

**A nociceptív elsődleges érző neuronok capsaicinnel kiváltott  
aktivációja és kémiai károsodása: a gangliozidok szerepe a  
fájdalomérzésben**

Ph.D. értekezés tézisei

**Oszlács Orsolya**

Szegedi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Élettani Intézet

Szeged

2016

## BEVEZETÉS

A fájdalom a különböző betegségek egyik leggyakoribb általánosan előforduló tünete. Eredetét tekintve megkülönböztethetünk nociceptív és neuropátiás fájdalmat. A nociceptív fájdalmat a nociceptorok aktiválása váltja ki és a szöveti károsodást okozó vagy azzal fenyegető ingerekre specifikusan érzékeny nociceptív primer szenzoros neuronok közvetítik. A neuropátiás fájdalom a fájdalomérző rendszert - gyakran a perifériás idegeket - érintő sérülések következményeként alakul ki. A hátsógyöki ganglionokban és az agyidegek szenzoros dúcaiban található neuronok körülbelül fele nociceptív primer szenzoros neuron. A primer szenzoros neuronoknak ez a populációja szelektíven érzékeny az erős paprika csípős anyagaként ismert capsaicinre. Jancsó Miklós 1950-es években végzett farmakológiai kutatásai kimutatták, hogy a capsaicin aktiválja, nagyobb koncentrációban alkalmazva pedig deszenzibilizálja a bőr és a viscerális szervek nociceptorait. Pórszász és Jancsó arra is rávilágított, hogy a capsaicin szelektíven aktiválja a C-rost afferenseket. Jancsó Miklós és Jancsó-Gábor Aranka megállapították továbbá, hogy a capsaicin-érzékeny szenzoros neuronok kettős funkcióval rendelkeznek. Egyrészt a szenzoros idegvégződések érzékelik és továbbítják az ártalmas stimulusokat a központi idegrendszerbe, másrészt aktiválásukat követően vazóaktív peptideket szabadítanak fel, amelyek a neurogén gyulladást közvetítik. Később, az 1970-es években Jancsó Gábor és munkatársai kimutatták, hogy a capsaicin egy szelektív szenzoros neurotoxin, amely a kisméretű B típusú, részben peptideket tartalmazó szenzoros ganglionsejtek szelektív degenerációját okozza szisztémás kezelést követően. A capsaicin hatásait a tranziens receptor potenciál vanilloid 1-es típusú (TRPV1) receptor, egy nem szelektív kation csatorna közvetíti, amelyet Caterina és munkatársai klónoztak 1997-ben. A TRPV1 receptort ma egy olyan archetipikus nociceptív ioncsatornának tekintik, amelyet a legtöbb fájdalomérző primer szenzoros neuron kifejez. Ennek köszönhetően a TRPV1 receptor funkcionális és molekuláris tulajdonságainak feltárása, valamint a receptornak a fájdalomérző rendszer élettani és patológias folyamataiban betöltött szerepe a fájdalomkutatás előterében áll. Jancsó Gábor és munkatársai 1980-ban kimutatták, hogy patkányban a perifériás idegek capsaicinnel történő egyszeri perineurális kezelése szelektív és hosszan tartó regionális hő és kémiai analgéziát, valamint a neurogén gyulladással válasz kieresztését idézi elő, de nem befolyásolja a nem-nociceptív érző idegek, valamint a vegetatív és szomatomotoros efferensek működését. Laboratóriumunkban végzett későbbi megfigyelések kimutatták, hogy a hátsógyöki ganglionsejtekben csökkent a TRPV1 receptor expressziója perineurális vanilloid (capsaicin vagy resiniferatoxin (RTX)) kezelés után. A fájdalomkutatásban széles körben alkalmazzák a perineurális capsaicin kezelést a TRPV1 receptort expresszáló primer

afferens neuronok funkciójának gátlására, és így a nociceptív, visceroszenzoros és neurogén gyulladási mechanizmusok tanulmányozására. Több állatfajban, így főemlősökben is igazolták, hogy különböző idegeket vanilloidokkal kezelve a test tetszőleges területein nociceptor analgészia idézhető elő, ezért felmerült az eljárás bevezetésének lehetősége a perifériás illetve neuropátiás eredetű fájdalmak kezelésében.

A perineurális capsaicin kezelés meghatározott ganglionális és transzganglionális változásokat okoz a C-rost primer afferensekben. A „capsaicin gap” technika alkalmazásával Jancsó és munkatársai kimutatták, hogy a capsaicin szisztémás adását megelőző perineurális capsaicin kezelés megakadályozta a gerincvelő hátsó szarvának szomatotópiásan megfelelő területein a primer afferens terminálisok argyrophil degenerációját. Ezzel együtt röviddel a perineurális vanilloid kezelést követően több C-rost specifikus jelölő molekula (fluorid-rezisztens savi foszfátáz/tiamin monofoszfátáz (FRAP/TMP), *Bandeiraea simplicifolia* izolektin B4 (IB4), P anyag (SP) és TRPV1) mennyiségének drasztikus csökkenését vagy teljes eltűnését figyeltük meg a gerincvelő hátsó szarvának felületes lamináiban. Hasonló változásokat tapasztalhatunk perifériás idegsérüléseket (pl. idegátmetzés) követően is. A perifériás idegekbe injektált koleratoxin B alegységnek (CTB) vagy konjugátumainak megnövekedett transzganglionális transzportja a gerincvelő substantia gelatinosa rétegébe a perifériás idegsérüléseket követő morfológiai változások szembetűnő jele. Tekintettel arra, hogy a CTB-t és konjugátumait szelektíven csak a gerincvelő hátsó szarvának mélyebb lamináiban végződő velőhüvelyes primer afferens neuronok veszik fel és szállítják, Woolf és munkatársai (1992) a substantia gelatinosa jelölődését azzal magyarázták, hogy a velőhüvelyes A rostok benőnek a károsodott C-rost nociceptor terminálisok helyére (sprouting). Mannion és munkatársai (1996) kimutatták, hogy az idegátmetzéshez hasonlóan perineurális capsaicin kezelést követően is megnövekedett a substantia gelatinosa CTB jelölődése, amit szintén a „sprouting” jelenséggel magyaráztak. Mindemellett a laboratóriumunkban végzett vizsgálatok eredményei rámutattak arra, hogy az irodalmi adatokkal ellentétben a substantia gelatinosa idegátmetzést követő transzganglionális CTB-HRP jelölődése elsősorban a nociceptív C-rost primer szenzoros neuronok fenotípusváltásának következménye, és nem a velőhüvelyes rostok benövése miatt alakul ki. Sántha és Jancsó (2003) munkája arra is rávilágított, hogy a CTB a GM1 gangliozid receptor specifikus és érzékeny biokémiai markere. A neuronokban a GM1 a többi gangliozidhoz hasonlóan a koleszterinben gazdag membrán mikrodoménekben akkumulálódik, és a lipid raftok egyik fő alkotórészének tekintik. A substantia gelatinosa perifériás idegsérülést követő megnövekedett transzganglionális CTB-HRP jelölődésének hátterében álló mechanizmusok megértése

hozzájárulhat nemcsak a gerincvelő hátsó szarvában lezajló morfológiai változások helyes értelmezéséhez, hanem a neuronális gangliozidok nociceptív funkciókban betöltött szerepének tisztázásához is. A GM1 gangliozid metabolizmus és a nociceptív primer afferens neuronokat érintő patobiológiai változások közötti nyilvánvaló kapcsolat ellenére a gangliozidokat mindeddig nem hozták összefüggésbe a fájdalomérzéssel kapcsolatos mechanizmusokkal.

## CÉLKITŰZÉSEK

Az értekezésben összefoglalt vizsgálatok legfőbb célkitűzése a gangliozidok, különösen a GM1 gangliozid szerepének tisztázása a fájdalomérzésben alapvető szerepet játszó kemoszenzitív primer szenzoros neuronok működésében és kémiai lézióját követő morfológiai és molekuláris változások mechanizmusában.

Korábbi hisztokémiai vizsgálatokban kimutatták, hogy perifériás idegek előzetes capsaicin kezelése után az idegbe injektált, a GM1 gangliozidhoz specifikusan kötődő CTB és konjugátumai transzganglionárisan transzportálódva nemcsak a gerincvelő hátsó szarvának mélyebb, hanem felületes rétegeit, főként a substantia gelatinosát is megjelölik. A jelenséget az intakt állatban a gerincvelő mélyebb rétegeibe vetülő, a CTB-t szelektíven kötő velős primer afferensek substantia gelatinosába történő benövésével magyarázták. Laboratóriumunkban végzett korábbi vizsgálatok arra utaltak, hogy a perifériás idegek átmetszését követően a C-rost afferens neuronok fenotípust váltanak és képessé válnak a CTB felvételére és axonális transzportjára. Mivel a C-rostokkal rendelkező érző ganglionsejteket kis méretük is jellemzi, kvantitatív morfológiai módszerekkel meghatároztuk a CTB-t transzportáló primer afferens neuronpopulációk méret-gyakorisági megoszlását kontroll és perineurálisan capsaicinnel kezelt állatokban. Funkcionális hisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk a n. ischiadicus CTB-t transzportáló primer afferenseinek gerincvelői megoszlását kontroll és perineurálisan capsaicinnel kezelt állatokban. Emellett a velőtlen idegrostok jelölésére alkalmas búzacsíra agglutinin-tormaperoxidáz konjugátumot (WGA-HRP) alkalmazva megvizsgáltuk a C-rost primer afferensek axonális transzport funkcióját perineurális capsaicin kezelés után. Kvantitatív elektronmikroszkópos hisztokémiai vizsgálatainkban célul tűztük ki a CTB-t transzportáló hátsógyöki érző idegrostok direkt morfológiai kimutatását és identifikálását perineurális capsaicin kezelést követően. A capsaicin mellett, tekintettel humán terápiás alkalmazásának lehetőségeire, tanulmányoztuk az ultrapotens vanilloid agonista resiniferatoxin hatásait is.

A perifériás idegsérüléseket követő neuroplasztikus változások vizsgálatában a CTB-t mint hodológiai vizsgálatokra alkalmas jelölő molekulát alkalmazták. A CTB azonban a membránfolyamatokban és számos celluláris/neuronális funkcióban fontos szerepet játszó GM1 gangliozid specifikus biokémiai markere. Ezért vizsgálataink további célját a gangliozidoknak az érző neuronok, különösen pedig a fájdalomérzés közvetítésében szerepet játszó nociceptív primer afferens neuronok működésében betöltött szerepének feltárása képezte. Hátsógyöki ganglionokból készített sejttenyészetekben az érző ganglionsejtek capsaicinnel történő aktiválhatóságának vizsgálata a nociceptív működés megbízható *in vitro* módszere. A capsaicin/TRPV1 receptor—aktiválódását a hisztokémiai módszerekkel kimutatható fokozott kobalt felvétel alapján jellemeztük. A gangliozidoknak a nociceptív primer szenzoros neuronok működésében betöltött szerepét kontroll, és a gangliozid szintézis kulcsenzime, a glukozilceramid-szintáz (GCS) bénítását követően gangliozid-depletált érző ganglionsejteken vizsgáltuk *in vitro*. A glukozilceramid-szintáz bénítását követően kvantitatív hisztokémiai és immunhisztokémiai módszerekkel meghatároztuk a neuronok capsaicinnel történő aktiválhatóságát, CTB-kötését valamint TRPV1 expresszióját. *In vitro* kísérleteinkben megvizsgáltuk a glukozilceramid-szintáz gátlásának hatását a hátsógyöki ganglionsejtek NGF-mediált akut szenzitizációjára és neurit növekedésére.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### Sebészeti beavatkozások

---

A kísérleteket a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélyével végeztük.

Kísérleteinkhez 300-350 g tömegű hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat klorálhidráttal (400 mg/kg, i.p.) elaltattuk, majd mindkét oldalon feltártuk a nervus ischiadicust a comb középső vonalában. Az ideg alá parafilmot helyeztünk, hogy izoláljuk a környező szövetektől, majd a jobb oldali ideg köré 0,1 ml 1%-os capsaicinnel vagy 0,005%-os RTX-el átítatott gelaspon mandzsettát helyeztünk, míg a baloldalon a capsaicin oldószerével (6% etanol és 8% Tween 80 fiziológiás sóoldatban) kezeltük az ideget. A műtét után zártuk a sebet és az állatokat visszavittük az állatházba.

A nervus ischiadicusban futó szenzoros neuronok jelölése céljából két héttel a perineurális capsaicin (n=9), illetve RTX (n=4) kezelést követően ismét elaltattuk az állatokat. Mindkét oldalon feltártuk az idegeket és Hamilton fecskendővel 1 µl 1,5%-os CTB-HRP (n=7) vagy WGA-HRP (n=2) konjugátumot oltottunk a nervus ischiadicusba. A jelölőanyagot

mikroszkópos szemkontroll alatt lassan injektáltuk az idegbe, az előzetes kezelés helyétől disztálisan.

### Szövetteni eljárások

---

Az állatokat a jelölőanyagok (CTB-HRP vagy WGA-HRP) beoltása után 3 nappal túlaltattuk, majd aldehides fixálóval (1,25% glutáraldehid és 1% formaldehid 0,1 M foszfát pufferben; pH 7,4) transzkardiálisan perfundáltuk. Fixálás után 400 ml 4 °C-os, 30% szacharózt tartalmazó foszfát pufferrel is átperfundáltuk a szöveteket. Ezt követően eltávolítottuk az L4-L5 hátsógyöki ganglionokat és a lumbális gerincvelőt, majd a metszésig 4 °C-on, szacharóz tartalmú pufferben tároltuk őket. A hátsógyöki ganglionokból 15 µm, a gerincvelőkből pedig 20 és 60 µm vastag sorozatmetszeteket készítettünk kriosztáttal, illetve fagyaszó mikrotómmal.

#### *Peroxidáz enzim aktivitás kimutatása*

A tormaperoxidázhoz kapcsolt jelölőanyagok jelenlétét a különböző szövetekben a Mesulam-féle (1978) peroxidáz reakcióval mutattuk ki. A ganglionból és a gerincvelőből készült metszeteket abszolút alkoholban oldott nitroprusszid nátriumot (100 mg/100 ml) és tetrametil-benzidint (TMB; 5 mg/100 ml) tartalmazó, acetát pufferrel (0,1 N; pH 3,3) hígított oldatban inkubáltuk 20 percig. Ezt követően az inkubáló oldatot frissen készített 0,3 %-os hidrogén-peroxiddal kiegészített oldattal cseréltük. Az enzimreakció kialakulását kis nagyítású fénymikroszkóppal ellenőriztük, majd a reakciótermék megjelenése után a metszeteket 5%-os ecetsavas oldatba helyeztük. A gerincvelő metszeteket alkoholos zselatin oldatból zselatinozott tárgylemezre húztuk fel, 24 órán keresztül száradni hagytuk, felszálló alkoholsorban dehidráltuk, xyloban átderítettük és DPX fedőanyaggal lefedtük. A hátsó gyöki ganglionokból készült metszeteket lefedés előtt neutrálvörössel felülfestettük.

#### *TMP enzim aktivitás kimutatása*

A TMP enzim aktivitást a Colmant (1959) által leírt reakció kisebb módosításával mutattuk ki. A festési eljárás a Gömöri féle savi foszfátáz reakción alapszik. Az L4-L5 hátsógyöki ganglion és gerincvelő metszeteket Tris pufferben oldott 0,3% tiamin monofoszfátot, 20 ml 0,2%-os ólom-nitrátot és 5,5% szacharózt tartalmazó oldatban (pH 5,2-

5,4) 37 °C-os termosztátban 90 percig inkubáltuk. Az enzim aktivitás hatására a szövetekben oldhatatlan ólom-foszfát csapadék képződik. Rövid mosást követően a szintelen reakcióterméket 5%-os kálium-bikromáttal hívtuk elő. A metszeteket mostuk, felszálló alkoholsorban dehidráltuk, xyloban átderítettük és DPX fedőanyaggal lefedtük. A hátsó gyöki ganglionokból készült metszeteket lefedés előtt a magfestő krezilibolyával felülfestettük.

### *Elektronmikroszkópos hisztokémia*

A CTB-HRP-t transzportáló hátsó gyöki afferenseket elektronmikroszkópos hisztokémiai módszerekkel mutattuk ki 2 héttel a nervus ischiadicus perineurális capsaicin kezelést követően. Három állatban 12 órával a CTB-HRP oltást követően lekötöttük az L5-ös hátsó gyökereket mind az intakt, mind a capsaicin-kezelt oldalon. Harminchat órával később az állatokat a fent említett módon perfundáltuk, majd az L5-ös hátsó gyökerekből vibratóm segítségével 80 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A peroxidáz aktivitást a Gu és munkatársai (1992) által leírt módon, tetrametil-benzidin kromogén és nátrium-wolframát stabilizátor felhasználásával mutattuk ki. A mintákat ezután diaminobenzidint (DAB) és kobalt-kloridot tartalmazó oldattal reagáltattuk, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezeltük, ozmium-tetroxiddal utófixáltuk, víztelenítettük és Aralditba beágyaztuk. A beágyazott mintákból ultravékony metszeteket készítettünk, amiket ezután uranil-acetáttal és ólom-citráttal kezeltünk. A hátsó gyökérben futó axon profilokat Jeol Jem 1010 elektronmikroszkóppal "on-screen" számoltuk.

### *Statisztikai analízis*

A CTB-HRP jelölt és jelöletlen L4-L5 hátsógyöki ganglion sejtek (minimum 200/csoport) átmetszeti területét számítógéphez kapcsolt kamera lucidával és digitalizáló táblával felszerelt fénymikroszkóp segítségével mértük reprezentatív sorozatmetszeteken 40x objektív nagyítás alatt. Az egyes csoportokban meghatároztuk a neuronok átmetszeti területének átlagát. Korábbi megfigyeléseink alapján a < 600 µm<sup>2</sup> területű sejteket tekintettük kisméretű sejteknek. A különböző neuron szubpopulációk átmetszeti területének és relatív arányának értékeit átlag ± SEM formában adtuk meg. Adataink parametrikus statisztikai kiértékeléséhez Student kétmintás t-próbát és egyoldalas ANOVA-t használtunk. A *post hoc* analízist a Dunnett-próbával végeztük. Szignifikáns eltérésnek a p < 0,05 értéket tekintettük.

## Primer sejt kultúrák készítése és D-PDMP kezelése

---

A 250-300 g tömegű hím Wistar patkányokat (n=24) éterrel elaltattuk, dekapitáltuk és steril körülmények között kivágtuk a gerincoszlopot. A primer hátsógyöki ganglion kultúrákat a Winter és munkatársai (1988) által leírt módon készítettük, kisebb módosításokkal. A gerinccsatorna feltárása után eltávolítottuk a C1-L6 ganglionokat és 1 mM L-glutamint, 50 IU/ml penicillint, 50 µg/ml streptomycint és 4% Ultrosor G-t tartalmazó tápoldatba gyűjtöttük (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient mixture F-12 HAM). A kötőszövet emésztése céljából a sejteket kollagenáz enzimet (2000 U/ml) tartalmazó F-12 HAM médiumban inkubáltuk 3 órán keresztül, 37 °C-on, CO<sub>2</sub> termosztátban (F<sub>CO<sub>2</sub></sub>=5%). Ezt követően 3x mostuk a sejteket, majd Pasteur pipetta segítségével triturráltuk a szuszpenziót és 15% szarvasmarha szérum albumin oldatra rétegezve lecentrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a leülepedett sejteket médiumban reszuszpendáltuk és Bürker kamrában megszámloltuk, majd lamininnel valamint poly-DL-ornitinnel előkezelt fedőlemezekre szélesztettük. A kultúrákon a sejtek letapadása után a tápoldatot 50 ng/ml idegnövekedési faktort (NGF) tartalmazó oldatra cseréltük.

A sejt kultúrákat különböző koncentrációjú (10, 20 vagy 50 µM) D-PDMP-t tartalmazó tápoldatban inkubáltuk 4 napig, 37 °C-on, CO<sub>2</sub> termosztátban. A D-PDMP törzsoldatát fiziológiás sóoldatban hígított abszolút alkohollal készítettük, majd a 20 és 50 µM PDMP és 0,05% etanol végső koncentráció eléréséhez tápoldattal hígítottuk tovább.

### *A hátsógyöki ganglion sejt kultúrák CTB-kötése*

A kontroll és D-PDMP kezelt kultúrákat fluoreszcein izotiocianáttal konjugált CTB-vel (FITC-CTB; 10 µg/ml) inkubáltuk 10 percig, 37 °C-on. Ezután friss médiummal mostuk, majd 10 percig 10%-os pufferelt formaldehid oldatban fixáltuk a sejteket. A mosást megismételtük, végül ProlongGold fedőanyaggal tárgylemezre ragasztottuk a fedőlemezeket. Kezelési csoportonként 50 db sejtről CARV II spinning disc konfokális mikroszkóphoz kapcsolt képalkotó rendszerrel Z-stack optikai metszet sorozatot készítettünk 40x nagyítású objektív alatt. A konfokális képeken a sejtmembrán relatív fluoreszcencia intenzitását az ImagePro Plus 6 képanalizáló programmal határoztuk meg. Kiszámítottuk a relatív intenzitás százalékos változásait. A kapott értékeket átlag ± S.E.M. formában adtuk meg.



*A capsaicin érzékeny hátsógyöki ganglionsejtek kimutatása kobaltfelvétellel*

A ganglionsejteket tartalmazó fedőlemezeket 57,5 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mg HEPES, 12 mM glükóz és 139 mM szacharóz tartalmú pufferben (pH 7.4) mostuk két váltás mosóoldattal, szobahőmérsékleten. A puffert kiegészítettük 5 mM CoCl<sub>2</sub>-dal és 1 μM capsaicinnel, majd a sejteket ebben az oldatban inkubáltuk 37 °C-on 5 percig. A kontroll kísérletben az inkubáló oldat csak a CoCl<sub>2</sub>-ot tartalmazta, capsaicint nem. Az inkubációs lépés után az eredeti, kobaltmentes pufferrel mostuk a fedőlemezeket két váltással. Ezt követően 2% merkaptóetanolt tartalmazó puffert pipettáztunk a sejtekre, majd 2 perc festődési időt követően (ez alatt a merkaptóetanol a kobalttal barnás csapadékot hoz létre a sejtben) a sejteket 70%-os alkohollal fixáltuk, abszolút alkoholban víztelenítettük, xyolban átderítettük és DPX fedőanyaggal tárgylemezre ragasztottuk.

*Az NGF akut szenzitizáló hatása*

A kontroll és D-PDMP-kezelt (20 μM, 4 nap) primer sejttenyészeteket 200 ng/ml NGF-el kezeltük 10 percig. A nociceptív hátsógyöki ganglionsejtek capsaicin-indukált aktivációját kobaltfelvétellel mutattuk ki a fent leírtak szerint. A neuronokat 20x nagyítású objektív alatt számoltuk és meghatároztuk a kobalt-jelölt sejtek arányát. A kapott értékeket átlag ± S.E.M. formában adtuk meg.

*TRPV1 immunhisztokémia*

A sejt kultúrákat 4% formaldehidet tartalmazó 0,1 M foszfát pufferben (pH 7,4) fixáltuk 10 percig, majd kétszer mostuk PBS-ben (0,01 M fiziológiás foszfát puffer, 0,9% NaCl). Ezt követően a sejteket 0,3 % Triton X 100 tartalmú PBS-ben hígított, nyúlban termeltetett poliklonális anti-TRPV1 primer antitesttel (1:1500) inkubáltuk egy éjszakán keresztül 4 °C-on. Háromszori mosást követően Cy3-jelölt számarban termeltetett nyúl ellenes másodlagos antitesttel (1:1500) inkubáltuk a kultúrákat 2 órán át, végül ismételt mosást követően a sejteket Vectashield fedőanyaggal lefedtük.

### *A hátsógyöki ganglionsejt-nyúlványok növekedésének mérése*

A hátsógyöki ganglionsejtek nyúlványainak hosszát monoklonális 200 kDa neurofilament ellenes antitesttel festett kultúrákban mértük. A jól azonosítható nyúlványokkal rendelkező kontroll és D-PDMP-kezelt (20 vagy 50  $\mu\text{M}$ ) kultúrákból (2 illetve 4 napos) származó hátsógyöki ganglionsejtekről egyenként fényképeket készítettünk, amelyeket az ImagePro plus képanalizáló szoftver segítségével értékeltünk ki. Minden kezelési csoportból 50 neuront értékeltünk. A kapott értékeket átlag  $\pm$  S.E.M. formában adtuk meg.

### *Statisztikai analízis*

A hátsógyöki ganglionsejt kultúrákon a kobalt-felvétel és a TRPV1 immunhisztokémia eredményét számítógéphez kapcsolt Retiga 2000R digitális kamerával felszerelt Leica DMLB fénymikroszkóppal vizsgáltuk 20x objektívvel. A kobalttal jelölt, a TRPV1 jelölt, illetve jelöletlen sejtek (csoportonként legalább 150-200 db) méretét és optikai denzitását az ImagePro Plus 6 képanalizáló programmal mértük le. Meghatároztuk a sejtek százalékos arányát, és méret szerinti eloszlás hisztogramokat készítettünk.

A capsaicin és D-PDMP kezelések hatásainak statisztikai kiértékeléséhez Student kétmintás t-próbát és egyoldalas ANOVA-t használtunk. A *post hoc* analízist a Dunnett-próbával végeztük. Szignifikáns eltérésnek a  $p < 0,05$  értéket tekintettük.

## **EREDMÉNYEK**

A perineurális capsaicin és RTX kezelés hatása a primer afferens terminálisok megoszlására a gerincvelő hátsó szarvában

---

### *A CTB-HRPjelölődés változásai*

A CTB-HRP-t intakt patkányokban kizárólag a velőhüvelyes idegrostok veszik fel és transzportálják. Korábbi eredményekkel összehangban megfigyeltük, hogy a CTB-HRP-t az oldószerrel kezelt bal oldali n. ischiadicusba oltva a lumbális gerincvelői szegmentumokban a hátsó szarv szomatotópiásan megfelelő mélyebb rétegei jelölődtek. Két héttel a nervus ischiadicus perineurális capsaicin, illetve RTX kezelését követően a CTB-HRP nemcsak a gerincvelő hátsó szarvának mélyebb rétegeiben, hanem a felületes laminákban, a marginális zónában és a substantia gelatinosában is megjelent.

### *A WGA-HRPjelölődés változásai*

A WGA-HRP a velőtlen rostok szelektív jelölőanyaga, amely intakt perifériás idegbe oltva a korábbi megfigyelésekhez hasonlóan a gerincvelő hátsó szarvában a C-rost afferensek terminálisait tartalmazó felületes laminákat, a marginális zónát és a substantia gelatinosát jelölte meg. A jelölődés folytonos sávként jelent meg a beoltott ideghez tartozó gerincvelői szegmentumokban, a zona marginalisban és substantia gelatinosában. A WGA-HRP-t 2 héttel a nervus ischiadicus perineurális vanilloid kezelését követően az idegbe oltva a fentiekhez hasonló jelölési mintázatot kaptunk.

### *A TMP aktivitás változásai*

A rágsálók hátsógyöki ganglionsejtjeinek mintegy 50%-ában (különösen a velőtlen rostokkal rendelkező kis átmérőjű sejtekben) kimutatható TMP enzim a kisméretű primer afferens neuronok markereként ismert. A kontroll oldalon a hátsó szarvban az enzimaktivitás a substantia gelatinosában lokalizálható. Két héttel a jobb oldali n. ischiadicus perineurális capsaicin vagy RTX kezelését követően a TMP aktivitás gyakorlatilag eltűnt a substantia gelatinosa mediális 2/3-ában, a nervus ischiadicusban futó C-rost afferensek gerincvelői végződéseinek területében.

### *A perineurális capsaicin és RTX kezelés hatása az L5-ös hátsógyöki ganglionsejtek CTB-HRPjelölődésére*

A CTB-HRP-vel retrográd módon jelölt L5-ös hátsógyöki ganglionsejtek sejttestjeit peroxidáz reakcióval mutattuk ki. Az oldószerral kezelt ideghez tartozó ganglionokban főleg a nagy és közepes méretű sejtek mutattak peroxidáz aktivitást. Ezzel szemben a capsaicinnel vagy RTX-szel kezelt ideghez tartozó ganglionokban sok kis sejt is jelölődött. Az L5-ös ganglionsejtek méret-gyakoriság eloszlásának vizsgálata azt mutatta, hogy a kezelt oldalon jelentősen nőtt a jelölődött kisméretű sejtek aránya a kontroll oldalhoz viszonyítva. Ezt alátámasztotta a jelölt sejtek átlagos átmetszeti területének vizsgálata: perineurális vanilloid kezelés után szignifikánsan csökkent a jelölt sejtek átlagos átmetszeti területe (kontroll:  $916,16 \pm 40,07 \mu\text{m}^2$ , capsaicin:  $698,16 \pm 27,59 \mu\text{m}^2$ , RTX:  $673,57 \pm 43,44 \mu\text{m}^2$ ;  $n=4$ ,  $p < 0,05$  mindkét csoportban). A teljes sejtpopuláció átlagos átmetszeti területének értékeiben nem volt különbség (kontroll:  $657,6 \pm 26 \mu\text{m}^2$ , capsaicin:  $652,02 \pm 48 \mu\text{m}^2$ , RTX:  $657,78 \pm 57 \mu\text{m}^2$ ). A jelölt sejtek arányának átlaga a kontroll ganglionokhoz képest szignifikáns növekedést

mutatott (kontroll:  $40,71 \pm 2,21\%$ , capsaicin:  $63,44 \pm 1,17\%$ , RTX:  $54,29 \pm 3,21\%$ ;  $n=4$ ,  $p < 0,05$  mindkét csoportban). A  $< 600 \mu\text{m}^2$  átmetszeti területű CTB-HRP pozitív sejtek aránya is szignifikánsan növekedett: a kontroll ganglionban  $45,35 \pm 1,58\%$ , míg a kezelt oldalon  $66,41 \pm 0,64\%$  (capsaicin) és  $65,62 \pm 1,03\%$  (RTX) ( $n=4$ ,  $p < 0,05$  mindkét csoportban).

#### A perineurális capsaicin kezelés hatása a hátsó gyökérben futó velőhüvelyes és velőtlen axonok CTB-HRPjelölődésére

---

Az L5-ös hátsó gyökér ultrastrukturális vizsgálata kimutatta, hogy a kontroll oldalon sok velőhüvelyes ( $50,60 \pm 6\%$ ), míg szignifikánsan kevesebb velőtlen axon ( $3,00 \pm 1\%$ ) mutatott CTB-HRP jelölődést. A CTB-HRP jelenlétét jelző elektrondenz reakcióvégtermék az axoplazmában és/vagy az axolemma belső felszínén lokalizálódott. Két héttel a nervus ischiadicus perineurális capsaicin kezelését követően az L5-ös hátsó gyökerekben a CTB-HRP pozitív velőtlen axonok aránya ( $47,80 \pm 6\%$ ) szignifikánsan nőtt, míg a velőhüvelyes rostok aránya nem változott ( $57,20 \pm 6,5\%$ ) a kontroll oldalhoz viszonyítva.

#### A D-PDMP kezelés hatása a hátsógyöki ganglionsejtek capsaicin érzékenységre

---

##### *A D-PDMP kezelés hatása a neuronok CTB-kötésére*

A D-PDMP kezelés celluláris GM1 gangliozid szintre kifejtett hatásait a neuronok CTB-FITC kötésével vizsgáltuk. A hátsógyöki ganglionsejtekből készített 2 illetve 4 napos kontroll kultúrákban a plazmamembránban intenzív, a citoplazmában pedig különböző intenzitású CTB-FITC jelölődést figyeltünk meg. A D-PDMP előkezelés a koncentráció és az idő függvényében csökkentette jelölődés mértékét. Kvantitatív adatok szerint a plazmamembránban a relatív fluoreszcencia intenzitás már 2 napos D-PDMP előkezelés után is szignifikánsan csökkent a kontroll kultúrákhoz viszonyítva, míg 4 napos előkezelés után 60%-os csökkenést ért el.

##### *A D-PDMP kezelés hatása a neuronok capsaicinnel kiváltott kobalt felvételére*

A TRPV1 receptorok capsaicinnel történő szelektív aktiválása a kobalt ionok gyors beáramlását váltja ki, amit hisztokémiai módszerekkel mutattunk ki. A capsaicinre érzékeny neuronokban különböző intenzitású barnás színű kobalt csapadék jelent meg. A kobalt-pozitív neuronok azonosítása és csoportosítása a jelölés intenzitásának alapján történt, amit optikai

denzitás méréssel határoztunk meg. Capsaicin hiányában nagyon kevés sejtben (< 5%) jelent meg a barna színű kobaltfestődés a kontroll és a 4 napig D-PDMP-vel előkezelt kultúrákban egyaránt. Korábbi eredményekkel összhangban kimutattuk, hogy a hátsógyöki ganglionsejtekből készített kontroll kultúrákban a sejtek  $29,74 \pm 2,53\%$ -a mutatott kobalt jelölést  $1 \mu\text{M}$  capsaicin jelenlétében. A D-PDMP hatása koncentrációfüggő volt. A  $10 \mu\text{M}$  D-PDMP-vel 4 napig kezelt kultúrákban a kobalttal jelölt ganglionsejtek aránya kis mértékben csökkent a kontrollhoz viszonyítva ( $26,8 \pm 1,9\%$  vs.  $29,74 \pm 2,53\%$ ). Húsz, illetve  $50 \mu\text{M}$  D-PDMP alkalmazása során a kobalt-pozitív neuronok arányának szignifikáns csökkenését figyeltük meg ( $20,57 \pm 0,93\%$ , illetve  $11,63 \pm 1,22\%$ ;  $n=24$ ,  $p < 0,05$  mindkét csoportban). A ganglionsejtek méret-gyakoriság eloszlásában nem volt különbség a kontroll és az  $50 \mu\text{M}$  D-PDMP-vel előkezelt kultúrák között. A jelölt neuronok optikai denzitásának vizsgálata szignifikáns intenzitás-csökkenést mutatott: capsaicin kezelés után az  $50 \mu\text{M}$  D-PDMP előkezelt kultúrákban a kobalttal jelölődött sejtek optikai denzitása a kontrollhoz viszonyítva  $47,8 \pm 6,4\%$ -al csökkent.

#### *Az NGF akut szenzitizáló hatása*

A hátsógyöki ganglionsejtek jól ismert és fontos jellemvonása, hogy a rövid ideig alkalmazott NGF szenzitizálja a TRPV1 csatornákat (fokozza a csatornák capsaicin-indukált aktivációját). Kísérleteinkben az NGF akutan, nagy koncentrációban alkalmazva szignifikánsan növelte a sejtek capsaicin-indukált kobalt felvételét. A kontroll kultúrákban a sejtek  $27,7 \pm 1,3\%$ -a jelölődött, míg az NGF ( $200 \text{ ng/ml}$ ;  $n = 7$ ,  $p < 0.05$ ) akut hatásának köszönhetően a sejtek  $36,5 \pm 2,4\%$ -a volt kobalt-pozitív. Ezzel ellentétben a D-PDMP-kezelt kultúrákban a sejtek mindössze  $18,1 \pm 2,9\%$ -a reagált a capsaicinre, és az NGF előkezelést követően a kobalt-jelölt neuronok aránya nem növekedett ( $17,3 \pm 2,4\%$ ;  $n = 7$ ).

#### *A D-PDMP kezelés hatása a neuronok TRPV1 immunreaktivására*

A kontroll hátsógyöki ganglion kultúrákban különböző méretű sejtek mutattak TRPV1 immunreaktivitást: a teljes neuron populáció  $37,5 \pm 1,4\%$ -a jelölődött. A D-PDMP hatása itt is koncentrációfüggő volt. A  $10 \mu\text{M}$  D-PDMP-vel 4 napig előkezelt kultúrákban a TRPV1-immunreaktív ganglionsejtek aránya csak kismértékben csökkent a kontroll kultúrákhoz viszonyítva ( $32,34 \pm 2,45\%$  vs.  $37,5 \pm 1,4\%$ ). Ezzel ellentétben a  $20$  vagy  $50 \mu\text{M}$  D-PDMP előkezelés szignifikánsan,  $23,07 \pm 1,93\%$  ill.  $18,23 \pm 2,1\%$ -al csökkentette a TRPV1-pozitív

neuronok arányát. A ganglionsejtek méret-gyakoriság eloszlásában nem volt különbség a kontroll és az 50  $\mu\text{M}$  D-PDMP-vel előkezelt kultúrák között sem a teljes, sem a TRPV1-pozitív populációkban.

#### *A hátsógyöki ganglionsejtek nyúlványainak növekedése*

A 2 illetve 4 napos kontroll kultúrákban az egyes sejtek nyúlványainak teljes hossza átlagosan  $956,3 \pm 54,3 \mu\text{m}$  és  $1557,4 \pm 75,8 \mu\text{m}$  volt. A D-PDMP kezelés a nyúlványok hosszának szignifikáns és koncentráció-függő csökkenését eredményezte (2 napos kultúra: 20  $\mu\text{M}$  D-PDMP  $737,82 \pm 35,62$ ; 50  $\mu\text{M}$  D-PDMP  $578,39 \pm 53,42$  és 4 napos kultúra: 20  $\mu\text{M}$  D-PDMP  $616,46 \pm 31,62$ ; 50  $\mu\text{M}$  D-PDMP  $312,22 \pm 21,81$ ;  $n=50$ ,  $p < 0,05$ ).

### **KÖVETKEZTETÉSEK**

Korábbi vizsgálatokban kimutatták, hogy perineurális capsaicin kezelést követően a gerincvelő hátsó szarvában, a substantia gelatinosában a C-rost primer afferensek végződési területében intenzív CTB-HRP jelölődés mutatható ki. Mivel intakt állatokban a CTB-HRP-t csak a velőhüvelyes A-rost primer afferensek, veszik fel és szállítják végződési területükbe, a hátsó szarv mélyebb lamináiba, a jelenséget a velőhüvelyes afferensek felületes laminákba, főként a substantia gelatinosába történt benövésével magyarázták. A jelen dolgozatban bemutatott eredmények alapján arra következtetünk, hogy a substantia gelatinosában a n. ischiadicus perineurális vanilloid (capsaicin vagy RTX) kezelését követően megjelenő transzganglionáris CTB-HRP jelölődés a sérült kemoszenzitív C-rost afferensek fokozott CTB-HRP felvételével és axonális transzportjával magyarázható, nem pedig az A $\beta$  afferensek „sprouting” válaszával hozható összefüggésbe. A jelenség feltehetően a C-rost primer szenzoros neuronok fenotípus-váltásának következménye, ami a GM1 gangliozid neuronális szintjének emelkedését és ennek következtében fokozott CTB-kötést eredményez. A vanilloidokkal kezelt perifériás ideghez tartozó hátsó gyökök elektronmikroszkópos vizsgálata közvetlen bizonyítékot szolgáltatott a C-rost primer afferensek CTB-HRP transzportjára vonatkozóan. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a perifériás idegek capsaicin kezelését követően az érintett idegbe injiciált CTB-HRP-t a velőtlen, C-rost afferensek transzportálják a substantia gelatinosába. Megfigyeléseink megkérdőjelezzik az ún. sprouting hipotézist, miszerint a substantia gelatinosa masszív jelölődéséért a hátsó szarv mélyebb rétegeibe vetülő velőhüvelyes A-rostok substantia gelatinosába történő benövése lenne

felelős. Emellett vizsgálataink felhívták a figyelmet a gangliozidok, főként a GM1 gangliozid nociceptor funkcióban betöltött szerepének jelentőségére. Ezt bizonyították hátsógyöki ganglion-kultúrákon végzett vizsgálataink, amelyekben kimutattuk, hogy a glukozilceramid-szintáznak, a gangliozidszintézis kulcs-enzimének gátlása reverzibilisen csökkentette a neuronok capsaicin-érzékenységét, a TRPV1 receptor expresszióját, az NGF-mediált akut szenzitizációt és neurit növekedést. A nociceptor funkciók gátlásának mechanizmusában a TRPV1 receptor NGF-függő expressziójának csökkenése, és/vagy a membrán lipid mikrodomének (lipid raftok) működésének zavara játszhat szerepet. Korábbi vizsgálatok kimutatták mind a GM1 gangliozid részvételét az NGF szignalizáció folyamataiban, mind pedig a gangliozidok jelenlétét a lipid mikrodoménekben, valamint ezek jelentőségét a TRPV1 receptor aktivációjában.

Vizsgálataink feltárták a perineurális capsaicin/vanilloid applikáció – egy lehetséges antinociceptív eljárás – által okozott ganglionáris és transzganglionáris neuroplasztikus változások valódi mechanizmusát és rávilágítottak a gangliozidok nociceptor funkciókban betöltött szerepére. Eredményeink arra utalnak, hogy a neurális gangliozid metabolizmus farmakológiai manipulálása lehetőséget nyújt a nociceptor funkció befolyásolására és ily módon a fájdalomérzés perifériás modulációjára.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani az Élettani Intézet minden volt és jelenlegi dolgozójának, aki a segítségemre volt a PhD munkám elkészítésében.

Köszönöm Dr. Sály Gyula intézetvezető professzor úrnak, hogy az Élettani Intézetben dolgozhattam.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni a témavezetőimnek Dr. Jancsó Gábor professzor úrnak és Dr. Sántha Péternek az elmúlt évek alatt nyújtott segítségért és támogatásért.

Hálás köszönettel tartozom kollégáimnak Dr. Deák Évának, Dr. Dux Máriának, Karcsúné Dr. Kis Gyöngyinek, Dr. Kisné Dr. Dobos Ildikónak, Lakatos Szendrának, Dr. Somodiné Dr. Boros Krisztinának, Dr. Tenkné Hegyeshalmi Évának és Tóthné Dr. Rosta Juditnak a szakmai és emberi támogatásért és a barátságos munkahelyi légkör megteremtéséért.

Legmélyebb hálammal nektek tartozom kedves családom és barátaim a szeretetért, türelemért és a biztos, támogató háttér megteremtéséért. Nem tudom eléggé megköszönni, hogy mindig mellettem álltok, ezért nektek ajánlom a munkámat, szeretettel.

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- I. Oszlács O, Jancsó G, Kis G, Dux M, Sántha P. (2015) Perineural capsaicin induces the uptake and transganglionic transport of cholera toxin b subunit by nociceptive C-fiber primary afferent neurons. *Neuroscience* 311:243-252.
- II. Sántha P, Oszlács O, Dux M, Dobos I, Jancsó G. (2010) Inhibition of glucosylceramide synthase reversibly decreases the capsaicin-induced activation and TRPV1 expression of cultured dorsal root ganglion neurons. *Pain* 150:103-112.
- III. Jancsó G, Dux M, Oszlács O, Sántha P. (2008) Activation of the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) channel opens the gate for pain relief. *Br J Pharmacol* 155:1139-1141.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények kumulatív impakt faktora: 13,614