

**Gerincvelői mellső gyökér avulsiót túlélő cervikális  
motoneuronok beidegzési képességeinek növelése: a  
gerincvelő - plexus brachialis kapcsolat helyreállítása és a  
riluzol kezelés hatásai**

PhD tézis

Dr. Gloviczki Balázs



Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Anatómiai,  
Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Témavezető: Prof. Dr. Nógrádi Antal

Szeged 2019

## Bevezetés

Amennyiben egy motoneuron axonja a sejttestől távol sérül azt a motoneuron túléli, a sejttesthez közeli sérülések azonban a neuron pusztulását okozzák. A gerincvelő mellső gyökerének kitépése - avulziója - az érintett motoneuronok nagy többségének pusztulásával jár. Jelenleg az általános vélemény az, hogy mind a programozott sejthalál, mind a sejtnecrosis együttesen vesznek részt a motoneuronok pusztulásában, de a pontos mechanizmus még ismeretlen. Avulziót követően a patkány motoneuronjai első lépésben nekrotikus jellegű károsodásokat szenvednek, majd később apoptózis következik be. Axonkárosodást követően a motoneuronokban biokémiai kaszkád indul glutamát mediálta excitotoxikus reakciók révén.

A motoneuronok avulziót követő megmentése érdekében az utóbbi időben számos próbálkozás történt, többek között neurotropikus faktorokkal, progenitor és őssejt kezeléssel illetve riluzollal. A riluzol blokkolja a sejtmembrán  $\text{Na}^+$ , és  $\text{Ca}^{++}$  csatornáit, illetve aktiválja a  $\text{K}^+$  csatornáit, ezzel gátolva a preszinaptikus glutamát felszabadulást, csökkentve annak excitotoxikus hatását. A kitépelt gerincvelői gyök reimplantációja vagy perifériás ideg graft beültetése a gerincvelőbe nem csak növeli a motoneuronok túlélését, de segíti az axonregenerációt és a funkcionális felépülést is. A sérült motoneuron axonok behatolnak ebbe a vezetőcsatornába és végig növekedhetnek egészen akár az eredetileg beidegzett izomig. Az ideg graft azonban nem csak vezető csatornaként szolgál a növekedő axonvég számára, hanem az őt felépítő Schwann sejtek által különböző neurotropikus faktorokat (GDNF, BDNF és CNTF) is kibocsát. Ezek a faktorok egyszerre neurotropikus és neurotopikus hatással segítik a neuronok túlélését, és az axonok a központi idegrendszer gátló környezetén való áthatolását a beültetett idegbe.

A riluzol neuronokat védő hatását korábban többen igazolták. A riluzol még abban az esetben is protektív, ha a sérült neuronok axonjai nem tudnak regenerálódni a periféria felé.

## **Célkitűzések**

Jelen munka során meg kívántuk határozni

1. a cervikális gerinvelői gyök avulzióját követően károsodott motoneuronok túlélésének és különböző vezetőcsatornába történő regenerációjának feltételeit
2. az avulziót követően azon riluzollal kezelt motoneuronok számát, melyek célhoz vezető csatorna hiányában is hosszú távon túlélhetnek
3. azt, hogy avulziót követően egy vagy három hetes késést követő perifériás ideg graft - mint vezetőcsatorna - beültetése esetén a riluzollal megmentett C7 szegmentumban lévő motoneuronok képesek-e morfológiailag és funkcionálisan is sikeresen reinnerválni a plexus brachiálist és a denervált izmokat

## **Anyag és módszer**

### *Kísérletes avulzió és transzplantáció*

A kísérleti munkánkat 3 sorozatban végeztük. Az első kísérleti mintában az avulzió során sérült motoneuronok túlélését vizsgáltuk riluzol kezeléssel, illetve anélkül, azokban az esetekben amikor nem biztosítottunk a növekvő axonoknak vezetőcsatornát (1. és 2. csoport). A második mintában a növekvő axonoknak különböző vezetőcsatornát és célizmot biztosítottunk (3.-5. csoport), illetve riluzol kezelést is folytattunk (5.csoport). A harmadik kísérleti csoportban a riluzollal megmentett motoneuronok reinnervációs képességét vizsgáltuk különböző gerinvelő-plexus brachialis rekonnekciós modellek segítségével (6.-11. csoport).

Összesen 65 Sprague-Dawley patkányon végzett kísérletek eredményeit használtuk. A műtéteket mély altatásban (klorálhidráttal vagy ketamin-xilazin kombinációval) steril körülmények között végeztük. Laminektómiát végeztünk a C5-C7 szegmentumokban. A dura megnyitását követően a C7 dorzális gyököt átvágtuk, majd a ventrális gyököt kitéptük.

Első lépésként az első és a harmadik sorozatban 5-5 állatban meghatároztuk a C7-es szegmentumban elhelyezkedő motoneuronok számát a nervus spinalis ventralis ágának Fast Blue fluoreszcens festékkel történő retrográd jelölésével. Az 1. és 2. csoport állataiban a C7-es spinális ideg ventrális ágát átmetsztük és előjelöltük Fast Blue-val. Ezekben az állatokban az avulziót ezt követően három nappal végeztük el. A 2. csoport állatai riluzol kezelésben is részesültek. A 3. csoportban a kitépett ventralis gyököt visszaültettük a gerincvelő ventrolaterális állományába. A 4. csoport állataiban avulziót követően a C7-es szegmentum motoneuronjait egy nervus surális graft segítségével a spinocervicalis izomzattal kapcsoltuk össze. Az 5. csoport állatai a 3. csoportéval megegyező műtétet követően 3 hétig riluzol kezelésben részesültek. A 3.-5. csoportban a 12 hetes túlélési időszak végén a C7-es spinális ideg ramus ventralisát, illetve a beültetett nervus suralist Fast Blue-val jelöltük.

A 6.-11. csoport állataiban a mellső gyökér avulziót követően nervus peroneus communis graft segítségével kapcsoltuk össze a gerincvelőt a C7 spinális ideg ramus ventralisával (rekonnekció). A 6. és 7. csoportban a graft közvetlenül avulziót követően, a 8. és 9. csoportban 1 hét késést, a 10. és 11. csoportban pedig 3 hét késést követően került beültetésre. A 6., 8. és 10. csoport állatait 3 hétig kezeltük riluzollal.

#### *Riluzol kezelés*

Naponta kezeltük az állatokat 4mg/kg riluzollal egy héten keresztül majd kétnaponta további két héten át.

#### *Retrográd jelölés és immunhisztokémia*

A sebészeti beavatkozást követően három hónappal a 3.-5. illetve a 6.-11. csoport állataiban a C7 spinális ideg ramus ventralisát, illetve a beültetett ideggraftot átmetsztük és Fast Blue-val jelöltük. A 6. és 7. csoport két-két állatában a C7-es szegmentum által beidegzett izmokat 2 nappal ezt megelőzően Diamidino-Yellow retrográd fluoreszcens festékkel jelöltük. Az ideggraftok 2 mm-es szegmentumát eltávolítottuk és glutáraldehiddel fixáltuk.

Öt nappal a Fast Blue jelölést követően az állatokat 4%-os paraformaldehiddel transzkardiálisan perfundáltuk. A gerincvelő nyaki szakaszát eltávolítottuk, majd 25 µm-es metszeteket készítettünk kriosztát segítségével és a retrográdan jelölt sejteket megszámláltuk.

A 2.-11. csoportokból 3 gerincvelői mintán kolin acetiltranszferáz immunhisztokémiai vizsgálatot is végeztünk, illetve néhány metszetet krezil-ibolyával festettünk meg morfológiai vizsgálatok céljából

### *Funkcionális analízis*

A csuklóizület dorsalflexiójának és kontrakturájának mértékét vizsgáltuk illetve pellet reaching tesztet végeztünk.

## **Eredmények**

### *Az operált állatok mozgásmintáinak vizsgálata*

Azokban az állatokban amelyekben az avulziót nem követte egyéb beavatkozás vagy a beültetett ideggraft a spinális izmokhoz vezetett (1.,2. és 4. csoport) jelentős izomatrófia alakult ki a felső végtag extenzor izmaiban, illetve flexiós kontraktúra jött létre a csukló és lábizületekben. A riluzollal kezelt állatokban, ahol halasztottan végeztünk az idegbeültetést (9. és 11. csoport), az extensorok kifejezett atrófiáját és kisebb fokú flexiós kontrakturát észleltünk 6-7 héttel a műtéteket követően. Ezek az állatok a pellet reaching tesztben csak kis hatékonysággal voltak képesek a kísérleti tápot megragadni és nem tudták a csuklóizületet 30 foknál jobban dorzalflektálni. Azokban az állatokban, ahol a C7-es motoneuronokat azonnal összekötöttük a célizomzattal már 3 héttel a beavatkozást követően megindult a felépülés, mely néhány hétig tartott. A túlélési időszak végére csaknem normálisan tudtak járni és a különböző mozgások során teljes csukló dorzalflexiót használtak. A legjobb funkcionális eredményeket azonnali reimplatációt követő riluzol kezelés esetén találtuk (5. csoport).

### *Motoneuronok túlélése C7 mellső gyökér avulziót követően*

A C7-es gerincvelői retrográdan jelölt motoneuronok átlagos száma az első sorozatban  $875 \pm 20.7$  SEM, a harmadik sorozatban  $881 \pm 35$  SEM volt. Avulziót követően öt héttel a motoneuronok száma drámai mértékben csökkent,  $65 \pm 7.5$  SEM volt a túlélő neuronok száma. Azokban az esetekben amikor riluzol kezelést

alkalmaztunk a jelölt motoneuronok jelentős többsége túlélte az 5. hetet ( $637 \pm 25.5$  SEM).

*A sérült motoneuronok axonregenerációja reimplantált mellső gyökéren és perifériás idegen keresztül.*

Azokban az állatokban ahol avulziót követően azonnali mellső gyökér reimplantáció történt (3. csoport)  $211 \pm 14.8$  SEM retrográdan jelölt sejtet találtunk. Hasonló eredményhez ( $274 \pm 27.8$  SEM) jutottunk azoknál az eseteknél, ahol nervus suralis grafftal kötöttük össze a sérült gerincvelői szegmentumot a spinocervikális izmokkal (4.csoport). Nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között. Ezzel szemben szignifikánsan emelkedett a retrográdan jelölt túlélő motoneuronok száma, ha a reimplantációt 3 hetes riluzol kezelés követte ( $573 \pm 8.6$  SEM).

*A cervikális motoneuronok axonjainak regenerációja mellső gyökér avulzió és rekonnekció esetén*

Azokban az állatokban ahol azonnali rekonnekció és riluzol kezelés történt (6. csoport),  $548 \pm 18$  SEM retrográdan jelölt sejtet számoltunk. Riluzol alkalmazása nélkül (7. csoport) a jelölt motoneuronszám visszaesett ( $281 \pm 23$  SEM). Amennyiben a rekonnekciót egy hét késéssel végeztük az avulziót követően riluzol kezeléssel ismét magasabb számot kaptunk (8. csoport,  $395 \pm 16$  SEM) összehasonlítva a kontroll csoporttal (9. csoport,  $159 \pm 21$  SEM). Bár a túlélő sejtek száma valamivel alacsonyabb volt a 10. csoportban ( $369 \pm 17$  SEM), amikor a rekonnekciót 3 hét késéssel végeztük, mégsem volt szignifikáns különbség a 8.csoporttal (1 hét késés) összehasonlítva. Ezzel szemben szignifikánsan csökkent a motoneuronok száma, ha nem alkalmaztunk riluzol kezelést 3 hetes késést követő rekonnekció esetén (11.csoport,  $76 \pm 22$  SEM).

*Kolin acetiltransferáz (ChaT) kimutatása a sérülés után regenerálódó motoneuronokban*

Összehasonlítottuk a ChaT pozitív sejtek és a Fast Blue-val jelölt sejtek lokalizációját annak érdekében, hogy megtudjuk a túlélő motoneuronok (ChaT pozitív) mekkora hányada volt képes regenerációra (Fast Blue-val jelölt sejtek száma). A 3., 4. és 5. csoportnál jelentős együttes előfordulás volt megfigyelhető ( $83.8\% \pm 12.2$ ,  $88.3\% \pm 6.6$  és  $86.4\% \pm 4.2$  SEM). Ezzel szemben szignifikánsan magasabb volt a Fast Blue-t

tartalmazó túlélő motoneuronok száma avulsiót követően riluzol kezeléssel, de reimplantáció nélkül ( $96.1\% \pm 6.0$  SEM, 2. csoport).

A 6.-11. csoportokban szintén jelentős együttes előfordulást találtunk, bár volt néhány ChaT immunreaktív sejt, melyek nem jelölődtek retrográd festékekkel.

*Célizom reinnerváció: Fast Blue és Diamidino Yellow festékekkel duplán jelölt sejtek*

A kettős jelölés alkalmazása a 6. és 7. csoportokban azt mutatta, hogy a Fast Blue-val jelölt sejtek  $78.5 \pm 0.7\%$ , illetve  $79.5 \pm 0.4\%$  arányban voltak Diamidino Yellow pozitívak is, ami arra utal, hogy az ideggraftban a periféria felé növekedő axonok nagy többsége képes volt eljutni a célizmokig, reinnerválni azokat.

## **Megbeszélés**

A tanulmányban bizonyítottuk, hogy a gerincvelői gyök avulzióját követően pusztulásra ítélt motoneuronok megmenthetők. A károsodott neuronok sejthalála megelőzhető riluzollal akkor is, ha a kiszakított gyökér reimplantációjára nem kerül sor, reimplantáció esetén pedig a megmentett motoneuronok képesek axonregenerációra a reimplantált gyökéren keresztül.

Kísérleteink alapján kijelenthető, hogy a riluzollal kezelt motoneuronok képesek voltak szignifikáns reinnervációra, és - érdekes módon - riluzol kezeléssel jobb funkcionális és morfológiai eredmények érhetők el 3 hetes késéssel végzett rekonstrukció esetén is, mint riluzol nélküli, azonnali műtéti beavatkozással.

A mellső gyökér avulziót követően riluzollal megmentett motoneuronok egy beültetett ideggraft segítségével egy illetve három hét után is képesek sikeres morfológiai és funkcionális reinnervációra.

Tanulmányunk klinikai jelentősége, hogy a sérülés és a sikeres sebészeti beavatkozás között eltelt időablak kiszélesíthető, ha sikerül megfelelő számú és kapacitású motoneuron túlélését biztosítani, melyek a vezetőcsatornaként szolgáló beültetett ideggrafton keresztül reinnerválhatják a célizmokat. Bizonyítottuk, hogy a riluzol kezeléssel kombinált késleltetett idegbeültetés biztató új kezelési módszer lehet a plexus brachialis sérültek ellátásában, ahol különös jelentőséggel bír a sérülés és sebészi ellátás között eltelt - gyakran nem túl rövid - idő.

## **A tézis alapjául szolgáló közlemények**

I. Pintér S, Gloviczki B, Szabó A, Márton G, Nógrádi A. (2010). Increased survival and reinnervation of cervical motoneurons by riluzole after avulsion of the C7 ventral root. *Journal of Neurotrauma*, 27, 2273-2282. DOI: 10.1089/neu.2010.1445

IF:3.426

II. Gloviczki B, Török DG, Márton G, Gál L, Bodzay T, Pintér S, Nógrádi A. (2017). Delayed spinal cord – brachial plexus reconnection after C7 ventral root avulsion: The effect of reinnervating motoneurons rescued by Riluzole treatment. *Journal of Neurotrauma*, 34, 2364-2374. DOI: 10.1089/neu.2016.4754. Epub 2017 Jun 28.

IF:5.19



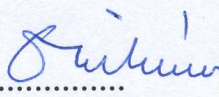
Co-author certification

## Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott Dr Pintér Sándor (felelős társszerző) kijelentem, hogy Dr Gloviczki Balázs (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.

2019.02.12

dátum



szerző

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemények:

Pintér S, Gloviczki B, Szabó A, Márton G, Nógrádi A. (2010). Increased survival and reinnervation of cervical motoneurons by riluzole after avulsion of the C7 ventral root. Journal of Neurotrauma, 27, 2273-2282.DOI:10.1089/neu.2010.1445