-30.1994.
- Horváth A, Sántha P, Horváth JV, Török N, Nagy I, Jancsó G, Vágvölgyi C, Somogyvári F.: Rapid genotyping of genetically modified laboratory animals from whole blood samples without DNA preparation. *Acta Biologica Hungarica* 63[3], accepted for publication. 2012.
- Ikonen E, Vainio S: Lipid microdomains and insulin resistance: is there a connection? *Sci STKE* 2005:e3.2005.
- Jancsó G, Dux M, Oszlács O, Sántha P: Activation of the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) channel opens the gate for pain relief. *British Journal of Pharmacology* 155:1139-1141.2008.
- Jancsó G, Király E, Jancsó-Gábor A: Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 270:741-743.1977.
- Jancsó G, Király E, Jancsó-Gábor A: Direct Evidence for An Axonal Site of Action of Capsaicin. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 313:91-94.1980.
- Jancsó G, Király E, Joó F, Such G, Nagy A: Selective Degeneration by Capsaicin of A Subpopulation of Primary Sensory Neurons in the Adult-Rat. *Neuroscience Letters* 59:209-214.1985.
- Jancsó G, Lawson SN: Transganglionic Degeneration of Capsaicin-Sensitive C-Fiber Primary Afferent Terminals. *Neuroscience* 39:501-511.1990.
- Jancsó G, Lynn B: Possible use of capsaicin in pain therapy. *Clin J Pain* 3:123-126.1987.
- Jancsó G, Maggi CA: Distribution of Capsaicin-Sensitive Urinary-Bladder Afferents in the Rat Spinal-Cord. *Brain Research* 418:371-376.1987.

Jancsó G, Oszlács O, Sántha P: The Capsaicin Paradox: Pain Relief by an Algesic Agent. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* 10:52-65.2011.

Jancsó G, Sántha P (2004) Transganglionic transport of cholera toxin by injured C fibres to the substantia gelatinosa: relevance to neuropathic pain and hyperalgesia. In: *Hyperalgesia: Molecular Mechanisms and Clinical Implications*, vol. 30 (Brune K, Handwerker HO, eds), pp 143-156 Seattle: IASP Press.

Jancsó N. Desensitization with capsaicin as a tool for studying the function of pain receptors. *Lim, R. K. S.* 33-55. 1968. Oxford, Pergamon Press. *Proceedings of the 3rd Int. Pharmacol. Meeting* 1966.

Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, Mckemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D: Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427:260-265.2004.

Knotkova H, Pappagallo M, Szallasi A: Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *Clin J Pain* 24:142-154.2008.

Michael GJ, Priestley JV: Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *J Neurosci* 19:1844-1854.1999.

Mutoh T, Tokuda A, Inokuchi J, Kuriyama M: Glucosylceramide synthase inhibitor inhibits the action of nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* 273:26001-26007.1998.

Nagy I, Sántha P, Jancsó G, Urban L: The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *European Journal of Pharmacology* 500:351-369.2004.

Nathan JD, Patel AA, Mcvey DC, Thomas JE, Prpic V, Vigna SR, Liddle RA: Capsaicin vanilloid receptor-1 mediates substance P release in experimental pancreatitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 281:G1322-G1328.2001.

Oszlács O, Sántha P, Jancsó G: Long-Lasting Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of N-Oleoyldopamine, An Endogenous Vanilloid. *Neuropeptides* 43:413.2009.

Razavi R, Chan Y, Afifiyan FN, Liu XJ, Wan X, Yantha J, Tsui H, Tang L, Tsai S, Santamaria P, Driver JP, Serreze D, Salter MW, Dosch HM: TRPV1+ sensory neurons control beta cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes. *Cell* 127:1123-1135.2006.

Robertson B, Grant G: A comparison between wheat germ agglutinin and cholera toxin-horseradish peroxidase as anterogradely transported markers in central branches of primary sensory neurons in the rat with some observations in the cat. *Neuroscience* 14:895-905.1985.

Robertson B, Grant G: Immunocytochemical evidence for the localization of the GM1 ganglioside in carbonic anhydrase-containing and RT 97-immunoreactive rat primary sensory neurons. *J Neurocytol* 18:77-86.1989.

Sántha P, Jancsó G: Transganglionic transport of cholera toxin by capsaicin-sensitive C-fibre afferents to the substantia gelatinosa of the spinal dorsal horn after peripheral nerve section. *Neuroscience* 116:621-627.2003.

Sántha P, Jenés A, Somogyi C, Nagy I: The endogenous cannabinoid anandamide inhibits transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-mediated currents in rat cultured primary sensory neurons. *Acta Physiol Hung* 97:149-158.2010a.

Sántha P, Nagy I.: Insulin-induced membrane currents in capsaicin-sensitive primary sensory neurons. *Journal of Physiology-London* 565P, C117. 2005.

Sántha P, Nagy I. Insulin and Insulin-Like Growth Factor-I modulate the activity of capsaicin-sensitive primary sensory neurons. 5th Forum of European Neuroscience, Vienna, Austria, 2006 , A215.21. 2006.

Sántha P, Oszlács O, Dux M, Dobos I, Jancsó G: Inhibition of glucosylceramide synthase reversibly decreases the capsaicin-induced activation and TRPV1 expression of cultured dorsal root ganglion neurons. *Pain*.2010b.

Sántha P, Tassi N, Oszlacs O, Horvath JV, Nagy I, Jancsó G. Predominant expression of insulin receptors in visceral primary afferent neurons and their colocalization with the capsaicin receptor. 7th Forum of European Neuroscience, Amsterdam, the Netherlands , P 020.18. 2010c.

Sántha P, Tassi N, Oszlács O, Horváth V, Nagy I, Jancsó G: Preferential Expression of Insulin Receptor in Visceral Dorsal Root Ganglion Neurons Innervating the Urinary Bladder. *Neuropeptides* 43:428.2009.

Sathianathan V, Avelino A, Charrua A, Sántha P, Matesz K, Cruz F, Nagy I: Insulin induces cobalt uptake in a subpopulation of rat cultured primary sensory neurons. *Eur J Neurosci* 18:2477-2486.2003.

Szigeti C, Sántha P, Körtvély E, Nyári T, Horváth JV, Deák E, Dux M, Gulya K, Jancsó G. Disparate changes in the expression of TRPV1 mRNA and protein in dorsal root ganglion neurons following local capsaicin treatment of the sciatic nerve in the rat. *Neuroscience* accepted for publication. 2011.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D: The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531-543.1998.

Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA: Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol* 534:813-825.2001.

Wang HF, Shortland P, Park MJ, Grant G: Retrograde and transganglionic transport of horseradish peroxidase-conjugated cholera toxin B subunit, wheatgerm agglutinin and isolectin B4 from *Griffonia simplicifolia* I in primary afferent neurons innervating the rat urinary bladder. *Neuroscience* 87:275-288.1998.

Winter J, Forbes CA, Sternberg J, Lindsay RM: Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to the excitotoxin capsaicin. *Neuron* 1:973-981.1988.