

**Nocicepcióhoz köthető agytörzsi magok aktivációs
mintázata és modulációja a migrén állatkísérletes
modelljeiben**

Bohár Zsuzsanna M.Sc.

Ph.D. értekezés tézisei

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ
Neurológiai Klinika

Témavezető: Dr. Párdutz Árpád

Szeged

2016

A Ph.D. értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó eredeti közlemények:

- I. Bohár Z,** Nagy-Grócz G, Fejes-Szabó A, Tar L, László AM, Büki A, Szabadi N, Vraukó V, Vécsei L, Párdutz Á.
Diverse effects of Brilliant Blue G administration in models of trigeminal activation in the rat.
J Neural Transm. 2015 Aug 23. [Epub ahead of print]
IF: 2,402 (2014)
- II. Fejes-Szabó A, Bohár Z,** Nagy-Grócz G, Vámos E, Tar L, Pödör B, Tajti J, Toldi J, Vécsei L, Párdutz A.
Effect of Probenecid on the Pain-Related Behaviour and Morphological Markers in Orofacial Formalin Test of the Rat.
CNS Neurol Disord Drug Targets. 2015;14(3):350-9.
IF: 2,628 (2014)
- III. Bohár Z,** Fejes-Szabó A, Tar L, Varga H, Tajti J, Párdutz Á, Vécsei L.
Evaluation of c-Fos immunoreactivity in the rat brainstem nuclei relevant in migraine pathogenesis after electrical stimulation of the trigeminal ganglion.
Neurol Sci. 2013 Sep;34(9):1597-604. doi: 10.1007/s10072-013-1292-1.
IF: 1,495

A kapcsolódó közlemények impakt faktora: 6,525

A Ph.D. értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

- Bohár Z,** Párdutz Á, Vécsei L.
Tryptophan Catabolites and Migraine.
Curr Pharm Des. 2016;22(8):1013-21.
IF: 3,452 (2014)
- Nagy-Grócz G, Tar L, **Bohár Z,** Fejes-Szabó A, Laborc KF, Spekker E, Vécsei L, Párdutz Á.
The modulatory effect of anandamide on nitroglycerin-induced sensitization in the trigeminal system of the rat.
Cephalalgia. 2015 Oct 28. pii: 0333102415613766. [Epub ahead of print]
IF: 4,891 (2014)
- Bohár Z,** Toldi J, Fülöp F, Vécsei L.
Changing the face of kynurenines and neurotoxicity: therapeutic considerations.
Int J Mol Sci. 2015 Apr 29;16(5):9772-93. doi: 10.3390/ijms16059772. Review.
IF: 2,862 (2014)
- Tuboly G, Tar L, **Bohár Z,** Sáfrány-Fárk Á, Petrovszki Z, Kékesi G, Vécsei L, Párdutz Á, Horváth G.
The inimitable kynurenic acid: The roles of different ionotropic receptors in the action of kynurenic acid at a spinal level.
Brain Res Bull. 2015 Feb 9. pii: S0361-9230(15)00031-3. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.02.001.
IF: 2,718 (2014)

Fejes-Szabó A, **Bohár Z**, Vámos E, Nagy-Grócz G, Tar L, Veres G, Zádori D, Szentirmai M, Tajti J, Szatmári I, Fülöp F, Toldi J, Párdutz Á, Vécsei L.

Pre-treatment with new kynurenic acid amide dose-dependently prevents the nitroglycerine-induced neuronal activation and sensitization in cervical part of trigemino-cervical complex.

J Neural Transm. 2014 Jul;121(7):725-38. doi: 10.1007/s00702-013-1146-2.

IF: 2,402

Párdutz A, Fejes A, **Bohár Z**, Tar L, Toldi J, Vécsei L.

Kynurenines and headache.

J Neural Transm. 2012 Feb;119(2):285-96. doi: 10.1007/s00702-011-0665-y.

IF: 3,052

Tajti J, Párdutz A, Vámos E, Tuka B, Kuris A, **Bohár Z**, Fejes A, Toldi J, Vécsei L.

Migraine is a neuronal disease.

J Neural Transm. 2011 Apr;118(4):511-24. doi: 10.1007/s00702-010-0515-3.

IF: 2,73

Vámos E, Párdutz A, Varga H, **Bohár Z**, Tajti J, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L.

l-kynurenine combined with probenecid and the novel synthetic kynurenic acid derivative attenuate nitroglycerin-induced nNOS in the rat caudal trigeminal nucleus.

Neuropharmacology. 2009 Sep;57(4):425-9. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.06.033.

IF: 3,909

Varga H, Párdutz Á, Vámos E, **Bohár Z**, Bago F, Tajti J, Bari F, Vécsei L.

Selective inhibition of cyclooxygenase-2 attenuates nitroglycerin-induced calmodulin-dependent protein kinase II alpha in rat trigeminal nucleus caudalis.

Neurosci Lett. 2009 Feb 20;451(2):170-3. doi: 10.1016/j.neulet.2008.12.038.

IF: 1,925

Összesített impakt faktor: 34,466

Bevezetés

A migrén egy visszatérő rohamokkal jelentkező elsődleges fejfájásbetegség, amely kezelés nélkül 4-72 óráig is tarthat. A fejfájást hányinger, hányás illetve fény- és hangkerülés kísérheti. Az európai populáció 14,7%-a szenved ebben a betegségben, ebből kifolyólag az okozott gazdasági teher jelentős, amely szükségessé teszi a migrén ezeddig nem teljesen ismert pathomechanizmusának feltárására irányuló vizsgálatok folytatását.

A betegség hátterében álló folyamatok magyarázatára az évek folyamán számos elmélet született, azonban ezek közül egyik sem magyarázza a kórkép minden aspektusát és kísérő tünetét. Az első teóriát az 1950-es években dolgozták ki, amely azt feltételezte, hogy az intrakraniális érösszehúzódás okozza az aura tüneteket, míg az extrakraniális értágulat vezet a fejfájáshoz, tehát elsődlegesen vaszkuláris eredetet feltételezett a betegség hátterében. Ezt követően került kidolgozásra a neurogén elmélet, amely szerint a roham az idegrendszerből indul és nem a vaszkulaturából. A két elmélet kombinációjából született meg a neurovaszkuláris elmélet, amely szerint a fejfájás az elsődleges afferensek aktiválódásához köthető, amelyekből gyulladáshoz vezető mediátorok szabadulnak fel, plazma fehérje extravazációt majd neurogén gyulladást okozva. Az elsődleges afferensek aktiválódását kiváltó mechanizmus azonban még nem ismert.

Később megfigyelték, hogy a spontán migrénes roham során aktiválódik a híd dorsolaterális valamint a középagy dorsalis része. Az aktivációban érintett magok a nucleus raphe magnus (NRM), a nucleus raphe dorsalis (DR), a locus coeruleus (LC) és a periaqueductalis szürkeállomány (PAG), amelyek aktivitása a migrén specifikus sumatriptan kezelés után is fennmarad. Ezen magok jellegzetes aktivációja szolgáltatta az alapot a migrén generátor elmélet megszületéséhez, amely szerint a fent említett magok megváltozott működése vezet a migrénes roham kialakulásához. Azonban még nem tisztázott, hogy a tapasztalt aktiváció a migrénes roham valódi oka, avagy a megélt fájdalomhoz köthető másodlagos jelenség. A migrén generátor magok mindegyike az endogén fájdalommoduláló rendszer tagja, de a migrénes roham során betöltött szerepük még nem tisztázott.

A fejfájás kialakulásának megértéséhez elengedhetetlen a trigeminális rendszer működésének ismerete. A fej területéről a trigeminális ideg három ága szállítja a fájdalomérző információt a szenzoros ganglionba, a Gasser-dúcba. Innen a centrális nyúlványok továbbhaladva a felső gerincvelői szegmentumok valamint a *nucleus tractus spinalis nervi trigemini pars caudalis* (TNC) felszíni lamináiban kapcsolódnak át a másodlagos neuronokra, megalkotva a trigemino-cervikális komplexet.

A migrén pathomechanizmusának vizsgálatára használt állatmodellek közül az egyik a trigeminális ganglion elektromos ingerlése (ESTG). Az elektromos ingerlés aktiválja mind az elsődleges mind a másodlagos neuronokat, neuropeptid felszabadulást és plazma protein extravazációt okoz, amelyek perifériás neurogén gyulladáshoz vezetnek. A TNC-ben megnöveli a c-Fos immunreaktív sejtek számát, amely a neuronok aktiválódását jelzi. A c-Fos immunreaktivitás növekedés erősen függ az alkalmazott ingerlés áramerősségétől és frekvenciájától, ezért tanácsos több ingerlési beállítás alkalmazása egy kísérleten belül.

Az orofaciális régióba adott szubkután (s.c.) formalin injekció a trigeminális gyulladással járó fájdalom vizsgálatára általánosan használt modell. Az állatokban viselkedési és molekuláris válaszok is megfigyelhetők a formalin beadását követően. A viselkedési válasz az oltott terület vakarásával, dörzsölésével eltöltött idővel mérhető, amely válasz bifázisos, az első fázis intenzívebb, de rövid ideig tartó, míg a második fázis elnyújtottabb és kevésbé intenzív viselkedési válasszal jellemezhető.

Az ATP molekulának fontos szerepet tulajdonítanak a nociceptív transzmisszió szabályozásában. Receptorait két nagy csoportba lehet osztani, a P2X és a P2Y receptorok családjára. A ligand-függő P2X receptorok közül a P2X7 receptor (P2X7-R) szerepét több fájdalom szindróma esetében is vizsgálták. Ez a receptor egy nem-szelektív kation csatorna, amelynek jelentősége lehet a nocicepció szabályozásában. A Brilliant Blue G-250 (BBG) a P2X7-R szelektív, nem kompetitív antagonistája, amely korábbi vizsgálatokban hatásosnak bizonyult neuropátiás fájdalom modellekben, valamint a migrén nitroglicerinnel (NTG) indukált állatmodelljében is. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a P2X7-R alapvető szerepet játszhat a fejfájások kialakulásában.

A probenecid (PROB, *p*-(di-*n*-propil szulfamoil)benzoesav) egy nem szelektív szerves sav transzporter és multidrog rezisztancia-asszociált fehérje (MRP) gátló vegyület, amelynek fájdalom- és gyulladáscsillapító hatásokat tulajdonítanak. A migrén NTG modelljében is kedvező hatásának bizonyult, amely arra utal, hogy a migrén kialakulásában lejátszódnak folyamatokat is befolyásolhatja.

Célkitűzések

A jelen vizsgálatokkal célunk volt:

- I. Megvizsgálni a migrén generátor magok aktivációs mintázatát a trigeminális ganglion elektromos ingerlése után különböző túlélési idők alkalmazásával patkányban.
- II. Feltárni a P2X7-R antagonistá BBG hatását a TNC neuronális aktivitására a trigeminális ingerlés két különböző paraméterekkel kiváltott kísérleti összeállításában.
- III. Tanulmányozni a BBG hatásait az orofaciális formalin tesztben magatartási és immunhisztokémiai vizsgálatokkal patkányban.
- IV. Vizsgálni a probenecid magatartásra és nociceptív aktivációra gyakorolt hatásait a patkány orofaciális formalin modelljében.

Anyagok és módszerek

A kísérletek elvégzését a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (I-74-14-16/2008; I-74-12/2012) és a Csongrád Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága engedélyezte (XI./15.1/02384/001/2007; XXIV/352/2012). Vizsgálatainkban felnőtt hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk.

Aktivációs mintázat trigeminális ingerlés után

Huszonhat patkányt két csoportra osztottunk. Az első csoport (n=13) állatainak mély klorál-hidrát anesztéziában koncentrikus bipoláris elektródát helyeztünk a jobb oldali trigeminális ganglionjába és 30 percre benne hagytuk. A második csoport (n=13) állatainál az elektródán keresztül 10 Hz frekvenciájú, 0,5 mA áramerősségű 5 ms időtartamú négyszögimpulzusokkal ingerlést alkalmaztunk 30 percig.

Minkét csoportból 7-7 állatot transzkardiálisan perfundáltunk két órával az elektródák behelyezése után, míg a maradék 6 állat 4 órával az elektródák behelyezése után került feldolgozásra. Az agyakat és a felső cervikális gerincvelőt eltávolítottuk, majd egy éjszakán át posztfixáltuk.

Krioprotekció után TNC-ből és az agytörzsi magokat tartalmazó blokkból 30 μ m vastag sorozatmetszeteket készítettünk, majd immunhisztokémiai festést végeztünk a c-Fos

fehérje detektálására. A sejteket megszámláltuk a TNC-ben, az NRM-ben, a PAG-ban valamint a LC-ben, majd kiszámoltuk a területre (μm^2) eső sejtszámot.

BBG vizsgálata trigeminális aktiváció után

Enyhe ingerlési beállítások

Huszonegy állatot ismét két csoportra osztottunk, az állatok egyik fele intravénás (i.v.) BBG injekciót kapott 50 mg/kg dózisban, míg az állatok másik fele fiziológiás sóoldatot kapott. Két órával az i.v. oltások után az állatokat elaltattuk, majd a sóoldattal kezelt (5SSstim) és a BBG-vel kezelt (5BStim) csoportból is az állatok felének jobb oldali trigeminális ganglionját 5 Hz frekvenciával 0,5 mA áramerősséggel 0,5 ms késleltetett négyszögimpulzusokkal ingereltük 5 percig. A csoportok másik fele álműtéten esett át, az elektródát a ganglionba engedték, de ingerlést nem végeztünk (5SSham és 5BSham csoportok). A beavatkozásokat követően az állatokat 2 óráig mélyaltatásban tartottuk, majd perfundáltuk és c-Fos valamint calcitonin gén-relációs peptid (CGRP) immunhisztokémiai festést végeztünk.

Erős ingerlési beállítások

Huszonegy állatot használtunk fel, a kezelési és műtéti protokollok megegyeztek az előzőekben ismertetettekkel, azzal a különbséggel, hogy az ingerlési paramétereket 10 Hz, 0,5 mA, 0,5 ms késleltetésű négyszögimpulzusokra változtattuk, az állatokat 30 percig ingereltük, és 4 órán át tartottuk altatásban a perfúzió előtt. Az ingerlési paraméterek megegyeznek az aktivációs mintázatok vizsgálatánál alkalmazottakkal.

Az erős ingerlési beállítású csoportok áttekintése:

Fiziológiás sóoldat + 30-min álműtét: 30SSham (n=6)

Fiziológiás sóoldat + 30-min ingerlés: 30SSstim (n=5)

BBG + 30-min álműtét: 30BSham (n=4)

BBG + 30-min ingerlés: 30BStim (n=6)

Orofaciális formalin teszt

A patkányokat az előzőekhez hasonlóan vagy BBG-vel (50mg/kg) vagy fiziológiás sóoldattal kezeltük i.v.. Egy óra ötven perccel később az állatokat egy 30x30x30 cm-es tükrös falú dobozba tettük. Tíz perc habituáció után kivettük őket a dobozból, és a jobb oldali

bajuszpárnájukba 50 µl 1,5%-os formalint (SForm és BForm csoportok) vagy fiziológiás sóoldatot oltottunk (SSal és BSal csoportok). Az oltás után visszatettük az állatokat a dobozba és viselkedésüket 45 percen keresztül megfigyeltük és videóra rögzítettük. A felvételt 15 db 3 perces blokkra osztottuk, és az oltott terület dörzsölésével, vakarásával eltöltött időt megmértük, ez a másodpercben kifejezett érték számított az adott blokk nociceptív pontszámának. Az SSal és BSal csoportok normál mosakodási viselkedését mértük meg kontrollként. Négy órával a bajuszpárna oltások után az állatokat perfundáltuk, majd c-Fos és CGRP immunhisztokémiai festést végeztünk.

A c-Fos immunreaktív sejteket a TNC különböző magasságaiban megszámoltuk, míg a CGRP pozitív rostok által lefedett területet az ImageProPlus 6.2. szoftver segítségével határoztuk meg. Az adatokat a TNC különböző magasságaiból külön elemeztük kétutas ismételt méréses varianciaanalízis segítségével.

A probenecid hatásának vizsgálata trigeminális aktivációs modellben

Magatartásvizsgálat és immunhisztokémia

Hatvan patkányt két csoportra osztottunk. A placebo csoport állatai intraperitoneális (i.p.) fiziológiás sóoldatot (1,5 ml), míg PROB csoport állatai probenecid (1mmol/kg, 1,5 ml) előkezelésben részesültek. Egy órával az előkezelések után mindkét csoportból az állatok fele s.c. formalin injekciót kapott a jobb oldali bajuszpárnába (50 µl; 1,5 %, Placebo-Form és PROB-Form csoportok) míg az állatok másik fele fiziológiás sóoldatot kapott (Placebo-Phys és PROB-Phys csoportok).

A magatartásvizsgálatok a BBG kísérleteknél ismertetettekkel azonos módon zajlottak, a habituációs periódus az előkezelések után 50 perccel indult.

Négy órával a bajuszpárna oltások után csoportonként 10 állatot perfundáltuk, majd c-Fos és neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) immunhisztokémiai festést végeztünk. A sejtszámolás a korábban ismertetett módon zajlott.

Western blot

Négy órával a bajuszpárna oltások után csoportonként 5 állatot perfundáltunk, majd az ipszi- és kontralaterális TNC-t az obextől caudalisan 0 és 4 mm között eltávolítottuk, lefagyasztottuk, majd a későbbiekben interleukin-1 béta (IL-1β) és β-aktin Western blot vizsgálatot végeztünk.

Eredmények

I. Aktivációs mintázat trigeminális ingerlés után

A trigeminális ganglion ingerlése következtében fellépő TNC aktivációt már számos korábbi tanulmányban leírták. Eredményeink ezekkel a megfigyelésekkel összhangban vannak, a TNC ipszilaterális oldalán egyértelmű aktiváció figyelhető meg, míg a kontralaterális oldalon illetve az álműtött állatokban nem tapasztalható jelentős c-Fos sejtszám emelkedés. A különböző túlélési idők után nem mutatkozik különbség a c-Fos immunreaktív (IR) sejtek számában, habár a 4 órás túlélésű csoportnál csökkenő tendencia fedezhető fel.

Az agytörzsi migrén generátor magok közül csak az NRM esetében találtunk szignifikáns c-Fos sejtszám emelkedést, a többi mag esetében (LC, DR, PAG) nem volt különbség az ingerlés után. Ezen felül oldalkülönbséget sem fedeztünk fel, a kontroll és az ingerelt oldalak sejtszámai hasonlóak voltak. A különböző túlélési idők sem befolyásolták a c-Fos sejtszámokat, egy kivétellel, a LC esetében a 4 órás túlélésű csoportban kevesebb sejt volt látható a 2 órás túlélésű csoporthoz képest. Nem találtunk összefüggést a TNC-beli és az NRM c-Fos pozitív sejtszámainak alakulása között.

II. A BBG hatásai trigeminális aktiváció után

Enyhe stimulációs paraméterek

Az enyhe stimulációs paraméterek esetén a kontroll (bal) oldalak összehasonlítása során nem találtunk különbséget a kezelési csoportok között. A trigeminális ganglion elektromos ingerlése a TNC egész kiterjedésében szignifikáns c-Fos pozitív sejtszám emelkedést okozott az ingerléssel megegyező oldalon. A BBG moduláló hatása csak egyetlen magasságban volt szignifikáns, a TNC rostralis végén -13,89 mm-re a bregmától. A CGRP immnureaktív rostok által lefedett terület vonatkozásában nem találtunk különbséget a csoportok között sem a kontroll sem az ingerelt oldalak esetében.

Erős stimulációs paraméterek

A kezelési csoportok kontroll oldalai között ez esetben sem találtunk különbséget. Az erőteljes stimuláció kifejezett sejtszám emelkedést okozott a TNC egész kiterjedésében főként a felszíni laminákban. A BBG-nek szignifikáns moduláló hatása mutatkozott, csökkentette a

c-Fos pozitív sejtek számát. A CGRP esetében nem találtunk különbséget a kezelési csoportok között.

Orofaciális formalin teszt

A fiziológiás sóoldattal kezelt csoportokban nem tapasztaltunk viselkedésbeli eltérést a bajuszpárna oltások után. A formalin injekció szignifikánsan megnövelte a nociceptív pontszámokat az 1. és az 5-7. blokkban. A BBG előkezelést kapott csoportokban a formalin után szignifikánsan megnőtt a nociceptív pontszám az 1., a 6. és a 8. blokkban a kontrollhoz képest. Továbbá a BBG kezelés hatására az állatok az 1. és az 5-7. blokkban kevesebbet dörzsölték az oltott területet, azonban ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak a formalin kezelt csoporthoz képest. A teszt második fázisa gyorsabban mérséklődött kísérleteinkben az SForm csoportban, mint a BForm csoportban.

Mivel vizsgálatainkban a formalin hatásának két fázisa egyértelműen elkülönült, ezért a nociceptív pontszámokat nem csak blokkonként, hanem a fázisokra összegezve is megvizsgáltuk. Az első fázisban mindkét formalin kezelt csoportban emelkedést tapasztaltunk, hasonlóan a második fázisban is. A fázisonkénti összegzés alapján is elmondható, hogy a BBG-nek nem mutatkozott moduláló hatása a nociceptív viselkedési válaszra ebben modellben.

A c-Fos sejtek számát elemezve a TNC-ben nem találtunk különbséget sem a kontroll oldalak, sem a fiziológiás sóoldattal oltott csoportok értékei között. A formalin kezelés hatására szignifikánsan megnövekedett a c-Fos pozitív sejtszám a TNC-ben, a -16,59 mm magasságtól a -15,51 mm-es magasságig az SSal csoport értékeihez képest. A BBG-vel kezelt csoportban is hasonló eredményt kaptunk, továbbá a SForm és a BForm csoportok között nem mutatkozott különbség a sejtszámok tekintetében egyik vizsgált magasságban sem.

A CGRP immunreaktív rostok által lefedett terület nagyságában nem volt különbség sem a kezelési csoportok, sem a kezelt és kontroll oldalak között.

III. A Probenecid hatásai trigeminális aktivációt követően

A formalin kezelés hatására az első és az 5-11. blokkban tapasztaltunk szignifikáns növekedést a Placebo-Phys és a Placebo-Form csoportok között a nociceptív pontszámok alakulásában. A PROB előkezelés minden blokkban csökkentette a formalin indukált nociceptív viselkedési választ, azonban nem sikerült azt a kontroll szintre csökkentenie az 1.

blokkban, ahol szignifikáns különbség mutatkozott a Placebo-Phys és a PROB-Form csoport értékei között.

A c-Fos sejtszámok alakulásában szignifikáns növekedést tapasztaltunk a formalin kezelt állatokban, amely a rostrocaudalis tengely mentén a -0,3 és a -3,3 mm-es magasságokban a TNC kezdetétől számítva mutatkozott, a szomatotópiás elrendezésnek megfelelően. A PROB-Form csoportban is jelen volt ez a sejtszám emelkedés, de sokkal kevésbé volt kifejezett, mint a Placebo-Form csoportban, a PROB előkezelés szignifikánsan csökkentette a formalin indukált c-Fos sejtszám emelkedést. A kontralaterális oldalakon nem volt változás a sejtszámokban.

A nNOS immunreaktív sejtek számában is növekedést tapasztaltunk a formalin beadását követően, amely a TNC kezdetétől számítva -2,1 és -2,7 valamint -3,3 és -3,9 mm-nél volt szignifikáns a Placebo-Form csoportban az ellenoldalhoz képest. A PROB-Form csoportban nem volt különbség a formalinnal oltott és kontroll oldalak között, a PROB előkezelés szignifikánsan csökkentette a nNOS pozitív sejtek számát a TNC-ben a formalin kezelés után. A csoportok kontralaterális oldalai között nem volt különbség a nNOS sejtszámokat tekintve.

A Western blot vizsgálatok nem mutattak ki különbséget a csoportok ipszi- és kontralaterális oldalai között az IL-1 β szintjében. Ezek alapján az IL-1 β szintje sem a formalin sem pedig a PROB kezelés hatására nem változott.

Megbeszélés

A trigeminális ganglion elektromos ingerlése a primer trigeminális érző neuronokra direkt hatást fejt ki, amely mind a perifériás mind a centrális nyúlványokat érinti. A meningeális ereket beidegző idegvégződésekből mediátor felszabadulás történik, amely plazma protein extravazációhoz és neurogén gyulladás kialakulásához vezet. Centrális irányban pedig a TNC-ben elhelyezkedő másodlagos neuronok kifejezett aktiválódása figyelhető meg. Eredményeink összhangban vannak ezekkel a korábbi megfigyelésekkel, kísérleteinkben emelkedett c-Fos IR sejtszámokat találtunk az ingerlés után két és négy óra elteltével is. Ez az aktivitás növekedés vagy az elektromos ingerlés direkt hatásából származhat, vagy a periférián az ingerlés következtében lezajló folyamatok következménye lehet.

Kíváncsiak voltunk a migrén generátor magok trigeminális ingerlés utáni aktivációs mintázatára patkányban, azért, hogy felmérjük, hogy ez a modell alkalmas-e azon

funkcionális aktivitási mintázat vizsgálatára, amelyet migrénésekben mutattak ki spontán kialakuló fejfájás rohamok során. Az NRM esetében találtunk a neuronális aktivitásban szignifikáns növekedést, amely az ingerlés után 4 órával is jelen volt. A TNC-ből közvetlenül az NRM-be futó rostok száma meglehetősen kevés, és még kevesebb ezeknek a rostoknak a száma a TNC felszínes rétegeiben, ahol a legnagyobb mértékű aktivációt tapasztaltuk. Ebből arra következtethetünk, hogy az NRM aktiválódása feltehetőleg nem a TNC fokozott működésének direkt következménye. Ezt támogatja a két mag c-Fos sejtszám emelkedései közti korreláció hiánya is mind a két mind a négy órás túlélésű csoport esetében. Azonban annak ellenére, hogy a sejtszám változások között nem találtunk kapcsolatot, a változások mindkét magban egy időben vannak jelen. Az NRM a leszálló fájdalommoduláló rendszer fő végrehajtó magja, innen indulnak a trigeminális rendszer és a gerincvelő hátsó szarvának nociceptív működését szabályozó rostok. Eredményeink arra utalnak, hogy az NRM fokozott működésére utaló c-Fos sejtszám növekedés a fájdalommoduláló rendszer aktiválódásának következménye lehet. Az NRM fokozott működése származhat kortikális és thalamikus kapcsolataiból, de eredhet a PAG-ból is, ahonnan az NRM fő bemente származik.

A PAG egyik régiójában sem találtunk az aktivitás megváltozására utaló eltéréseket a c-Fos sejtszámokban. Ezen eredményünk meglepő annak ismeretében, hogy a TNC közvetlenül küld rostokat a PAG-ba, így az alkalmazott erős stimulus következtében létrejövő TNC aktiváció közvetlenül tovább terjedhetne a PAG területére. Korábbi tanulmányokban aktivitás növekedést figyeltek meg a PAG-ban nociceptív ingerlés után, azonban az alkalmazott kísérleti beállítások jelentősen eltértek az általunk alkalmazottaktól.

Szintén nem találtunk eltérést az aktivitási szintben a LC esetében az ingerlés után, habár ennek a magnak az aktivitása már a két órás túlélésű álműtött csoportban is kifejezett volt. Ez arra utalhat, hogy ezen mag esetében a műtéti eljárás elfedheti az elektromos ingerlés által okozott aktivitás változást. Ezt alátámasztja az a megfigyelés is, hogy a négy óra túlélésű álműtött és ingerelt csoportokban is csökkent az LC aktivációs szintje a 2 órás csoportokéhoz képest.

A DR esetében sem találtunk eltérést az aktivációs szintben az ingerlés után sem 2 sem 4 óra elteltével. Nincs bizonyíték arra, hogy közvetlen felszálló kapcsolat lenne a TNC és a DR között. A DR is a leszálló fájdalommoduláló rendszer része és jelentős beidegzéssel rendelkezik az NRM felől, de a DR működését befolyásoló kérgi moduláció is jelentős. A trigeminális ingerlést követő aktiváció hiánya a DR esetében arra utal, hogy ez a mag feltehetően nem vesz részt közvetlenül a trigeminális nocicepció rövidtávú szabályozásában.

Ha feltételezzük, hogy a vizsgálataink során látott aktivitás változások másodlagosak, tehát nem közvetlenül a trigeminális ingerlésnek tudhatóak be, a TNC és a migrén generátor magok között lévő közvetlen kapcsolat hiánya alátámasztja ezen feltevésünket. Eredményeink arra utalnak, hogy az elektromos ingerlés következtében aktiválódnak a thalamusz és a cortex felé tartó nociceptív rostok, amely struktúrák a nociceptív információra a leszálló fájdalommoduláló rendszer aktiválásával reagálnak. A trigeminális rendszer elektromos stimulálása patkányban nem eredményezte a migrén generátor magok azon aktivitási mintázatának megjelenését, amelyet spontán migrénes rohamok során betegekben megfigyeltek. Ez arra utal, hogy a migrén generátor magok aktivációs mintázata kifejezetten a migrénes rohamra jellemző, más trigeminális stimulussal nem reprodukálható.

Korábbi vizsgálatokban számos különböző ingerlési paramétert és ingerlési időt alkalmaztak. Ezért vizsgálatunkban két különböző ingerlési paradigmát használtunk, egy enyhe, rövid ideig tartó, és egy erősebb hosszabb időtartamú elektromos ingerlést annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a P2X7-R trigeminális nocicepcióban betöltött szerepét. A P2X7-R blokkolása korábbi vizsgálatok során gyulladáscsökkentő körülmények között is hatásosnak bizonyult, ezért a P2X7-R antagonistá BGG hatását egy gyulladáscsökkentő modellben, az orofaciális formalin tesztben is megvizsgáltuk.

Mind az enyhe mind az erősebb ingerlési paradigma aktiválta a trigeminális rendszert, amelyet a TNC-ben a c-Fos IR sejtek számának növekedése jelzett. A két paradigma között a fő különbség az aktiválódott sejtek számában volt. Az erősebb stimuláció következtében több c-Fos pozitív sejtet találtunk a TNC-ben, amely erőteljesebb aktivációs szintre utal. Ez feltehetően a magasabb alkalmazott ingerlési frekvenciának köszönhető, amely a neuronok gyorsabb tüzelését okozhatja. Ez a megnövekedett tüzelési frekvencia nagyobb transzmitter felszabaduláshoz vezethet mind a perifériás és a centrális végződés esetében, amely eredményezheti a TNC-ben tapasztalt megnövekedett aktivitást. Az alkalmazott hosszabb ingerlési idő is állhat a nagyobb aktivitás hátterében, azonban úgy gondoljuk, hogy kísérletünkben mind a magasabb frekvencia, mind a hosszabb ingerlési idő hozzájárul a TNC-ben tapasztalt aktivitás növekedéséhez.

A P2X7 antagonistá BGG-vel való előkezelés csak az erős ingerlési paradigmában mutatott egyértelmű aktivitás csökkentő hatást a TNC-ben. A P2X7-R-ek a trigeminális ganglionban és a TNC-ben is megtalálhatóak, így a BGG moduláló hatása perifériásan és centrálisan is érvényesülhet. A periférián befolyásolhatja a neurogén gyulladáscsökkentő folyamatát, illetve a trigeminális ganglionon belüli nem szinaptikus kapcsolatokat is. A központban a BGG modulálhatja a centrális preszinaptikus terminálisok működését, ezen keresztül a

glutamát felszabadulást, ezáltal szabályozhatja a nociceptív információ terjedését. Az erős ingerlési paradigmában feltételezhetően nagyobb mértékű a perifériás aktiváció és gyulladás, amely folyamatokban a P2X7-R-ök is részt vesznek, ezáltal a BBG hatása ebben a paradigmában megjelenik, míg az enyhébb ingerlés után a P2X7-R-ök szerepe valószínűleg kevésbé jelentős, és így a BBG hatása sem érvényesül.

Sem az enyhe, sem az erősebb ingerlés után nem tapasztaltunk változást a CGRP szintjében. Korábbi vizsgálatokban, amelyekben az általunk használt erősebb stimulációs paraméterekhez hasonló beállításokat alkalmaztak CGRP szint csökkenést tapasztaltak a centrális trigeminális végződés mediális részében. Ezek a mérési eredmények rögtön az ingerlés befejeztével vett mintákból történtek, míg a mi esetünkben az ingerlést követően két vagy négy óra elteltével történtek a mintavételek, mivel ezek az időpontok voltak megfelelőek az aktivitás változások fehérje szintű megfigyeléséhez. Ezek az időintervallumok elegendőek lehetnek arra, hogy az esetlegesen felszabadult CGRP újrasszintetizálódjon, pótlódjon, és ezáltal ne mutakozzon változás az ingerlést követően. A BBG kezelés sem önmagában, sem az ingerlés után nem befolyásolta a CGRP szintjét a TNC-ben.

A bajuszpárnába adott formalin injekció következtében egy kétfázisú viselkedési válasz jelentkezik, amelyet vizsgálataink során mi is megfigyeltünk. Az első fázisban a BBG-nek nem mutatkozott a formalin okozta viselkedést befolyásoló hatása. Talppárnába oltott formalin kezelést követően egy másik szelektív P2X7-R antagonistá, az A-438079 sem mutatott moduláló hatást az első fázisban. Ezen felül a BBG-nek hiperalgégiás hatását mutatták ki a korábbi vizsgálatokban a hot-plate tesztben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a P2X7-R-ök BBG általi gátlása nem hatásos az akut trigeminális fájdalom modulálásában.

A formalin teszt második fázisában sem tapasztaltuk, hogy a BBG képes lett volna befolyásolni a viselkedési választ. A második fázis első blokkjaiban a BBG hatására a nociceptív pontszámok csökkenő tendenciát mutattak, míg a későbbi blokkokban éppen az ellenkezője volt jellemző. Egy másik P2X7-R antagonistá kedvező hatásának bizonyult korábban a talppárnába adott formalin hatásának kivédésében, ezért úgy gondoljuk, hogy a P2X7-R-ök nociceptív modulációban betöltött szerepe a szenzoros rendszer egyes területein nem feltétlenül egyforma, régió és stimulus függő is lehet.

A c-Fos IR sejtek számának alakulását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy négy órával a formalin beadását követően egyértelmű aktiváció figyelhető meg a TNC-ben, amely aktiváció eloszlása korrelál a beoltott terület szomatotopikus reprezentációjával. A BBG nem változtatott az aktiváció mértékén a formalin kezelés után. Az orofaciális formalin tesztben

kapott eredményeink nincsenek összhangban korábbi irodalmi adatokkal, amelyek szerint különböző P2X7-R antagonisták és a BBG is hatásosak voltak számos gyulladási fájdalom modellben. Azonban ezen gyulladási vizsgálatok nem a trigeminális rendszerben zajlottak, mi vizsgáltuk először a BBG hatását a gyulladási fájdalomra ezen a területen.

A CGRP szintje nem változott négy órával a formalin oltás után, illetve a BBG kezelés hatására sem. A CGRP szintjének változása időben eltérő lehet a különböző kísérleti modellekben, így a P2X7-R-ok gátlásának hatását a CGRP expresszióra formalin modellben más időintervallumokban is vizsgálni szükséges.

Eredményeink arra utalnak, hogy a P2X7-R-oknak szerepük van a trigeminális nociceptív transzmisszió szabályozásában, és ezen receptorok és a trigeminális rendszer kapcsolatának további vizsgálata fontos információkkal szolgálhat a rendszer működéséről és hozzájárulhat a fejfájások pathomechanizmusának megértéséhez.

Vizsgálatainkban a PROB egyértelmű antinociceptív hatást mutatott a magatartás vizsgálatok során az orofaciális formalin tesztben, főként a második fázisban, de nem befolyásolta a kontroll állatok normál viselkedését. Ezen kívül a TNC-ben modulálta a c-Fos és az nNOS aktivációs és szenzitizációs markerek szintjét is.

Korábbi vizsgálatok során a PROB képes volt csökkenteni a szenzitizációs markerek és a CGRP szintjét a TNC-ben NTG adása után, amely a migrén egy másik állatkísérletes modellje. A PROB trigeminális aktivációt és szenzitizációt befolyásoló hatása különböző molekuláris mechanizmusok eredménye lehet:

A PROB gátolja az MRP4 fehérje működését, amely a gyulladási mediátorok így a prosztaglandin E₁ (PGE₁) és a prosztaglandin E₂ (PGE₂) felszabadulásában játszik szerepet. A PGE₂ képes szenzitizálni a tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1) receptort, amely nociceptív szenzitizációs folyamatok egyik kulcsszereplője. A PGE₂ felszabadulás ezen kívül képes CGRP felszabadulást előidézni trigeminális ganglionból készült sejtenyészeten. Továbbá a PGE₂ trigeminális rendszer központi területén hatva képes megnövelni a kapszaicin kiváltotta CGRP felszabadulást a TNC-ben. Ezek alapján a PROB gátolhatja a PGE₂ felszabadulását az MRP4 gátlásán keresztül, amelynek eredményeként modulálhatja a trigeminális nocicepció és szenzitizáció folyamatát.

A PROB képes más, a fájdalomérzésben szerepet játszó tranziens receptor potenciál csatornákat, így a tranziens receptor potenciál vanilloid 2 (TRPV2) és a tranziens receptor potenciál ankirin 1 (TRPA1) aktiválására. Azonban ezen receptorok deszenzitizálhatóak is agonistáik segítségével, tehát előfordulhat, hogy a PROB deszenzitizálja ezeket a receptorokat és így fejt ki antinociceptív hatását.

A PROB gátolhatja a pannexin-1 csatornát, amely alapvető a kaszpáz-1 aktiválódása során, és ezáltal fontos szerepet tölt be az IL-1 β termelésében és felszabadulásában. Kísérletes adatok arra utalnak, hogy az IL-1 β felszabadulása a trigeminális ganglion sejtekből hozzájárul a gyulladás során fellépő hiperalgémia kialakulásához. Az asztrocitákban megfigyelhető IL-1 β felszaporodás a TNC-ben jelenlévő receptorain keresztül centrális szenzitizációhoz vezethet. Ezen eredmények alapján az IL-1 β szerepet játszik a trigeminális aktiváció és szenzitizáció folyamatában.

A Western blot mérésünk eredménye szerint azonban nem volt változás az IL-1 β szintjében négy órával a formalin beadás után a TNC-ben és a PROB sem változtatott az IL-1 β expresszióján. Eredményeink arra utalnak, hogy a PROB centrálisan nem befolyásolja az IL-1 β expresszióját, azonban a trigeminális rendszert érintő perifériás moduláló hatását nem zárhatjuk ki.

A PROB képes megnövelni a kinurénsav, egy endogén triptofán metabolit, szintjét a központi idegrendszerben. Ezt a hatást valószínűleg a szerves sav transzporterek gátlásán keresztül éri el, amelyek részt vesznek a kinurénsav vér-agy gáton keresztül való eltávolításában. Kísérletes adatok szerint a kinurénsav nociceptív modulátor, emelkedett koncentrációban képes a trigeminális aktiváció gátlására, feltehetően az ionotróp glutamát receptorokon kifejtett antagonistá vagy a G protein-kapcsolt receptor 35-ön való agonista hatásának köszönhetően. A PROB fájdalomcsillapító hatása így a kinurénsav koncentrációjának megemelésén keresztül is megvalósulhat.

Következtetések

A trigeminális ganglion elektromos ingerlése csak az NRM-ben okozott egyértelmű aktivitás növekedést a migrén generátor magok közül. Ez az aktivációs mintázat nem egyezik azzal, amelyet spontán rohamok alatt regisztráltak migrénes betegeknél. A megfigyelt agytörzsi aktiváció eredete nem tisztázott, kialakulhat másodlagosan, a megélt fájdalom következtében is. Mivel ezen régió fokozott aktivitása a fájdalom kezelése után is fennmarad, ez arra utal, hogy az említett magok aktivációs mintázata csak a migrénes rohamra jellemző. Eredményeink alátámasztani látszanak ezt a hipotézist, mivel kísérleteinkben a trigeminális rendszer aktiválása nem vezetett a migrén generátor magok fokozott működéséhez. Azonban a migrénes betegek esetében tapasztalt funkcionális aktivitás hátterét még tisztázni szükséges. Eredményeink szerint az ESTG modell használható a leszálló fájdalommoduláló rendszer

működésének vizsgálatára, amely közelebb vihet a fejfájások pathomechanizmusának megértéséhez.

A P2X7-R-ok gátlása csak az erősebb ingerlési paradigma esetén volt képes modulálni a trigeminális rendszer aktivitását, ami arra utal, hogy a P2X7-R-ok szerepe a trigeminális nocicepció szabályozásában összetett, és stimulus függő lehet. Korábbi kísérletekben a BBG-nek tapasztalták már ellentmondásos hatásait, így a P2X7-R-ok trigeminális rendszerben való működésének részletes feltérképezése szükséges.

A formalin tesztben a PROB-nek egyértelmű fájdalomcsillapító hatása volt, amelyet már más kísérletekben is megfigyeltek. Ezt a hatását valószínűleg a PGE₂ felszabadulásának gátlása és a kinurénsav szintjének megemelése révén érte el, azonban a fájdalomcsillapítás pontos mechanizmusa nem tisztázott.

Eredményeink fontos információkkal szolgálnak a trigeminális rendszer működéséről, és ezzel hozzájárulnak a migrén és egyéb fejfájások pathomechanizmusának megértéséhez.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni őszinte hálámat témavezetőmnek, Dr. Párdutz Árpádnak kutatómunkám irányításáért és azért, hogy hallgató korom óta formálja a tudományos kutatáshoz való hozzáállásomat, világképemet. Türelmét nem tudom eléggé megköszönni.

Köszönettel tartozom Vécsei László Professzor Úrnak, hogy lehetővé tette, hogy kutatásaimat a klinikán végezhessem. Hálás vagyok, hogy megmutatta, hogy létezik határtalan lelkesedés a tudomány iránt.

Külön köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak Dr. Fejes-Szabó Annamáriának és Nagy-Grócz Gábornak, akikkel együtt végeztük a kísérleteket, és akikkel együtt tapasztaltuk meg a tudományos kutatás kihívásait.

Szeretném megköszönni a rengeteg segítséget Vékonyé Széll Valériának, akitől megtanulhattam a laboratóriumi munka alapvető szabályait.

Köszönettel tartozom minden jelenlegi és korábbi kollégámnak is, különösképpen Dr. Varga Hedvignek, Dr. Vámos Enikőnek és Dr. Tuka Bernadettnek.

Hálás vagyok családomnak, különösen a szüleimnek és vőlegényemnek a kitartó támogatásért és azért, hogy hittek benne, hogy egyszer eljutok ideig.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott Prof. Dr. Vécsei László (felelős társszerző) kijelentem, hogy Bohár Zsuzsanna (pályázó) PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - közösen publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

Szeged, 2015. október 13.

dátum



felelős társszerző

Prof. Dr. Vécsei László

tanszékvezető egyetemi tanár

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemények:

Fejes-Szabó A, **Bohár Z**, Nagy-Grócz G, Vámos E, Tar L, Pődör B, Tajti J, Toldi J, Vécsei L, Párdutz A.

Effect of Probenecid on the Pain-Related Behaviour and Morphological Markers in Orofacial Formalin Test of the Rat.

CNS Neurol Disord Drug Targets. 2015;14(3):350-9.

IF:2,628 (2014)