

A trigeminalis rendszer aktivációja a migrén állatkísérletes modelljeiben

Dr. Laborc Klaudia Flóra

Ph.D. értekezés tézisei

Témavezető: Dr. Párdutz Árpád



Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

Neurológiai Klinika

Szeged, 2023

A Ph.D. tézishez közvetlenül kapcsolódó eredeti közlemények:

I.

Kludia Flóra Laborc, Eleonóra Spekker, Zsuzsanna Bohár, Mónika Szűcs, Gábor Nagy-Grócz, Annamária Fejes-Szabó, László Vécsei, Árpád Párdutz
“Trigeminal activation patterns evoked by chemical stimulation of the dura mater in rats”
The Journal of Headache and Pain 2020 Aug 15;21(1):101
IF: **7.277**

II.

Gábor Nagy-Grócz, Zsuzsanna Bohár, Annamária Fejes-Szabó, **Kludia Flóra Laborc**, Eleonóra Spekker, Lilla Tar, László Vécsei, Árpád Párdutz
Nitroglycerin increases serotonin transporter expression in rat spinal cord but anandamide modulated this effect
Journal of Chemical Neuroanatomy 2017 Nov;85:13-20
IF: **2.162**

Teljes impakt faktor: 9.439

Ph.D. tézishez közvetlenül nem kapcsolódó eredeti közlemények:

I.

Gábor Nagy-Grócz, Lilla Tar, Zsuzsanna Bohár, Annamária Fejes-Szabó, **Kludia Flóra Laborc**, Eleonóra Spekker, László Vécsei, Árpád Párdutz

The modulatory effect of anandamide on nitroglycerin-induced sensitization in the trigeminal system of the rat

Cephalalgia 2016 Aug;36(9):849-61

IF: **3.609**

II.

Gábor Veres, Annamária Fejes-Szabó, Dénes Zádori, Gábor Nagy-Grócz, Anna M László, Attila Bajtai, István Mándity, Márton Szentirmai, Zsuzsanna Bohár, **Kludia Laborc**, István Szatmári, Ferenc Fülöp, László Vécsei, Árpád Párdutz

A comparative assessment of two kynurenic acid analogs in the formalin model of trigeminal activation: a behavioral, immunohistochemical and pharmacokinetic study

Journal of Neural Transmission 2017 Jan;124(1):99-112

IF: **3.886**

III.

Gábor Nagy-Grócz, **Kludia Flóra Laborc**, Gábor Veres, Attila Bajtai, Zsuzsanna Bohár, Dénes Zádori, Annamária Fejes-Szabó, Eleonóra Spekker, László Vécsei, Árpád Párdutz

The effect of systemic nitroglycerin administration on the kynurenine pathway in the rat

Frontiers in Neurology 2017 Jun 14;8:278

IF: **3.508**

IV.

Scott J Denstaedt, Joanna L Spencer-Segal, Michael W Newstead, **Kludia Laborc**, Anne P Zhao, Alexander Hjelmaas, Xianying Zeng, Huda Akil, Theodore J Standiford, Benjamin H Singer

S100A8/A9 Drives Neuroinflammatory Priming and Protects against Anxiety-like Behavior after Sepsis.

Journal of Immunology 2018 May 1;200(9):3188-3200

IF: **4.718**

V.

Annamária Fejes-Szabó, Eleonóra Spekker, Lilla Tar, Gábor Nagy-Grócz, Zsuzsanna Bohár, **Kludia Flóra Laborc**, László Vécsei, Árpád Párdutz

Chronic 17 β -estradiol pretreatment has pronociceptive effect on behavioral and morphological changes induced by orofacial formalin in ovariectomized rats.

Journal of Pain Research 2018 Sep 25;11:2011-2021

IF: **2.236**

VI.

Scott J Denstaedt, Joanna L Spencer-Segal, Michael Newstead, **Klaudia Laborc**, Xianying Zeng, Theodore J Standiford, Benjamin H Singer

Persistent Neuroinflammation and Brain Specific Immune Priming in A Novel Survival Model of Murine Pneumosepsis.

Shock 2020 Jul;54(1):78-86

IF: **3.454**

VII.

Joanna L. Spencer-Segal, Benjamin H. Singer, **Klaudia Laborc**, Khyati Somayaji, Stanley J. Watson, Theodore J. Standiford, Huda Akil

“Sepsis survivor mice exhibit a behavioral endocrine syndrome with ventral hippocampal dysfunction”

Psychoneuroendocrinology 2020 Jul;117:104679

IF: **4.732**

VIII.

Eleonóra Spekker, **Klaudia Flóra Laborc**, Zsuzsanna Bohár, Gábor Nagy-Grócz, Annamária Fejes-Szabó, Mónika Szűcs, László Vécsei, Árpád Párdutz

“Effect of dural inflammatory soup application on activation and sensitization markers in the caudal trigeminal nucleus of the rat and the modulatory effects of sumatriptan and kynurenic acid”

The Journal of Headache and Pain 2021 Mar 31;22(1):17.

IF: **8.592**

IX.

Swapnill Gavade, Qiang Wie, Colin Johnson, Savannah Kounelis-Wuillaume, **Klaudia Laborc**, Salisha Baranwal, Huda Akil, Joanna L. Spencer-Segal

Forebrain glucocorticoid receptor overexpression alters behavioral encoding of hippocampal CA1 pyramidal cells in mice

eNeuro 2022 Dec 9;9(6):ENEURO.0126-22.2022

IF: **4.363** (2021)

Teljes impakt faktor: 39.098

Összesített impakt faktor: 48.537

Rövidítések:

5-HT – szerotonin

AEA – anandamid

CB – kannabinoid receptor

CFA – Complete Freund adjuváns

CGRP – kalcitonin-gén relációs peptid

ECs – endokannabinoid rendszer

i.p. – intraperitoneális

IS – inflammatory soup / ”gyulladásos leves”

NOS – nitrogén-oxid szintáz

NTG – nitroglicerín

pERK – foszforilált extracelluláris signal-regulated protein kináz

SERT – szerotonin transzporter

SIF – szintetikus interstitialis folyadék

TG – ganglion trigeminale

TNC – nucleus trigeminalis caudalis

V/1 – nervus ophthalmicus

V/2 – nervus maxillaris

V/3 – nervus mandibularis

Bevezetés

A migrén az egyik leggyakoribb primer fejfájás betegség, a magyar populáció több mint 10%-át érinti. A rohamok kezelés nélkül 4-72 órán át tartó, jellemzően féloldali, lüktető jellegű fejfájást okoznak, amelyet hányinger, hányás, fény- és hangérzékenység kísérhet.

A betegség lényeges népegészségügyi problémát jelent, hatása jelentős mind az érintett betegekre, mind a társadalomra. A rohamok kifejezetten rontják az életminőséget, csökkentik a produktivitást, valamint az anyagi terhei a gazdaságra is kihatnak, a direkt és indirekt költségek nagyságrendjét Európában évente 50-111 milliárd Euróra becsülik.

Annak ellenére, hogy egyre több specifikusan a migrénre ható gyógyszer kerül a piacra, ezen terápiák hatékonysága csupán 60% körüli. Nagy az igény az újabb hatékonyabb kezelési módszerekre, de a pontos pathomechanizmus ismeretének hiánya visszaveti a potenciális új szerek kifejlesztését.

A betegség háttere még mindig nem teljesen tisztázott, de ismert, hogy a trigeminalis rendszer aktiválódása és szenzitizációja alapvető a fejfájások kialakulásában. A nervus trigeminus mindhárom ága érző rostokkal látja el a durát és az arcot, valamint rosthálózatot adnak az agyhártyák ereihez. Ezek vazodilatációja aktiválhatja az elsődleges érző idegsejteket a Gasser-dúcban (TG) és vazóaktív mediátorok felszabadulását eredményezheti, mint a kalcitonin génrelációs peptid (CGRP) és a substance-P. Ezek a neurotranszmitterek megnövelik a ganglion sejtek érzékenységét, melyet perifériás szenzitizációnak hívunk és a migrénes fejfájás lüktető jellegében nyilvánul meg. Az elsődleges érző neuronok tüzelése okozta folyamatos transzmitter-felszabadulás befolyásolja a másodlagos érző neuronok működését és centrális szenzitizációt hozhat létre a caudalis trigeminalis magban (TNC), ami allodyniahoz vezet, a nem fájdalmas ingerek fájdalmassá válnak.

A szerotonin (5-HT) monoamin neurotranszmitter, amely több élettani és kórélettani folyamatban vesz részt, szerepet játszik a fájdalomérzetben és a migrénben is. Lokalizációtól, receptortól és sejtípustól függően, mind pronociceptív és antinociceptív hatása is ismert. Perifériás idegsérülés vagy gyulladás esetén a 5-HT pronociceptív hatása jelentkezik, ami során ilyenkor képes aktiválni és szenzitizálni a nociceptorokat, míg a központi leszálló fájdalom szabályzó rendszerben csökkentheti és emelheti is a gerincvelői nocicepciót.

Régóta ismert, hogy a 5-HT kulcsfontosságú a migrén patomechanizmusában, a lebomlási terméke az 5-hidroxi-indolecetsav szintje emelkedett a migrénesek vizeletében roham során. Emellett egyre több megfigyelés szól amellett, hogy a roham kialakulásában az alacsonyabb 5-HT szint szerepet játszhat. Például a rezerpin, mely csökkenti a 5-HT szintet, képes rohamot provokálni. Egy másik tanulmány pedig kimutatta, hogy az alacsonyabb 5-HT szint magasabb c-Fos expresszióval jár duralis ingerlés után a patkány TNC területén.

Az agytörzs több területe is szerepet játszik a migrén kialakulásában, mint például a periaqueductalis szürkeállomány, a nyúltvelő rostralis ventromedialis magja és a nucleus raphe magnus. Ezen struktúrák aktiválódása növeli a gerincvelői 5-HT felszabadulást és csökkenti a fájdalomérzetet, melyet 5-HT antagonisták ki tudnak védeni. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a 5-HT komplex szerepet játszik a fájdalomérzésben és a migrén kialakulásában, azonban a pontos részletek még nem tisztázottak.

A szerotonin transzporter (SERT) a neurotranszmitter visszavétele révén szabályozza az extracelluláris és szinaptikus 5-HT szintet. Pozitron emissziós tomográfiával (PET) magasabb SERT expressziót találtak a migrénesek mesopontin régiójában az egészséges kontroll alanyokhoz képest, melynek az oka az eredendően magasabb szint vagy a normálistól eltérő 5-HT neurotranszmisszióra adott válasz lehet. Összességében a 5-HT hatása sokrétű a gyulladás és a fájdalomérzés kapcsán, de egyre több bizonyíték utal rá, hogy a neurotranszmitter szintjének változása szerepet játszik a migrén kialakulásában.

A c-Fos a korai-válaszgenek családjába tartozó fehérje, amely az idegrendszeri aktiváció egyik leggyakrabban használt markere: az idegsejtek depolarizációját követően pár percen belül megkezdődik az expressziója, szintjének vizsgálatával a fájdalom érzékelésben résztvevő pályák aktivációs mintázata is feltérképezhető. Bár széleskörben elterjedt a használata, fontos megjegyezni, hogy nem minden aktivált neuronnál lehet detektálni c-Fos immunpozitivitást, és más sejttípusok is expresszálhatják a proteint. Bár a c-Fos szint változásával kapcsolatban felmerült, hogy nem specifikus, de a protein expressziójának mérése széles körben elfogadott módszer az aktivációs mintázatok tanulmányozására és a specifikus pályák azonosítására. A kísérleti körülmények gondos kontrollálása ezért kulcsfontosságú lehet a technika alkalmazása során, amely így lehetőséget kínál a különböző hatások összehasonlítására és potenciális gyógyszerek tesztelésére állatmodellekben.

A migrén fejfájást már számos módon lehet modellezni, az egyik leghatékonyabb módszer a szisztémás nitroglicerin (NTG) használata. A NTG beadást követően szabadon diffundál membránokon keresztül és át tud jutni a vér-agy gáton is, rövid félideje ellenére felhalmozódik a lipofil szövetekben, így például az agyban is. A NTG egyik jól ismert mellékhatása, hogy először egy azonnali, tompa jellegű fejfájást okoz, ami a gyógyszer értágító hatásával függ össze. Ezt az azonnali fejfájást migrénes betegekben négy-hat óra elteltével egy migrénszerű roham követi. Feltételezik, hogy az azonnali fejfájás vasoaktív tulajdonságainak az eredménye, és a prodrom fázishoz hasonló tüneteket, valamint a hypothalamus és a periaqueductalis szürke állomány aktiválódását figyelték meg az NTG beadása után. Az NTG használata után fellépő késleltetett fejfájás eredete nem teljesen tisztázott, de egy PET-vizsgálat kimutatta az agytörzsi aktivációt ezen fejfájások során, hasonlóan a migrénhez. Ezen tulajdonsága miatt állatokban gyakran használják a szisztémás NTG-t a migrén modellezésére, ami rágsálókban arc területi hyperalgesiaként, fénykerülő magatartásként jelenik meg, a trigeminalis rendszer aktivációját és szenzitizációját mutatva. Emellett megemeli a különböző markerek, mint például a calcitonin-gén relációs peptid (CGRP) és substance-P szintjét is a vena jugularis externában, így feltételezhető, hogy gyulladásban szerepet játszó útvonalakat is aktiválhat, melyet kísérleti állatokban is megerősítettek. Acetilszalícilsav adása kivédte a neuronális NOS (nNOS) emelkedést patkányokban, mely arra utalhat, hogy a ciklooxygenáz útvonal is aktiválódik NTG adása után. Szintén állatkísérletekben kimutatták, hogy a NTG képes a trigeminalis rendszer aktiválására és szenzitizálására és több órás latenciával megemeli a c-fos expressziót a TNC-ben, mely időben egybeesik a NTG okozta migrén indulásával. Emellett több tanulmány igazolta, hogy hyperalgesiát és allodyniát is létrehoz rágsálókban.

Több vizsgálatban különböző kémiai anyagokat használnak a dura közvetlen ingerléséhez, mint pl. a kapszaicin, a Complete Freund Adjuváns (CFA), vagy az inflammatory soup (IS). A CFA-t, mely elölt Mycobacterium tuberculosis szuszpenziót tartalmaz, gyakran alkalmazzák kísérletes bőr és ízületi gyulladás vizsgálatára. Kísérleti állatokban a durára adva mind a CFA, mind az IS képes volt az interleukin-1 β mennyiségét megemelni a TG-ban, amely neurogén gyulladás jelenlétére utal. Az IS négy gyulladást közvetítő anyagot tartalmaz, 5-HT-t, bradykinint, prosztaglandin E₂-t és hisztamint. Magatartásvizsgálatokkal bizonyították, hogy az IS nemcsak aktiválja a másodlagos érző neuronokat, hanem szenzitizálja is azokat, erre utal, hogy csökkentette a von Frey filamentum stimulációját követő fájdalomküszöb értékét, az állatokban

allodynia volt kimutatható. Mind a migrén specifikus (pl. szumatriptan), mind a non szteroid gyulladásgátló gyógyszerek (pl. naproxen) képesek a hatás kivédésére, jelezve a modell validitását a gyógyszeresztelésben.

Összegezve, NTG-t vagy a dura kémiai ingerlését használva a kísérleti állatokban kimutatható a trigeminalis rendszer aktivációja és szenzitizációja, a migrénhez hasonlóan. Az állatkísérletek pontosan előre jelezték a migrénellenes gyógyszerek hatékonyságát, így a jövőbeli kezelési módszerek kifejlesztésében hasznosak lehetnek.

Az endokannabinoid rendszer (ECs) alapvető jelentőségű több élettani folyamatban, mint pl. az étvágy, anyagcsere, immunfunkciók, memória, alvás, hőmérséklet- és fájdalom szabályozásában. Az ECs ezeket a funkciókat a kannabinoid receptorok (CB) révén fejtik ki, elsősorban a CB1 és CB2-n keresztül, melyek különböző sejtekben más és más jelátviteli utakat aktiválnak. Az ECs kiemelt szerepet játszik a fájdalomérzés szabályozásában is, a kannabinoidok mind perifériásan, mind intrathecalisan adva csökkentik a hyperalgesiát és az allodyniát, valamint a nociceptorok tüzelési rátáját. Emellett azok az idegrendszeri struktúrák, melyek fontosak a fájdalomérzésben, mint pl. a gerincvelő hátsó szarva, vagy a TNC nagy mennyiségben tartalmaznak endokannabinoidokat és receptoraikat. Ezek közül az anandamid (AEA) hatása a CB1 és CB2 receptorok mellett a vanilloid 1 receptoron keresztül is kifejtetheti hatását.

Az ECs hatással van a szerotonerg rendszerre a perifériás és a központi idegrendszerben, ezen tulajdonsága hozzájárulhat a fájdalom moduláló képességéhez. A CB1 receptor agonista, arachidonoil-2-kloroetilamid, csökkentette a 5-HT koncentrációt a szérumban, mely hatást CB1 agonistával blokkolni lehetett, ami arra utal, hogy a kannabinoidok képesek a perifériás 5-HT szintet befolyásolni. Ezen túl a CB1 szelektív gátlása képes a szerotonerg sejtek tüzelését csökkenteni a raphe magban, ami arra utalhat, hogy az endokannabinoidok szabályozzák a szerotonerg sejtek tónusos aktivitását.

Irodalmi adatok alapján felmerült, hogy az ECs nem megfelelő működése szerepet játszhat több fájdalommal kapcsolatos kórképben, mint például a migrén, a fibromyalgia és az irritábilis bél szindróma. Ezt az elméletet támogatta, hogy migrénesekben magasabb a vérlemezkek zsírsavamid hidroláz aktivitása a gerincvelői folyadékban, mely gyorsabb AEA lebomlást eredményez a migrénesekben. Emellett csökkent AEA szintet mértek krónikus migrénesek liquorjában az

egészséges kontrollokhoz képest, és negatív korreláció mutatkozott a liquor AEA és CGRP valamint nitrát szint között ezekben az alanyokban. Állatkísérletekben az AEA csökkentette az NTG indukált c-fos expressziót a TNC-ben, mely szintén a trigeminalis nocicepcióban betöltött moduláló szerepére utal.

Célkitűzés

- I. Megvizsgálni a SERT expressziót a TNC-ban szisztémás NTG adását követően.
- II. Tanulmányozni az endokannabinoid AEA hatását a SERT expresszióra a migrén NTG modelljében.
- III. Valamint feltárni, hogy a dura mater felületén alkalmazott CFA és IS hogyan befolyásolja az aktivációs mintázatokat a TNC területén.

Anyagok és módszerek

A kísérleteket a Csongrád Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága (XI./352/2012; XI./1098/2018) és a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (I-74-12/2012; I-74-49/2017) engedélyezte. A kísérletek az Európai Közösség Tanácsának (86/609/ECC; 2010/63/EU) és a Nemzetközi Fájdalomkutató Egyesület ajánlásait követve kiviteleztek. Vizsgálatainkhoz felnőtt hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk, amiket standard laboratóriumi körülmények között tartottunk, 12-12 órás sötét-világos megvilágítási ciklusokkal, folyamatos, szabad hozzáférést biztosítva standard táphoz és vízhez.

I. SERT expresszió szisztémás NTG és AEA adását követően

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz 24 állatot négy csoportra osztottunk (n=6 csoportonként), míg 20 patkányt használtunk fel a Western blot mérésekhez (n=5 csoportonként). Az első csoport állatai intraperitoneálisan (i.p.) fiziológiás sóoldatot (placebo), míg a második csoport i.p. NTG injekciót (10 mg/kg, Pohl Boskamp, Hohenlocksted, Németország) kaptak. A harmadik csoportnak a fiziológiás sóoldaton és NTG-en kívül i.p. AEA-ot (5 mg/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adtunk 30 perccel a sóoldat és NTG kezelés előtt, valamint egy órával a kezelés után.

Immunhisztokémia

Az i.p. placebo vagy NTG injekciót követően négy óra elteltével az állatokat mély klorál-hidrát altatásban transzcardialisan perfundáltuk. A gerincvelő cervicalis szakaszának obextől számított -5 – -11 mm-es részét eltávolítottuk, majd posztfixációt és krioprotekciót követően 30 µm vastagságú transzverzális sorozatmetszeteket készítettünk. A metszetek SERT festése után Zeiss AxioImager M2 fénymikroszkóp (Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY, USA) 20×-os nagyítású objektívét használva mikrofényképeket készítettünk. A fényképeken a SERT immunoreaktív rostok által lefedett területet az Image Pro Plus 6.1 (Windows XP, Media Cybernetics Inc. Silver Spring, USA) szoftverrel mértük meg.

Western-blot

A Western-blot vizsgálatokhoz az állatokat fiziológiás sóoldattal perfundáltuk majd ezt követően a TNC-t tartalmazó gerincvelői szakaszt (obex +1– -5 mm) eltávolítottuk. A mintákat -20 fokon tároltuk felhasználásig, majd SERT és gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz Western-blot méréseket végeztünk.

II. Aktivációs mintázat a trigeminalis rendszerben a dura kémiai stimulációját követően

A második kísérletünkhöz összesen 48 felnőtt hím Sprague-Dawley patkányt használtunk, az állatokat tizenkét csoportra osztottuk. Két csoport állatait vagy klorál-hidrátos mély altatásban tartottunk (FRE), vagy mélyaltatásban sztereotaxiás állványban rögzítettük az állatok fejét (NAT). A 2PHYS/2CFA valamint a 4PHYS/4CFA csoportokban a craniotomiát követően fiziológiás sóoldatot vagy CFA oldatot alkalmaztunk a dura mater felületén. A LCFA/LPHYS csoport a 2CFA/2PHYS csoportnak megfelelő beavatkozáson esett át, azonban a koponya bőrbemetszését megelőzően lidocainnal érzéstelenítettük a bőrt. Kettő (FRE, NAT, 2PHYS/2CFA, LCFA/LPHYS) és négy óra elteltével (4PHYS/4CFA) az állatokat transzcardialisan perfundáltuk. A patkányok a 2SIF/2IS and 4SIF/4IS csoportokban az LPHYS/LCFA csoportokhoz hasonlóan végeztük a műtétet, de a PHYS és CFA kezelés helyett szintetikus interstitialis folyadékot (SIF) vagy gyulladáscsökkentő levest (inflammatory soup/IS) alkalmaztunk az agyhártya felületén, valamint az állatokat kettő és fél óra (SIF/2IS) valamint négy óra (4SIF/4IS) elteltével perfundáltuk. A c-Fos immunhisztokémiához a TNC-nak

megfelelő szegmenseket eltávolítottuk, és a korábbiakban részletezett módon metszeteket készítettünk. Az immunpozitív sejteket a hátsó szarv I és II lamináiban megszámláltuk a nervus trigeminalis szomatotopiás eloszlásának megfelelően (V/1 – nervus ophthalmicus, V/2 – nervus maxillaris, V/3 – nervus mandibularis). Nikon Optiphot-2 fénymikroszkóp 10×-es objektívét használva. Reprezentatív fényképeket a Zeiss AxioImager M2 fénymikroszkóp 20×-os nagyítású objektívével készítettünk.

Eredmények

I. SERT expresszió szisztémás NTG és AEA adását követően

Immunhisztokémia

A nyaki gerincvelő és TNC transzverzális metszeteit vizsgálva a SERT immunreaktív rostok mennyiségében nem találtunk különbséget a hátsó szarv felszíni rétegeiben sem a rostrocaudalis tengely mentén, sem pedig jobb és bal oldali hátsó szarvak között.

Szisztémás NTG kezelést követően a SERT immunpozitív rostok által lefedett terület nagysága szignifikánsan nőtt a fiziológiás sóoldattal kezelt placebo csoporthoz képest. I.p. adott AEA előkezelés szintén képes volt megemelni az immunreaktív rostok mennyiségét, míg a kombinált AEA+NTG kezelés esetén a placebo csoporthoz képest nem volt megfigyelhető szignifikáns expresszió változás.

Western-blot

A cervicalis gerincvelői szegmentumokból végzett Western-blot vizsgálat során látott expresszió változások megerősítették az immunhisztokémiai eredményeket. A NTG és az AEA kezelés önmagában képes volt a SERT protein (64 kDa) expressziót szignifikánsan megemelni a placebo csoporthoz képest a C1-C2 gerincvelői magasságban. A kombinált AEA+NTG kezelés kivédte ezt a hatást, a kontroll csoporthoz képest szignifikáns expresszió változás nem volt kimutatható négy óra elteltével.

II. Aktivációs mintázat a trigeminalis rendszerben a dura kémiai stimulációját követően

A c-Fos expressziót vizsgálva két óra elteltével elhanyagolható számú immunreaktív sejtet találtunk a TNC területén klorál-hidrát anesztéziában végzett perfúzió után, míg a sztereotaxiás

állványban történő rögzítés kifejezett bilaterális c-Fos aktivációt okozott a V/2 megfelelő területen a hátsó szarvban.

Dura mater felületén alkalmazott CFA kezelés a fiziológias sóoldathoz képest nem okozott eltérést a c-Fos immunpozitív sejtek számában sem kettő, sem négy óra elteltével. A trigeminalis ideg ágainak megfelelő szomatotopias eloszlást figyelembe véve kifejezett számú immunreaktív sejtet találtunk a V/2 területén, míg mérsékelt számú sejtet a V/1 által beidegzett régiókban. Lidocain a V/1 megfelelően csökkentette a c-Fos immunpozitív sejtek számát, azonban így sem láttunk különbséget a kontroll és CFA-val kezelt csoportok között.

A durán alkalmazott IS képes volt a TNC-ban szignifikánsan megemelni a c-Fos immunreaktív sejtek számát a SIF-kal kezelt csoporthoz képest. Ez a hatás kifejezettebben látszódott a V/1 területén, míg a V/2 mentén a NAT csoporthoz hasonló aktivációs mintázatot találtunk.

Megbeszélés

I. SERT expresszió szisztémás NTG és AEA adását követően

SERT egy monoamin transzporter, amely a 5-HT visszavételével szabályozza a transzmitter szinaptikus és extracellularis szintjét. 5-HT szintézis gátlása, ezzel a szintjének lecsökkenése erősebb fejfájás rohamokat okozott migrén betegekben, így feltételezhető, hogy a neurotranszmitter szintjét befolyásoló transzporter proteinek szerepe lehet a migrén pathomechanizmusában is. Kísérletünkben a NTG megnövelte a SERT immunreaktív rostok számát és expressziójának szintjét a TNC-nak megfelelő szegmentumokban. Korábbi kísérleti adatok alapján ismert, hogy intraperitonealisan adott NTG képes a TNC-ban megemelni a 5-HT immunreaktív rostok számát is, ami utalhat a csökkent 5-HT felszabadulásra a terminálisokból vagy a növekedett turnover-re. Korábban felvetették a nitrogén-oxid és szerotonerg rendszer kapcsolatának lehetőségét is, miután kimutatták a nNOS és SERT interakcióját, így felmerül a reciprok szabályozás lehetősége is.

AEA előkezelés a NTG-hez hasonlóan megemelte a SERT immunreaktív rostok mennyiségét és transzporter expressziót a TNC hátsó szarvában. Már korábbi eredmények is utaltak a kannabinoid és szerotonerg rendszer kapcsolatára, miután egy szelektív CB1 receptor agonista, arachidonil-2'-kloroetilamid, csökkentette a vérben a 5-HT szintet, ami kivédhető volt CB1 receptor antagonistával előkezeléssel. Míg a kannabinoidok perifériásan csökkentik a 5-HT

szintet, centrálisan, a leszálló fájdalomszabályzó rendszeren keresztül emelhetik a 5-HT felszabadulását és ezáltal hozzájárulhatnak a fájdalomcsillapító hatáshoz. Erre utal, hogy a gerincvelői szerotonerg pályák szelektív léziója csökkenti a kannabinoidok antinociceptív hatását. Emellett nem zárhatjuk ki, hogy az AEA NTG-hez hasonlóan a NO szint emelésén keresztül váltotta ki SERT expresszió növekedését, ugyanis az endokannabinoidok képesek a nNOS enzim aktivitásának befolyásolására is.

Ezzel ellentétben, amikor AEA kezelést alkalmaztunk az i.p. NTG injekció előtt és után, a SERT immunpozitív rostok száma és a SERT expresszió nem változott a kontrollhoz képest. Mivel mind az NTG, mind AEA növelte a transzporter expresszió szintjét, lehetséges, hogy a kombinált kezeléssel negatív visszacsatolós folyamatok aktiválódnak és ezért nem láttunk különbséget a két csoport között. Korábbi tanulmányunkban a NTG több szenitizációs marker szintjét is megemelte a TNC-ban, amit az AEA kezelés képes volt kivédeni. Ez alapján valószínűleg más mechanizmusok is szerepet játszhatnak a SERT expresszió szintjének szabályozásában, amely további kutatások tárgyát képezheti.

II. Aktivációs mintázat a trigeminalis rendszerben a dura kémiai stimulációját követően

C-Fos expresszió mérését széleskörben használják aktivációs mintázatok feltárására. Kísérleteinkben a dura kémiai stimulációjának és különböző kísérleti tényezőnek a hatását térképeztük fel a TNC-ban. Szisztémásan alkalmazott anesztetikumok közül az uretán közismerten képes a trigeminalis rendszert aktiválni, ezért fontosnak tartottuk megvizsgálni a klorál-hidrát altatás hatását. Az anesztézia és perfúzió (FRE csoport) nem okozott kifejezett aktivációt a TNC területén. Amikor az állatok fejét mély altatást követően sztereotaxiás állványba fogtuk be (NAT csoport), kifejezett és nagy variabilitást mutató c-Fos expressziót találtunk, amely főként a V/2 területére korlátozódott, míg a V/3 területén elhanyagolható számú immunpozitív sejtet találtunk. A sztereotaxiás állvány használata alapvető a craniotomia végzéséhez, az állat fejét három ponton rögzítettük. A V/2 területén kifejezetten megemelkedett c-Fos immunreaktív sejtek számát valószínűleg a felső metszőfogak rögzítése váltotta ki, amely a V/2-ből kap érző idegrostokat. A külső fül beidegzéséért főként a V/3 és a cervicalis gerincvelői idegek, valamint az Arnold ideg felelős, amely nervus vagus, nervus glossopharyngeus és nervus facialisból kap rostokat.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy dura materen alkalmazva CFA képes-e aktiválni a másodlagos trigeminalis neuronokat a TNC-ban. A CFA fiziológias sóoldathoz képest nem emelte meg a c-Fos immunreaktív sejtek számát a TNC-ben, sem két, sem pedig négy óra elteltével. Nem találtunk eltérést az immunpozitív sejtek számában akkor sem, amikor a műtétet megelőzően a fejtető területét lidocainnal elérsztelenítettük. CFA oldat elölt Mycobacteriumot tartalmaz ásványi olajban, amit gyakran használnak gyulladás indukálására különböző szövetekben. Korábban már kimutatták, hogy CFA alkalmazása a dura materen képes megemelni a foszforilált extracellularis protein kináz (pERK1/2), CGRP, interleukin-1 β szintjét az elsődleges trigeminalis neuronok szintjén. CFA pár órán belül aktivációt vált ki, de sok esetben maximális hatását csak 24-72 óra elteltével érte el. Ennek oka lehet, hogy a CFA olyan anyagokat is tartalmaz, amelyek a lebontását lassítják, növelve ezzel a hatástartamát. Ezen felül feltételezhető, hogy a CFA IV-es típusú vagy más néven késői típusú hyperszenzitivitási reakciót is elindíthat, ami egy T-sejt függő immunválasz, ezáltal kialakulása több időt vehet igénybe. Korábban felmerült, hogy a CFA ezen tulajdonsága alkalmassá teheti a fejfájás krónikussá válásának modellezésére. CFA, a temporomandibularis ízületbe injektálva elhúzódo gyulladást képes indukálni, amely különböző mediátorok, így például CGRP felszabadulásával jár, és következményeként egy önerősítő folyamat jön létre. Ez a kialakuló úgynevezett neurogén neuroinflammáció párhuzamba hozható a betegekben tapasztalt az ismételt migrén rohamokkal. Bár ezek a kísérletes adatok hosszabb túlélési idő alkalmazását sugallják, a CFA hosszútávon több súlyos mellékhatást, például bőr fekélyek kialakulását, helyi necrosist és granulomát vált ki, ezért kísérleteinket nem terjesztettük ki hosszabb túlélési időkre.

A migrén pathomechanizmusában szerepet játszhat a neurogén gyulladás, amely modellezhető az agyhártya kémiai stimulációjával. Erre használhatók az IS összetevői is, mint a prosztaglandin E₂, bradykinin, 5-HT és hisztamin is, amelyek képesek steril gyulladást létrehozni és ezáltal közvetlenül irritálni a dura matert. Kísérleteinkben az IS képes volt a kontrol SIF-hez képest szignifikánsan megemelni a c-Fos immunreaktív sejtek számát a TNC területén kettő és négy óra elteltével is, amely legkifejezettebb a V/1-nek megfelelő területen volt. Parietális dura mater beidegzéséért főként az ipsilaterális V/1 felelős, ennek megfelelően szignifikánsan több c-Fos immunoreaktív sejtet találtunk az IS stimulált jobb oldalon. Míg műtét által indukált c-Fos mintázatok már nem voltak megfigyelhetőek, az IS okozott aktiváció még jelen volt négy óra elteltével is, amely elhúzódo aktivációra és szenzitizációra utalhat.

Korábban már kimutatták, hogy IS a durán alkalmazva képes trigeminalis szenzitizáció kiváltására is, mely során a neuronok ingerküszöbe csökkent, receptív mezejük megnőtt. A szenzitizációra utaló viselkedés mintázatokat is leírtak, von Frey filamentummal stimulált állatokban allodynia volt kimutatható az arc és lábak területén. Ezek a változások körülbelül három óra elteltével tetőztek, és hat óra után oldódtak, ami alapján a kísérleteinkben látott elhúzódó aktiváció a IS-által kiváltott trigeminalis szenzitizációhoz köthető.

Következtetés

Összefoglalva, kísérleteink során a NTG és AEA megemelte a SERT expresszió szintjét a TNC-ban, ami kivédhető volt kombinált NTG+AEA kezeléssel. Ezek az eredmények arra utalhatnak, hogy NTG a trigeminalis rendszer aktivációja és szenzitizációja mellett képes a 5-HT rendszerre hatni, befolyásolja a neurotranszmitter metabolizmusát. Az endokannabinoid AEA valószínűleg a leszálló fájdalom szabályozó rendszer aktivációja vagy az emelkedett nNOS enzim aktivitás következményeként emeli a SERT expressziót. Az együttes NTG+AEA adása kivédte ezt a hatást, feltételezhetően negatív visszacsatolós mechanizmusok révén. Eredményeink megerősítik, hogy a szerotonerg és az endokannabinoid rendszer kapcsolatban lehet egymással, és a szerotonerg pályáknak szerepe lehet a kannabinoidok fájdalomcsillapító hatásában a trigeminalis rendszer területén.

Dura materen alkalmazott IS aktiválta a sejteket a TNC nervus ophthalmicusnak megfelelő területén. A műtéti beavatkozások nem-specifikus aktivációt hozhatnak létre, amelyek megfelelő műtéti előkészítés nélkül akár el is fedhetik a dura stimulációjából eredő változásokat. Eredményeink hangsúlyozzák a megfelelően kontrollált kísérletek fontosságát és megerősítik, hogy a dura mater kémiai stimulációja alkalmas a migrén modellezésére.

Összefoglalva, kísérletei eredményeink a 5-HT és endokannabinoid rendszer kapcsolatának és egy megbízható módszert ajánl a migrén modellezésére, ezáltal hozzájárulhatnak a migrénben szerepet játszó folyamatok megértéséhez.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Párdutz Árpádnak, hogy lehetőséget adott hogy a kutatócsoport munkájában részt vegyek. Őszintén köszönöm neki türelmét, támogatását a laborban töltött időm során és azon túl is.

Hálás vagyok Vécsei László Professor Úrnak és Klivényi Péter Professor Úrnak, hogy lehetőséget biztosítottak számomra a doktori programban és Neurológiai Klinikán folyó munkába való bekapcsolódásra.

Szeretnék köszönetet mondani minden közvetlen munkatársamnak a Neurológiai Klinikán: Dr. Bohár Zsuzsannának, Dr. Nagy-Grócz Gábornak, Dr. Fejes-Szabó Annamáriának, Dr. Spekker Eleonóranak, Vékonyné Széll Valériának és Lukács Erzsébetnek. Hálás vagyok mindazoknak, akik további tanulási lehetőséget biztosítottak számomra, különösen Dr. Joanna Spencer-Segalnak és Dr. Kathryn Hilde-nek. Végezetül, szeretném megköszönni a férjemnek, a családomnak és a barátaimnak, a kitartó támogatásukat ezen a hosszú, rögös úton.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Co-author certification

Alulírott Dr. Nagy-Grócz Gábor (felelős társszerző) kijelentem, hogy Dr. Laborc Klaudia Flóra (pályázó) PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - közösen publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

Szeged, 2022.04.23.
.....
dátum

Nagy-Gra
.....
szerző

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemények:

“Gábor Nagy-Grócz, Zsuzsanna Bohár, Annamária Fejes-Szabó, Klaudia F Laborc, Eleonóra Spekker, Lilla Tar, László Vécsei, Árpád Párdutz
Nitroglycerin increases serotonin transporter expression in rat spinal cord but anandamide modulated this effect
Journal of Chemical Neuroanatomy 2017 Nov;85:13-20