

Az érző idegek kardioprotektív szerepe adriamycinnel kiváltott kísérletes kardiomiopátiában

P.h.D. értekezés tézisei

Dr. Boros Krisztina

Témavezetők:

Prof. Dr. Jancsó Gábor

Dr. Sántha Péter



Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Szeged

2016

A cikkek alapjaul a következő közlemények szolgáltak:

I. Katona M, Boros K, Sántha P, Ferdinándy P, Dux M, Jancsó G. Selective sensory denervation by capsaicin aggravates adriamycin-induced cardiomyopathy in rats.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2004, 370: 436-443, Impact factor: 1.963

II. Boros K, Jancsó G, Dux M, Fekécs Z, Bencsik P, Oszlács O, Katona M, Ferdinandy P, Nógrádi A, Sántha P. Multiple impairments of cutaneous nociceptor function

induced by cardiotoxic doses of Adriamycin in the rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.

Pharmacol. 2016, 389:1009-1020. Impact factor: 2.376

BEVEZETÉS

Az antraciklin származékok súlyos mellékhatásaik ellenére a mai napig széles körben alkalmazott citosztatikumok. Az adriamycin legsúlyosabb és terápiás használatát limitáló mellékhatása a dilatatív kardiomiopátia formájában jelentkező krónikus szívizom károsodás, mely a kezelt betegek 1.7-6.8 %-ában alakul ki. Az antraciklinek által kiváltott kardiomiopátia sokszor halálos kimenetelű szívelégtelenséghez vezet, melynek előfordulási gyakorisága a gyógyszer összdózisával nő. Az antraciklinek által okozott szívkárosodás patomechanizmusa összetett, melyben többek között szabadgyök képződés és lipid peroxidáció, a szívizomsejtek kalcium- és vas homeosztázisának megváltozása, illetve mitokondriális zavarok szerepe igazolódott. A témáról szóló számtalan tanulmány ellenére az antraciklinek szívkárosító hatásának még számos részlete tisztázásra vár. A szív peptiderg érző idegeinek védő szerepe iszkémia-reperfúziós károsodásokban már bizonyítást nyert. Izolált patkányszíven végzett kísérletek igazolták, hogy az iszkémiás prekondicionálás védő hatását jelentősen csökkentette a szív szenzoros peptiderg beidegzésének kapszaicinnal létrehozott szelektív kemodenervációja. Az is ismertté vált továbbá, hogy az iszkémiái-reperfúziós modellben a védő hatást nagymértékben a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) típusú receptort kifejező kemoszenzitív idegekből felszabaduló kalcitonin-gén-rokon peptid (CGRP) közvetíti. Bár a szív érző beidegzésének anatómiai és élettani sajátosságait számos tanulmány tárgyalta, a szenzoros idegek kórélettani szerepe a szív számos kórállapotában még mindig ismeretlen. Ezért vizsgálatainkban adriamycinnel előidézett kardiomiopátia kísérletes modelljében tanulmányoztuk a szenzoros idegek lehetséges kórélettani szerepét az antraciklin által okozott szívizomkárosodás kialakulásában. A kardiomiopátia kialakulását és progresszióját az adriamycin kezelés után végzett ismételt echokardiográfiás vizsgálatokkal követtük intakt és kapszaicinnal előkezelt patkányokban. Tekintettel arra, hogy korábbi vizsgálataink szerint az érző idegek fontos szerepet játszanak az iszkémiás prekondicionálás kardioprotektív mechanizmusaiban, felmerült annak a lehetősége, hogy az adriamycinnel előidézett kardiomiopátia kialakulásához az adriamycin direkt idegkárosító hatása is

hozzájárulhat. Ezért további kísérleteink során megvizsgáltuk az adriamycin kemoszenzitív afferens idegek működésére kifejtett hatását is. Tanulmányoztuk, hogy az adriamycin kezelés hogyan befolyásolja a szenzoros idegek klasszikus afferens, nociceptív működését, illetve a vazoaktív és gyullásos neuropeptidek felszabadulása által közvetített szenzoros efferens, lokális vaszkuláris szabályozó funkcióit. Mivel a zsigeri és kután afferensek nagyfokú funkcionális és neurokémiai hasonlóságot mutatnak, kísérleteinkben az adriamycin szenzoros idegek működésére kifejtett hatásait a kemoszenzitív afferensek legjobban karakterizált populációján, a bőr afferenseken tanulmányoztuk. Kísérleteink kiterjedtek az érző idegek morfológiai/neurokémiai jellemzőinek, a kután afferensek ingerlésével kiváltott nociceptív viselkedési reakciók és a neurogén gyulladáshoz kapcsolódó érreakciók tanulmányozására.

Jelen tézis célkitűzései a következők voltak:

1. A szívet beidegző peptiderg érző idegek lehetséges kardioprotektív szerepének feltárása az adriamycinnel előidézett kardiomiopátia kísérletes modelljében. A szív működés echocardiográfiás paramétereinek nyomonkövetése és összehasonlítása adriamycinnel kiváltott kardiomiopátiában kontroll állatokban és kapszaicinnel előkezelt, szelektív szenzoros kemodenerváción átesett patkányokban.
2. Az adriamycin neurotoxikus hatásának tanulmányozása a kután érző idegek szenzoros nociceptív és efferens vazoregulatorikus működésére: az adriamycin dózis- és idő-függő hatásainak vizsgálata a patkány bőr szenzoros idegei által közvetített véráramlás fokozódásra és ödéma képződésre (neurogén gyulladás), a karrageninnel kiváltott kísérletes hiperalgéziára, illetve a perifériás idegrostok kapszaicinnel *in vitro* kiváltott CGRP felszabadulására.
3. Az adriamycin kezelésnek a bőr beidegzésére kifejtett hatásainak vizsgálata kvantitatív morfometriai és immunhisztokémiai módszerekkel.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Szisztémás adriamycin kezelés és szisztémás kapszaicin-előkezeléssel kiváltott szelektív szenzoros kemodenerváció

Kísérleteinket 250 ± 30 g súlyú hím Wistar patkányokon végeztük. Az állatok 15 mg/kg összdózisú adriamycint kaptak szisztémásan, két hét alatt 6 alkalommal, alkalmanként 2.5 mg/kg dóziban Tong és mtsai módszere szerint. A méréseket az echokardiográfia kivételével 2-7 nappal az utolsó kezelést követően végeztük.

Az állatok egy csoportja az adriamycin kezelés megkezdése előtt 2 héttel szisztémás nagy dózisú kapszaicin előkezelést kapott. A kapszaicin előkezelés denervációs hatásának sikerességét bizonyította a szív CGRP tartalmú beidegzésének teljes eltűnése.

A szívfunkció echokardiográfias vizsgálata

Ismételt echokardiográfias vizsgálatokat végeztünk a szívfunkció változásainak megítélésére a szisztémás kapszaicin- és adriamycin kezelések előtt, illetve azokat követően Schwarz és munkatársai leírása alapján. Az állatokat elaltattuk és hanyatt fekvő helyzetben rögzítettük. A bal kamrát (LV) a mitrális billentyű magasságában parasternális hosszmetsetben, illetve a papilláris izmok magasságában keresztmetsetben vizsgáltuk. A bal kamrai átmérőket M-mód echokardiográfiával mértük az endokardiális határok között. A legszélesebb átmérő a végdiasztolés átmérő (LVDD) és a legkeskenyebb a végszisztolés (LVSD). A rövidülési hányadost (FS) a LV átmérőkből számoltuk $(LVDD-LVSD)/LVDD$ és %-ban fejeztük ki. A bal pitvari átmérőt (LAD) és aorta átmérőt (AOD) a leghosszabb LAD értéknél mértük és a kettő hányadosát (LAD/AOD) kiszámoltuk. Az értékeket átlag \pm SEM-ben adtuk meg. A perikardiális és pleurális folyadékokat az epi- és perikardium, illetve a fali és zsigeri pleura rétegek között kétdimenziós és M-mód mérésekkel detektáltuk.

A szív érző idegeinek immunhisztokémiai vizsgálata

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz kontroll, adriamycin-, illetve kapszaicin + adriamycin- kezelt állatokat használtunk fel, az adriamycin kezelés befejezése után két héttel. A kamrák falából Zamboni fixálást követően 20 µm-es keresztmetszeteket készítettünk és indirekt immunfluoreszcenciás módszerrel megfestettük: nyúlban termeltetett anti-PGP 9.5 (protein gén termék 9.5), mint panneuronális marker segítségével az összes idegrostot tettük láthatóvá, illetve egér eredetű anti-CGRP alkalmazásával a peptiderg idegeket vizualizáltuk.

Kémiai irritánsokkal kiváltott neurogén vaszkuláris válaszok vizsgálata patkány bőrén

Az állatokat klorálhidráttal altattuk, testhőmérsékletüket stabilan tartottuk. A kémiai irritánsok által kiváltott neurogén vazodilatáció vizsgálata során a hátsó lábfejek bőrének véráramlását (CuBF) Lézer Doppler véráramlás monitor segítségével mértük. Stabil alapáramlás elérését követően a bőr felszínére juttatott mustárolaj (0.2 és 1%) és kapszaicin (1%) által kiváltott relatív véráramlás fokozódást vizsgáltuk. Az eredményeket mérések átlaga \pm S.D. formájában, %-ban fejeztük ki.

A kémiai irritánsok által kiváltott plazma extravazáció vizsgálatát a Jancsó és munkatársai által leírt Evans-kék technikával végeztük. Evans kék oldat i.v. adását követően az állatok hátsó lábfejét 5% mustárolaj oldattal, vagy 1%-os kapszaicin oldattal ecseteltük, majd 20 perc elteltével az állatokat elvéreztettük, az érintett bőrterületeket eltávolítottuk, nedves súlyukat lemértük. Az irritánsok hatására áteresztővé váló ereken keresztül a szövetekbe diffundált festéket formamid segítségével kivontuk és mennyiségét fotometriával meghatároztuk. A szöveti festékkoncentrációt 1 g szövetre vonatkoztatva (átlag \pm S.D.) formában fejeztük ki. A közvetlenül az erekre ható hisztamin, bradikinin és P anyag (SP) vaszkuláris permeabilitást fokozó hatását hasonló módszerrel mértük a has bőrén.

Szelektív TRPA1, illetve TRPV1 antagonisták (HC-030031 és kapszazepin) lokális alkalmazásával igazoltuk a mustárolajjal és a kapszaicinnal kiváltot vazodilatációt, illetve plazma fehérje extravazációt közvetítő receptorok identitását.

Kapszaicinnel és káliummal kiváltott CGRP felszabadulás mérése perifériás idegekből in vitro

Az állatokat klorálhidráttal elaltattuk, dekapitáltuk, majd mindkét oldalon kimetszettük a n. ischiadicus-t. Az epineurimot óvatosan eltávolítottuk, és a mintákat karbogén gázzal átáramoltatott, stabil hőmérsékletű, pH=7.4-es szintetikus intersticiális folyadékban (SIF) 30 percig átmostuk. Ezután az idegeket szérum albuminnal és tiorfánnal kiegészített SIF oldatban 10 percig inkubáltuk a bazális CGRP felszabadulás meghatározása céljából. Ezt követően a folyadékot 10 μ M kapszaicint vagy 60 mM KCl-ot tartalmazó oldatokra cseréltük a TRPV1 aktiváció, illetve a membrán depolarizáció által kiváltott CGRP felszabadulás méréséhez. A kapszaicin szelektív hatását kapszazepin előkezeléssel ellenőriztük. Az inkubáló oldat mintákat -70 °C-on fagyasztva tartottuk a felszabadult CGRP mennyiségének gyári ELISA kittel történő meghatározásáig. Az eredményeket a bazális peptid felszabaduláshoz viszonyított %-os emelkedések (átlag \pm S.D.) formájában adtuk meg

Karrageninnel kiváltott gyulladósos hiperalgémia vizsgálata patkányban

A hő fájdalomküszöb mérését a Hargreaves módszerrel, a mechanikai fájdalomküszöböt pedig egy reprodukálható mechanikai inger kiváltó automatizált rendszerrel (dynamic plantar aesthesiometer) határoztuk meg. A gyulladósos fájdalomküszöb csökkenést (hiperalgémia) karrageninnel kiváltott gyulladósos modellen (3 mg s.c. a talp bőrébe) tanulmányoztuk. A fájdalomküszöbök csökkenését a 3 órával a karragenin injektálása után mért értékekhez viszonyított %-os változásával (átlag \pm S.D.) jellemeztük kontroll- és adriamycinnel kezelt állatokban.

A szomatomotoros funkciók vizsgálata kinematikus lokomotor analízissel

Az adrimicinnel kezelt állatok motoros funkcióinak vizsgálatát Nógrádi és munkatársai által kifejlesztett módszerrel, az állatok plexi kifutón történő mozgásáról készült videofelvételek kinematikai elemzésével, VirtualDub program alkalmazásával végeztük. Az analízis során 9 paraméter (lépéshossz, boka-és térd emelése,

oldalmozgás, boka- és térdhajlítás, lábujjak terpesztése, tarsus off- és metatarsus-felszín szögek) tekintetében hasonlítottuk össze az adriamycin kezelésben részesült állatokat a kontroll csoporttal.

A bőr beidegzésének és struktúrájának vizsgálata immunhisztokémia és kvantitatív morfológia segítségével

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz 4%-os formaldehid oldattal fixált hátsó láb talpbőről készített 25 µm-es kriosztát metszeteket használtunk. Az összes epidermális idegrost megjelenítéséhez β-tubulin ellenes egérben termeltetett monoklonális antitesteket, és a TRPV1-et expresszáló populáció kimutatásához nyúlban termeltetett poliklonális anti-TRPV1 antitesteket használtunk indirekt fluoreszcens immunhisztokémiai technika alkalmazásával. A kvantitatív morfológiai vizsgálathoz metszeteinkről Zeiss LSM 700 konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal vertikális (Z stack) optikai sorozatmetszeteket készítettünk. A felvételek alapján Gokhale és munkatársai által kidolgozott sztereológiai módszerrel (vastag szelet projekció) meghatároztuk az egységnyi térfogatra eső intraepidermális idegrost denzitást. Az epidermisz vastagságát a bőr felszínére merőlegesen mértük meg 6-6 random mintában adriamycin-kezelt és kontroll állatok talpbőr metszeteiből. Az eredményeket átlag ± S.D. formájában fejeztük ki.

Statisztikai módszerek

Az echokardiográfiás vizsgálatok, neurogén vaszkuláris válaszok és a motoros tesztek eredményeinek statisztikai elemzéséhez ANOVA teszteket és Bonferroni féle post-hoc analízist használtunk, $p < 0.05$ értéket tekintettünk szignifikánsnak. A karrageninnel kiváltott gyulladási modellben a küszöbváltozásokat, illetve a CGRP felszabadulás változásait és a morfológiai vizsgálatok eredményeit Student-féle t-próbával elemeztük, $p < 0.05$ szignifikancia szintet választva. Az analíziseket megelőzően a csoportok normalitásáról a Shapiro-Wilk teszt segítségével és a varianciák homogenitásáról a Levene teszt alkalmazásával győződünk meg.

EREDMÉNYEK

Az adriamycin kezelés hatása a szív echokardioráfias paramétereire kapszaicinnel kemodenervált és intakt szenzoros beidegzéssel rendelkező állatokban

A kontroll állatokban mért rövidülési hányados (FS) a vizsgálatok kezdetén $25.3 \pm 1.5\%$ volt és nem mutatott szignifikáns változást a kísérletek során. A csak kapszaicinnel kezelt állatok echokardiográfias értékei nem különböztek a kontroll csoporttól, így ezt a két csoportot az analízis során összevontuk. A kizárólag adriamycinnel kezelt állatokban az LV átmérők közül a LVSD értékek 3-4 héttel az adriamycin kezelés befejezése után szignifikánsan magasabbak voltak, míg a LVDD nem változott szignifikánsan. A LAD/AOD hányados pedig már a kezelés vége után 1 héttel szignifikánsan megemelkedett. A kapszaicin előkezelésben, majd adriamycin kezelésben is részesült állatok LVSD értéke és LAD/OAD hányadosa már az adriamycin kezelés vége után 1 héttel szignifikánsan nagyobb volt, és a 3. héten mind a LVSD, mind a LVDD szignifikánsan emelkedett értékeket mutatott. Az FS értéke az adriamycin kezelés hatására progresszíven csökkent a 2. héttől kezdve, jelezve a szívizom fokozatosan csökkenő kontraktilitását, ám szignifikáns különbség csak a 4. héten mutatkozott. A kapszaicinnel előkezelt állatok FS értéke ezzel szemben már az adriamycin kezelés vége után 1 héttel szignifikánsan csökkent, és a 4. hét kivételével minden héten szignifikánsan alacsonyabb volt nemcsak a kontroll, hanem a csak adriamycinnel kezelt csoporthoz viszonyítva is. A mellkas és a has ultrahangos vizsgálata kimutatta, hogy az adriamycin kezelés hatására a kezelés után 3 héttel a szívburokban és a hasüregben folyadék jelent meg és az állatok boncolása során a szívéregek tágulata és a szeptum elvékonyodása is nyilvánvaló volt.

Adriamycin és/vagy kapszaicin által okozott változások a szív beidegzésében: immunhisztokémiai vizsgálatok

Kontroll állatokban a PGP 9.5 panneurális markerrel jelölődő sűrű diffúz idegrost hálózat figyelhető meg a bal és a jobb kamrai szívizomban. Az egyes rostok nagy arányban mutattak CGRP immunreaktivitást is. Az adriamycin kezelés

önmagában nem okozott drámai változást az idegrost hálózat morfológiájában. A kapszaicin kezelés hatására azonban a CGRP teljes deplécióját figyeltük meg.

Szenzoros neurogén vaszkuláris válaszok kiváltása kémiai irritánsokkal

Kontroll állatokban mind 0.2% és 1% mustárolaj, mind 1% kapszaicin epikután alkalmazása lokális véráramlás fokozódást okozott a CuBF szignifikáns emelkedésével. A specifikus TRPA1 és TRPV1 antagonisták előzetes s.c. injektálása szignifikánsan csökkentette a mustárolaj, illetőleg kapszaicin által kiváltott értágulatot. Az 1%-os mustárolaj által okozott CuBF emelkedés $121.80 \pm 24.19\%$ volt, míg a TRPA1 antagonista HC-030031 előkezelés estén ez az emelkedés csak $14.47 \pm 10.44\%$ volt ($p < 0.01$, $n=6$ /csoport). Kapszaicin (1% epikután) hatására a CuBF $167.23 \pm 53.36\%$ -kal emelkedett, mely hatást a TRPV1 antagonistista kapszazepin előkezelés szignifikánsan gátolta: $27.94 \pm 8.95\%$ ($p < 0.01$, $n=6$ /csoport). A 7.5 mg/kg kumulatív dózisú adriamycinnel kezelt állatokban a kezelés befejezése után két nappal mért 1% mustárolajjal és 1% kapszaicinnel okozott CuBF emelkedések a kontrollhoz képest 51%-kal ($p < 0.01$, $n=10$), illetve 64%-kal ($p < 0.01$, $n=6$) csökkentek, míg a 0.2% mustárolaj hatása nem változott szignifikánsan (n.s., $n=10$). A teljes dózisú (15 mg/kg) adriamycin kezelés után viszont a 0.2% és 1% mustárolaj, illetve az 1% kapszaicin által kiváltott CuBF emelkedés szignifikánsan lecsökkent, a kontroll értékekhez képest sorban 57, 71 és 71%-kal, ($p < 0.01$, $n=6-10$ /csoport).

A kémiai irritánsokkal kiváltott plazma protein extravazációt az Evans-kék technikával vizsgáltuk. Kontroll állatokban a bőr ecsetelése mind 5% mustárolajjal, mind 1% kapszaicinnel jelentős festékkiáramlást okozott az érintett területeken, melynek eredményeképpen $180 \pm 68 \mu\text{g/g}$, illetve $205.50 \pm 60.90 \mu\text{g/g}$ szöveti festéktartalmakat mértünk. A specifikus TRPA1 és TRPV1 antagonisták (HC-030031, illetve capszazepin) előkezelés ezeket az értékeket szignifikánsan ($32.67 \pm 17.98 \mu\text{g/g}$, illetve $32.73 \pm 19.75 \mu\text{g/g}$), lecsökkentette ($p < 0.01$, $n=6-10$ /csoport). 7.5 mg/kg kumulatív dózisú adriamycin kezelés hatására a mustárolajjal és kapszaicinnel kiváltott plazma extravazáció szignifikánsan csökkent 72.85 ± 20.84 , illetve $109.93 \pm 38.16 \mu\text{g/g}$ értékre, míg 15 mg/kg kumulatív dózisú adriamycin kezelés hatására a neurogén permeabilitás fokozódás minimális volt 24.95 ± 10.84 és $51.08 \pm 17.43 \mu\text{g/g}$;

$p < 0.01$, $n = 8-10$ /csoport. A közvetlenül az erekre ható permeabilitást fokozó anyagok, így a bradikinin, hisztamin és SP hatásában nem látszott különbség a kontroll és adriamycinnel kezelt állatok között.

Adriamycin kezelés hatása a perifériás ideg kapszaicinnel kiváltott axonális CGRP felszabadulására

A neurogén vazodilációt az kemoszenzitív afferensekből az irritánsok hatására TRPV1/TRPA1 receptor aktiváció következtében felszabadult CGRP közvetíti. A kapszaicin által kiváltott CGRP felszabadulás vizsgálata széles körben elfogadott módszer a peptiderg nociceptorok TRPV1 receptor által közvetített efferens működésének tanulmányozására. A peptiderg afferensek TRPV1-függő (kapszaicin) és TRPV1-független (KCl) ingerlésével a n. ischiadicus-ból kiváltott *ex vivo* CGRP felszabadulást meghatározva azt tapasztaltuk, hogy adriamycin kezelés (15 mg/ kg kumulatív dózis) hatására a kapszaicin által kiváltott peptid felszabadulás szignifikánsan csökkent, míg a KCl-dal kiváltott depolarizációt követő peptid felszabadulás jelentősen nem változott. Kontroll állatokban a 10 μ M kapszaicin a bazális peptid kiáramlást $325 \pm 110\%$ -ra emelte, mely érték adriamycinnel kezelt állatokban szignifikánsan alacsonyabb: $164 \pm 71\%$ volt. Ezzel szemben a 60 mM KCl által okozott CGRP felszabadulás $327 \pm 77\%$ és $303 \pm 55\%$ -át tette ki a bazális kiáramlásnak kontroll, illetve kezelt állatokban. Kontroll kísérletekben teszteltük a kapszaicin specifikus TRPV1-hatását kapszazepin alkalmazásával, melynek során azt tapasztaltuk, hogy 0.1, 1 és 10 μ M kapszaicin CGRP felszabadító hatását 10 μ M kapszazepin szignifikánsan, sorban 69.5%, 54.02% és 23.26 %-kal csökkentette.

Adriamycin kezelés hatása a karrageninnel kiváltott hő- és mechanikai hiperalgéziára

Mivel a nociceptív ioncsatornák alapvető szerepet játszanak a gyulladással hiperalgéria kialakulásában, és a szenzoros efferens funkciók vizsgálata a TRPV1 és TRPA1 receptorok által közvetített folyamatok jelentős károsodását mutatta adriamycinnel kezelt patkányokban, ezért a nociceptív afferens funkciók teszteléséhez a karrageninnel kiváltott gyulladással modellt alkalmaztunk. Kontroll állatokban a

karragenin oldat talpba injektálása 3 óra elteltével jelentős hiperalgéziát okozott, aminek következtében az érintett lábon a hő fájdalomküszöb $63.2 \pm 2.0\%$ -kal, és a mechanikai fájdalomküszöb $61.6 \pm 10.5\%$ -kal csökkent ($p < 0.05$, $n=5$) az alapértékekhez viszonyítva. Adriamycin-kezelt állatokban a karragenin adása után a hő fájdalomküszöb szinte egyáltalán nem különbözött az alapértékektől ($-16.5 \pm 11.6\%$), és a mechanikai fájdalomküszöb sem változott szignifikánsan ($-19.4 \pm 7.0\%$).

Adriamycin kezelés hatása a motoros működésekre

A kezelt állatok járása szemmel láthatóan hasonló volt a kontroll társaikéhoz. A videófelvételek kinematikai analízise alapján a hátsó lábakon mért lépéshosszban, boka- és térd emelésben, oldalsó mozgásban, boka flexióban és a lábujjak terpesztésében a 7.5 mg/kg és a 15 mg/kg kumulatív dózisú adriamycin kezelés sem okozott szignifikáns változást. A térd flexió, illetve a tarsus off és metatarsus-felcsín szögek tekintetében mérsékelt, de szignifikáns különbség mutatkozott ($p < 0.05$, $n=5$) mindkét kezelt csoportban a kontroll csoporthoz képest.

Adriamycin kezelés hatása a bőr beidegzésére és szerkezetére

A kontroll bőrmintákban tubulin immunfestés segítségével szubepidermális idegkötegek és belőlük elágazó epidermális idegrostok ábrázolódtak, melyek szinte mind TRPV1-immunpozitivitást is mutattak. A tubulin- és TRPV1-pozitív idegrostok denzitása $1075 \pm 120 \text{ mm/mm}^3$, illetve $1065 \pm 116 \text{ mm/mm}^3$ volt. Adriamycin kezelést (kumulatív dózis: 15 mg/kg) követően az epidermális idegrostok denzitása jelentősen csökkent; tubulin immunreaktív idegrostok: $503 \pm 76 \text{ mm/mm}^3$, TRPV1-immunreaktív rostok: $417 \pm 80 \text{ mm/mm}^3$ ($p < 0.01$; $n=5$), míg a szubepidermális idegrostkötegek denzitása nem mutatott változást. Az adriamycin kezelést követően az epidermisz jelentősen elvékonyodott (kontroll: $70.41 \pm 7.52 \mu\text{m}$; adriamycin kezelt: $47.47 \pm 6.75 \mu\text{m}$; $p < 0.01$; $n=5$).

KÖVETKEZTETÉSEK

A jelen tézisben összefoglalt kísérletek dilatatív kardiomiopátia experimentális modelljében bizonyították az érző idegek kardioprotektív szerepét. Az irodalmi adatokkal összhangban 2 hetes adriamycin kezelés felnőtt patkányokban dilatatív kardiomiopátia kialakulásához vezetett. Kimutattuk, hogy a kapszaicin előkezeléssel létrehozott szelektív szenzoros kemodenerváció jelentősen súlyosbította és fel is gyorsította az adriamycin szívfunkciót károsító hatását: a kapszaicinnal előkezelt állatokban az adriamycin által okozott kongesztív szívelégtelenség jelei súlyosabbak voltak, és hamarabb jelentkeztek. Kapszaicinnal előkezelt állatokban már egy, illetve két héttel az adriamycin kezelés befejezése után mérhetővé váltak a szisztolés funkció károsodásának jelei és a szívüregek tágulata. Ezek az eltérések az FS csökkenésében, illetve a LAD/AOD hányados szignifikáns növekedésében nyilvánultak meg, amelyek nemcsak az alapértékektől, hanem a csak adriamycinnal kezelt csoport értékeitől is szignifikánsan különböztek. Feltételezésünk szerint az adriamycin kezeléssel kiváltott szívfunkció-romlás kemodenervált állatokban megfigyelt fokozódásnak és gyorsabb progressziójának legvalószínűbb oka a CGRP kemoszenzitív afferens idegekből történő depléciója, és ílymódon egy fontos kardioprotektív mechanizmus károsodása. Ezt alátámasztják azok a korábbi megfigyelések is, amelyek igazolták a CGRP-t tartalmazó peptiderg idegek alapvető szerepét az iszkémiás prekondicionálás jelenségében kísérletes iszkémia-reperfúziós modellben. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a TRPV1 receptort kifejező kemoszenzitív afferensek diszfunkciója és/vagy CGRP tartalmának megváltozása jelentősen befolyásolja az adriamycin kardiotoxikus hatását. Ezen új ismeretek lehetőséget nyújthatnak a szívizom károsodások megelőzésére illetve csökkentésére irányuló alternatív terápiás stratégiák kialakítására.

Megfigyeléseink felvetették annak a lehetőségét is, hogy az adriamycin neurotoxikus hatása az érző idegek károsítása révén hozzájárulhat a szívműködés antraciklin-okozta romlásához. Ezért további kísérleteinkben megvizsgáltuk az adriamycin szenzoros (nociceptív) idegekre kifejtett neurotoxikus hatását. Vizsgálatainkat a morfológiai, neurokémiai és funkcionális szempontból legalaposabban jellemzett, a zsigeri kemoszenzitív idegekhez sok tekintetben hasonló

bőrrafferenseken végeztük. Bizonyítottuk, hogy a kardiotoxikus dózisban alkalmazott adriamycin kezelés szignifikánsan csökkentette a capsaicin és a mustárolaj kiváltotta szenzoros neurogén vazodilatációt és plazma extravazációt, azaz a neurogén gyulladáshoz vezetett választ. Ezeket az érreakciókat a sok esetben azonos érző idegrostokban kifejeződő TRPV1 és TRPA1 receptorok közvetítik, amelyek aktiválása vazoaktív peptidek, CGRP és SP felszabadulását váltja ki az érző idegvégződésekből. A neurogén szenzoros vazodilatáció az érző idegek funkcionális állapotának érzékeny indikátora; már egyetlen afferens axon aktiválása mérhető változásokat okoz a bőr vérátáramlásában. Emberben az axon-reflex flare válasz mérése (amely a patkányban megfigyelhető szenzoros neurogén vazodilatáció humán megfelelője) a bőr C-rost afferenseinek funkcionális tesztelésre alkalmas diagnosztikai módszer. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a bőrre juttatott kapszaicin vagy mustárolaj a lokális CuBF átmeneti, dóziszfüggő emelkedését váltja ki, amelyet a szisztémás adriamycin előkezelés, szintén dóziszfüggő módon, jelentősen csökkentett. Az adriamycin kezelés igen kifejezetten csökkentette a neurogén plazma extravazációt is. A közvetlenül a posztkapilláris venulákra ható, érpermabilitást fokozó kémiai anyagok hatása viszont nem változott, ami arra utal, hogy az adriamycin kezelés nem az erek (endothelium) válaszkészségét, hanem a szenzoros idegek funkcióit károsítja. A szenzoros neurogén érreakciók károsodásának egyik lehetséges magyarázata a TRPV1 (és valószínűleg hasonló módon a TRPA1) receptorok megváltozott aktivációja/válaszkészsége, hiszen izolált perifériás idegekben a kapszaicinnal kiváltott TRPV1-mediált CGRP felszabadulás jelentősen csökkent adriamycin kezelés következtében, míg a magas koncentrációjú káliummal létrehozott depolarizáció hatására bekövetkező CGRP felszabadulás mértéke változatlan maradt.

A nociceptív bőr afferensek által közvetített gyulladáshoz vezető hiperalgéziát a karrageninnel kiváltott gyulladás modelljén vizsgáltuk. Eredményeink itt is a TRPV1 receptort expresszáló kemoszenzitív afferens idegek funkciózavarára utalnak: a nociceptív magatartási válaszok emelkedett küszöbértékei elsősorban az adriamycin nociceptív afferensekre kifejtett toxikus hatásával magyarázható; az adriamycinnel kezelt állatok lokomotoros funkciói nem különböztek szignifikánsan a kontroll csoporttól.

A bőr beidegzésének immunhisztokémiai vizsgálata és kvantitatív morfológiai elemzése az epidermális kemoszenzitív idegvégződések denzitásának jelentős csökkenését igazolta. Az adriamycin kezelés jelentősen csökkentette az epidermisz vastagságát is. Ez feltehetően az adriamycin antiproliferatív hatásának tulajdonítható, de neurális folyamatok szerepe sem zárható ki: irodalmi adatok szerint a bőr szenzoros denervációja az epidermisz elvékonyodásához vezet patkányban.

A TRPV1 és TRPA1 receptorokat kifejező kemoszenzitív afferens idegek klasszikus nociceptív afferens és lokális szabályozó, szenzoros efferens működésének károsodása részben az epidermális érző idegek degenerációjával magyarázható. A nocicepcióban, a gyulladásos hyperalgézia mechanizmusában, valamint a szenzoros neurogén vazodilatáció és plazma extravazáció kiváltásában az epidermális kemoszenzitív nociceptív idegrostok játszanak alapvető szerepet. Az epidermális idegrostok szelektív károsodása következtében fellépő kután érzészavarok jellemzőek egyéb kísérletes toxikus neuropátiákban (vincristin, paclitaxel) és, érdekes módon egy humán bakteriális megbetegedésben, a leprában is.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy kísérleteink során sikerült bizonyítanunk a szívet beidegző, TRPV1 receptort kifejező afferensek kardioprotektív szerepét az adriamycin súlyos, klinikai szempontból igen jelentős, irreverzibilis dilatatív kardiomiopátiához vezető szívkárosító hatásával szemben. Vizsgálatainkban bizonyítottuk, hogy a szív peptiderg, CGRP-tartalmú kemoszenzitív idegrostjai alapvető védő szerepet töltenek be az adriamycin szívkárosító hatásával szemben. A kemoszenzitív afferens idegek kapszaicinnel történő szelektív kemodenervációja szignifikánsan súlyosbítja a kardiomiopátiás elváltozások progresszióját és lefolyását.

Vizsgálatainkban elsőként mutattuk ki, hogy patkányban az adriamycin neurotoxikus hatást fejt ki a bőr TRPV1 és TRPA1 receptorokat kifejező kemoszenzitív nociceptív érző idegrostjaira, ami súlyos károsodásokat okoz a bőr alapvető élettani és kórélettani működéseiben, a fájdalomérzésben és a bőr szenzoros peptiderg idegei által közvetített vaszkuláris reakciókban. Eredményeink alapján felmerül annak lehetősége, hogy az adriamycin kezelés által okozott szívfunkció károsodások kialakulásához – egy jelentős kardioprotektív mechanizmus károsítása révén – hozzájárulhat a kemoszenzitív idegekre kifejtett neurotoxikus hatás is. Fontos

kiemelnünk, hogy megfigyeléseink szerint a bőr szenzoros beidegzését érintő károsodások időben megelőzték a szívfunkció károsodását, ami felveti a C-rost specifikus kvantitatív szenzoros tesztek, például a neurogén vazodilatáció human megfelelőjének, a flare válasz mérésének diagnosztikus szerepét az adriamycin-kardiotoxicitás rizikójának előrejelzésében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni Dr. Jancsó Gábor Professzor Úrnak és Dr. Sántha Péternek, témavezetőimnek, hogy velük dolgozhattam és így megismerhettem két éles eszű, nyitott elméjű, őszinte és rendíthetetlen érdeklődéssel, fáradhatatlanul és kompromisszumok nélkül a primer szenzoros neuronokat kutató férfit, akik miatt sokat nevettem, sokat sírtam és sokat dolgoztam.

Köszönettel tartozom Dr. Katona Márta Professzor Asszonynak a szív ultrahang vizsgálatok elvégzéséért, melyek gyakorlatilag a teljes munka alapját képezték. Szerencsésnek tartom magam azért, mert a múlt évben lehetőségem nyílt bepillantani szakmai és emberi és szempontból is példamutató gyógyító munkájába.

Hálás vagyok Dr. Dux Máriának és Dr. Oszlács Orsolyának a közösen végzett munkákért és hasznos tanácsaikért, mindig nagy örömmel dolgoztam velük. Köszönöm Hegyeshalmi Évának a magas színvonalú technikai segítséget és természetesen köszönettel tartozom a Funkcionális Neuromorfológiai Laboratórium és az Élettani Intézet minden munkatársának.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Benedek György, Dr. Jancsó Gábor és Dr. Sály Gyula Professzor Uraknak, az Élettani Intézet előző és jelenlegi vezetőinek, hogy munkámat lehetővé tették és támogatták.

Köszönöm Dr. Bari Ferenc Professzor Úrnak, hogy sok évvel ezelőtt felkeltette bennem az érdeklődést az Orvosi Élettan iránt.

Köszönöm Szüleimnek és Férjemnek a rengeteg szeretetet, támogatást és türelmet. Külön köszönöm nekik, hogy úgy gondolják, hogy nincs mit megköszönni.

Végül köszönöm a Gyerekeimnek, hogy megtanítottak mindenre, ami az életben igazán fontos.