

Új típusú KYNA analóg hatása CFA-indukált trigemino-vascularis aktivációs modellben

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Lukács Melinda

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ

Neurológiai Klinika

Témavezetők: Dr. Tajti János

Prof. Dr. Vécsei László

Szeged

2017

A PhD értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó eredeti közlemények:

Lukács M, Haanes KA, Majláth Zs, Tajti J, Vécsei L, Warfvinge K, Edvinsson L, Dural administration of inflammatory soup or Complete Freund's Adjuvant induces activation and inflammatory response in the rat trigeminal ganglion, *Journal of Headache and Pain*, 2015 Sep; 16(1):79.

IF: 3.497

Lukács M, Warfvinge K, Kruse LS, Tajti J, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L, Edvinsson L, KYNA analogue SZR72 modifies CFA-induced dural inflammation-regarding expression of pERK and IL-1 β in the rat trigeminal ganglion, *Journal of Headache and Pain*, 2016 Dec; 17(1):64.

IF: 3.580

Lukács M, Warfvinge K, Tajti J, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L, Edvinsson L, Topical dura mater application of CFA induces enhanced expression of c-fos and glutamate in rat trigeminal nucleus caudalis: attenuated by KYNA derivate (SZR72), *Journal of Headache and Pain*, 2017 Dec; 18 (1):39.

IF: 3.580

A PhD értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó eredeti közlemények impakt faktora: 10.657

PhD értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó eredeti közlemények:

Lukács M, Tajti J, Fülöp F, Toldi J, Edvinsson L, Vécsei L, Migraine, neurogenic inflammation, drug development-pharmacochemical aspects; Current Medicinal Chemistry, 2017 July, in press.

IF: 3.249

Lukács M, Tajti J, Fülöp F, Toldi J, Edvinsson L, Vécsei L, The therapeutic impact of new migraine discoveries, Current Medicinal Chemistry- review in progress.

Tajti J, Szok D, Tuka B, Csáti A, Kuris A, Majláth Z, **Lukács M,** Vécsei L, Botulinum neurotoxin-a therapy in migraine; Ideggyógyászati Szemle, 2012 Mar 30, 65 (3-4):77-82

IF: 0.322

A PhD értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó eredeti közlemények impakt faktora: 3.571

Összesített impakt faktor: 14.228

1. Bevezetés

A migrén egy súlyos, életminőséget rontó neurológiai megbetegedés, mely komoly népegészségügyi problémát okoz.

Klinikailag a migrénes roham négy szakaszra osztható. A prodroma fázisában nem specifikus tünetek: fáradtság, kedvetlenség, ingerlékenység jelentkezhetnek, melyeket a hypothalamus aktivációjának tulajdonítanak. A prodroma fázisát az ún. aura jelenség (látási, szaglási, sensoros vagy motoros) követheti. A fejfájás általában féloldali, pulzáló, lüktető jellegű. Időtartamát tekintve a fájdalom 4-72 órán át tart, hányinger, hányás, photo- vagy phonophobia kíséri. A postdroma (rekonvaleszcencia) fázisáról kevesebbet tudunk, hasonló tünetek jellemzik, mint a bevezető szakaszt.

Külön kiemelnénk a Nemzetközi Fejfájás Társaság (International Headache Society, IHS) által új altípusba sorolt krónikus migrén fogalmát (15 fejfájós nap, havonta, melyből 8 migrénes jellegű fejfájás; mindez 3 hónapon át), ami kiemelkedően fontos a munkánk szempontjából.

A migrénes fejfájás pontos kórélettani háttere nem tisztázott, ami bizonyított, hogy a trigemino-vascularis rendszer aktivációja központi szereppel bír. A ganglion trigeminale (TG) pseudounipolaris sejtjeinek idegvégződései az agyhártya perivascularis fájdalomérző idegrostjait képezik. Ezek leginkább vékony A δ típusú és myelin nélküli C típusú idegrostok, melyek a háromosztatú ideg ophthalmicus ágát (V1), kisebb mértékben a maxillaris (V2) és mandibularis (V3) ágát képezik. A TG neuronjait egy sorban elhelyezkedő gliasejtek, ún. szatellita gliasejtek (SZG) ölelik körül. A TG neuronjainak felszálló rostjai hozzák létre a tractus spinalis nervi trigemini-t (Sp5C) és a trigemino-cervicalis komplexben (TCC) szinaptizálnak a másodlagos érző neuronokkal. A TCC magában foglalja az agytörzsben elhelyezkedő caudalis trigeminalis magcsoportot (TNC) és a C₁-C₂ gerincvelői szegmentumot. A másodlagos neuronok felszálló rostjai a thalamus neuronjaival létesítenek szinapszist, emellett számos egyéb köztiagyi maggal állnak kapcsolatban, létrehozva a migrénes fejfájást kísérő egyéb tüneteket. Az ún. „fájdalom-mátrix”, mely magába foglalja a thalamust, a somato-sensoros agykérgi központokat, az insulat, a prefrontalis régiót és anterior cingularis kérget, egységesíti a fájdalomérző-, érzékelő- és kognitív válaszokat, létrehozva a fájdalom komplex megélését.

Bár számos tanulmány áll rendelkezésre a migrén kórélettani hátterének felderítésére, a migrénes fájdalom kiváltó oka, első lépése, még nem teljesen tisztázott. Az egyik elmélet

szerint központi szereppel bír az ún. neurogén gyulladás (NI), azaz a dura mater steril gyulladása, melyet különböző neuropeptidek felszabadulása (CGRP, SP, PACAP) okoz. A gyulladás masztocita és pericita aktivációt, valamint plazma protein extravazációt és a vér-agy gát zavarát hozza létre. Korábbi kísérletek bebizonyították, hogy a kemény agyhártya kémiai stimulációja (gyulladásokeltő anyag cseppentése a dura mater-re) fizikai és kémiai ingerekkel szembeni túlérzékenységet okoz, ami a trigemino-vascularis rendszer aktivációjához vezet.

Az Európai Neurológiai Társaság (European Federation of Neurological Society, EFNS) a migrén kezelését roham- és preventív terápiára osztotta. A migrénes roham kezelésében a triptánok (5-hydroxytryptamine (szerotonin) $1B/1D$ receptor agonisták, $5HT_{1B/1D}$) képezik a „gold-standard” terápiát. Emellett akut kezelésben non-steroid gyulladáscsökkentők (NSAID), ergot-alkaloidák használhatóak, hányinger-csillapítás céljából pedig antiemetikumok. Megelőző kezelésként β -adrenerg receptor blokkolók, kalcium-csatorna blokkolók, antidepresszánsok és antiepileptikumok szerepelnek az EFNS ajánlásban. Ezzel szemben a krónikus migrén kezelése igazi terápiás kihívás mind a klinikusok, mind a kutatók számára, hiszen a triptánok hosszú távú használata nem ajánlott, mivel a fájdalom állandósulásához vezetnek. Emellett a krónikus migrén kezelésében nagyon magas a gyógyszerkölcsonhatások okozta mellékhatások aránya. Az utóbbi időben a Botulinum toxin A jótékony hatásának bizonyult krónikus migrén kezelésében, de az intramuscularis injekció formájában való alkalmazás megnehezíti a mindennapi gyakorlatban való alkalmazást.

A szerotonin a triptofán (TRP) lebomlásának egyik fontos anyagcsereterméke. A TRP egy esszenciális aminosav, melynek fő lebomlási útvonala a kinurenin útvonal. A kinurenin útvonal során számos neuroaktív termék keletkezik, ezek közül kiemelkedő fontosságú a neuroprotektív tulajdonságokkal bíró kinurénsav (KYNA) és a neurotoxikus quinolénsav. Mindkét anyagcseretermék fontos szerepet játszik különböző KIR-i megbetegedésekben, főként a glutamát (Glu) receptorokon keresztül. Mivel a KYNA nehezen jut át a vér-agy gáton, különböző KYNA analógok előállítására vált szükségessé. Ezek az új analógok számos állatmodellben (agyi ischaemia, epilepsia, Huntington-kór, trigemino-vascularis aktiváció) bizonyították hatékonyságukat. A KYNA és a különböző gyulladásos citokinek egymásra gyakorolt hatása arra enged következtetni, hogy a kinurenin útvonal szerepet játszik gyulladásos folyamatokban. Ezek alapján felmerül, hogy a KYNA analógok egyik hatásmechanizmusa a NI lehet trigemino-vascularis aktivációs modellekben.

2. Célkitűzések

Kitűzött céljaink:

- I. Egy új trigemino-vascularis rendszer aktivációján alapuló patkány modell kidolgozása, amely során a dura mater kémiai ingerlésére CFA-t használunk. A kiváltott hatást egy régóta ismert gyulladós elegy hatásával hasonlítottuk össze.
- II. Felmérni, hogy a CFA képes-e hosszú távú aktivációt létrehozni a TG-ban, így az általunk használt módszer alkalmas-e krónikus fájdalom modellezésre.
- III. Az esetleges TNC-ben jelentkező aktiváció és centrális szenzitizáció kialakulásának vizsgálata CFA hatására.
- IV. Az új KYNA analóg hatásának felmérése CFA indukálta aktivációban a TG-ban és a TNC-ben.
- V. Választ adni a kérdésre, hogy hosszú távú trigemino-vascularis aktiváció esetén ismételt KYNA analóg kezelés hatékonyabb-e, mint az egy dózisz előkezelés.
- VI. Különböző, migrén kórélettani hátterével kapcsolatban álló gyulladós citokin és neuropeptid immunhisztokémiai feltérképezése a TNC-ben, az agytörzs más területein és a C₁-C₂ gerincvelői régióban.

3. Anyag és módszer

A KYNA analóg előállítás

A munkánk során használt KYNA analógot a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerkémiai Intézetének Sztereokémiai Kutatócsoportja állította elő. Az új KYNA analóg (KYNA-a, N-(2-N,N-dimethylaminoethyl)-4-oxo-1H-quinoline-2-carboxamide hydrochloride) a következő szerkezeti sajátosságokkal rendelkezik: egy vízdékony oldallánc, egy új kationos centrum és egy oldallánc csere. Mindez elősegíti a vér-agy gáton való átjutást.

Állatkísérlet

Első lépésben az állatmodell beállítását céloztuk meg, különös tekintettel a kémiai stimulációra használt anyagra és a megfelelő időpontokra. Felnőtt, hím Sprague-Dawley patkányokat (220-320 g) használtunk (n=72 immunhisztokémia, IHC; n=67 Western blot, WB és n=5 miográfia). Az állatokat standard laboratóriumi körülmények közt tartottuk. A

beavatkozást 4%-os klorálhidráttal való mély altatásban (0.01 ml/ttkg, Sigma-Aldrich, St. Louis, AEÁ) végeztük. Az állat fejét stereotaxias készülékben rögzítettük, majd egy kézi fűróval a koponyacsonton egy 3x3 mm-es craniectomias nyílást készítettünk. 30 patkány esetén „gyulladásos levest” (IS, összetétel: 10 μ M bradykinin, 10 μ M szerotonin, 10 μ M prosztaglandin E2 és 100 μ M hisztamin, pH 5.0; Strassman és mtsai); 30 patkánynál CFA-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, AEÁ) és 21 állatnál (kontroll) fiziológiás sóoldatot cseppentettünk a kemény agyhártyára. Abszolút kontrollként, 9 nem műtött (abszolút kontroll, AK) állatot használtunk. Azonos mennyiséget (10 μ l) használtunk és 20 percig hagytuk az anyagokat a dura felszínén, majd fiziológiás sóoldattal lemostuk. A csontiányt viasszal pótoltuk, a sebet 3 öltéssel zártuk. Az állatokat transcardiálisan perfundáltuk, majd fixáltunk 4 óra, 24 óra vagy 7 nap után. A kétoldali TG-t, az agytörzset (TNC) és a C₁-C₂ gerincvelői régiót eltávolítottuk (-1, +5 mm az obex-től). A miográfiás vizsgálatokhoz 5 nem műtött (AK) patkányt használtunk. CO₂-al való altatást követően az állatok fejét eltávolítottuk, az a. meningeal media-t (AMM) kiperaráltuk.

Kezelés KYNA analóggal

Tekintettel arra, hogy a KYNA analógok hatását krónikus modellben kívántuk tesztelni, a 7 napos CFA modellt használtuk a további kísérleteinkben. Az állatokat 4 csoportba soroltuk: egyszeri kezelés (műtétet megelőzően 1 órával i.p. KYNA-a, dózis: 1mmol/ttkg, 1 ml fiz. sóoldatban hígítva), egyszeri kontroll (műtétet megelőzően 1 órával i.p. fiz. sóoldat, dózis: 1 ml), ismételt kezelés (i.p. KYNA-a napi 2x, 7 napig, dózis: 1mmol/ttkg, 1 ml fiz. sóoldatban hígítva) és ismételt kontroll (i.p. fiz. sóoldat napi 2x, 7 napig).

Immunhisztokémia

IHC vizsgálatokra a mintákat 4%-os paraformaldehid majd cukoroldattal fixáltuk, majd -80 C°-on tároltuk. A mintákat az IHC festések elvégzése céljából a Lundi Egyetemre (Svédország) szállítottuk. A TG mintákból 12 μ m-es metszeteket készítettünk, melyeket hematoxin-eosin és pER1/2, IL-1 β és CGRP festésre használtunk. Annak érdekében, hogy a TCC teljes képét láthassuk, a metszés 6 különböző helyről történt (100-120 metszet/minta). Az anatómiai struktúrák azonosítására patkány anatómiai atlaszt használtunk. TCC esetén Glu, c-fos, PACAP, SP, TNF α , IL-6 és IL-1 β festést készítettünk.

Western blot

A TG mintákat homogenizáltuk, a fehérjéket denaturáltuk. Centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk, meghatároztuk a minták fehérje-koncentrációját. Ezt követően gélelektroforézist végeztünk. pERK1/2, IL-1 β and CGRP elleni antitesteket használtunk. A gélelektroforézis során nyert csíkok optikai denzitását ImageJ software-el számszerűsítettük. Kontroll fehérjeként β -actint és GAPDH-t használtunk.

Miográfia

Vizsgálatainkhoz artériás miográfot használtunk. A ~2 mm hosszúságú AMM szegmentumokat 25 μ m széles fémszálakra erősítettük. Normalizációt követően CFA-t és IS-t cseppentettünk az érre.

Statisztika

A WB és miográfias vizsgálatok eredményének statisztikai feldolgozására az SPSS 15.00 programot használtuk. Az adatokat egyutas varianciaanalízissel elemeztük (one-way ANOVA), Bonferroni korrekcióval és a csoportok összehasonlítására kétmintás t-próbát használtunk. A miográfias vizsgálatoknál kumulatív dózis-hatás görbét készítettünk. $p < 0.05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

Etikai engedélyek

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

4. Eredmények

Immunhisztokémia-Trigeminális ganglion

a. Phospho extracellular signal-regulated kinase (pERK1/2)

AK állatokban a neuronok sejtmagja, a sejtmagvacska és a rostok mutattak pERK1/2 immunpozitivitást. CFA és IS használata esetén erős aktivációt láttunk a SZG sejtekben. 4

órás kontroll modellekben (fiz. sóoldat a dura felszínén) hasonló SZG aktiválódást észleltünk, ami hiányzott a 24 órás és 7 napos modellben. A lokalizáció pontosabb meghatározására a legintenzívebb immunreakciót mutató 7 napos modellben pERK1/2 és GS (specifikus gliasejt-marker) dupla festést végeztünk, ami egyértelműen kimutatta, hogy az általunk észlelt immunfestés a SZG sejtekben van. A KYNA-a továbbiakban képes volt csökkenteni a SZG sejtekben látott aktivitást. Ismételt KYNA-a kezelés nem bizonyult hatékonyabbnak, mint az egyszeri kezelés. Jobb- és bal oldali TG között különbséget nem észleltünk. A negatív kontroll (primér ellenanyag elhagyása) nem mutatott immunreaktivitást.

b. Interleukin 1 β (IL-1 β)

Nem műtött állatok esetén a neuronális citoplazmában, sejtmag körüli, szemcsés mintázatot mutató IL-1 β festődést láttunk. Kontroll állatok esetén hasonló képet detektáltunk. CFA és IS okozta aktiváció során, a 7 napos modellekben erős, sejthártya közeli, homogén festődést mutató immunpozitivitást észleltünk a SZG sejtek közelében. Mivel ez határozottan különbözött a korábban látott képtől, aktivációnak minősítettük. I.p. KYNA-a kezelés esetén a kontroll állatokhoz hasonló, sejtmag közelében levő, szemcsés mintázatot észleltünk. A sejthártya közeli, homogén festés eltűnt. Ismételt KYNA-a kezelés esetén nem vettünk észre számottevő különbséget az egyszeri dózisu kezeléshez képest.

c. Calcitonin-gene related peptide (CGRP)

AK állatoknál CGRP immunpozitivitást az idegsejtek citoplazmájában és az idegrostokban láttunk. A neuronális festés homogén és szemcsés mintázat közt váltakozott, a sejtmag nem festődött. Az idegrostok vékony, gyöngyfüzér szerű immunreaktivitást mutattak. Lokalizációban eltérő aktivitást CFA és IS hatására nem észleltünk, a rostfestődés kissé intenzívebb volt. Emiatt a CGRP festésben egyértelmű aktivációt nem észleltünk, így KYNA-a kezelés esetén további CGRP festést nem végeztünk.

Immunhisztokémiai-trigemino-cervicalis komplex

a. Glutamát (Glu)

AK állatoknál Glu-pozitív rostokat láttunk az Sp5C-ben. Emellett a caudalis részen néhány homogéne festődő gliasejt és neuron is ábrázolódott. CFA alkalmazását követően számottevően megemelkedett a Glu-pozitív neuronok mennyisége. A festés kiválóan mutatja meg a TNC specifikus morfológiáját: közepes méretű, három- vagy sokszög alakú, rendezetlenül elhelyezkedő sejtek. A rostfestődésben aktivációra utaló jelet nem észleltünk. KYNA-a i.p. adását követően a Glu-immunpozitív sejtek mennyisége és a festés intenzitása is

csökkent. A kép hasonló volt az AK állatokban észlelt festődéshez. Ismételt kezelés nem okozott változást a festődési mintázatban. Rost- és gliasejt festődésben eltérést nem észleltünk. A kontroll állatokban, fiziológias sóoldat i.p. adását követően a CFA által indukált fokozott Glu-aktivitás továbbra is fennállt.

b. C-fos

AK állatokban néhány pozitív sejtmagot láttunk a TNC-ben. A neuronális sejtmagvacskák nem festődtek. A dura kémiai ingerlését követően nagyobb mennyiségben láttunk c-fos pozitív sejtmagokat, főként a TNC caudalis részében. KYNA-a csökkentette a CFA okozta aktivitást a TNC minden szintjén. Ismételt kezelés itt sem bizonyult hatékonyabbnak és a fiz. sóoldat nem befolyásolta a CFA hatását.

c. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)

PACAP immunpozitivitást az Sp5Cben láttunk, kontroll és CFA-val aktivált modellekben egyaránt. Emellett számos PACAP-pozitív sejtet láttunk különböző agytörzsi magvakban, a gerincvelő elülső szarvában és a canalis centralis ependymalis sejtjei is festődtek. PACAP-pozitív idegrostok majdnem minden gerincvelői pályában előfordultak (cortico-cerebellaris, spino-cerebellaris, piramis pálya). CFA hatására néhány PACAP-pozitivitást láttunk a fasciculus cuneatus és gracilis idegrostjaiban.

d. Substance P (SP)

SP immunpozitív rostokat láttunk a TNC teljes magasságában, az Sp5C-ben. CFA hatására enyhe intenzitásbeli fokozódást detektáltunk a rostokban, ami a substantia gelatinosát nem érintette.

e. Tumor necrosis factor α (TNF α), Interleukin-6 (IL-6) és Interleukin-1 β (IL-1 β)

Sűrű rostfestődést láttunk az Sp5C-ben, de a neuronok és a gliasejtek nem festődtek a TNC egyik szintjén sem. A gerincvelőben néhány kisebb méretű neuron festődött, főként a canalis centralis körül. Pozitív rostok számos gerincvelői pályában festődtek. CFA és KYNA-a hatására festésünkben kvalitatív eltérést nem észleltünk.

Western blot – Trigeminalis ganglion

Protein kvantifikálás céljából pERK1/2, IL-1 β és CGRP WB vizsgálatokat végeztünk a TG-ban. Az IHC-i eredményekhez hasonló értékeket és tendenciát észleltünk, de statisztikailag szignifikáns különbséget csak a 24 órás CFA-s aktivációs modellben mértünk, pERK1/2 esetén.

KYNA-a kezelés esetén a pERK1/2 és IL-1 β mennyiségét néztük a TG-ban. Az IHC-hoz hasonló csökkenő tendenciát észleltünk a kezelés hatására, de ez nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet.

Miográfia

A miográfias vizsgálataink arra a kérdésre adnak választ, hogy az IS vagy a CFA ereken kifejtett hatása eredményezi-e a látott aktivációt. IS esetén erős érszűkületet detektáltunk, míg a CFA-nak sem hígtva, sem töményen nem volt hatása az értónusra.

5. Megbeszélés

Tudomásunk szerint elsőként fejlesztettük ki a dura mater kémiai ingerlésével létrehozott, hosszú távú trigeminális aktivációs modellt. Továbbá a gyulladáskeltő anyagok erekre (AMM) kifejtett helyi hatását és a neuro-glia-immun interakció fontosságát vizsgáltuk. Ezen felül egy KYNA analóg hatását néztük ebben az új, krónikus fájdalom modellben. Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy ismételt adagolás hatékonyabb-e, mint egyszeri alkalmazás. Emellett számos, a migrén kórélettani hátterével kapcsolatban álló citokin és gyulladási mediátor expresszióját írtuk le a TCC-ben.

Az egyik gyulladáskeltő anyag, amit használtunk (IS) egy olyan gyulladási elegy, amely számos, endogén és neurogén gyulladásban is központi szereppel bíró anyagot tartalmaz (hisztamin, szerotonin, bradykinin és prosztaglandin E2). Ezzel szemben a CFA-t közel 50 éve autoimmun és gyulladási betegségek állatmodellezésére használják, de a pontos hatásmechanizmusa mai napig nem ismert. CFA használatát követően a tipikus gyulladási jeleket (tumor, rubor, calor, dolor) nem észleltük, mivel a KIR-ben lezajló gyulladási folyamatok teljesen eltérőek a szervezetben máshol előforduló gyulladási reakcióktól. Régóta tudott, hogy a KIR-ben hiányoznak a dendritikus sejtek és ezek szerepét a perivascularis periciták és a makrofágok veszik át. A mikroglia, masztociták és asztrociták patológiai körülmények közt aktiválódnak. A vér-agy gát jelenléte szintén megváltoztatja a gyulladási folyamatot a KIR-ben, hiszen normális körülmények között a nagyméretű sejtek (fehérvérsejtek) számára nem átjárható. Szakirodalmi adatok szerint neurogén gyulladás és egyéb kórfolyamatok esetén átjárhatóvá válik a T-sejtek számára, de ezek hatékonysága elenyésző a szervezetben máshol előforduló (pl. bőr), dendritikus sejtek aktivitásához képest. Véleményünk szerint a hosszú távú hatás eléréséért modellünkben a centrális szenzitizáció a felelős, nem a CFA reguláris hatása. Mivel a CFA hasonló hatást váltott ki, mint az IS,

további munkánkban CFA-t alkalmaztunk. Az időpontok tekintetében 4 óránál nem láttunk különbséget a kontroll állatokhoz képest. Ez azzal magyarázható, hogy a bőrben, az izmokban és főként a periosteumban számos fájdalomérző idegvégződés van, melyeknek műtét során bekövetkezett aktivációja elkerülhetetlen. Feltételezésünk szerint, a 4 órás modellekben detektált pERK1/2 aktivitás főként a műtétnek köszönhető, míg a 24 órás és 7 napos, csak gyulladással aktivált állatoknál észlelt SZG sejt pozitivitás már a CFA és IS hatásának tulajdonítható.

Eredményeink támogatják a neuro-glia-immun interakció szerepének fontosságát a TG-ban migrén pathomechanizmusára vonatkozóan. A SZG sejtekben látott pERK1/2 aktiváció támogatja a gliasejteknek fájdalomban és gyulladással kórfolyamatokban bizonyított kiemelkedő szerepét. Ugyanúgy, az IL-1 β festődésben észlelt neuronális citoplazma festődés is ezt sugallja, hiszen a SZG sejtek közelében elhelyezkedő, intenzíven homogén festődés parakrin szabályozás lehetőségére utal.

Felmértük, hogy a CFA képes-e hosszú távú aktivációt okozni a TCC-ben, azaz létrehozni a centrális szenzitizációt. Számos olyan anyagot vizsgáltunk, melyek kóros szerepe felmerül migrén kapcsán. A Glu, a fő excitatorikus neurotranszmitter, központi szereppel bír a terjedő kérgi gátlás (CSD) kialakulásában és CGRP-vel együtt szabadul fel a TG-ból aktiváció során, centrális szenzitizációt eredményezve. A c-fos egy proto-onkogén, gyakran használt marker a TCC-ben migrénes állatmodellek tesztelésére. CFA hatására fokozott Glu és c-fos expressziót észleltünk a TCC-ben, mely azt igazolja, hogy aktiválódnak a másodlagos trigeminális neuronok. TNF α , IL-6 és IL-1 β esetén nem észleltünk minőségbeli változást a festésben CFA hatására. Ennek az egyik magyarázata az lehet, hogy ezen citokinek migrénben betöltött szerepe még kérdéses, szintjük a vérplazmában megemelkedik migrénes roham kapcsán, majd 1-2 óra múlva ismét normális tartományba kerül. Ugyanakkor az általunk használt IHC metodika korlátait is hangsúlyoznunk kell, hiszen eredményeinket minőségbeli változásokra fókuszáltuk, ami nem zárja ki, hogy aktiváció kapcsán intenzitásbeli vagy számszerű növekedés jelen lenne. Ehhez kvantifikációs eljárás alkalmazása lenne szükséges.

CFA hatására PACAP-pozitív rostokat láttunk a fasciculus cuneatusban és gracilisben, ennek pontosabb megértésére további kísérletek szükségesek. SP esetén számottevő eltérést CFA hatására nem láttunk. Ez megegyezik az újabb szakirodalmi adatokkal, melyek szerint a SP szerepe kérdéses migrénben.

Amint a bevezetésben is említettük a kinurenin útvonal terápiás lehetőség a migrén kezelésében, ezért jelenleg is zajló állatkísérletekkel ennek pontos megértését tűzték ki célul. Bár a KYNA analógok számos trigeminális aktivációs modellben bizonyították hatékonyságukat, néhány részlet még tisztázásra szorul. Állatmodellünkben bizonyítottuk a KYNA-a jótékony hatását mind a TG-ban, mind a TNC-ben. Felmerül a kérdés, hogy hol hatnak az analógok. Két lehetőséget gondolunk a hatásmechanizmus hátterében: 1. Az analógok perifériásan hatnak, pl. a TG szintjén, hiszen ez bizonyítottan kívül esik a vér-agy gáton. 2. Migrén kapcsán a neurogén inflammáció nyomán megnyílik a vér-agy gát, így átjárhatóvá válik olyan anyagok számára, melyek fiziológias körülmények között nem jutnak át. Feltételezzük, hogy trigeminalis aktiváció kapcsán a vér-agy gát megnyílik, így az analógok centrális hatása sem zárható ki. Ennek tisztázására további kísérleteket tervezünk.

Tanulmányunkat úgy terveztük, hogy összehasonlítsuk az egyszeri dózisu és ismételt KYNA-a kezelést. Ismételt kezelés nem bizonyult hatékonyabbnak, ezért azt feltételezzük, hogy az analógok a rohamok preventív terápiájában kapnak majd szerepet. Azonban fontos kiemelni, hogy további farmakokinetikai vizsgálatok szükségesek a hatás pontos részleteinek feltérképezésére.

A WB kísérleteink tendenciájában az IHC-i eredményekhez hasonlóakat észleltünk. Eredményeink nem érték el a statisztikailag szignifikáns szintet. Mindezt egy metodikai hibával tudjuk magyarázni: a WB-hoz a teljes TG-t használtuk. Az IHC vizsgálatok lehetővé tették a gondos mikroszkópos elemzés révén, hogy eredményeinket a TG V1 régiójára fókuszáljuk. Ezzel szemben makroszkóposan lehetetlen a TG V1 részét azonosítani, így a WB eredményeink kevésbé specifikusak.

A miográfiás vizsgálatok bebizonyították, hogy a gyulladáskeltő anyagok nem az érfal tónusára kifejtett hatásuk révén okoznak trigeminális aktivációt. A legutóbbi fMRI vizsgálatok arra utalnak, hogy Wolff vascularis teóriája elavult, hiszen sem az extra- sem az intracranialis erekben nem észleltek vasodilatációt migrénes roham alatt.

6. Eredeti megállapítások, újszerű felismerések

- I. Ez az első tanulmány, ami CFA-t használ a dura mater kémiai ingerlésére. Bebizonyítottuk, hogy a CFA hasonló trigeminális aktivációt okoz, mint a korábban számos kísérletben használt IS.

- II. CFA hatására hosszú távú pERK1/2 és IL-1 β aktivációt láttunk a TG-ban, így kísérletünk bizonyítottan alkalmas krónikus fájdalom modellezésére.
- III. Fokozott Glu és c-fos immunreaktivitást észleltünk a TCC-ben 7 nappal a CFA hatása után. Ez alapján kijelenthetjük, hogy a CFA hosszú távú aktivációt okozott a másodlagos trigeminális neuronokban is.
- IV. Az új KYNA-a csökkentette a pERK1/2 és IL-1 β immunreaktivitást a TG-ban, valamint a Glu és c-fos aktivitást a TCC-ben.
- V. A KYNA-a krónikus adagolása nem volt hatékonyabb az egyszeri dózisú kezelésnél.
- VI. PACAP, SP, TNF α , IL-6 és IL-1 β immunpozitivitást detektáltunk az Sp5C-ben. PACAP- pozitív rostokat találtunk az agytörzs különböző részeiben, számos gerincvelői pályában és a fasciculus cuneatus és gracilis rostjában. TNF α , IL6 és IL-1 β immunpozitivitást láttunk az elülső és hátsó szarv neuronjaiban, a canalis centralis közelében és a különböző gerincvelői kötegekben.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőimnek, Dr. Tajti Jánosnak és Prof. Dr. Vécsei Lászlónak a kutatómunkám irányításáért. Emellett köszönöm Vécsei Professzor Úrnak, hogy lehetővé tette, hogy kutatómunkámat a laboratóriumában végezzem és formálta a tudományos kutatáshoz való hozzáállásomat. Köszönettel tartozom Prof. Fülöp Ferencnek a KYNA analógok szintéziséért és Prof. Toldi Józsefnek a kéziratok megírásában nyújtott segítségével.

Hálával tartozom továbbá Prof. Lars Edvinssonnak, akinek a laboratóriumában tölthettem 10 hónapot Lundban, Svédországban. Külön köszönet Prof. Karin Warfvingenek, akitől megtanultam az IHC minden részletét. Hálás vagyok a szakmai támogatásukért és azért, hogy megtanították, létezik határtalan lelkesedés a tudomány iránt.

Köszönettel tartozom a dán és svéd kollégáimnak, akik kíségtettek a WB és miográfiás vizsgálatokkal: Kristian Agmund Haanes, akivel közösen dolgoztuk ki az állatmodell minden részletét és a miográfiás vizsgálatokat és Lars Kruse, aki a kiegészítő WB kísérleteket végezte Dániában.

Külön köszönettel tartozom a laboratóriumban dolgozó kollégáimnak, akikkel együtt tapasztaltuk meg a kutatás kihívásait. Külön köszönet Bohár Zsuzsannának, Nagy-Grócz Gábornak, Veres Gábornak és a klinikumból Prof. Klivényi Péternek, Szabó Nikolettának, Zádori Dénesnek és Szpisjak Lászlónak, akik segítettek a tézis megszerkesztésében.

Hálás köszönettel tartozom a családomnak és a közeli barátaimnak, hogy biztattak és hittek bennem.

Legfőképpen, köszönöm Istennek a lehetőséget és az erőt, hogy megírjam ezt a tanulmányt.

