

**A NOCICEPTÍV ELSŐDLEGES ÉRZŐNEURONOK
MORFOLÓGIÁJÁNAK ÉS FENOTÍPUSÁNAK VÁLTOZÁSA
NEUROTOMESIS ÉS PERINEURÁLIS KAPSZAICIN KEZELÉS
UTÁN**

PhD Tézis összefoglaló

Szigeti Csaba

Témavezetők:

Jancsó Gábor, MD, PhD, DSc

Sántha Péter MD, PhD

**Szegedi Tudományegyetem,
Általános Orvostudományi Kar
Élettani Intézet**

**Szegedi Tudományegyetem,
Természettudományi és Informatikai Kar
Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszék**

Szeged

2011

1. Bevezetés

A perifériás idegek kóros mechanikai, kémiai és metabolikus hatások vagy immunfolyamatok következtében kialakuló károsodása az érző, motoros és vegetatív idegrostok működésének zavarához vezet. A perifériás ideg folytonosságának teljes megszűnését eredményező sérülések (neurotmesis) sokszor neuropátiás fájdalommal és fájdalmas dizesztéziás állapotokkal társulhatnak. Ezért a perifériás idegek átmetszése a neuropátiás fájdalom gyakran használt kísérletes állatmodelljévé vált. Az érző idegrostok eredő idegsejtjeit tartalmazó hátsógyöki dúcokat (dorsal root ganglion, DRG) különböző funkcionális, morfológiai és neurokémiai sajátosságokkal rendelkező elsődleges érző ganglionsejtek alkotják. A velőtlen, C-rostokkal rendelkező kis érző neuronok nagy többsége érzékeny a kapszaicin szelektív szenzoros izgató és neurotoxikus hatásával szemben. A kapszaicin-szenzitív neuronok többsége fájdalmas termális és kémiai ingereket közvetít és gyakorlatilag minden nociceptív érző ganglionsejt kifejezi a kapszaicin/tranziens receptor potenciál vanilloid 1-es típusú (TRPV1) receptort.

Patkányban a n. ischiadicus átmetszése a sérült elsődleges érző neuronokban napok alatt kifejlődő és akár hónapokig fennmaradó neurokémiai és morfológiai változásokat okoz. A gerincvelő szomatotopiásan megfelelő régióiban a primer afferens idegvégződések transzganglionáris degeneratív elváltozásait is kimutatták, amelyeket a degenerálódó primér afferensek helyére benövő egyéb afferens idegek regeneratív folyamatai követhetnek. Hisztokémiai vizsgálatok arra utaltak, hogy a perifériás ideg átmetszése után az érintett idegbe injiciált cholera toxin B alegység (CTB) transzganglionárisan transzportálódik és megjelöli a hátsó szarv felületes rétegeit is. Mivel az intakt idegbe injiciált CTB nem jelöli a substantia gelatinosát – a velőtlen afferensek projekciós területét – és a CTB-t a velős idegrostok specifikus markerének tartották, a jelenséget a velős primer afferenseknek a hátsó szarv felületes rétegeibe történő benövésével (sprouting) magyarázták. A velőtlen hátsógyökér rostok és a kis DRG neuronok fokozott CTB jelölődése, illetve a CTB és egyes nociceptív neuron-specifikus markerek kolokalizációja azonban megkérdőjelezte a „sprouting” hipotézist. A CTB C-rostokban történő retrográd axonális transzportjának kapszaicinnal történő szelektív blokkolása után csak a hátsó szarv mélyebb rétegei – a velős primer afferensek projekciós areai – mutattak CTB jelölődést, míg a substantia gelatinosa nem jelölődött. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a substantia

gelatinosa idegsérülést követő fokozott CTB jelölődése nem a velős afferenseknek a hátsó szarv felületes rétegeibe történő benövésével, hanem a velőtlen primer afferensek kémiai fenotípusának megváltozásával magyarázható. Vizsgálataink egyik fő célja a kapszaicin-szenzitív afferenseknek a „sprouting” jelenségben betöltött szerepének további tisztázása volt. Ezért kapszaicinnal újszülöttkorban előkezelt állatokban, amelyekben a C-rost primer afferens neuronok a kezelés következtében elpusztulnak, vizsgáltuk a CTB transzganglionáris transzportját a n. ischiadicus átmetszését követően.

Axotómiát követően a C-rost elsődleges afferens neuronok egyik legjellemzőbb funkcionális változása a kapszaicin szenzitivitás elvesztése. A perifériás idegek lokális kapszaicin kezelése, amely szelektív regionális kémiai és termális analgéziát hoz létre, szintén az érző neuronok kapszaicin érzékenységének csökkenésével illetve elvesztésével jár. Mivel a neuronális kapszaicin-érzékenység alapvetően a TRPV1 receptor expressziójának függvénye, az értekezésben összefoglalt vizsgálatok további célját a TRPV1 receptor mRNAs és fehérje axotómiát és perineurális kapszaicin kezelést követő változásainak vizsgálata képezte.

2. Célkitűzések

Kísérleteinkben célul tűztük ki a kemoszenzitív elsődleges érző neuronok perifériás idegsérülést követő centrális neuroplasztikus változásokban betöltött szerepének tisztázását, illetve a perineurális kapszaicin kezelés hatására kialakuló szelektív kémiai és termális analgészia lehetséges molekuláris mechanizmusainak azonosítását. A tézisben bemutatott kísérletek célkitűzései a következőkben foglalhatók össze:

1. a kapszaicin-szenzitív primér szenzoros neuronok szerepének tisztázása a perifériás idegek sérülését követő „sprouting” jelenség mechanizmusában;
2. az elsődleges érző neuronok osztályozása a TRPV1 receptor expressziója alapján;
3. a primer szenzoros neuronok kapszaicin/TRPV1 receptor expressziójának vizsgálata nem specifikus traumás és specifikus kémiai idegi léziót követően és,
4. a perineurális kapszaicin kezeléssel kiváltott analgészia molekuláris mechanizmusainak tisztázása.

3. Anyagok és módszerek

Perineurális kapszaicin kezelés és perifériás idegátmetzés

Az állatokban a n. ischiadicust mindkét oldalon feltártuk, a jobb oldali ideget 1% kapszaicin oldattal, a bal oldali ideget pedig a kapszaicin oldószerével kezeltük. A n. ischiadicus átmetzését az idegre helyezett ligatúrától distalisan végeztük; kontrollként ál-műtött állatok szolgáltak. Az állatokat 3, 14 és 30 nappal a kezeléseik után dolgoztuk fel.

Spinális ganglionsejtek és afferensek jelölése CTB konjugátummal

Újszülött (2 napos) patkányoknak egyszeri, szubkután kapszaicin (50 mg/kg) vagy oldószer injekciót adtunk. Három hónap múlva a kezelt és kontroll állatokban a jobb n. ischiadicust átmetstettük, majd újabb két hét elteltével az átvágott és az intakt idegbe 1 µl, 2%-os CTB-tormagyökér peroxidáz (HRP) konjugátumot injektáltunk. Három nappal később a lumbalis spinalis ganglionokban és gerincvelői szegmentumokban a HRP enzimaktivitást Mesulam módszerével mutattuk ki.

Oligonukleotid ribopróba szintézis és in situ hibridizáció

Patkány ggl. trigeminale-ből totál RNS-t izoláltunk, dT17-adapter primerrel reverz transzkripciót végeztünk. A cDNS templátot a következő primer kombinációkkal RT-PCR-ra használtuk (forward primer: 5'-AACCATGGAACAACGGGCTAGC-3'; reverse primer: 5'-AACTCGAGTTAGAACAGAGCTGACA-3'). A T7, vagy SP6 polimerázokkal végzett *in vitro* transzkripciót követően, a szensz és antiszensz cRNS próbák digoxigenin jelöléséhez DIG RNA labelling kitet használtunk. A gerincvelői érződúcokat eltávolítottuk, a fagyasztott sorozatmetszeteket digoxigenin-11-UTP-jelölt cRNS próbával hibridizáltuk. RNase A kezelés és blokkolás után a metszeteket alkalikus foszfatáz-konjugált anti-digoxigenin antitesttel inkubáltuk. Az enzimreakciót nitro blue tetrazolium és 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate kromogénekkal vizualizáltuk.

Quantitatív RT-PCR mérések

Az L5 gerincvelői érződúcokat Trizol reagensben gyűjtöttük. A kvantitatív RT-PCR-t triplikátumokban, SYBR Green technikával, BioRad MyiQ5 Real Time Detection System segítségével a következő primer kombinációkkal végeztük. TRPV1: 5'-TGTCTTCCGGGCAACGTCCA-3'; 5'-AAGCGCCTGACTGACAGCGA-3'; beta-2-microglobulin referencia gén: 5'-TCTCCGGTGGATGGCGAGAGT-3'; 5'-GCTCGCTCGGTGACCGTGATC-3'. A TRPV1 mRNS expressziójának relatív változását a Pfaffl módszerrel határoztuk meg.

TRPV1 immunhisztokémia

Az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk, az L5 gerincvelői érződúcokból transzverzális fagyasztott sorozatmetszeteket készítettünk, amelyeket anti-TRPV1 elsődleges és biotin-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltunk. Az immunreakciót Vectastain ABC Elite staining kit-tel vizualizáltuk.

Szemikvantitatív denzitometria és a DRG neuronok osztályozása

A kezelt és kontroll érződúcokról azonos paraméterekkel mikrofotogramokat készítettünk, a jól definiálható maggal rendelkező neuronok szürkességi értékét (gray value, GV, 0-255) és átmetszeti területét (cross-sectional area, CSA) meghatároztuk. A relatív optikai denzitást (ROD) a $ROD = \log_{10} (255/(255-GV))$ egyenlet alapján határoztuk meg. A ROD érték DRG neuron alpopulációk közti klasszifikációs hatását diszkriminancia analízissel vizsgáltuk. Az optimális elválasztás küszöbértékeinek meghatározásához a receiver operating characteristic (ROC) módszert alkalmaztuk.

Western blot és statisztika

Az érződúc homogenátumok fehérjekoncentrációjának meghatározását a Lowry-módszerrel végeztük. A fehérje mintákat 12%-os SDS-poliakrilamid gélen szeparáltuk, majd polyvinylidene difluoride membránra transzferáltuk. Blokkolást követően a membránokat anti-TRPV1 és anti- β -actin elsődleges, majd peroxidáz-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Az immunoreaktív sávokat az

enhanced chemiluminescence módszerrel detektáltuk. A denzitometriás méréseket az ImageJ analysis szoftverrel végeztük. Statisztikai analízishez SPSS szoftvert, ANOVA és Holm-Sidak, Brown-Forsythe vagy Bonferroni teszteket használtunk. Az eltéréseket $p < 0,05$ esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények és megbeszélés

Neonatólis kapszaicin kezelés hatása a spinális elsődleges afferensek transzganglionáris CTB-HRP jelölődésére

Kontroll állatokban, a CTB-HRP intakt idegbe történő injekciója a gerincvelői hátsószarv mélyebb lamináinak jelölődését eredményezte. A CTB-HRP krónikusan átmetszett idegbe történt injektálását követően azonban a mélyebb rétegek mellett a substantia gelatinosa és a marginális zóna erős, homogén jelölődést mutatott. Ezzel szemben, a neonatólis kapszaicin előkezelés gyakorlatilag teljesen meggátolta a hátsószarv felületes lamináinak CTB-HRP jelölődését. Ezek a megfigyelések bizonyítékot szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy a perifériás idegek átmetszését követően a substantia gelatinosa fokozott CTB jelölődéséért nem a velős afferenseknek a hátsó szarv felületes rétegeibe történő benövése, hanem a C-rost elsődleges afferens neuronok fokozott CTB-HRP felvétele és transzportja, azaz fenotípus váltása játszik szerepet. Az L5 gerincvelői dúcban a CTB-HRP jelölt érző neuronok méret-eloszlásának fénymikroszkópos analízise is alátámasztotta a fenti megfigyeléseket. Kontroll állatokban a CTB-HRP-t elsősorban nagy DRG neuronok transzportálták, míg idegátmetszést követően sok kis DRG neuronban is megjelent a CTB-HRP. A neonatólis kapszaicin kezelést követő, a kisméretű velőtlen axonokkal rendelkező kemoszenzitív primer afferens neuronokra gyakorolt szelektív neurotoxikus hatás következtében a kis DRG neuronok arányában drasztikus csökkenést figyeltünk meg. Ezen állatokban, az intakt ideghez tartozó ganglionokban CTB-HRP jelölődést elsősorban a nagy DRG neuronokban detektáltunk, míg az átmetszést követően a jelölt sejtek arányának növekedése minden mérettartományban megfigyelhető volt. A velős primer afferensek fokozott CTB-HRP felvétele és transzportja tehát független a C-rost primer afferens neuronok integritásától.

A TRPV1 mRNS és fehérje lokalizációja patkány L5 érződúcaiban

A kontroll érződúcokban a TRPV1 mRNS és fehérje expresszió alapján, három eltérő neuron csoportot különböztettünk meg. A C és B típusú neuronokat kis, illetve közepes sejt méret és magas, vagy közepes ROD érték jellemezte. Az A típusú neuronok populációja különböző méretű, alacsony ROD értékű sejtekből állt. A C és B típusú neuronok a teljes neuronpopuláció 19% és 29%-át alkották. A két sejtípust magas, illetve közepes TRPV1 expresszióval rendelkező sejteknek tekintettük. A teljes neuronpopuláció 51%-át alkotó A típusú neuronokat TRPV1-negatív sejt-ként osztályoztuk. A sejt méret és a TRPV1-intenzitás ROD értéke alapján a TRPV1-et expresszáló DRG neuronok statisztikai módszerekkel (ROC analízis) egyértelműen elkülöníthetők voltak.

Perineurális kapszaicin kezelés és perifériás idegátmetzés hatása a TRPV1 mRNS expressziójára

Kísérleteink a TRPV1 mRNS expresszió (C + B sejtek) korai markáns csökkenését mutatták a perineurális kapszaicin kezelést követő harmadik naptól (kontroll érték 19%-a). A későbbi túlélési időpontokban azonban jelentős restitúciós tendenciát figyeltünk meg, amelynek során a 30 napos túlélési időpontban a TRPV1 mRNS expresszió markáns, statisztikailag szignifikáns emelkedése elérte a kontroll szint mintegy 60%-át. A perifériás idegátmetzés szintén gyors, jelentős TRPV1 mRNS expresszió csökkenéshez vezetett. A kapszaicin kezeléssel ellentétben azonban, a TRPV1 mRNS expressziója az átmetzést követően a kísérlet teljes időtartama alatt alacsony szinten maradt, restitúciót nem tapasztaltunk. Kvantitatív RT-PCR méréseink alátámasztották ezeket az eredményeket: a TRPV1 (B2Mg referenciagénre normalizált) expressziós szintje már a perineurális kapszaicin kezelést követő harmadik naptól drámai csökkenést (kontroll érték 18%-a) mutatott. A későbbi időpontokban szintén megfigyelhető volt egy restitúció, amely a 30 napos túlélési időpontban a korai 3 napos értékekhez viszonyítva statisztikailag szignifikánsnak bizonyult. Idegátmetzés után tapasztaltunk ugyan kisebb mértékű emelkedést a TRPV1 mRNS expresszióban, ez azonban a 30 napos túlélési időpontban sem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét.

Perineurális kapszaicin kezelés és perifériás idegátmetzés hatása a TRPV1 fehérje expressziójára

Az immunhisztokémia a TRPV1-pozitív DRG neuronok arányának jelentős csökkenését (a kontroll szint 30%-a) mutatta ki három nappal a perineurális kapszaicin kezelést és perifériás idegátmetzést követően egyaránt. A csökkenés különösen a C típusú sejtek esetében volt markáns (kb. 85%-os csökkenés). A későbbi időpontokban restitúciót nem figyeltünk meg. A Western-blot analízis megerősítette, hogy az érintett ganglionokban a TRPV1 fehérje expressziója mind a perineurális kapszaicin kezelést, mind pedig a perifériás idegátmetzést követően az összes vizsgált időpontban tartósan alacsony szinten maradt.

Eredményeink arra utalnak, hogy az elsődleges érző neuronok TRPV1 expressziójának (poszt-) transzkripciós szabályzó mechanizmusai és ezek hosszú távú változásai nem a DRG neuronok típusától, hanem az őket ért különböző károsító tényezők sajátosságaitól függenek. Kimutattuk, hogy a perifériás idegátmetzés a TRPV1 receptort expresszáló DRG neuronok arányában egy legkevesebb 4 hétig fennmaradó csökkenést hozott létre, amelyet a TRPV1-immunreaktív neuronok arányának hasonlóan hosszan tartó és szignifikáns csökkenése kísért.

Ezzel szemben, perineurális kapszaicin kezelést követően az L5 DRG neuronok TRPV1 mRNS és fehérje expressziójában eltérő változásokat tapasztaltunk. A TRPV1 mRNS expresszióját egy korai csökkenést követő restitúciós tendencia jellemezte. A TRPV1 immunreaktivitás vizsgálata azonban a receptor fehérje tartósan alacsony expressziójára utalt. A perineurális kapszaicin kezelést követő hosszú távú, irreverzibilis funkcionális hatások, mint pl. a vanilloidok által kiváltott kemogén fájdalom és neurogén gyulladás elmaradása, a TRPV1 receptor protein expressziójának csökkenésével magyarázható. A TRPV1 protein szintjének csökkenése képezheti a molekuláris alapját a perineurálisan alkalmazott kapszaicin szelektív analgézis, anti-hiperalgézis és anti-inflammatórikus hatásainak is.

Eredményeink alapján, a nociceptív ioncsatornák expressziója (poszt-)transzkripciós szabályozásának befolyásolása, pl. specifikus siRNS molekulák alkalmazásával, hatékony molekuláris biológiai megközelítés lehet a nociceptív neuronok működésének befolyásolására és hatékony fájdalomcsillapító eljárások kidolgozására.

5. Összefoglalás

Az értekezésben ismertetett vizsgálatok főbb eredményeit a következőkben foglalhatjuk össze:

1. Megállapítottuk, hogy a gerincvelő hátsó szarvának felületes rétegeiben a CTB-pozitív primer afferensek megoszlásában idegsérülést követően kimutatható változások nem a velős primer afferenseknek a substantia gelatinosaba történő benövésével („sprouting”), hanem a C-rost primer afferens neuronok fenotípusának megváltozásával magyarázhatóak.
2. Morfometriai és statisztikai módszerekkel a TRPV1 mRNS és protein expresszió alapján a hátsógyöki ganglionsejtek különböző csoportjait azonosítottuk és jellemeztük.
3. A perifériás idegek átmetszése a TRPV1 mRNS expresszió és protein tartalom gyorsan bekövetkező és tartós csökkenését hozza létre az érintett primer szenzoros neuronokban.
4. A perifériás idegek lokális (perineurális) kapszaicin kezelése a neuronális TRPV1 protein szint markáns és tartós csökkenését hozza létre. A kezelés a TRPV1 mRNS expresszió korai, szignifikáns csökkenését eredményezi, amelyet azonban jelentős restitúció követ.
5. A TRPV1 protein expressziójának jelentős és tartós csökkenése molekuláris alapját képezheti a perineurálisan alkalmazott kapszaicin analgéziás és anti-hyperalgéziás hatásainak.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Prof. Dr. Jancsó Gábornak, a SZTE ÁOK Élettani Intézet vezetőjének, a lehetőségért, hogy intézetében dolgozhattam, irányításáért és értékes segítségéért tudományos és emberi oldalon egyaránt, illetve Dr. Sántha Péternek segítségéért és emberi hozzáállásáért a munka teljes időtartama alatt. Köszönöm Prof. Dr. Gulya Károlynak az SZTE ÁOK-TTIK Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszék vezetőjének a segítségét és hogy támogatott abban, hogy oktatási és kutatási tevékenységeimet párhuzamosan két intézetben végezhessem. Köszönöm Dr. Nyári Tibornak eredményeink statisztikai

interpretációjában nyújtott segítségét és Dr. Dux Máriának tudományos tanácsait. Hálás vagyok Hegyeshalmi Évának, Ambrus Zsuzsának és Darányi Olgának a precíz technikai segítségükért. Köszönetemet fejezem ki a két intézet minden munkatársának, akik segítségemre voltak a munkafolyamat bármely fázisában. Végül, de nem utolsó sorban szeretném hálámat kifejezni Családomnak a támogatásukért, megértésükért és türelmükért, amellyel minden tekintetben biztosították a háttérrel a tudományos munkámhoz.

A tézishoz kapcsolódó tudományos közlemények:

Teljes közlemények:

- I. Jancsó G, Sántha P, **Szigeti C**, Dux M, Selective C-fiber deafferentation of the spinal dorsal horn prevents lesion-induced transganglionic transport of cholera toxin to the substantia gelatinosa in the rat. *Neurosci Lett* **361:204-207, 2004** (IF: 2.1)
- II. **Szigeti C**, Sántha P, Körtvély E, Nyári T, Horváth VJ, Deák É, Dux M, Gulya K, Jancsó G, Disparate changes in the expression of TRPV1 mRNA and protein in dorsal root ganglion neurons following local capsaicin treatment of the sciatic nerve in the rat. *Neuroscience* 2011 Nov 9. [Epub ahead of print] (IF:3.2)

Idézhető absztraktok, konferencia közlemények:

- I. **Szigeti C**, Körtvély E, Sántha P, Nyári T, Gulya K, Jancsó G, Changes in TRPV1 receptor expression following perineural treatment with capsaicin and resiniferatoxin: implications for the analgesic effects of vanilloids. *5th Forum of European Neuroscience, Vienna, Austria, 2006 A215.224, 2006*
- II. **C. Szigeti**, E. Körtvély, P. Sántha, T. Nyári, K. Gulya and G. Jancsó, Effects of traumatic and selective chemical lesions of peripheral nerves on TRPV1 receptor expression: Implications for vanilloid-induced analgesia *European Journal of Pain*, **11, (1), 176, 2007**

Egyéb publikációk:

Teljes közlemények:

- I. **Szigeti C**, Fülöp Z, Gulya K, Branching-pattern analysis of the dendritic arborization in the thalamic nuclei of the rat brain. *Acta Biol Hung* 53: 177-186, 2002 (IF: 0.4)
- II. **Szigeti C**, Kovács B, Körtvély E, Gulya K, Comparison of treatment regimens to sensitize in situ hybridization for low abundance calmodulin transcripts in the white matter of the spinal cord. *Acta Biol Szeged* 47: 1-6, 2003
- III. Oroján I, **Szigeti C**, Várszegi S, Dobó E, Gulya K, Dithranol abolishes UCH-L1 immunoreactivity in the nerve fibers of the rat orofacial skin. *Brain Research* 1121: 216-220, 2006 (IF: 2.3)
- IV. Légrádi Á, Várszegi S, **Szigeti C**, Gulya K, Adult rat hippocampal slices as in vitro models for neurodegeneration: Studies on cell viability and apoptotic processes. *Brain Res Bull* 84 (1): 39-44, 2011 (IF: 2.1)

Idézhető absztraktok, konferencia közlemények:

- I. Gulya K, **Szigeti C**, Várszegi S, Beliczai Z, Simonka JA, Dobó E, Mihály A, Felnőtt patkány csontvelői őssejtszármazékok autológ transzplantációja a központi idegrendszerbe: az in vitro kezelések hatása a reintegrációra *Magyar Ideg- és Elmeorvosok Társaságának 34. Nagygyűlése, Szeged, 2005*
- II. I Orojan, L Bakota, **C Szigeti**, S Varszegi, K Gulya, Orofacial skin inflammation upregulates calmodulin gene expression in the trigeminal nuclei of the rat. *Acta Derm Venereol* 85: 477, 2005
- III. **Szigeti C**, Légrádi Á, Simonka JA, Kása P, Gulya K, Csontvelői eredetű őssejtszármazékok reintegrációjának vizsgálata nucleus basalis magnocellularis specifikus kolinerg lézióját követően *Magyar Élettudományi Társaság LXXIV vándorgyűlése, 2010*
- IV. Légrádi Á, **Szigeti C**, Várszegi S, Gulya K, Sejtpusztulás vizsgálata felnőtt patkány hippocampális szövetszeletekben *Magyar Élettani Társaság LXXIV Vándorgyűlése, 2010*