

Egyes endogén ligandok (endomorfín-1, kinurénsav, 2-arachidonoyl glicerol) perifériás hatása ízületi fájdalom modellben

Ph. D. dolgozat összefoglalója

Dr. Mécs László, 2010

1. Bevezetés

A fájdalom hivatalos definíciója szerint „olyan kellemetlen szenzoros és emocionális élmény, amelyet a szövetek aktuális vagy potenciális károsodása okoz”. A fájdalom egy komplex információ feldolgozó hálózat eredménye, ahol nem csak a beérkező stimulus jellege határozza meg a fájdalmat, hanem a tapasztalat, az érzelmek, emlékek, stb.

Az egészségügyi ellátásban a mozgásszervi megbetegedések világszerte nagy számban fordulnak elő, ezeknek a muskuloskeletális betegségeknek döntő többsége ízületi mozgáskorlátozottsággal és fájdalommal is járnak. Az ízületekben myelinhüvelyes A β -, A δ - és myelinhüvely nélküli C-idegrostok találhatóak. Az A β rostok a szalagokban és az ízületi tokban végződnek. Szabad idegvégződések találhatóak az ízület összes struktúrájában, kivéve a porcot. Az A β rostok az ízület normális működésében vesznek részt, míg az A δ - és C-rostok nagy része a normálistól eltérő extrém ingerületeket továbbítják, a C rostok egy részét csendes nociceptoroknak hívjuk, mert nem reagálnak még kóros mechanikai ingerületekre sem, ezek elsősorban az ízület gyulladós reakciója esetén lépnek működésbe.

A perifériás receptorokban kiváltott ingerületeket C és A δ -típusú primer afferensek vezetik a gerincvelő hátsó szarvának felületes rétegeihez, ahol azok aktiválják a gerincvelői hátsó szarv interneuronális rendszereit. Ingerület feldolgozási folyamatokat követően a gerincvelői interneuronok ezeket a jeleket felszálló érző pályák eredő sejtjeihez, a projekciós neuronokhoz közvetítik, melyek axonjai a nociceptív ingerületeket magasabb idegi központokhoz továbbítják. A felsőbb központokon belül az agytörzs, azon belül is a periaqueductalis szürkeállomány (PAG), a rostralis ventromedialis medulla (RVM), a locus coeruleus (LC); a thalamus laterális és medialis magcsoportjai, illetve több kérgi struktúra (érző kéreg, anterior gyrus cinguli, insula, amygdala, hypothalamus, hippocampus és a törzsdúcok) is szerepet játszik a fájdalom feldolgozásában, valamint a fájdalomérzés befolyásolásában. Ennek a komplex információ feldolgozási mechanizmusnak minden szintje erőteljes belső kontroll alatt áll. Ha ez a belső kontroll mechanizmus a gerincvelői nociceptív neuronok aktivitását olyan mértékben csökkenti, hogy azok nem tudják tüzelésre készíteni a projekciós neuronokat, akkor a nociceptív ingerület nem jut el a diencephalonhoz és a telencephalonhoz, következésképpen nem alakulhat ki fájdalom érzet sem.

Gyakorlatilag nincs olyan endogén ligand és receptor mely ne venne részt a nociceptív rendszer folyamatában, ezek közül egyesek erősítik, mások gátolják a fájdalomérzést. Az akut és krónikus fájdalom gyógyszeres kezelésében lényeges forradalmi áttörés nem történt, ma is

1

három nagy csoportot különböztetünk meg: a nem szteroid gyulladáscsökkentőket (NSAID), az ópoid származékokat, és azoknak a gyógyszereknek a csoportját, melyeket összefoglalva adjuvánsoknak hívunk (antidepresszánsok, görcsoldók, helyi érzéstelenítők, α_2 -adrenoceptor agonisták, stb.). Szisztémás alkalmazása mind az NSAID-oknak, mind az ópoidoknak jelentős mellékhatásokkal járnak (hányinger, hányás, gyomorfekély, veseelégtelenség, májelégtelenség légzésdepresszió, köhögési inger csökkenése, stb.) és sok krónikus fájdalom ezekkel a szerekekkel hatékonyan nem kezelhető. Az adjuvánsoknál nehézséget okoz a kellő dózis beállítása, illetve itt is nem tolerálható mellékhatások jelentkezhetnek, sajnos ezért eredményességük csak korlátozott. A fenti hátrányok elkerülésére egy fontos alternatív lehetőség a gyógyszeres kezelés helyi alkalmazása, ott ahol a fájdalom keletkezik. Lokálisan krémet, gélt, sprayt, tapaszt vagy injekciót adhatunk direkt a fájdalmas területre, illetve intra-artikulárisan közvetlenül az ízületbe. Dolgozatomban három, korábban centrálisan hatásos antinociceptív szernek bizonyuló endogén ligand gyulladáscsökkentő fájdalomra gyakorolt hatását vizsgáltam, lokálisan alkalmazva, éber patkány ízületében:

Endomorfín-1: Több mint 10 évvel ezelőtt Zadina és munkatársai két új μ -ópoid receptor agonistát fedeztek fel, az endomorfín-1 (EM1) -et és az endomorfín-2 (EM2) -t. Az endogén ópoidok közül az endomorfínok rendelkeznek a legnagyobb affinitással és specificitással a μ -ópoid receptorokhoz. Szintézisük pontosan nem ismert, lebontásukért endopeptidázok felelősek. Az endomorfínok előfordulása a nociceptív pályákban feltételezi, hogy fontos szerepet játszhatnak a fájdalom modulálásában, melyet in vivo vizsgálatok is igazoltak. Számos tanulmány született az EM1 antinociceptív hatásának vizsgálatáról. Beadása után kismértékű, rövid idejű antinocicepciót eredményez, ugyanakkor tolerancia kialakulásáról is beszámoltak. Az EM1 lokális, intraplantáris alkalmazása csökkenti a mechanikus allodíniát és a termális hiperszenzitivitást neuropátiás és gyulladáscsökkentő fájdalommodellekben.

Kinurénsav (KYNA): A KYNA a triptofán kinurenin úton történő lebomlása során keletkező végtermék. Mind centrálisan, mind perifériálisan alacsony koncentrációkban fordul elő (10-150 nM), a központi idegrendszerben túlnyomórészt a gliasejtek által szintetizálódik. A kinurénsav magas, nem fiziológiás koncentrációkban az egyetlen endogén ligand, mely az NMDA receptor komplex glicin és NMDA felismerő helyhez egyaránt kötődik. Nagyobb koncentrációban (0.1-1 mM) a non-NMDA glutamát receptorokon is hat. A KYNA hatékony nonkompetitív antagonistája lehet az $\alpha 7$ -nikotinos acetilkolin receptornak is, tehát a glutamaterg és a kolinerg neurotranszmisszióban is szerepe lehet. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy intratekálisan, infúzióban adagolva dózis függően emelte a láb elrántási latenciát gyulladáscsökkentő modellen.

2-Arachidonoyl glicerol (2-AG): A 2-AG az anandamid mellett az egyik legfontosabb endogén cannabinoid (CB) agonista. Jelenlétét 1995-ban mutatták ki, szerkezetileg monoacil-glicerol észter, melynek koncentrációja az agyban az anandamidnak 50-500 szorososa. A CB1 és CB2 receptorokon agonista hatást fejt ki és ellentétben az anandamiddal, nem befolyásolja a TRPV1 receptorokat. Metabolizálódhat a cyclooxygenáz-2 (COX2) enzim által, továbbá a 2-AG képes gátolni a COX2 kibocsátást a CB1 receptorok révén. Kimutatott, hogy jelentős szereppel bír a nem-ópoid stressz-indukált analgeszációban. Intravénás adásakor a 2-AG

antinociceptiót produkál különböző fájdalomtesztekben. Perifériásan, intraplantárisan alkalmazva csökkenti a fájdalmat a formalinteszt késői fázisában, antihiperalgéziás és antiallodíniás hatását is kimutatták neuropátiás fájdalom modellen.

2. Célkitűzések

Kísérleteink célja a fent említett fájdalmat befolyásoló endogén ligandok és azok kölcsönhatásának vizsgálata volt perifériásan, patkányok ízületében, carrageenan által kiváltott fájdalommodellben. Dolgozatunk célja volt:

- Az EM1 dózis-hatásának és időbeli lefolyásának vizsgálata.
- A KYNA dózis-hatásának és időbeli lefolyásának vizsgálata.
- A 2-AG dózis-hatásának és időbeli lefolyásának vizsgálata.
- Az EM1 és a KYNA kölcsönhatásának vizsgálata.
- Az EM1 és a 2-AG kölcsönhatásának vizsgálata.

3. Módszerek

Kísérleteink során hím Wistar patkányokat használtunk. Két csoportban vizsgáltuk az állatokat, az egyik csoportot az EM1-KYNA vizsgálatokhoz, a másikat az EM1-2-AG vizsgálatokhoz használtuk. A két csoport állatainak súlya között nem volt szignifikáns eltérés.

A gyulladós fájdalommodellben carrageenanat használtunk (300 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$), melyet intra-artikulárisan adtuk be a patkányok jobb bokaízületébe. A gyulladás miatt kialakuló ízületi duzzanatot elektromos digitális tolómérővel határoztuk meg. A lábélrántási küszöb mechanikai ingerre történő meghatározását von Frey filamentumokkal végeztük. A von Frey filamentumokat, emelkedő sorrendben, 1-2 másodpercig alkalmaztuk a patkány talpára a vizsgálórácson keresztül. A kísérleti protokoll szerint először megmértük a patkányok bokáinak átmérőjét, majd meghatároztuk a kiindulási lábélrántási értéket a von Frey filamentumokkal (-180 perc). Ezután beadtuk a fent említett dózisú carrageenat a jobb bokaízületbe. Három órával később (0 perc) ismételten megmértük a patkányok bokaízületét digitális tolómérővel. Ezt követően a következő anyagokat alkalmaztuk:

Az első csoportban EM1-et (30, 100 és 200 μg) valamint KYNA-t (30, 100, 200 és 400 μg) és ezek kombinációit (30-30, 100-100 és 200-200 μg) adtuk a gyulladt ízületbe, majd a mechanikai érzékenységet határoztuk meg a beadást követően 10, 20, 30, 45, 60, 75 perccel. Az állatok egy csoportját naltrexonnal (jól ismert μ -opioid receptor antagonist) előkezeltük (4mg/kg sc.) a 200 μg EM1-t adása előtt 20 perccel.

A második csoportban EM1-t (100, 200 és 300 µg) illetve 2-AG-t (30, 100, 200 µg) adtunk a gyulladt ízületbe, valamint vizsgáltuk ezek kombinációit. Az EM1 és a 2-AG kombinációkat 10:1 arányban alkalmaztuk (100-10, 200-20 és 300-30 µg). A mechanikai érzékenységet 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90 és 105 perc múlva határoztuk meg. A kísérletek végén ismételt megmértük a patkányok bokájának átmérőjét mindkét oldalon.

4. Eredmények

Ízületi ödéma:

Három órával a carrageenan injekció után az érintett jobb bokaízület mérete szignifikánsan nagyobb volt ($p < 0.01$) mint a kontroll csoporté, jelezve a gyulladást. Az ödémát egyik endogén ligand sem befolyásolta.

Mechanikai érzékenység:

Első csoport eredményei: A carrageenan jelentősen csökkentette a mechanikai ingerküszöböt minden csoportban. Az EM1 dózisfüggő, fokozatosan kifejlődő antinociceptív hatást produkált. A maximális hatást 30 és 45 perc között figyeltük meg. 30 µg EM1 hatástalan volt, míg 200 µg hosszantartó, csaknem teljes küszöbérték normalizációt okozott. Naltrexonnal előkezelt patkányokban az EM1 hatástalan volt.

A KYNA önmagában szintén dózisfüggő antiallodíniás hatást váltott ki, mely 30 perccel az injekció beadása után kezdődött. Csak a magasabb dózisok mutattak prolongált, igen hatékony antinocicepciót.

Az EM1 és a KYNA interakcióját illetően 30-30 µg EM1 és KYNA együttes adása nem okozott antiallodíniás hatást. 100 µg EM1 és 100 µg KYNA adásakor a varianciaanalízis a kezelés szignifikáns hatását igazolta, 200-200 µg EM + KYNA adásakor elhúzódó antinocicepció volt észlelhető. Az EM1-KYNA kombináció additív interakciót mutatott.

Második csoport eredményei: Az EM1 dózisfüggő antinociceptív hatást váltott ki volt észlelhető, mely a maximális értékeket 45 és 60 perc között érte el.

A 2-AG önmagában lassan kifejlődő, dózisfüggő antiallodíniás hatást fejtett ki. A magasabb dózisok prolongált antinocicepciót mutattak. A 2-AG nagyobb antinociceptív potenciálú volt, mint az EM1.

Ami a 2-AG és az EM1 interakcióját illeti, 10 µg 2-AG és 100 µg EM1 együttes adása nem mutatott szignifikáns különbséget az egyedüli kezeléshez képest. 20-200 µg 2-AG + EM1 kombinációja hatékonyabb volt mind az 2-AG, mind az EM1-hez képest. Hasonlóképpen 30-300 µg 2-AG + EM1 szintén elhúzódó és hatásosabb antinocicepciót eredményezett, mint az alkotórészek külön adása.

A dózis-hatás görbék esetén megfigyelhető volt, hogy a koktélok görbéje meredekebb volt az EM1 és a 2-AG görbéjéhez képest, így a legnagyobb dózis kombináció szignifikánsan hatékonyabb volt, mint a vizsgált anyagok önmagukban.

5. Megbeszélés

A fájdalomtól való szenvedés és a fájdalomcsillapítás világszerte jelentős orvosi, társadalmi és gazdasági kérdés. Sajnos ideális fájdalomcsillapítót még nem találtak, a ma használatban lévő szereknek, mint az ópoid származékoknak, a non-szteroid gyulladásgátlóknak, jelentős mellékhatásaik vannak. Alternatív lehetőségként felmerül a fájdalomcsillapítók helyi alkalmazása, ott ahol a fájdalom keletkezik, így elkerülve a szisztémás mellékhatásokat. Korábbi tanulmányok szerint centrális alkalmazásnál, ha ópoidokat együttesen adunk cannabinoidokkal vagy NMDA antagonistákkal, additív vagy szinergikus hatás figyelhető meg. Dolgozatunkban arra kerestük a választ, hogy észlelhető-e perifériás szinten is hasonló interakció az EM1 és a KYNA valamint az EM1 és a 2-AG között. Eredményeink azt igazolták, hogy intra-artikulárisan alkalmazva az EM1-et, a KYNA-t és a 2-AG-t dózisfüggően csökkentik a mechanikus allodíniát gyulladt ízületnél. Az endogén ligandok szisztémás hatást nem okoztak.

Együttes adáskor az EM1 és a KYNA, valamint az EM1 és a 2-AG additív interakciót mutattak, bár az EM1 + 2-AG kombinációnál, magasabb dózisoknál, felmerül a szinergikus hatás is.

Következtetések:

1. Bizonyítottuk, hogy az EM1-nek antinociceptív hatása van perifériásan is, ízületben alkalmazva, gyulladásoos fájdalom modellben.
2. Először mutattuk ki intra-artikulárisan alkalmazott KYNA antiallodíniás hatását.
3. Kimutattuk a 2-AG perifériás antinociceptív hatását.
4. Kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy az általunk alkalmazott kombinációkban az EM1 és a KYNA együttes adásakor additív interakció jelentkezik.
5. Az EM1 és a 2-AG kombinációk esetén szintén additív interakció tapasztalható.