

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Élettani Intézet
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

**A NOCICEPTÍV FUNKCIÓK VISSZATÉRÉSE DENERVÁLT
BŐRBEN: LONGITUDINÁLIS VIZSGÁLATOK LÉZER
DOPPLER SZKENNER ÉS VASZKULÁRIS JELÖLŐDÉS
ALKALMAZÁSÁVAL**

A Ph.D. értekezés tézisei

Gyórfi-Lakatos Szandra

Témavezető:

Dr. Sántha Péter

Szeged

2023

PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

- I. Sántha P, **Lakatos Sz**, Horváth Á, Dux M, Jancsó G (2022) Perineural Capsaicin Treatment Inhibits Collateral Sprouting of Intact Cutaneous Nociceptive Afferents; Biomedicines (2227–9059): 10 (6) Paper 1326. 12. p., 2022,
doi: [10.3389/fphys.2020.00439](https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00439)
SJR Scopus - Medicine (miscellaneous): Q1
IF: 4,757

- II. **Lakatos Sz**; Jancsó G; Horváth Á; Dobos I; Sántha P (2020) Longitudinal Study of Functional Reinnervation of the Denervated Skin by Collateral Sprouting of Peptidergic Nociceptive Nerves Utilizing Laser Doppler Imaging; Frontiers in Physiology (1664–042X): 11 Paper 439. 10. p., 2020,
doi: [10.3390/biomedicines10061326](https://doi.org/10.3390/biomedicines10061326)
SJR Scopus - Physiology (medical): Q2
IF: 4,566

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények kumulatív impaktfaktora: **9,323**

BEVEZETÉS

A szomatoszenzoros rendszer feladata a szervezetet érő mechanikai, kémiai és hőingerek érzékelése és feldolgozása, ami elengedhetetlen a külső és a belső környezet változásaira adott azonnali válaszok kiváltásához és a hosszú távú alkalmazkodás kialakításához. A perifériáról a központi idegrendszer feldolgozó állomásai felé bonyolult neuronális hálózatok továbbítják a szenzoros információt. A szomatoszenzoros rendszer sérülései jellegzetes tünetekkel és funkcióvesztéssel járnak, ugyanakkor a rendszerre jellemző a nagyfokú plaszticitás is. A perifériás idegsérülés következtében megszakad a szenzoros bemenet, azonban a központi idegrendszeri kapcsolatok hosszú ideig megtartják válaszkészségüket. Az elsődleges érző neuron sikeres regenerálódásával és az érintett célszövet reinnervációjával helyreállhat az érző funkció. Ezért komoly törekvések irányulnak a perifériás szenzoros idegek regenerációs sajátosságainak tanulmányozására, hogy olyan módszereket találjanak, amelyek elősegítik a károsodott axonok növekedését és a denervált terület reinnervációját. Vizsgálataink célja a patkány hátsó lábának bőrét innerváló szenzoros idegek regenerációjának tanulmányozása idegátmetszést, illetve kapszaicinnal kiváltott szelektív kémiai denervációt követően. A kután szenzoros funkciók regenerációja többféle regeneratív mechanizmuson keresztül történhet. Kísérleteink során elsősorban a denervált területtel szomszédos bőrterületet innerváló intakt idegrostok denervált területre történő benövésén keresztül megvalósuló kollaterális reinnervációt vizsgáltuk. Az intakt kemoszenzitív elsődleges érző neuronok klasszikus szenzoros, afferens funkciójuk mellett szenzoros efferens funkcióval is rendelkeznek, mely két fő komponenst, neurogén plazmaextravazációt és szenzoros vazodilatációt magában foglaló neurogén gyulladási reakcióban nyilvánul meg. Ezeket a vaszkuláris reakciókat az idegvégződésekből kémiai vagy elektromos ingerlésre felszabaduló neuropeptidek, elsősorban a P-anyag (SP) és a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) közvetítik. Ezen neurogén vaszkuláris reakciók kiválthatósága a vizsgált bőrterületeket beidegző szenzoros idegek funkcionális integritását igazolja. Mivel a szenzoros idegek antidrómos ingerlésével kiváltott neurogén vazodilatáció kiterjedése pontosan megfelel a stimulált ideg innervációs területének, a kémiaileg indukált vazodilatáció lézer Doppler képalkotó (laser Doppler imaging, LDI) eljárással történő topografikus feltérképezése alkalmas módszer a bőr innervációs mintázatának és az érintett szenzoros idegek funkcionális integritásának tanulmányozására. Mivel a szenzoros efferens funkció a bőr denervációját követően teljesen kiesik, ezért a szenzoros neurogén vazodilatáció mérésével a bőr denervációjának mértéke és topográfiája, valamint a

szenzoros idegek funkcionális regenerációja is nyomon követhető. Ezen vizsgálati stratégiával lehetőség nyílik az idegsérülést követő degeneratív és regeneratív folyamatok direkt és objektív tanulmányozására összetett nociceptív reflexek vizsgálatán (állatkísérletek), illetve szubjektív szenzoros tesztelésen (humán vizsgálatok) alapuló módszerek alkalmazása nélkül. Jelen vizsgálataink során a kémiai kiváltott neurogén vazodilatációs válasz időbeni lefutását és térbeli eloszlását tanulmányoztuk a bőr vérátáramlásában bekövetkező változások LDI-vel történő leképezésének segítségével a patkány hátsó lábát beidegző perifériás szenzoros idegek szelektív kémiai, illetve mechanikai károsodását követően. Vizsgálataink célja volt továbbá az LDI, egy non-invazív vizsgálati módszer alkalmazhatóságának értékelése és validálása a kután nociceptív idegek funkcionális regenerációjának longitudinális vizsgálata szempontjából.

CÉLKITŰZÉS

Jelen vizsgálataink fő célja a denervált bőrben zajló funkcionális reinnervációs mechanizmusok vizsgálata lézer Doppler képalkotó technika és vaszkuláris jelölődés jelensége alkalmazásával, mely módszereket alkalmasak tekintettünk a reinnerváció folyamatának longitudinális nyomon követésére. Vizsgálataink célkitűzései a következők:

1. A lézer Doppler képalkotó technika (LDI), mint non-invazív módszer értékelése és validálása a kután peptiderg nociceptív afferens idegek funkcionalitásának longitudinális vizsgálata szempontjából.
2. Annak vizsgálata, hogy a lézer Doppler képalkotó technika alkalmazható-e a denervált bőr peptiderg nociceptív afferens idegek által történő funkcionális reinnervációjának követésére.
3. A denervált bőr peptiderg nociceptív afferens idegek általi funkcionális reinnervációjának vizsgálata lézer Doppler képalkotó módszer és vaszkuláris jelölés segítségével a perifériás idegek perineurális kapszaicin kezelését követően.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok és műtéti beavatkozások

Kísérleteinket az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács engedélyével végeztük a 40/2013 (II. 14.) számú kormányrendeletnek megfelelően. Az állatok szenvedését a lehető legnagyobb mértékben csökkentettük, a kísérletbe bevont állatok számát pedig a lehető legalacsonyabban tartottuk.

Kísérleteinket felnőtt hím, a kísérletek kezdetén 250–280 g súlyú Wistar patkányokkal ($n = 34$) végeztük. A sebészi beavatkozások altatásban történtek, melyhez az állatok ketamin (Calypsol, 70 mg/kg, Richter Gedeon, Budapest) és xilazin (CP-Xylazin 2%, 10 mg/kg, Produlab Pharma, Raamsdonksveer, Hollandia) kombinációját intraperitoneális injekció formájában kapták. Az állatokat véletlenszerűen két csoportba osztottuk, az egyik csoport perifériás idegátmetszésen, a másik csoport pedig perineurális kapszaicin kezeléssel esett át két kísérleti elrendezés szerint. A műtéteket követően és az egyes LDI mérések között az állatokat az állatházban tartottuk.

1. kísérleti elrendezés:

Az állatok 5 hét különbséggel két műtéten estek át. Az első alkalommal a jobb saphenus ideget feltártuk, lekötöttük, majd a lekötéstől disztálisan átmetsztük. Az idegek regeneratív újraegyesülésének megakadályozása érdekében a disztális idegcsonkból egy körülbelül 0,5 cm-es darabot eltávolítottunk. A saphenus ideg átmetszése után 40 nappal egy második műtétet is végeztünk. Ekkor a jobb ischiadicus ideget feltártuk és perineurálisan kapszaicinnal kezeltük, mely során az ideg köré egy 0,1 ml 1%-os kapszaicin oldattal (Sigma, Saint Louis, USA; 6% etanol és 8% Tween 80-at tartalmazó sóoldatban feloldva) átítatott zselatinhabot (Gelaspon®) helyeztünk.

2. kísérleti elrendezés:

Az első műtét során a jobb oldali saphenus ideg feltárását követően az ideget kémiaiilag denerváltuk 1%-os kapszaicin oldattal történő perineurális kapszaicin kezeléssel. A második műtetre ezt követően 7 héttel került sor. Ekkor az előzőleg kemodenerált ideget átmetsztük és lekötöttük a fentiekben már részletezett módon.

2. A bőr vérátáramlásának mérése lézer Doppler áramlásméréssel

A patkány hátsó láb lábhátbőrének vérátáramlását PeriScan PIM3 típusú lézer Doppler áramlásmérővel (Perimed, Järfälla, Svédország) mértük perfúziós sorozatfelvételek készítésével. Az LDI mérésekhez az állatokat ketamin–xilazin kombinációjának intraperitoneális injekciójával elaltattuk, majd melegítőpadra fektettük, így biztosítva a relatív

állandó testhőmérsékletüket ($37 \pm 0,5$ °C). Mindkét lábát bőrének szkennelése ismétlődő szkennelés módban, 52×42 pixel méretű területen történt, a szkennelés és a bőrfelszín távolsága 19 cm volt, a lézernyaláb a bőrfelszínre merőleges szögben érkezett.

A hátsó lábak dorzális bőrfelszíni perfúzióját 2 percenként mértük, az egyes állatok esetén a mérések 15–20 percig tartottak. A bőr bazális perfúzióját a stimulációt megelőzően, majd közvetlenül a lábát bőr 5%-os mustárolajjal (paraffinban oldva) történő epikután ecsetelését követően mértük.

A bőr perfúzió értékeit az átlag \pm S.E.M értékkel fejeztük ki. A szövet bazális perfúzióját és a vérátáramlásban a mustárolaj hatására bekövetkező változásokat származtatott („arbitrary”) perfúziós egységben (PE) regisztráltuk és a kiindulási értékhez viszonyított százalékos változásban fejeztük ki. A kiindulási értékeket a mustárolaj-ecsetelést megelőzően regisztrált három egymást követő mérés átlagából nyertük. A kvantitatív kiértékeléshez a maximális vazodilatációs választ mutató felvételeket használtuk minden egyes mérés során.

A lézer Doppler áramlásméréseket az egyes műtéteket megelőzően, majd azokat követően, az utánkövetési időszakban ismétlődően végeztük.

3. A bőr denervációjának és reinnervációjának a stimulált bőrterületekről készített LDI perfúziós képek alapján végzett kvantitatív értékelése

A saphenus ideg innervációs területének meghatározása a saphenus átmetszését vagy perineurális kapszaicin kezelését követő 4. napon készített perfúziós felvételek alapján történt. Az egyes kísérletek során kiválasztottuk a maximális vazodilatációs választ mutató színekódolt perfúziós képeket, amelyeket az ImagePro 6.2 képelemző szoftver (MediaCybernetics, Rockville, MD, USA) segítségével elemeztünk tovább. A funkcionális reinnerváció értékeléséhez a saphenus és ischiadicus idegek innervációs területein mért vazodilatációs válasz intenzitásában bekövetkező változásokat mértük. A maximális vazodilatáció pillanatában nyert színekódolt perfúziós képek segítségével megállapítottuk az innervált és denervált területek arányát. A háttér értékek kivonásához az összes pixel intenzitásértékét a maximális válasz 90. percentilisére normalizáltuk, majd a perfúziós képek intenzitás-szegmentálásával szétválasztottuk a nagy (vagy maximális) perfúzió emelkedést mutató területeket a perfúzió emelkedést nem, vagy csak minimálisan mutató területektől. A szegmentáláshoz az egyes képekhez külön-külön rendeltünk küszöbértéket a laterális (intakt) oldalhoz tartozó értékek 20. percentilisének kiszámításával. Az intakt oldal 20. percentilisénel alacsonyabb intenzitás értéket mutató pixeleket a denervált területhez tartozónak tekintettük. Ezt a lépést egy bináris

maszk létrehozása követte, amely a saphenus ideg innervációs területének megfelelő denervált bőrterület méretét és topográfiáját reprezentálta. A funkcionális reinnerváció jellemzése a vazodilatációs válasz intenzitásának mérésével történt a fentiekben ismertetett módszerrel meghatározott saphenus innervációs területen.

4. A bőr szenzoros innervációjának immunhisztokémiai vizsgálata

A 4%-os paraformaldehiddel (0,1 M-os foszfátpufferben, pH 7,4) történő transzkardiális perfúziót követően leválasztottuk a hátsó láb dorzális felszínének bőrét, melyet ezt követően 2 órán keresztül utófixáltuk. A 4%-os paraformaldehidben utófixált szövetet 30%-os foszfátpufferelt cukoroldatba helyeztük krioprotektív céllal. Kriosztát segítségével a dorzális bőrpreparátumból 20 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A zselatinnal bevont tárgylemezre felvett metszeteket foszfátpufferrel (PBS) kétszer átmostuk, majd egy éjszakán át az elsődleges antitesteket tartalmazó, 1% Triton X100 tartalmú oldatban inkubáltuk. Az idegrostok általános jelölésére β -tubulin III ellenes antitestet (egér monoklonális antitest, 1:500 hígítás, Sigma-Aldrich GmbH, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok), a peptiderg rostok jelölésére pedig CGRP ellenes antitestet (nyúl poliklonális antitest, 1:4500 hígítás, Sigma-Aldrich GmbH, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok) alkalmaztunk elsődleges antitestként. Az inkubációt követően PBS-sel kétszer átöblítettük a metszeteket, majd a másodlagos antitesteket (szamár anti-nyúl és anti-egér antitestek CY3-mal és DL488-cal jelölve, 1:500, PBS-ben hígítva, Triton X100 hozzáadásával) tartalmazó oldattal inkubáltunk 2 órán át. Az inkubációs idő leteltekor a metszeteket PBS-sel öblítettük, majd a tárgylemezeket DAPI-t tartalmazó ProLong Gold fedőanyaggal fedtük (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok).

A metszetek vizsgálatát Zeiss konfokális fluoreszcens mikroszkóppal végeztük, mellyel Z-stack felvételeket készítettünk tile scan módban.

5. A neurogén plazmaextravazáció és vaszkuláris permeabilitás változásainak vizualizációja vaszkuláris jelölődés módszerével

Ahhoz, hogy pontos képet kapjunk a permeabilitás fokozódás morfológiai eloszlásáról a denervált és intakt innervációjú területeken, vaszkuláris jelölődés módszerét alkalmaztuk. Kolloidális ezüst 1%-os oldatát (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, 50 mg/kg) intravénásan a farokvénába fecskendeztük, miközben a hátsó lábak dorzális bőrfelszínét 5%-os mustárolajjal ecseteltük. Az intakt innervációjú, fokozott vaszkuláris permeabilitást mutató

bőrterületek barnás elszíneződése jelentkezett, míg a denervált területeken ez a reakció nem mutatkozott. További elemzés céljából fényképeket készítettünk, melyek felhasználásával az ImagePro szoftver segítségével meghatároztuk a denervált–innervált területek arányát. A vaszkuláris jelölődést követően a hosszú túlélést vizsgáló csoportban 2 héttel később, a rövid túlélést vizsgáló csoportban pedig 30 perccel később az állatokat feláldoztuk és transzkardiálisan 4% paraformaldehiddel perfundáltuk. A hátsó lábak dorzális bőrét eltávolítottuk, melyekből kisebb darabokat kimetszettünk, és metanolos fixálást, valamint xilolos átderítést követően Canada-balzsammal fedtük fénymikroszkópos vizsgálatok céljából. Ezen kívül, egy kísérleti csoport (n = 3) esetében 1% kolloidális ezüst jelöléses sorozatot készítettünk, mellyel a két bőrideg innervációs területeiben bekövetkező változásokat kívántuk hosszabb távon nyomon követni.

6. Statisztika

Az adatok 5–9 független mérés átlagát \pm S.E.M. mutatják. A mustárolajjal kiváltott vazodilatációs válaszok statisztikai összehasonlításához egyutas ANOVA tesztet futtattunk, illetve Dunett post-hoc analízist vagy Fisher-féle egzakt tesztet a többszörös összehasonlításokhoz. Mindegyik kísérleti csoport esetében a normalitást Shapiro-Wilk teszttel, a varianciák homogenitását pedig Levene teszttel igazoltuk az ANOVA tesztek futtatása előtt. A statisztikai analízist a Statistica 6.4 szoftverrel végeztük (Dell Inc., Tulsa, Oklahoma, USA.).

EREDMÉNYEK

1. A mustárolajjal kiváltott vaszkuláris reakciók jellemzői

A hátsó láb dorzális bőrfelületének perfúziós mintázata egységesnek bizonyult a lézer Doppler perfúziós képalkotó módszerrel történő mérés során. A hátsó lábak bazális perfúzióját reprezentáló, egymást követően rögzített perfúziós képekhez tartozó bazális perfúziós értékek variációs koefficiense $0,043 \pm 0,28$ (mediális terület) és $0,054 \pm 0,027$ (laterális terület), a két oldal között pedig nem volt szignifikáns különbség ($p = 0,19$). Az 5%-os mustárolaj epikután alkalmazása az intakt hátsó láb lábhat bőrén szignifikáns, azonnali vazodilatációs választ eredményezett, mely a teljes lábhat bőrön megfigyelhető volt, és a válasz 2–4 percen belül érte el a maximumát. A bőr kiindulási perfúziója a vazodilatációs válasz kezdete után 15–20 percen belül tért vissza. Az applikáció területén a perfúzió fokozódás maximuma 80–85%-nak adódott,

és a mediális–laterális oldal között nem volt különbség. A vazodilatációs válasz ismételtően kiváltható volt, a reakció hasonló perfúziós mintázatot eredményezett, bár alacsonyabb maximális változásokkal.

2. Az idegátmetzés és a kapszaicin-indukált szelektív kemodenerváció hatása a mustárolajjal kiváltott vazodilatációs válaszra

Nem figyeltünk meg különbséget a láb hát denervált (saphenus) és intakt (ischadicus) területein mért bazális vérátáramlásban. A mustárolajjal kiváltott vazodilatációs válasz nagysága azonban szignifikánsan csökkent a mediális, denervált területen 3 nappal a saphenus ideg sértését követően, összehasonlítva a laterális, intakt ischiadicus területen mért vazodilatációs reakcióval. Ez a csökkent reakció mind a saphenus ideg átmetzését, mind pedig szelektív kemodenervációját követően megfigyelhető volt. Mindkét kezelés eredményeképp a laterális, intakt oldalon 80–100%-os relatív perfúzió emelkedés jelentkezett. Ezzel ellentétben, a saphenus ideg átmetzését követően a mediális, teljes denerváción átesett területen jelentős különbség mutatkozott, a vazodilatációs válasz során a relatív perfúzió emelkedés maximuma mindössze $32 \pm 4\%$ volt. Hasonló mértékű változást figyeltünk meg a saphenus ideg perineurális kapszaicin kezelése után is, ebben az esetben szintén jelentős mértékben csökkent a mustárolajjal kiváltott vazodilatációs válasz ($39,03 \pm 16,38\%$) az intakt, laterális oldalhoz viszonyítva. A kezelt állatok laterális, intakt bőrterületein a vazodilatációs válasz időbeni lefutása hasonlóan bizonyult a kontroll csoportban megfigyeltekhez. Eredményeink azt mutatják, hogy mind az idegátmetzés, mind a perineurális kapszaicin kezelés a szenzoros neurogén vazodilatációs válasz szignifikáns csökkenését okozza a denervált, mediális bőrterületeken az akut, posztoperatív fázisban, ami a patkány hátsó lábának mediális bőrterületeit innerváló peptiderg afferens idegek vazodilatátoros efferens funkciójának károsodására utal.

3. A denervált bőr idegátmetzést követő reinnervációja

Az átmetzést követően a mustárolajjal kiváltott vazodilatációs válasz fokozatos visszatérését figyeltük meg, mely visszatérés kezdetben, az idegátmetzést követően 20 nappal az ischiadicus ideg innervációs területét közvetlenül határoló, az eredetileg a saphenus ideghez tartozó innervációs területen jelentkezett. A mustárolajjal kiváltott vazodilatációs választ mutató terület fokozatosan kiterjedt a mediális területek felé, és a vazodilatációs válasz topográfiája körülbelül 4 hét elteltével érte el a denervációt megelőző állapotot. Ezzel párhuzamosan, a mustárolajjal indukált vazodilatáció maximális értékei a mediális és a laterális területeken folyamatosan

közelítettek egymáshoz, végül pedig megegyező mértékű választ lehetett kiváltani. Feltételeztük, hogy a hátsó láb mediális területét reinnerváló idegrostok a szomszédos ischiadicus idegből származnak. Ennek igazolására az ischiadicus idegben futó kemoszenzitív afferenseket lokális, perineurális kapszaicin kezeléssel defunkcionalizáltuk. Ez a kezelés a szenzoros neurogén vazodilatátoros válasz kiesését eredményezte 3–4 nappal a kapszaicin kezelést követően nem csak az ischiadicus ideg eredeti innervációs területén, hanem az eredetileg a saphenus ideg által ellátott mediális területeken is. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a vazodilatációs válasz visszatéréséért valóban az ischiadicus afferensek felelősek kollaterális sarjadzás révén.

4. A kemodenervált bőr reinnervációja kollaterális sarjadzás révén csak a kapszaicinnal kezelt ideg átmetszését követően történik meg

A perineurális kapszaicin kezelést követően a 7 hetes utánkövetés alatt a neurogén vazodilatációs válasz visszatérésére utaló jelet nem tapasztaltunk. Ezen utánkövetési periódus során a laterális, intakt területen mért maximális perfúziós változások szignifikánsan magasabbak voltak, mint a mediális területen mért változások. A perineurális kapszaicin kezelést követően a denervált bőrterület aránya nem mutatott szignifikáns változást a hosszú túlélésű csoportban, ami arra utal, hogy a vazodilatációs reakciók tartós csökkenésének hátterében degeneratív folyamatok állhatnak. A feltételezésünk szerint a kapszaicinnal kezelt idegben futó, a kapszaicin kezeléssel nem érintett, épen maradt idegrostok akadályozhatják a szomszédos intakt ischiadicus ideg afferens rostjainak kollaterális benövését a részlegesen denervált bőrterületekre. Ennek igazolására a perineurális kapszaicin kezelést követő 7. héten átmetszettük a korábban kapszaicinnal kezelt jobb saphenus ideget, és vizsgáltuk az ezt követően kiváltott vazodilatációs reakciók alakulását. A perfúziós képek értékelése rámutatott arra, hogy 2–4 héttel a korábban kapszaicinnal kezelt saphenus ideg átmetszését követően a denervált bőrterületek aránya fokozatosan csökkent, míg a kemodenervált, majd átmetszett ideg területén a reinnervált bőrterület aránya fokozatosan nőtt, és 4 héttel később érte el a maximumát, a körülbelül 40%-os arányt. A kollaterális reinnervációs folyamat elméletének további alátámasztása céljából perineurálisan kapszaicinnal kezeltük az ischiadicus ideget, ami a már helyreállt vazodilatációs válasz elvesztését eredményezte a kapszaicinnal kezelt saphenus ideg területén.

Az LDI eredmények megerősítése céljából alkalmaztuk a mustárolajjal kiváltott vaszkuláris jelölődés módszerét, és sorozatmérésekben értékeltük a jelölődési mintázat topográfiai eloszlását. A kolloidális ezüst intravénás injektálását követően a bőrfelszín mustárolajjal

ecseteltük. A neurogén gyulladás következtében fokozottan permeábilissá vált kiserek (főleg venulák) falában lerakódó ezüstszemcsék jól detektálhatók mikroszkópos képen, és megfigyelhető a bőr elszíneződése szabad szemmel is. Ez a vaszkuláris jelölés megfigyelhető az intakt szenzoros innervációval rendelkező bőrterületeken, míg hiányzik a denervált területeken. A vaszkuláris jelöléssel nyert eredményeink összhangban voltak az LDI mérésekkel kapott eredményekkel. A saphenus ideg perineurális kapszaicin kezelését, majd átmetszését követően fényképsorozatot készítettünk különböző időpontokban, hogy vizuálisan is követhessük a denervált bőrterület méretének és topográfiájának időbeni alakulását és a korábban denervált bőrterületeken a vaszkuláris jelölődés fokozatos helyreállítását. A kvantitatív adatok a kemodenervált bőr jelentős reinnervációját igazolták a kapszaicinnal kezelt saphenus ideg átmetszését követően.

5. A kután idegek degenerációjának és regenerációjának immunhisztokémiai vizsgálata perifériás idegsérülést követően

Az epidermiszt, szőrtüszőket és a bőr kis véreireit innerváló idegrostok vizsgálatára alkalmas a tubulin III és CGRP immunhisztokémiai kimutatása. A tubulin III mint általános marker, a perifériás szöveteket beidegző minden idegrost típusban kimutatható. Ezzel szemben a CGRP a peptiderg afferens idegek specifikus markerének tekinthető. Az intakt innervációjú bőrterületek dermális és hipodermális rétegeiben a tubulin- és/vagy CGRP-immunreaktív rostok vagy rostkötegek gazdag hálózata figyelhető meg. Az epidermiszben tubulin-immunreaktivitást mutató egyedi idegrostok szintén nagy számban vannak jelen, de ezen rostoknak csupán csak egy része CGRP-pozitív.

A saphenus ideg átmetszését követően 4 nappal drasztikusan csökkent a tubulin és a CGRP pozitivitást mutató idegrostok száma a láb hát bőr mediális oldalán a saphenus innervációs területének megfelelően. Az intakt ischiadicus ideg innervációs területének immunhisztokémiai vizsgálata a kontrollhoz hasonló eredményt mutatott. A reinnerváció első hisztológiai jelei 14 nappal a saphenus ideg átmetszését követően mutatkoztak; a szubepidermális területen néhány ezüsttel jelölt eret, valamint az epidermális és szubepidermális rétegekben kevés tubulin- és CGRP-immunpozitív idegrost megjelenését figyeltük meg a korábban denervált bőrterületeken. A részlegesen helyreállt innerváció az ischiadicus ideg perineurális kapszaicin kezelése után teljesen eltűnt a kísérletsorozat végén, ami alátámasztja a funkcionális vizsgálatok eredményeit és megerősíti a kollaterális sarjadzás elméletét.

Az idegátmetszéstől eltérően, a perineurális kapszaicin kezeléssel végzett szelektív kemodenerváció nem okozza a dermális és hipodermális idegrostok teljes eltűnését. Négy nappal a kezelést követően az intraepidermális rostok nagy része, valamint a bőr minden rétegében a CGRP pozitív idegrostok mennyisége drasztikusan lecsökkent. Az idegátmetszéssel ellentétben, ezek a változások fennmaradtak, sem az intraepidermális rostok sűrűsége, sem a CGRP-immunreaktivitás nem állt helyre a 7 hetes utánkövetési periódus alatt. Az utánkövetési időszak végén a kapszaicinnal kezelt saphenus ideget átmetszettük és lekötöttük, mely kezelés után 2 héttel az intraepidermális rostok, néhány CGRP-pozitív rost, valamint kolloid ezüsttel jelölt vérerek is megfigyelhetők voltak a saphenus ideg innervációs területén. A CGRP-immunreaktivitás és a vaszkuláris jelölődés visszatérését nem okozhatta a saphenus ideg regenerációja annak lekötése miatt, ezért a reinnervációért valószínűleg a szomszédos intakt területekről benövő kollaterálisok felelősek. A vaszkuláris jelölődés visszatérése emellett a korábban denervált bőrterületek nem csak morfológiai, de funkcionális regenerációjára is utal.

MEGBESZÉLÉS

A bőr beidegzésének funkcionális állapotáról szerzett információ mind klinikai, mind kísérletes szempontból alapvető jelentőséggel bír a szenzoros idegeket érintő degeneratív és regeneratív folyamatok tanulmányozása, valamint a perifériás idegrendszeret érintő betegségek progressziójának megítélése tekintetében. A specifikus szenzoros modalitások, mint a tapintás, vibráció, hideg, meleg, viszketés és fájdalom érzékelésében szerepet játszó, a bőrt ellátó szenzoros idegek funkciójának vizsgálatára többféle módszer rendelkezésre áll, melyek bár alkalmasak a bőr szenzoros funkcióinak, valamint kísérletes idegsértések után az érintett ideg innervációs mintázatában bekövetkezett változások vizsgálatára, azonban ezen technikák pontossága és objektivitása elmarad a kívánttól. Ezen technikai nehézségek még inkább kiütököznek longitudinális vizsgálatok esetén.

Laboratóriumunkban végzett korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a bőrben kiváltott neurogén gyulladáshoz válasz vizualizációja alkalmas a peptiderg kután nociceptor populáció funkciójának és térbeli eloszlásának objektív tanulmányozására. Denervált bőrben nem váltható ki mustárolajjal neurogén plazmaextravazáció, ezért az innervált és denervált bőrterületek egyértelműen meghatározhatók a bőrterületek Evans-kék jelölődésének vizsgálatával. Hasonló módon a bőrfelület mustárolaj-ecsetelését követően fokozott vaszkuláris permeabilitást mutató

kiserek (venulák) térbeli eloszlásának vizualizálását teszi lehetővé a vaszkuláris jelölés technika is. A nociceptív idegek mustárolajjal történő ingerlésének következtében ezüstkolloid akkumulálódik a permeábilis vérerek falában, amelyek ezáltal fénymikroszkóp alatt vizsgálva könnyen láthatóvá válnak az átderített szövetpreparátumokon. A módszer alkalmazásával a bőr innervált területei a bőr barnás elszíneződésének köszönhetően szabad szemmel is jól láthatók.

A jelen Tézisben ismertett kísérletekben egy új megközelítést alkalmaztunk a patkány hátsó lábának bőrét ellátó idegek innervációs területeinek kimutatására, mely a mustárolajjal kiváltott szenzoros neurogén vazodilatáció non-invazív LDI technikával történő vizsgálatán alapul. Ezeket a funkcionális vizsgálatokat a mustárolajjal kiváltott vaszkuláris jelölődés meglétével vagy annak hiányával azonosított bőrterületekhez futó peptiderg idegek immunhisztokémiai kimutatásával kombináltuk.

A bőr neurogén vazodilatációs válaszána vizsgálatá az LDI technikával, a korábban alkalmazott módszerekhez (pl. Evans-kék extravazáció, vaszkuláris jelölés) hasonlóan, alkalmas módszernek bizonyult a kemoszenzitív kután idegek funkcionális integritásának értékelésére. Ez a módszer megfelelő térbeli és időbeli felbontást biztosít, ezért alkalmas a TRPA1-agonista mustárolaj által kiváltott regionális keringési reakciók okozta kután vérátáramlási változások időbeli lefutásának és topográfiájának vizsgálatára. Miután a bőr szenzoros denervációja a neurogén gyulladáso reakció csökkenését vagy teljes kiesését eredményezi, az LDI bizonyítottan alkalmas a denervált bőrterület elkülönítésére röviddel a perifériás idegek teljes átmetszését vagy perineurális kapszaicin kezelését követően. A korábban alkalmazott technikákkal összehasonlítva, az LDI a perifériás idegsérüléseket követően a bőrben zajló reinnervációs folyamatok ugyanazon egyénben történő longitudinális nyomon követésére is alkalmas objektív módszernek tűnik. Hasonló neurogén vazodilatációs válasz emberben is megfigyelhető, ezért a módszer segítségével a perifériás idegsérüléseket követő axonregeneráció és reinnerváció objektív és non-invazív klinikai vizsgálatára is alkalmas lehet.

A saphenus ideg átmetszése és lekötése a mustárolajjal kiváltható vazodilatációs válasz nagymértékű csökkenését, bár nem teljes kiesését eredményezi a denervált bőrben 3–4 nappal a műtétet követően. A reinnerváció első jelei a 3. posztoperatív héten figyelhetők meg: a denervált területen a mustárolajjal kiváltott neurogén vazodilatációs reakció fokozatos visszatérése mutatható ki. További 3–4 hét elteltével a vazodilatációs válasz topográfiája és intenzitása már hasonlóan bizonyult a műtét előtti állapothoz. A funkció helyreállításának ezen időbeli lefolyása egybevá a bőridegek funkcionális regenerációjának vizsgálatát célzó

korábbi, viselkedési tesztekkel vagy az Evans-kék extravazációs technika alkalmazásával végzett vizsgálatok eredményeivel. A saphenus ideg perineurális kapszaicin kezelésének hatására a mustárolajjal kiváltott neurogén vazodilatációs válasz teljesen és véglegesen kiesett a sértett ideg innervációs területén. A 7 hetes utánkövetési időszak során nem figyeltünk meg a neurogén vazodilatációs válasz visszatérésére utaló jeleket. Ezek az eredmények összhangban vannak azokkal a korábbi megfigyelésekkel, melyek szerint a kapszaicin-indukált szelektív kemodenerváció hatására az érintett bőrterületekben, illetve perifériás idegekben megfigyelt C-rost afferens depléció véglegesnek tekinthető. Ez arra utal, hogy a kemodenervált bőrterület beidegzését sem a kezelt saphenus ideg afferenseinek regeneratív benövése, sem pedig a szomszédos intakt ischiadicus ideg kollaterálisainak benövése nem képes helyreállítani. A kapszaicinnal kemodenervált saphenus ideg későbbi átmetszése azonban a mustárolajjal kiváltott vazodilatációs reakció fokozatos és szignifikáns visszatérését eredményezte, a reakció intenzitásában és térbeli kiterjedésében pedig hasonlóan bizonyult ahhoz az állapothoz, melyet az intakt saphenus ideg átmetszését követő regeneráció során láttunk. Miután az átmetszéssel együtt lekötöttük az ideget, tehát a saphenus afferensek regenerációja akadályozott volt, ezért a neurogén vaszkuláris reakciók visszatérésének hátterében a denervált terület kollaterális sarjadzás útján történő reinnervációja állhat. Ezt a feltételezést támasztja alá a saphenus ideg innervációs területén immunhisztokémiai módszerrel kimutatott CGRP-pozitív rostok jelenléte. Továbbá az eredetileg a saphenus ideg innervációs területének reinnerválását követően az ischiadicus ideg perineurális kapszaicin kezelése nem csak az ischiadicus, hanem a saphenus innervációs területén is megszüntette a neurogén vazodilatációs választ, ami szintén igazolja azt a feltételezést, mely szerint a reinnervációért a kollaterális sarjadzás felelős. Ezen megfigyeléseket erősítették meg azon eredmények is, amelyek a mustárolajjal kiváltott vaszkuláris jelölés helyreállítását mutatják a korábban kemodenervált bőrterületen, röviddel a kapszaicinkezelt saphenus ideg átmetszésével végzett teljes denervációt követően.

Ezen megfigyelések a bőr perineurális kapszaicin kezeléssel kiváltott szelektív szenzoros denervációját követően fellépő, eddig még nem teljesen ismert patofiziológiai/neuroplasztikus változásokra utalnak. A denervált bőr kollaterális sarjadzás útján történő reinnervációjának gátlását tekinthetjük úgy, mint az ideg regeneráció kollaterális gátlása. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy a kapszaicinnal kezelt saphenus ideg átmetszése permisszív hatású, mely utat enged a kollaterális sarjadzásnak, azonban ezen permisszív hatás pontos mechanizmusa jelenleg még nem ismert. Feltételezésünk szerint, a kemodenervált bőrben perzisztáló nem degenerálódó, velőtlen és myelinizált idegrostok gátolhatják a szomszédos

ischiadicus ideg rostjainak benövését a denervált bőrterületre. A részlegesen denervált perifériás idegekhez tartozó gliasejtek lehetséges szerepe is felmerülhet a kollaterális sarjadzással megvalósuló reinnerváció szabályozásában. A regeneráció gátlását eredményező hasonló folyamatok humánban is szerepet játszhatnak az afferens idegek egyes alpopulációit érintő bizonyos típusú neuropátiákban.

KÖVETKEZTETÉS

Emberben és rágcsálókban a bőr felszínének mustárolajjal történő ecsetelése szenzoros neurogén vazodilatációt vált ki az intakt bőrben, viszont ez a reakció denervált bőrben nem figyelhető meg. A mustárolajjal kiváltott szenzoros vazodilatációs válasz LDI eljárással történő mérése egy alkalmas módszert jelent a kután nociceptív idegek funkcionális integritásának és regeneratív képességének tanulmányozására. A módszer alkalmas a perifériás idegsérüléseket, például idegátmetszést vagy kémiai denervációt követően a vazodilatációs válasz topográfiai eloszlásában és intenzitásában bekövetkező változások longitudinális, noninvazív követésére.

Ezen kísérleti megközelítéssel a korábbi megfigyelésekkel összhangban igazoltuk a perifériás szenzoros idegek sebészi és kémiai denervációját követően zajló regenerációs tendenciák közötti különbségeket. A saphenus ideg sebészi úton végzett denervációját követően jelentős reinnervációt mutattunk ki, melynek hátterében a szomszédos intakt ischiadicus ideg kemoszenzitív rostjainak kollaterális sarjadzása állhat. Ezzel szemben, a bőr perineurális kapszaicin kezeléssel történő kemodenervációját követően a reinnerváció elmaradt. Kísérleteink fontos megfigyelése, hogy a kapszaicinnal kezelt saphenus ideg átmetszését és lekötését követően lehetővé válik az intakt ischiadicus afferensek benövése a denervált bőrterületre, feltehetően kollaterális sarjadzás útján.

Ezen megfigyelések az ideg regeneráció kollaterális gátlásának jelenségére utalnak, mely gátlásért feltehetően a kemodenervált bőrterületeken perzisztáló kapszaicin-inszenzitív idegek felelősek.

A kollaterális sarjadzást lehetővé tevő permisszív hatás pontos mechanizmusainak tisztázása érdekében további vizsgálatokra van szükség, mely vizsgálatok segíthetnek részletesebben megismerni a neuropátiában zajló, az idegek és célterületeik részleges épségével kísért axonregenerációs folyamatokat.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Sántha Péternek, aki szakmai iránymutatásával segítette a PhD dolgozatom elkészítését.

Tisztelettel köszönöm Jancsó Gábor Professor Úrnak, hogy lehetővé tette az Elméleti Doktori Iskola „Idegtudomány” alprogramjában való részvételemet.

Hálásan köszönöm Sály Gyula Professor Úrnak a lehetőséget, hogy a SZAOK Élettani Intézetében végezhettem kutatómunkámat.

Rendkívüli hálával tartozom jelenlegi és volt kollégáimnak és az Élettani Intézet minden munkatársának, hogy mindvégig segítettek és támogattak.

Legmélyebb köszönetemet pedig férjemnek, családomnak és barátaimnak szeretném kifejezni szeretetükért és rendületlen támogatásukért.