

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

**A CGRP- ELLENES ANTITEST GALCANEZUMAB HATÁSA A NEUROPEPTIDEK
ÁLTAL MEDIÁLT TRIGEMINOVASZKULÁRIS MŰKÖDÉSEKRE
PATKÁNYOKBAN**

Ph.D. tézis összefoglalója

Dr. Friedrich Nadine

Élettani Intézet, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar,
Szegedi Tudományegyetem
Szeged

Témavezető:

Prof. Dr. Dux Mária

Élettani Intézet, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar,
Szegedi Tudományegyetem
Szeged

Szeged

2025

I. PUBLIKÁCIÓK

1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemény:

I. Friedrich, Nadine; Németh, Krisztina; Tanner, Martin; Rosta, Judit; Dobos, Ildikó; Oszlács, Orsolya; Jancsó, Gábor; Messlinger, Karl; Dux, Mária: Anti-CGRP antibody galcanezumab modifies the function of the trigeminovascular nociceptor complex in the rat.

JOURNAL OF HEADACHE AND PAIN 25: 1 Paper: 9, 11 p. (2024)

IF: 7.9

Medicine (miscellaneous) SJR indicator: D1

doi: 10.1186/s10194-024-01717-2.

2. Az értekezéshez nem közvetlenül kapcsolódó közlemények:

II. Benedicter, Nicola; Messlinger, Karl; Vogler, Birgit; Mackenzie, Kimberly D.; Stratton, Jennifer; **Friedrich, Nadine;** Dux, Mária: Semi-Automated Recording of Facial Sensitivity in Rat Demonstrates Antinociceptive Effects of the Anti-CGRP Antibody Fremanezumab.

NEUROLOGY INTERNATIONAL 15: 2 pp. 622-637., 16 p. (2023)

IF: 3.2

Neurology (clinical) SJR indicator: Q2

doi: 10.3390/neurolint15020039.

III. Rosta, Judit; Tóth, Máté; **Friedrich, Nadine;** Sántha, Péter; Jancsó, Gábor; Dux, Mária: Insulin sensitizes neural and vascular TRPV1 receptors in the trigeminovascular system.

JOURNAL OF HEADACHE AND PAIN 23: 1 Paper: 7, 11 p. (2022)

IF: 7.4

Anesthesiology and Pain Medicine SJR indicator: D1

doi: 10.1186/s10194-021-01380-x.

II. BEVEZETÉS

A migrén egy összetett neurovaszkuláris betegség. Patogenezisében a perifériás és a központi idegrendszer több komponense is részt vesz. Bár a migrénes roham kialakulásának pontos mechanizmusa nem teljesen ismert, széles körben elfogadott, hogy a fejfájást a trigeminális nociceptív pálya aktiválása váltja ki.

A migrén patofiziológiájában a calcitonin gén-rokon peptid (CGRP) az egyik legfontosabb neuropeptid. A trigeminális ganglionban az idegsejtek körülbelül 50%-a CGRP-pozitív. Ezen CGRP-pozitív neuronok perifériás axonjai főként a Willis-kör artériái és a meningeális erek mentén helyezkednek el. Nem csak az idegrendszerben található meg a CGRP, de például endotélsejtekben, makrofágokban és adipocitákban is. A központi idegrendszerben a CGRP főként nociceptor-aktiváció során szabadul fel, és hozzájárulhat a centrális szenzitizációhoz a glutamát mediálta jelátvitel fokozásán keresztül a nyúltvelőben és a gerincvelő hátsó szarvában.

Klinikai és kísérletes bizonyítékok is alátámasztják a CGRP szerepét a migrén patofiziológiájában. Migrénes betegekben a CGRP plazmaszintje megnövekszik a véna jugularis externában a rohamok alatt. Emellett emelkedett CGRP-szinteket mértek a könnyben és a nyálban a migrénes rohamok során, valamint a krónikus migrénes betegek plazmájában a rohamok közötti időszakban is. Egy másik bizonyíték, hogy intravénásan beadott CGRP migrénes betegekben migrénhez hasonló fejfájást vált ki. Mindezek mellett, a CGRP hatását mérséklő terápia sikeres alkalmazása a klinikai gyakorlatban az egyik legjelentősebb bizonyíték a CGRP szerepére vonatkozóan.

Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a hypophysis adenilát-cikláz-aktiváló polipeptid (PACAP) is szerepet játszhat a migrén patofiziológiájában. A PACAP élettani hatásai hasonlóak a CGRP-hez: erős, értágító hatással bír és patkányokban a durában hízósejt-degranulációt idéz elő. Klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy intravénás PACAP-beadás fejfájást vált ki egészséges és migrénes embereknél is, ellentétben a CGRP-vel, amely csak migréneseknél okoz migrénhez hasonló tüneteket. A PACAP hozzájárulhat a perifériás és centrális szenzitizáció kialakulásához, valamint befolyásolhatja a neurogén gyulladást, így potenciális terápiás célpont lehet.

A CGRP-t és a PACAP-ot egyaránt a migrén patofiziológiai mediátorainak tekintik. Mindkét peptid vazodilatációt idéz elő az általuk beidegzett szövetekben, migrénhez hasonló fejfájást okoz embereknél és migrénszerű tüneteket rágcsálókban. A CGRP és a PACAP különböző, de átfedő területeken találhatóak meg a perifériás és a központi idegrendszer

migrénnel összefüggésbe hozható részeiben. Kísérleti körülmények között a két peptid hasonló funkciót tölt be, például neurogén gyulladást váltanak ki és fokozzák a nociceptív reakciókat. A hasonlóság ellenére különböző receptorokhoz kötődnek, és független mechanizmusokon keresztül hatnak, valószínűleg eltérő sejten belüli jelátviteli útvonalak révén.

A P-anyag (SP) főként a trigeminális érzőidegrostokban és a durális erek mentén expresszálódik, hasonlóan a CGRP-hez. A SP által kiváltott fokozott érfal-permeabilitás főként a posztkapilláris venulákra jellemző, elősegítve a perifériás szövet neurogén gyulladását. Emellett a SP szerepet játszik a fájdalom átvitelben is. Bár migrénnel való kapcsolata nem teljesen tisztázott, spontán, aura nélküli migrénes rohamok során megemelkedett SP-szintet mértek a nyálban, illetve a rohammentes időszakokban is megfigyeltek emelkedett SP-szinteket epizodikus és krónikus migréneseknél. Ugyanakkor a plazmában migrénes roham alatt nem találtak megemelkedett SP-koncentrációt, és a klinikai vizsgálatok szerint az NK-receptor antagonisták nem bizonyultak hatékonynak a migrén terápiájában.

A szomatosztatin (SOM) egy olyan neuropeptid, amely fájdalomcsillapító hatású rágcsálókban és emberekben egyaránt. Az érzőidegekben gátolja a nociceptív folyamatokat és más neuropeptidek felszabadulását. A SOM fájdalomcsillapító szerepét migrénes rohamok során is feltételezik. Klinikai vizsgálatok során a SOM koncentrációját alacsonynak mérték a rohamok közötti időszakban a cerebrospinalis folyadékban, amely tovább csökkent a fejfájásos rohamok alatt.

A trigeminovaskuláris rendszer kiemelt szerepe a migrénes fájdalom patofiziológiájában nemcsak a trigeminális nociceptív pálya aktiválásán keresztül valósul meg, ami fejfájáshoz vezethet, hanem a meningeális szövetekben kialakuló neurogén gyulladás révén is. Az érzőrendszerben a nociceptorok aktiválása során felszabaduló vazodilatátor neuropeptidek által kiváltott neurogén gyulladás kulcsfontosságú tényezőnek számít a nociceptorok érzékenyítésében. Az aktivált nociceptorokból felszabaduló peptidek fokozzák a véráramlást és az érpermeabilitást, valamint hízósejtek-degranulációját és más meningeális sejtek aktiválását válthatják ki, amelyek további értágító és szenzitizáló mediátorokat szabadíthatnak fel.

Korábbi kutatási eredmények alapján néhány évvel ezelőtt került bevezetésre a trigeminális nociszenzor komplex fogalma, mint a meningeális nociceptor érzékenyítés morfológiai szubsztrátja. A nociszenzor komplex részei az elsődleges trigeminális érző neuronok, azok perifériás és centrális végződéseivel együtt, amelyek beidegzik a dura mater-t, és szenzoros információt közvetítenek a másodlagos neuronok felé. A nociszenzor komplex

részét képezik még a meningeális erek és hízósejtek is. A jelenlegi elméletek szerint az idegi aktivitás és az érrendszeri reakciók kombinációja fejfájást generálhat migrénes rohamok során.

A meningeális nociceptorok aktiválódása a nociceptív információ továbbításához vezet, és értágító peptideket, mint CGRP-t és SP-t szabadít fel. Ezek a peptidek neurogén gyulladást idéznek elő a meningeális szövetekben, ami vazodilatációt, illetve plazmaextravazációt okoz. A szöveti mediátorok képesek lehetnek aktiválni vagy szenzitizálni a meningeális nociceptorokon expresszálandó tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) és tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatornákat. A hízósejteket aktiválhatják a nociceptorokból felszabaduló CGRP és SP, valamint a hízósejtekből származó triptáz enzim is. Kimutatták, hogy a hízósejtek egymást is képesek aktiválni a proteináz-aktivált 2-es receptor (PAR-2) triptáz általi aktiválásán keresztül, ami tovább fokozhatja a hízósejt-mediátorok, például a hisztamin felszabadulását. A hízósejtekből felszabaduló hisztamin felerősítheti az érrendszeri reakciókat, és szenzitizálhatja a nociceptív afferens rostokat is. Bár az értágulat és a fokozott véráramlás valószínűleg nem vezet közvetlenül a nociceptorok aktiválódásához, az érrendszeri reakciók gyorsíthatják a káros anyagok eltávolítását és hozzájárulhatnak a meningeális szövetek homeosztázisának helyreállításához.

Negyven évvel ezelőtt a vazoaktív hatású neuropeptid CGRP felfedezése és annak szerepe a migrén patofiziológiájában új korszakot nyitott a migrén kezelésében és a rohamok megelőzésében. A triptánok az 5-HT_{1B} és 5-HT_{1D} szerotonin-receptorokat célozzák meg, és ezek aktiválásán keresztül csökkentik a CGRP-felszabadulását. A gepántok kis molekulatömegű, nem peptid típusú, kompetitív CGRP-receptor-antagonisták.

Napjainkban négy monoklonális antitest érhető el az epizodikus és krónikus migrén megelőzésére. Ezek közül három – eptinezumab, fremanezumab és galcanezumab – CGRP-ellenes, míg az erenumab CGRP-receptor-ellenes antitest. Ezek a monoklonális antitestek mind IgG izotípusúak, egyedi szerkezettel és affinitással rendelkeznek, valamint hosszú felezési idővel a vérben. A CGRP-ellenes és CGRP-receptor-ellenes antitestek mérete körülbelül 150 kilodalton, így nem jutnak át a vér-agy gáton, és nem okoznak jelentős központi idegrendszeri mellékhatásokat vagy toxicitást.

Laborunkban hagyománya van a migrén állatkísérletes kutatásának. Patkányok ex vivo dura mater preparátumaiban meg tudjuk határozni a bazális és az ingerlés által kiváltott peptid-/mediátor-felszabadulást a dura mater különböző sejtes komponenseiből. Immunhisztokémiai módszerek segítségével, dura mater total preparátumokban és a trigeminális ganglion metszetein vizsgálni tudjuk azokat a morfológiai változásokat, amelyek a trigeminovaszkuláris funkciókat érintik a migrénhez kapcsolódó patofiziológiás állapotok során.

III. CÉLKITŰZÉS

Kutatómunkánk célja az volt, hogy meghatározzuk a patkányok trigeminovaszkuláris nociszenzor komplexében azokat a funkcionális változásokat, amelyek hatással lehetnek a nociceptor működésre a CGRP-ellenes galcanezumab antitesttel történő kezelést követően. Fluoreszcens festékkel jelölt galcanezumabot használtunk a CGRP-ellenes antitest eloszlásának vizualizálására a dura materben és a trigeminális ganglionban. A meningeális szövetekben és a trigeminális ganglionban vizsgáltuk a fluoreszcens festékkel jelölt galcanezumab koexpresszióját a neuropeptid CGRP-vel, az endotéliális marker von Willebrand faktorról, simaizom komponens aktinnal és hisztaminnal. Mértük galcanezumab kezelés után a CGRP, SP és SOM felszabadulásában bekövetkező változásokat a meningeális afferensek TRPV1 receptor agonista kapszaicinnal vagy a depolarizáló KCl oldattal történő ingerlését követően ex vivo dura mater preparátumban. Mivel a CGRP és a SP a trigeminális neuronokban általában kolokalizáltak fordulnak elő, ugyanabban a vezikulában tárolódnak, és aktiválódáskor együttesen szabadulnak fel, azt is vizsgáltuk, hogy vajon a galcanezumabbal végzett kezelés megváltoztatja-e a SP felszabadulását a CGRP-hez hasonlóan? Emellett tanulmányoztuk a galcanezumab hatását a meningeális hízósejtek működésére; ex vivo patkány dura mater preparátumban vizsgáltuk a meningeális hízósejtekből CGRP és compound 48/80 által indukált hisztaminfelszabadulást.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkben felnőtt hím (270-320 g) és nőstény (230-260 g) Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat 12 órás fény-/sötét ciklusban, 22 ± 2 °C hőmérsékleten, 50–70%-os relatív páratartalom mellett tartottuk. Az állatok szabadon hozzáfértek a táphoz és az ivóvízhez. A kísérleti protokollt a Szegedi Tudományegyetem Állatjóléti Etikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: XIV./1800/2021 és XIV./2368/2023), a kísérletek az Európai Parlament 2010/63/EU irányelve szerint kerültek végrehajtásra. Minden tőlünk telhetőt megtettünk az állatok szenvedésének minimalizálása érdekében. A felhasznált kísérleti állatok száma a lehető legalacsonyabb volt.

2. Antitest kezelés

A patkányokat isoflurán belélegeztetésével altattuk, a koncentrációt fokozatosan 4%-ra emelve (Aerrane, Baxter Hungary Kft, Magyarország). Az egyik csoport szubkután 30 mg/kg galcanezumab CGRP-ellenes antitest injekciót kapott (Emgality, Eli Lilly Netherlands B.V., Utrecht, Hollandia, 10 mg/ml oldat formájában) a nyak és váll területén leborotvált bőrterületbe. A kontroll patkányokat oldószerrel kezeltük (0,9%-os NaCl).

A galcanezumab jelenlétének és eloszlásának vizualizálására a dura materben és a trigeminális ganglionban, fluoreszcensen jelölt antitestet (Cy3-galcanezumab) használtunk. Összehasonlításként vizsgáltuk a Cy3-bevacizumab (Avastin, Roche, Svájc, 30 mg/kg, 10 mg/ml oldat formájában), egy másik fluoreszcensen jelölt antitest eloszlását is, amely függetlenül hat a CGRP útvonalától.

3. Immunhisztokémiai festés a dura mater és a trigeminális ganglion vizsgálatához

Az antitest pontos lokalizációjának megállapítására a dura mater különböző elemeiben és a trigeminális ganglionban, a fluoreszcensen jelölt antitest koexpresszióját vizsgáltuk endotéliális marker von Willebrand faktorról, simaizom komponens aktinnal vagy hisztaminnal indirekt immunfluoreszcens módszer segítségével. A szövettani preparátumokban a térbeli kapcsolatokat is vizsgáltuk a fluoreszcensen jelölt antitest és a CGRP-t tartalmazó neuronális elemek között.

A Cy3-galcanezumabot vagy Cy3-bevacizumabot kapott patkányokat 3 vagy 30 nappal a kezelést követően thiopental nátrium (200 mg/kg, Braun, Spanyolország) intraperitoneális injekciójával altattuk, majd transzkardiálisan fiziológiai sóoldattal és 4%-os paraformaldehid oldattal perfundáltuk (pH 7,4). Az állatok fejét eltávolítottuk, a koponyáról a bőrt és az izmokat leválasztottuk, majd a koponyát a középvonal mentén félbe vágtuk. Az agyféltekéket eltávolítottuk, a parietális dura mater-t és a trigeminális ganglionokat kiemeltük, majd 2 órára a fixáló oldatban posztfixáltuk. A trigeminális ganglionokból 16 µm vastag hosszanti metszeteket készítettünk kriosztáttal.

A a trigeminális ganglionból készült metszeteket és a dura materből készített totálpreparátumokat indirekt immunfluoreszcens technikával festettük meg, majd konfokális fluoreszcens mikroszkóppal értékeltük.

4. A meningeális afferensekből felszabaduló calcitonin gén-rokon peptid (CGRP), P-anyag (SP) és szomatosztatin (SOM) mennyiségének mérése ex vivo dura mater preparátumban

A CGRP, SP és SOM mennyiségét ex vivo dura mater preparátumban mértük. A hím és nőstény patkányokat, amelyeket a kísérlet elvégzése előtt 7 nappal galcanezumabbal vagy annak oldószerével kezeltünk, thiopental nátrium (200 mg/kg, intraperitoneálisan) segítségével altattuk el, majd dekapitáltuk. A bőr és az izmok eltávolítása után a koponyát a középvonalban félbevágtuk, és eltávolítottuk az agyat. A fél koponyákat szintetikus intersticiális folyadékkal (SIF) 30 percig szobahőmérsékleten mostuk, majd vízfürdő fölé helyeztük őket 37 °C-on. A koponya üreget 300 µl SIF oldattal töltöttük fel. Minden 10. percben mintát gyűjtöttünk. A bazális peptid felszabadulást SIF oldat jelenlétében mértük. Ezt követően a CGRP és SP mérések során a dura matert 10 percig a TRPV1 receptor agonista kapszaicinnel (100 nM) stimuláltuk, a SOM felszabadulás vizsgálata során 60 mM KCl oldatot alkalmaztunk. A mintákból 200 µl-t 50 µl enzyme-linked immunoassay (EIA)-pufferrel hígítva Eppendorf csövekbe pipettáztunk és -70 °C-on tároltunk a felhasználásig.

5. Ex vivo hisztaminfelszabadulás mérése a meningeális hízósejtekből

A kontroll és galcanezumabbal kezelt állatokból a peptid felszabadulás vizsgálatánál ismertetett módon készítettünk ex vivo dura mater preparátumot. A bazális hisztaminfelszabadulást a preparátumok 10 perces SIF inkubációja során nyert mintákból határoztuk meg. Ezt követően a dura matert 10 µM koncentrációjú CGRP oldattal vagy 2,5 µg/ml compound 48/80 oldattal stimuláltuk.

6. Minták neuropeptid (CGRP, SP, SOM) és hisztamin tartalmának mérése

A minták neuropeptid (CGRP, SP, SOM) tartalmának mérésére EIA módszert használtunk. A CGRP- és SP-koncentrációkat ugyanazokban a mintákban mértük a minták kettéosztását követően. A minták bazális és stimulációt követő CGRP, SP és SOM tartalmának meghatározását EIA kitek segítségével végeztük a gyártók útmutatása alapján.

A hisztaminkoncentráció mérésére használt EIA módszer alapja a kompetíció a mintákban lévő nem jelölt hisztamin és az acetilkolin-észterázhoz kötött hisztamin között, amely a korlátozott specifikus anti-hisztamin antitest helyekkel verseng a lemezekben.

7. Statisztikai elemzések

A statisztikai elemzést a Statistica 13 szoftver (StatSoft, USA) segítségével végeztük el. Az adatok normális eloszlásának ellenőrzése után Student-tesztet és variancia elemzést (factorial ANOVA vagy one-way ANOVA) használtunk, amelyet HSD tesztel egészítettük ki. Az eredményeket átlag $\pm$ standard hiba (SEM) formájában tüntettük fel. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

V. EREDMÉNYEK

1. A fluoreszcensen jelölt antitestek előfordulása a dura materben

Patkányok dura mater preparátumaiban 3 nappal a Cy3-galcanezumab kezelést követően a fluoreszcensen jelölt galcanezumab legnagyobb mennyiségben az artéria meningeá media arterioláiban volt kimutatható. A CGRP-pozitív afferens neuronok axonjai közvetlenül ezen arteriolák közelében helyezkedtek el. Ezen kívül néhány, a dura mater kötőszövetében található sejt is Cy3-fluoreszcenciát mutatott. Annak vizsgálatára, hogy a hízósejtek, amelyek fokozzák a meningeális szövetben a neurogén gyulladást mediátoraik felszabadításával, felhalmozódik-e a fluoreszcensen jelölt antitestet, a hisztamin jelenlétét is megvizsgáltuk a preparátumokon. A hízósejtek a Cy3-galcanezumabbal jelölt erek közelében helyezkedtek el nagyobb számban, de a hízósejtek hisztaminja és a Cy3-galcanezumab jelölés kolokalizációja nem volt megfigyelhető a meningeális szövetben. A Cy3-galcanezumab nyomai még 30 nappal az antitest beadás után is jelen voltak a dura materben.

Kísérleteinkben a vaszkuláris endotéliális növekedési faktor-ellenes antitestet, Cy3-bevacizumabot használtuk kontroll antitestként. Bár a Cy3-bevacizumab, amely hatásának nem célpontja a CGRP, lokalizációja a dura mater ereiben hasonló volt, mint a Cy3-galcanezumabé, a fluoreszcensen jelölt bevacizumab összességében kevésbé intenzív jelölődést eredményezett.

2. A fluoreszcensen jelölt antitestek megjelenése a trigeminális ganglionban

Három nappal a Cy3-galcanezumabbal történő kezelés után a trigeminális ganglion metszeteiben a fluoreszcensen jelölt galcanezumab az erek falában volt kimutatható, hasonlóan a dura materben látottakhoz, de néhány trigeminális ganglion sejt szomája körül is megfigyelhető volt. A jelölt erek a CGRP-immunpozitív trigeminális neuronok közelében helyezkedtek el. Annak tisztázására, hogy az érfal mely rétegéhez asszociáltan helyezkedik el az antitest, immunhisztokémiai módszerrel meghatároztuk annak kolokalizációját az endotéliális marker von Willebrand faktorról és a simaizom komponens aktinnal. A Cy3-

galcanezumab nem mutatott kolokalizációt a simaizom aktinnal, de szinte minden jelölt érben együtt volt kimutatható a von Willebrand faktor endotéliális markerrel. A von Willebrand faktor-pozitív kapillárisokban nem volt kimutatható a Cy3-galcanezumab. A Cy3-galcanezumab még 30 nappal az antitest beadása után is jelen volt a ganglionban.

A Cy3-bevacizumab előfordulása a trigeminális ganglion ereiben hasonló volt a Cy3-galcanezumabéhoz, de az antitest a ganglionsejtek szomájának környezetében nem volt jelen, és a jelölés intenzitása is kisebb volt.

3. A calcitonin gén-rokon peptid és a P-anyag felszabadíthatóságának változása a dura materből galcanezumab kezelést követően

Ex vivo félkoponya preparátumokban SIF jelenlétében mértük a meningeális afferensekből spontán felszabaduló CGRP és SP mennyiségét. Kontroll állatokban a bazális CGRP-felszabadulás alacsonyabb volt hímekben, mint a nőstényekben, míg ugyanazon mintákban mért SP-koncentrációk a hímekben mutatkoztak magasabbnak.

A galcanezumabbal kezelt állatoknál a stimulált CGRP-felszabadulás növekedése szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult, mint az oldószerrel kezelt csoportban. A különbség a nőstény állatoknál volt megfigyelhető. A kapszaicinnal kiváltott SP felszabadulás mértéke az oldószerrel kezelt állatokban alacsonyabb volt, mint a spontán felszabadulás során mért érték, a galcanezumabbal kezelt állatokban nem mutatott eltérést a bazális szinthez képest. Ez a két csoport közötti szignifikáns különbséget eredményezett, amely szintén a nőstény állatok értékeinek volt köszönhető.

4. A szomatosztatin bazális és stimulált felszabadulása a dura materből

A SOM felszabadulását a dura materből, 60 mM koncentrációjú KCl oldat stimulációját követően mértük. Mivel nem szerettük volna kizárni a TRPV1 receptor negatív, de SOM pozitív neuronokat a mérésből, ebben a kísérletsorozatban a meningeális afferenseket 60 mM koncentrációjú KCl oldattal stimuláltuk kapszaicin helyett. Az oldószerrel kezelt állatoknál mind a bazális, mind a KCl-stimulált SOM felszabadulás magasabbnak bizonyult nőstények esetében, de a KCl-stimulációt követően nem figyeltünk meg szignifikáns változásokat a SOM felszabadulásában. Hét nappal a galcanezumabbal végzett kezelés után a bazális és stimulált SOM felszabadulásában nem figyeltünk meg szignifikáns változást.

5. A különböző hízósejt-degranuláló szerek hisztaminfelszabadító hatása

Hím patkányok dura mater preparátumában vizsgáltuk a különböző hízósejt-degranuláló szerek hisztaminfelszabadulásra kifejtett hatását. A bazális hisztaminfelszabadulás galcanezumab-kezelést követően szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll állatokban. A galcanezumab kezelés eltérően befolyásolta a hízósejt-degranuláló szerek hisztaminfelszabadító hatását. Az oldószerrel kezelt kontroll állatoknál a CGRP (10 μ M) erőteljesebben fokozta a hisztaminfelszabadulást, mint a galcanezumab-kezelt csoportban. Teszteltük a széles körben használt hízósejt-degranuláló anyag, a compound 48/80 (2,5 μ g/ml) hisztaminfelszabadító hatását is, amely esetében nem találtunk különbséget az oldószerrel és galcanezumabbal kezelt állatok között.

VI. MEGBESZÉLÉS

Kutatásunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a trigeminovaskuláris rendszerben bekövetkező változásokat a migrén megelőzésére használt monoklonális CGRP-ellenes antitest galcanezumab kezelést követően. Mivel a trigeminális nociszenzor komplex magában foglalja a peptiderg érző neuronokat, a meningeális vaszkuláris elemeket és a hízósejteket, amelyek részt vesznek a dura mater neurogén gyulladásos reakciójának kialakításában, és jelentős szerepet játszik a trigeminális nociceptív pálya perifériás és centrális szenzitizációjában. Ezért vizsgáltuk ezen rendszer működésbeli változásait, mint például a neuropeptidek, valamint a hisztamin felszabadulását, amelyek a migrénes fejfájás kialakulásában fontos szerepet tölthetnek be.

1. Cy3-galcanezumab eloszlása a dura materben és a trigeminális ganglionban

A Cy3-galcanezumabot már 3 nappal az állatok kezelése után ki tudtuk mutatni a dura materben és a trigeminális ganglionban, és még 30 nap múlva is megtalálható volt a trigeminovaskuláris rendszerben. Mindkét szövetben elsősorban az arteriolákban volt jelen a jelölt antitest. A Cy3-galcanezumab jelentős mértékben koexpresszáldott a von Willebrand faktor endotéliális markerrel, viszont a simaizom aktinnal nem mutatott átfedést. Feltételezzük, hogy a dura mater ereiben az endotéliális sejtek lumenális glikokalixának egyes komponensei erős affinitást mutatnak a keringő antitesthez, ami lokális depo képződéséhez vezet, így ez lehetővé teszi az antitest 30 napon át történő felszabadulását a dura materben és a trigeminális ganglionban.

A dura materben és a trigeminális ganglionban a fluoreszcensen jelölt erek akár 30 napon keresztül biztosíthatják az antitestet a nociszenzor komplex komponensei számára; a közvetlen közelükben elhelyezkedő CGRP-immunoreaktív idegrostok vagy sejtestek, illetve a dura mater hízósejtjei számára.

Bár a CGRP-ellenes antitest jelenléte már a Cy3-galcanezumab injekció utáni 3. napon jelentős volt mind a dura materben, mind a trigeminális ganglionban, a funkcionális tesztek csak néhány nappal később, a beadást követő 7. napon végeztük el, hogy elegendő időt biztosítsunk a nociszenzor komplexben esetlegesen kialakuló teljes funkcionális változásokhoz.

2. Nemi különbségek a dura materből felszabadítható calcitonin gén-rokon peptid és P-anyag mennyiségében

A CGRP, a migrénes fejfájás központi szereplője, más peptidekkel együtt fordulhat elő a nociceptív neuronokban. Korábbi megfigyelések alapján, a SP jelen van a CGRP-t tartalmazó érző neuronok egy alcsoportjában, ezért azt vizsgáltuk, hogy a CGRP-ellenes antitest kezelés a SP-felszabadulást a CGRP-felszabadulás mérsékléséhez hasonlóan módosítja-e? A jelen kísérletsorozatunkban megfigyeltük, hogy a szisztémás galcanezumab-kezelés csökkentette a TRPV1 stimulációval kiváltott CGRP-felszabadulást a meningeális afferensekből.

Eredményeink nemi különbséget mutattak a peptidfelszabadulásban, nemcsak a bazális, hanem a kapszaicinnal stimulált CGRP-koncentrációk is magasabbnak bizonyultak nőstény patkányokban. Mivel a migrén gyakoribb a női populációban, feltételezhető, hogy a női trigeminális rendszer nagyobb CGRP iránti érzékenysége tükröződik az eredményeinkben. A nőstény állatokban a galcanezumab-kezelés utáni CGRP-felszabadulás erőteljesebb gátlása arra utal, hogy a nők trigeminális neuronjai érzékenyebbek a peptidfelszabadulást szabályozó tényezőkre.

A kontroll állatokban a CGRP-felszabadulás sokkal alacsonyabb SP-felszabadulással társult ugyanazon mintákban, ami a trigeminális rendszerben lévő kevesebb SP-tartalmú neuronra utal. Az oldószerrel kezelt nőstény patkányoknál a kapszaicin stimuláció után magasabb CGRP-koncentrációkat, ám alacsonyabb SP-koncentrációkat mértünk a hímekhez képest. Míg a galcanezumab-kezelés csökkentette a kapszaicin indukálta CGRP-felszabadulást, a minták SP-tartalma mindkét nemben megnövekedett, ez a különbség szignifikánsnak bizonyult nőstényeknél.

Bár a P-anyag klinikai jelentősége a migrén patofiziológiájában nem teljesen tisztázott, jelenleg nem tudjuk megmagyarázni a megnövekedett SP-termelés vagy felszabadulás szerepét galcanezumab-kezelés után. Eredményeink mindenesetre arra utalnak, hogy a neuronokban a csökkent CGRP-termelés felszabadíthat olyan fehérjeszintézist szabályozó mechanizmusokat, amelyek megnövekedett SP-termeléshez vagy vezikuláris transzportjához vezethetnek. Hipotézisünk szerint a galcanezumab kezelés nemcsak célzottan a CGRP-termelésre és funkcióra van hatással, hanem más neuropeptidek expresszióját és felszabadulását is befolyásolhatja.

3. Szomatosztatin felszabadulás meningeális afferensekből

Immunhisztokémiai vizsgálatok korábban igazolták SOM jelenlétét a trigeminális neuronokban. A SOM nemcsak az akut gyulladást és a nociceptív folyamatokat gátolja az általa beidegzett szövetekben, hanem úgynevezett "szenzokrin" funkcióval is rendelkezhet, amely szisztémás gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatást eredményezhet.

Mivel megfigyeltük, hogy a galcanezumab kezelés nemcsak a CGRP-felszabadulást csökkenti, hanem ezzel párhuzamosan a SP felszabadulás fokozódik, ezért azt feltételeztük, hogy a CGRP-ellenes antitestek migrén prevenciók hatása nemcsak a CGRP expressziójának és hatékonyságának csökkenésével magyarázható, hanem legalább részben szerepe lehet a stimulált terminálisokból felszabaduló SOM megnövekedett mennyiségének is. Ennek megfelelően elképzelhetőnek tartottuk, hogy a SOM fokozott expressziója és felszabadulása — szisztémás fájdalomcsillapító hatásán keresztül — hozzájárulhat a kezelés jótékony hatásához.

A kapszaicinról korábban kimutatták, hogy képes SOM-felszabadulást indukálni különböző szövetekben, viszont a trigeminális ganglion neuronjainak csak körülbelül 8%-a expresszálja ezt a neuropeptidet. Ezért annak érdekében, hogy mérhető választ kapjunk a SOM-felszabadulás tekintetében, kapszaicin helyett KCl oldatot használtunk, mint erőteljes depolarizáló ingert, amely nemcsak a kapszaicinre érzékeny neuronpopulációt aktiválja.

Eredményeink nemi különbséget mutattak a bazális SOM-felszabadulásban a kontroll állatok esetében: a nőstényeknél magasabb értékeket mértünk, mint a hímeknél. Azonban a bazális és stimulált SOM-koncentrációk között nem mutatkozott szignifikáns eltérés sem az oldószerrel kezelt, sem a galcanezumabbal kezelt csoportban. Ez arra utal, hogy valószínűtlen, hogy a galcanezumab kezelés fájdalomcsillapító hatásához a megnövekedett SOM-felszabadulás érdemben hozzájárulna.

4. Hisztaminfelszabadulás patkány dura materéből

A dura materben nem figyeltünk meg kolokalizációt a Cy3-galcanezumab és a hízósejtek jelenlétét jelző immunhisztokémiai módszerrel kimutatott hisztamin között. Ugyanakkor a fluoreszcensen jelölt erek, a CGRP-immunoreaktív afferens idegrostok, valamint a hízósejtek egymáshoz közeli elhelyezkedése morfológiai alapot szolgáltathat a CGRP-ellenes antitestek által közvetített, a hízósejtek funkcióját módosító hatások feltételezéséhez. Kísérleteinkben a hisztaminfelszabadulást, mint a hízósejtek aktivációját jelző markert mértük. A különböző hízósejt-degranuláló ágensek eltérő hatásokat mutattak a hisztaminfelszabadulás mértékére, ami arra utal, hogy a galcanezumab kezelés módosíthatja a hízósejt-mediált jelátvitel amplifikáló hatását, anélkül, hogy megváltoztatná a hízósejtek hisztamin tartalmát.

Jelenlegi eredményeink arra utalnak, hogy az antitest kezelés által indukált CGRP-receptor komponens változások nemcsak a neuronokat, hanem a trigeminális nociszenzor komplex más komponenseit is érinthetik, mint például a CGRP-receptort expresszáló hízósejteket.

Egyelőre nem ismert, hogy mi okozza a bazális hisztaminfelszabadulásban mért különbséget az oldószerral és a galcanezumabbal kezelt állatok között. A galcanezumabbal kezelt patkányokban mért spontán felszabaduló hisztamin magasabb koncentrációja felveti annak lehetőségét, hogy a hízósejtek receptorainak számában és/vagy funkciójában bekövetkező változások állhatnak a háttérben, amelyeket a szöveti metabolitok enyhe, alapállapotban is fennálló stimulációja válthat ki.

5. Klinikai relevancia

A tézis egyik kulcskérdése: hol fejtenek ki hatást a CGRP-ellenes antitestek a trigeminális nociceptív pályán? A CGRP-t célzó antitestek migrénmegelőző hatását a trigeminovaskuláris rendszer perifériás hatásaként értelmezik, mivel az antitestek átjutása a vér-agy gáton a központi idegrendszerbe korlátozott. A trigeminális ganglion és a trigeminális nociceptorok perifériás axonjai, amelyek a dura matert is innerválják, nem védettek a vér-agy gát által, így valószínűsíthető, hogy ezek a struktúrák az antitest kezelés célpontjai.

Kísérleti eredményeink arra utalnak, hogy a CGRP-ellenes antitestek hatásmechanizmusa összetett. Nemcsak a felszabadult CGRP semlegesítésére korlátozódik, hanem képes lehet módosítani a CGRP-vel együtt koexpresszálódó egyéb neuropeptidek termelését és/vagy felszabadulását is. Emellett a trigeminális neuronok CGRP receptorainak expressziójában vagy funkciójában bekövetkező változások, valamint a trigeminális

nociszenzor komplex más komponenseiben bekövetkező változások megakadályozhatják a trigeminális neuronok érzékenyítését. Ezáltal csökkenhet a nociceptív és vaszkuláris válaszok intenzitása.

VII. KÖVETKEZTETÉS

A migrén a primer fejfájás egyik típusa, amely elsősorban nőket érint. A CGRP-hez kötődő monoklonális antitestek napjainkban a migrén megelőzésére alkalmazott gyógyszerek. Jelenleg pontos hatásmechanizmusuk még nem tisztázott, de egyre több bizonyíték utal arra, hogy védik a trigeminális afferens idegrostokat a szenzitizációval szemben.

Kísérleteink során patkányokban kimutattuk, hogy a CGRP-ellenes galcanezumab antitesttel történő kezelés hosszú távú, sokoldalú változást okoz a trigeminovaszkuláris nociszenzor komplex működésében. A fluoreszcens módon jelölt galcanezumab főként a dura mater arterioláiban és a trigeminális ganglionban halmozódott fel, amelyek nem állnak a vér-agy gát védelme alatt. A CGRP-ellenes antitest kezelés ellentétes irányú változásokat idézett elő a CGRP- és SP-felszabadulást illetően; a CGRP-felszabadulása csökkent, míg a SP szintje megnövekedett a trigeminális nociceptorok TRPV1 receptorainak aktiválásakor. Ezzel ellentétben a SOM, amely szisztémás antinociceptív hatással rendelkezik, nem mutatott változást az antitest kezelés hatására.

A CGRP aktiváló hatása a trigeminális nociszenzor komplex nem neuronális elemeire, különösen a dura mater hízósejtjeire mérséklődik az antitestkezelést követően. A trigeminális aktiváció hatására felszabaduló pronociceptív és antinociceptív mediátorok közötti egyensúly eltolódása hozzájárulhat a CGRP-ellenes antitest kezelés hatékonyságához.

Megfigyeléseink alapján a trigeminovaszkuláris rendszer aktivitása és a CGRP-ellenes antitestekkel szembeni érzékenysége kifejezettebb volt nőstény állatokban, ami összhangban áll a migrén nemi különbségeket mutató klinikai prevalenciájával.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni mély hálámat konzulensemnek, Dux Mária Professzor Asszonynak, hogy a szárnyai alá vett, és fáradhatatlanul támogatta és irányította a munkámat. Köszönetet szeretnék mondani Németh Krisztinának az együttműködésért és azért, hogy biztosította számunkra a fluoreszcens módon jelölt antitesteket, amelyek alapvetőek voltak kísérleteinkhez. Hálás vagyok Sály Gyula Professzor Úrnak, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy PhD hallgató lehessenek az Élettani Intézetben. Köszönettel tartozom volt kollégáimnak is az Élettani Intézetben, akik mellettem álltak, és még a legnehezebb napokon is igyekeztek biztatással és jókedvvel támogatni.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném hálámat kifejezni és megköszönni családomnak és barátaimnak, hogy végigkísértek ezen az úton, és akkor is hittek bennem, amikor én magam is elbizonytalanodtam. Az ő töretlen támogatásuk nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.