

# SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar  
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

és

Általános Orvostudományi Kar  
Neurológiai Klinika

## XXXII. OTDK Biológia Szekció

A patkány Gasser-dúc elektromos ingerlés hatása a caudalis trigeminalis mag c-Fos és  
nNOS expressziójára – a Brilliant Blue G előkezelés moduláló hatása

**Szabadi Nikolett**

Biológus M.Sc. II. évfolyam

Témavezetők:

**Dr. Párdutz Árpád**

*egyetemi docens*

SZTE-ÁOK, Neurológiai Klinika

és

**Bohár Zsuzsanna**

*tudományos segédmunkatárs*

MTA-SZTE, Idegtudományi kutatócsoport

Belső konzulens:

**Dr. Kis Zsolt**

*egyetemi adjunktus*

SZTE-TTIK, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

**2015**

## **Tartalomjegyzék**

|                                                                         |                                        |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 1. Összefoglaló.....                                                    | 3                                      |
| 2. Rövidítések .....                                                    | 5                                      |
| 3. Elméleti háttér .....                                                | 6                                      |
| 3.1. Migrén .....                                                       | 6                                      |
| 3.1.1. Migrén története.....                                            | 6                                      |
| 3.1.2. Migrén jellemzése .....                                          | 6                                      |
| 3.1.3. Migrén tünettana .....                                           | 8                                      |
| 3.1.4. Migrén patomechanizmusa.....                                     | 8                                      |
| 3.1.4.1. Perifériás és centrális szenzitizáció szerepe a migrénben..... | 14                                     |
| 3.1.4.3. A Gasser–dúc elektromos ingerlése .....                        | 15                                     |
| 3.1.5. A nitrogén monoxid szerepe a fejfájás kialakulásában .....       | 15                                     |
| 3.2. Purinerg receptorok .....                                          | 17                                     |
| 3.2.1. P2X7 receptor .....                                              | 18                                     |
| 3.3. Brilliant Blue G .....                                             | 20                                     |
| 4. Célkitűzés.....                                                      | 22                                     |
| 5. Anyagok és módszerek .....                                           | 23                                     |
| 5.1. Állatok.....                                                       | 23                                     |
| 5.2. A kísérletek menete.....                                           | 23                                     |
| 5.3. Immunhisztokémia .....                                             | 23                                     |
| 5.4. Statisztikai elemzés .....                                         | 24                                     |
| 6. Eredmények.....                                                      | 25                                     |
| 7. Megbeszélés .....                                                    | 31                                     |
| 8. Irodalomjegyzék .....                                                | <b>Hiba! A könyvjelző nem létezik.</b> |
| 9. Köszönetnyilvánítás .....                                            | <b>Hiba! A könyvjelző nem létezik.</b> |
| 10. Tételes szakmai hozzájárulás.....                                   | <b>Hiba! A könyvjelző nem létezik.</b> |

## **1. Összefoglaló**

A migrén önálló fejfájás betegség, amely magas prevalenciája következtében egyre inkább a kutatások középpontjába került. A betegség patomechanizmusának hátterében alapvető a trigemino-vascularis rendszer aktivációja valamint perifériás- és centrális szenzitizációja, azonban a folyamatok pontos mibenléte és ok-okozati összefüggések még nem teljesen tisztázottak.

A trigemino-vascularis rendszer aktivációjának bizonyítására és nyomon követésére alkalmazható marker egy onkoprotein, a c-Fos detektálása, amely közvetetten kapcsolódik a szignalizációs folyamathoz. A trigeminalis aktiváción túl, a szenzitizációs jelátviteli utak kulcseleme a nitrogén-monoxid (NO), amely szerepet játszhat a migrénes roham kialakulásában. Irodalmi adatok is alátámasztják a NO és szintetizáló enzime a neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) szerepét a trigeminalis rendszer aktivációjában és szenzitizációjában.

Új kutatási eredmények szerint a purinerg jelátvitel szerepet játszik a nociceptív folyamatok modulálásában, így valószínűsítik, hogy a fejfájások patomechanizmusában is részt vehet. A kutatásokban a P2X7 receptorra (P2X7R) helyezték a hangsúlyt, ugyanis a P2X7R blokkolók alkalmazásával eredményesen csökkentették a centrális szenzitizációt és az allodyniát.

Jelen kísérletben a Gasser-dúc elektromos ingerlésének következtében kialakuló trigeminalis aktiváció modulálását vizsgáltuk P2X7R antagonistá kezeléssel.

Kísérleteinkben hím patkányokat használtunk (n=21), amelyeket négy csoportra osztottunk. Az első csoport állatait fiziológiás sóoldattal oltottuk farok vénába, majd álműtöttük. A második csoportba tartozó állatok jobb oldali Gasser-dúcát sóoldattal való előkezelés után ingereltük (5Hz, 0,5mA, 30perc). A harmadik és negyedik csoport egyedeit P2X7R antagonistá Brilliant Blue G (BBG) előkezelést (50mg/kg, i.v.) követően álműtöttük, illetve ingereltük. Négy óra múlva az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk, fixáltuk, majd a caudalis trigeminalis magot (TNC) eltávolítottuk és c-Fos illetve nNOS immunhisztokémiai festést végeztünk.

Korábbi adatokkal megegyezően az ingerlés szignifikánsan megemelte az ipsilaterális c-Fos expressziót a TNC-ben, ezt a BBG előkezelés részben kivédte. Az nNOS expressziója az ingerlés következtében nem változott szignifikánsan, és ebben az esetben a BBG sem okozott érdemi változást.

Vizsgálatunkban a c-Fos immunreaktivitás változás bizonyítja a neuronális aktivációt, a Gasser-dúc elektromos ingerlése után, viszont az nNOS szint változatlansága a szenzitizációs folyamatok hiányára utalhat ezen körülmények között. A P2X7 receptor gátlása képes volt csökkenteni a trigeminalis rendszer aktivációját, azaz ezen receptorok részt vehetnek a trigeminalis nocicepció kialakulásában és funkciójuk pontosabb megismerése közelebb vihet a fejfájások patomechanizmusának megértéséhez.

## **2. Rövidítések**

AS – aminosav

ATP – adenzin-trifoszfát

ADP – adenzin-difoszfát

BBG – Brilliant Blue G

Ca<sup>2+</sup> – kalcium-ion

CGRP - kalcitonin gén-relációs peptid

CSD – cortical spreading depression, kérgi kúszó depresszió

IHS – International Headache Society (Nemzetközi Fejfájás Társaság)

IR - immunreaktív

i.p. – intraperitoneális

LC- locus coeruleus

NRD – dorsalis raphe mag

NO – nitrogén-monoxid

NOS – nitrogén-oxid szintáz

eNOS – endoteliális nitrogén-oxid szintáz

iNOS – indukálható nitrogén-oxid szintáz

nNOS – neuronális nitrogén-oxid szintáz

NTG - nitroglicerín

P2X7R – P2X7 receptor

PAG – periaqueductalis szürkeállomány (periaqueductal gray)

PBS - foszfát puffertelt sóoldat

PBS-T - Triton X-100-at tartalmazó foszfát puffertelt sóoldat

SEM – az átlag standard hibája (standard error of the mean)

SP - substance P

SPRD – Sprague-Dawley

TM - transzmembrán

TNC – caudalis trigeminalis mag

### **3. Elméleti háttér**

#### **3.1. Migrén**

##### **3.1.1. Migrén története**

A migrént civilizációs betegségként tartják számon, pedig a fejfájás egyidős az emberiséggel. Kezelési kísérletek, a koponyalékelések nyomait a paleopatológiai csontleletek őrzik jóval az írásos emlékek előtt. A trepanációval engedték ki az embert megszálló gonoszt a fejből, mivel akkoriban a szellemeket tartották a fejfájás okozójának (Lyons A. és Petrucelli R. J. 1987).

Kr. e. 1550 körül az ókori Egyiptomból származó gyógymódokat az Ebers-papirusz tartalmazza.

Kr. e. 400 évvel Hippokratész a gasztrointesztinális és neurológiai tünetek okát a májból felszálló gázoknak tulajdonította és elsőként figyelte meg a fejfájást előre jelző aurát.

Kr. e. 90-ben Kappadociai Aretaeus írta le a migrén féloldali jellegét és a vele járó látótérkiesést (Adams F. 1856).

A migrén szó a görög eredetű hemicrania elnevezésből ered, a legjellemzőbb sajátossága, a féloldali fejfájás miatt. Kr. u. 131-201 között Galénosz nevezte el először a betegséget, vezette be a hemicrania fogalmát és Aretaios írta le a migrénnel járó hányingert, hányást és izzadást, mint kísérő tüneteket (Waeber C. és Moskowitz M. A. 2003).

A tudomány fejlődésének előrehaladtával a migrén mindmáig a kutatások középpontjában áll, a magas prevalenciája és a súlyos gazdasági és szociális kiesését okozó tünetei miatt.

##### **3.1.2. Migrén jellemzése**

Néhány szerencsés kivételtől eltekintve az emberek többsége szenvedett már fejfájástól az élete során. 1695-ben Pápai Páriz Ferenc is így vélekedett: „A fejfájás olyan gyakori dolog, hogy az a csoda, ha valakinek nincs”. A háziorvosokat felkereső páciensek panaszai közül az egyik leggyakoribb a fejfájás. Elsőként azonban azt kell eldönteni a diagnózis során, hogy a fejfájás, mint önálló betegség jelentkezik vagy más kórok tüneteént, másodlagosan. A Nemzetközi Fejfájás Társaság (IHS - International Headache Society) osztályozása szerint, amelynek alapjául szolgáló kritériumokat az (1. ábra) részletezi, a migrén az önálló fejfájás betegségek közé tartozik. A migrén két fő előfordulási formája az aura nélküli más néven közönséges, valamint az aurával járó vagy klasszikus migrén, de beszélhetünk még

ophthalmoplegias, retinalis, basilaris, gyermekkori és szövődményes migrénről is (IHS Cephalalgia 2004).

A migrén az Egészségügyi Világszervezet (WHO) által rangsorolt megbetegedések között a 19-ik, vagyis az egyik leggyakoribb neurológiai betegség (WHO 2001). A migrén prevalenciája Magyarországon 12% (Guseo A. és Giczi J. 1994). Nemek közti előfordulásban eltérés mutatkozik, nőknél közel háromszor gyakoribb (Bánk J. és Márta M. 2000).

| Jellemzők                                                   | Kritériumok                                                                |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>Időtartam</b>                                            | 4-72 óra                                                                   |
| <b>A fejfájás jellemzői<br/>(legalább kettő)</b>            | 1. Féloldali fejfájás                                                      |
|                                                             | 2. Lüktető jelleg                                                          |
|                                                             | 3. Közepes vagy erős intenzitás                                            |
|                                                             | 4. Fizikai rutincselekvés (pl. gyaloglás, lépcsőn járás) hatására erősödik |
| <b>A fejfájást kísérő<br/>jelenségek<br/>(legalább egy)</b> | 1. Émelygés                                                                |
|                                                             | 2. Hányás                                                                  |
|                                                             | 3. Fényérzékenység                                                         |
|                                                             | 4. Hangérzékenység                                                         |
| <b>A rohamok száma</b>                                      | Legalább öt megelőző roham                                                 |
| <b>Tüneti fejfájások<br/>kizárása</b>                       | Orvosi vizsgálat által                                                     |

1. ábra; Táblázatba foglalt IHS kritériumok (Keidel M. 2007)

A rohamok kialakulásának gyakoriságát számos tényező befolyásolja, amelyek egyéni specificitással bírnak, ezek az úgynevezett triggertényezők. Legfőképp a környezeti faktoroknak van fokozó szerepe, mint az időjárás változások, de ide tartoznak a különböző élelmiszerek fogyasztása (Weber R. W. és Vaughan T. R. 1991; Larmande és mtsai. 1993) is. Ilyenek például a fenil-alanin forrást tartalmazó vagy glutamáttal ízesített ételek, továbbá egyeseknél a csokoládé és a vörösbor is indukálhatja a migrénes rohamot (Larmande és mtsai. 1994). Az endogén ritmus és hormon szintek ingadozásai (pl.: menstruáció esetén (Silberstein S. D. 1995)), pszichikai tényezők (stressz) és egyes gyógyszerek is provokáló hatásúak lehetnek (Olesen és mtsai. 1993).

### **3.1.3. Migrén tünettana**

Azt a fejfájást, amely a fej egyik oldalán hirtelen jelentkezik, a tompa nyomástól a lüktető fájdalomig erősödik, migrénnek nevezzük. W. R. Gowers 1888-ban ekképpen jellemezte a migrénes fejfájást: „A migrén olyan, rohamokban jelentkező idegfájdalom, amelynek a legállandóbb eleme a fejfájás. A fájdalom majdnem mindig megjelenik, s bár önmagában is létezhet, rendszerint émelygés és hányás kíséri, és gyakran valamilyen érzékszavar, különösen látási rendellenesség előzi meg. A tünetek gyakran féloldaliak, és az ilyen fejfájás nevét is e tulajdonságáról kapta...” (Robert W. P. és Cutler M. D. 1990).

Egy adott roham legtöbbször négy klinikai fázisra osztható. Az érintettek kétharmadánál a tényleges fejfájás rohamot az első szakasz, a prodroma általában néhány órával vagy akár napokkal is megelőzi. Ez a szakasz fokozatosan kialakuló enyhe tünetekkel jár, mint a közérzetváltozás, ételek megkívánása. A betegek 10-15%-ánál jelentkezik az aura fázisa (Russell M. B. 1997), amely során leggyakrabban a látórendszert érintő izgalmi vagy kiesési tünetek (szikralátás, látótérkiesés) tapasztalhatók. A következő szakasz a fejfájás, amely hevesen fellépő, lüktető, legtöbbször féloldali, fizikai terhelésre erősödik, hányingerrel, hányással, photophobiával, allodyníával társul. Az utolsó szakasz a lábadozás, amely során még dekoncentrálttság, gyengeség, fáradékonyság állhat fenn. Kezelés nélkül a roham teljes hossza akár 4-72 óráig is elhúzódhat (IHS Cephalalgia 2004).

### **3.1.4. Migrén patomechanizmusa**

A migrén patomechanizmusa az évtizedek óta tartó kutatások ellenére sem ismert teljes mértékben. Egy-egy tünet patológiás lefolyását már azonosították, ezekre elméleteket építettek, de az ok-okozati összefüggések, illetve időbeli lefolyásuk még kérdéses. A trigemino-vascularis rendszer alapvető szerepet játszik a fejfájások, így a migrén patogenezisében is. Aktivációját igazolták a migrénes roham alatt, de a triggerelő folyamatok pontos mibenlétét eddig még nem tudták teljes mértékben tisztázni (Tajti J. és mtsai. 2012).

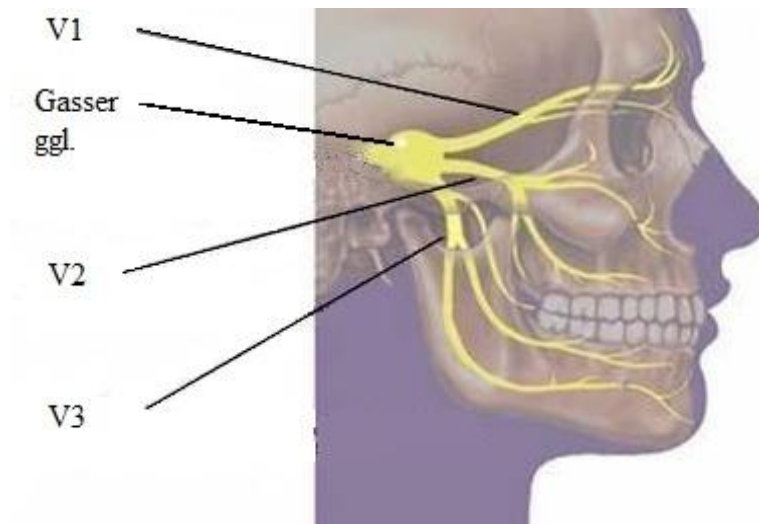
Az évek folyamán több elmélet is született a migrénes roham kialakulásának magyarázatára. Az úgynevezett vascularis elmélet szerint a migrénes roham alatt kialakuló lüktető fejfájás a rendellenesen vazodilatált erek pulzációjából ered (Friberg L. és mtsai. 1991). A durális erek területén felszabaduló vazoaktív anyagok hatására generálódó nociceptív inger a Gasser-dúcon keresztül a nucleus tractus spinalis nervi trigemini pars caudalisba (caudalis trigeminalis mag - TNC) és magasabb fájdalomérző struktúrákba jut (Saxena P. R. 1994). Úgy gondolták, hogy a roham elején a hízósejtekből származó

szerootonin okozta vazokonstrikció következménye az aura jelensége (Fozard J. R. és Kalkman H. O. 1994).

A neurogén hipotézis a migrénnel társuló vegetatív tüneteket és a trigeminalis szenzitizációt az agykéreg – agytörzs - gerincvelő – mellékvese vegetatív innervációs tengely egymásra hatásával magyarázza. Tehát magasabb idegi központokból eredő impulzust feltételez, amely agytörzsi szerotonerg és noradrenerg rostokat aktivál. A nervus facialis paraszimpatikus rostjaiból felszabaduló neuropeptidek a dorsalis raphe mag (DRN), a locus coeruleus (LC) és a TNC szenzitizációja által durális vazodilatációt okoznak. Továbbá a LC impulzusai a mellékveséből noradrenalin fel szabadítanak fel és indukálják a szerotonin releasing factort, amely a vascularis elméletben szereplő folyamatokat eredményezi, ezáltal kapcsolva össze a két hipotézist (Moskowitz M. A. 1993).

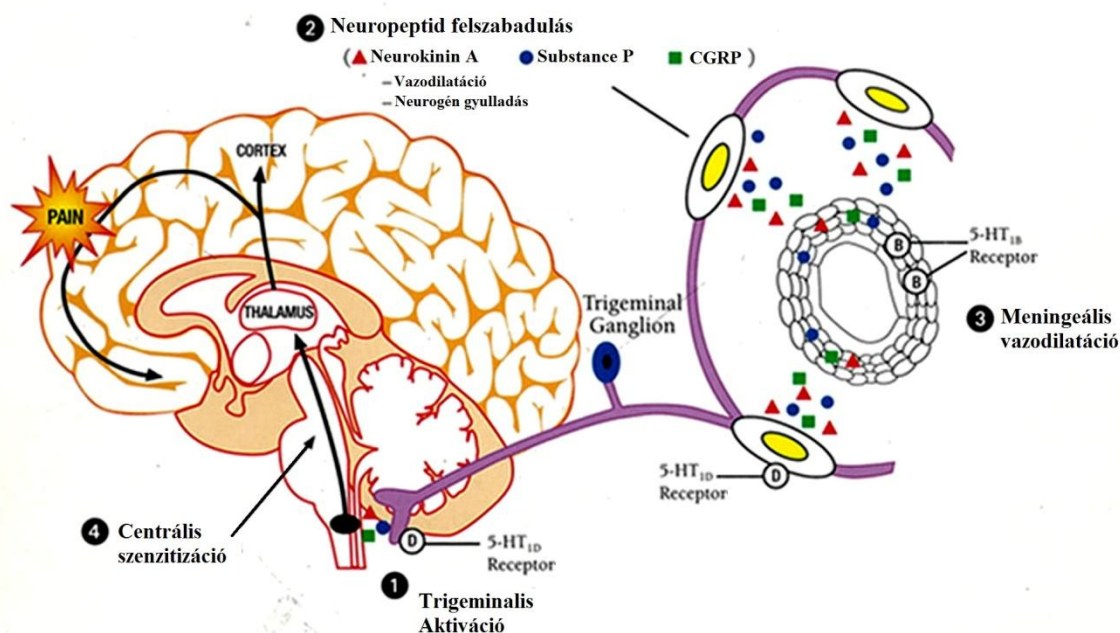
Napjainkban a két elképzelés összefüggését feltételezik a neuro-vascularis elméletben, vagyis a vasculáris változásokat egy neurogén gyulladás következményének tekintik.

A trigemino-vascularis rendszer nem strukturális, hanem funkcionális egységet, a nervus trigeminus és az általa innervált területek (dura mater, sinusok, erek) összességét jelenti. A nervus trigeminus az V. agyideg vagy más néven háromosztatú agyideg, amely érzően innerválja az arc területeit és motorosan a rágóizmokat. A pszeudounipoláris rostok sejttestjei a Gasser-dúcban (ganglion trigeminale) helyezkednek el, az itt lévő három sejtcsoport axonjai alkotják az ágakat, ezt szemlélteti a (2. ábra). A migrén patomechanizmusában főként a V1 ophthalmicus ideg játszik szerepet. A centrális ága a nucleus tractus spinalis nervi trigeminihez fut és szinapszisokat képez, illetve kollaterálisok egészen a thalamuson keresztül az agykéregig nyúlnak. Ezen a pályán terjedő stimulusokat a periaqueductalis szürkeállomány (PAG), a DRN és a LC leszálló rostokkal modulálják.



2. ábra; Nervus trigeminus ágai: V1: *ophthalmicus ideg*; V2: *maxillaris ideg*; V3: *mandibularis ideg*, amelyek közül elsősorban az ophthalmicus ág szerepét valószínűsítik a migrén patomechanizmusában (<http://www.chiropraxie-pollentier.be/aangezichtspijn.html> alapján szerkesztve).

A migrénes roham alatt a craniocervicalis vasculatura konstriktója jön létre, feltételezhetően lokális szerotonin felszabadulás révén és ez fokozza a perivascularis trigeminalis érző idegvégződés izgalmi állapotát (3 ábra/1), ennek eredményeképp antidrom módon vazodilatatív neuropeptidek (kalcitonin gén-relációs peptid - CGRP és substance P - SP) valamint gyulladásos mediátorok szabadulnak fel (3 ábra/2) és neurogén gyulladáshoz vezetnek (Moskowitz M. A. 1993), míg az ortodrom terjedő ingerület nociceptív inputként szolgál a trigemino-cervicalis komplex felé (3 ábra/3) (Goadsby P. J. és Hoskin K. L. 1997).



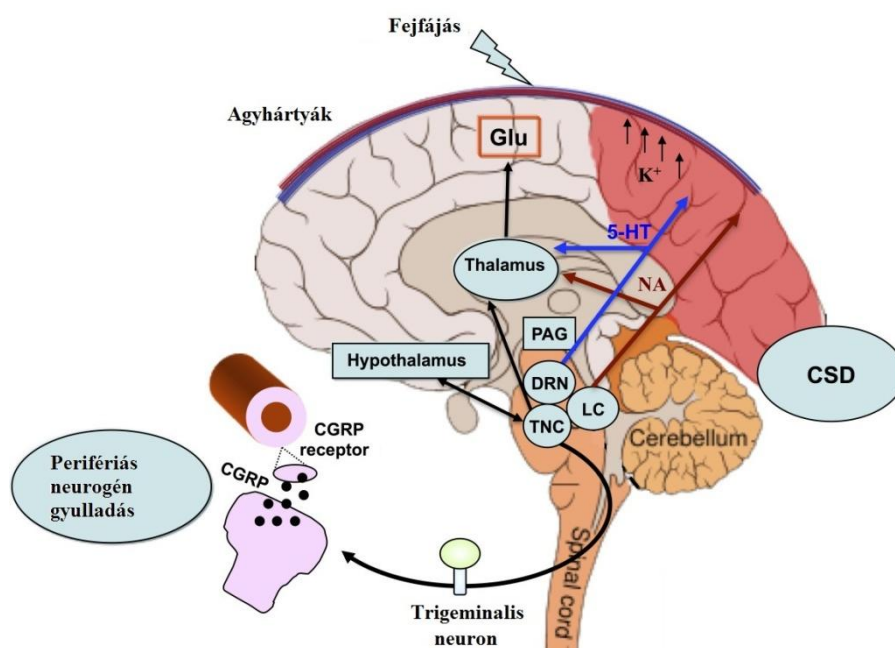
3. ábra; Migrén patomechanizmusa során a trigeminalis rendszer aktivációjának szerepét is feltételezik (1), a szenzitizálódott idegvégződések a szignalizációs útvonalat neuropeptidek (kalcitonin gén-relációs peptid - CGRP és substance P - SP) és gyulladásos mediátorok felszabadulásán keresztül közvetítik (2), amely meningeális vazodilatációhoz vezet (3), majd a kialakuló nociceptív inger a thalamuson keresztül éri el az agykérget, így a fájdalom tudatosul. A trigeminalis aktiváció mellett centrális szenzitizáció is kialakul a nociceptorokban (4) (Hargreaves R. J. és Shephard S. L. 1999; <http://www.medscape.org/viewarticle/545807> alapján szerkesztve).

Humán vizsgálatokban migréneseknél a vena jugularisban magasabb a CGRP koncentrációja roham alatt az egészséges kontroll személyekhez képest (Goadsby P. J. és mtsai. 1990), amely emelkedett CGRP szint indukálhatja a trigeminalis neuronok perifériás és centrális szenzitizációjának kialakulását. Újabb kutatások rohammentes időszakban is igazolták az emelkedett CGRP szintet, ezek alapján a magas CGRP szint kockázati tényezőnek tekinthető (Ashina M. és mtsai. 2000). Több vizsgálat igazolta, hogy CGRP infúzió tíz migrénés betegből nyolcnál rohamot provokál (Iversen H. K. 2001).

Funkcionális képalkotó vizsgálatok eredményei alapján újabb elméletet fogalmaztak meg, amiben az úgynevezett agytörzsi „migrén generátorok” megváltozott aktivitása okozza a migrénes rohamot. Ezek az agytörzsi struktúrák, mint például a PAG, a raphe magvak (pl.: DRN) és a LC fokozott aktivációt mutatnak, ami a roham gyógyszeres kezelése ellenére is

megmarad (Weiller C. és mtsai. 1995). Nem tisztázott azonban, hogy a tapasztalt aktivitás növekedés a migrénes roham kiváltó oka, avagy következménye-e.

Évtizedek óta zajló kísérletek adatai alapján az már bizonyítottnak látszik, hogy az aurajelenség hátterében az úgynevezett cortical spreading depression (CSD) jelensége áll (4. ábra) (Hadjikhani N. és mtsai. 2001), ami egy 2-5 mm/perc sebességű tovaterjedő agykérgi gátlás (Leao A. A. P. 1944). Humán vizsgálatban a CSD mellett „tovaterjedő hypoperfúziót” figyeltek meg, ami a féloldali fejfájás oldalával megegyezően, míg az aurajelenséggel ellentétesen mutatkozott (Olesen J. és mtsai. 1990). A CSD extracelluláris ion homeosztázis ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  ionok mennyisége) változással, illetve a neuronok intracelluláris anyagcsere zavarával is társul (Read S. J. és Parsons A. A. 1999). Nemrég kísérletesen is igazolták a CSD trigemino-vascularis rendszert aktiváló hatását (Moskowitz M. A. 2007). Az aura nélküli migrén esetében nem bizonyított a CSD megjelenése, és ez által a rohamok kialakításában játszott szerepe sem. Azt feltételezik, hogy a CSD rejtett, a nociceptív impulzusok szubkortikális területeken (pl.: hippocampusz) alakulnak ki és provokálják a neuronális izgalmat (Moskowitz M. A. 2008).



4. ábra; Aurával járó migrén patogenezisében egyre több neurofiziológiai megfigyelés utal a CSD oki szerepére. A CSD biokémiai változásai aktiválják a trigemino-vascularis rendszert, amelyből mediátorok szabadulnak fel. A trigeminalis rendszer aktivációja révén kialakuló fájdalom mellett perifériás és centrális szenzitizáció is kialakul. A folyamat hatással lehet az agytörzsi migrén generátorokra is (PAG, LC, DRN) (Costa C. és mtsai. 2013 alapján szerkesztve).

Rövidítések:

*CSD: cortical spreading depression; LC: locus coeruleus; TNC: caudalis trigeminalis mag; DRN: dorsalis raphe mag; PAG: periaqueductalis szürke állomány; CGRP: calcitonin gén-relációs peptid; NA: noradrenalin; 5-HT: szerotonin; Glu: glutamát*

Eddigi eredmények ellenére az ok-okozati összefüggés a CSD kialakulásában nem egészen tisztázott, viszont a genetikai hátteret kutató kísérletekben a monogénes öröklődésű familiáris hemiplegiás migrént vizsgálva, több mutáció esetében is kimutatták, hogy megkönnyítik a CSD létrejöttét (Kors E. és mtsai. 2003).

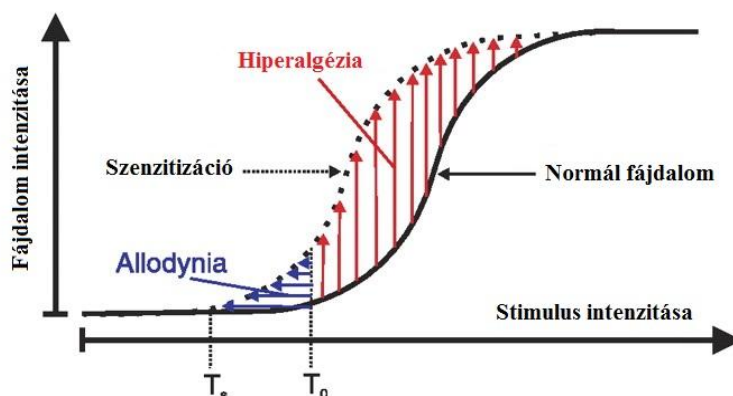
Azonban a legfőbb tünet, a kialakuló fájdalom eredetéről megegyeznek az eddigi elméletek, vagyis a trigeminalis rendszer aktiválódásának és szenzitizációjának következményének tartják ezt a jelenséget.

### 3.1.4.1. Perifériás és centrális szenzitizáció szerepe a migrénben

Szenzitizáció az a folyamat, amely során az érző neuront érő azonos ingerek esetén erősebb afferens válasz generálódik. Lokalizációját tekintve beszélhetünk perifériás és centrális szenzitizációról.

A perifériás szenzitizáció kémiai úton kiváltott funkcionális változás, amely eredményeként a magas ingerküszöbű perifériás afferens nociceptív idegvégződése alacsony ingerküszöbűvé alakul. Ezekben a folyamatokban a trigeminalis rendszer peptiderg neuronjainak részvétele mellett lokálisan felszabaduló gyulladásos mediátorok (adenozin-difoszfát, prosztaglandinok, leukotriének, hisztamin, bradykinin, szerotonin) jelenléte is a hiperalgéria kialakulásához vezet. Ezek a mediátorok növelik a trigeminalis perifériás nociceptorok érzékenységét és ezáltal intracraniális artériák fiziológiai pulzációjából adódó intracraniális nyomásváltozást a beteg lüktető fejfájásként éli meg (Burstein R. és Jakubowski M. 2002).

A perifériás szenzitizáció hatására a hiperreaktívá vált trigeminalis neuronok az átkapcsoló neuronokat folyamatosan ingerelve alakítják ki a másodlagos átkapcsoló neuronok érzékenyítését, a centrális szenzitizációt. Megfigyelhető a másodlagos érző neuronokon az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorok aktivitás emelkedése. Patológiás jellemzője a kitágult receptor mező, megnövekedett alap aktivitás és tüzelési frekvencia, valamint a nociceptorok a korábban akciós potenciált nem indukáló ingerekre is aktiválódnak (Goadsby P. J. 2005). Az utóbbi az allodynia jelensége, amely a fájdalomküszöb alatti ingereknek fájdalomként való megélését jelenti, ezt ábrázolja az alábbi függvény (5. ábra).



5. ábra; Az allodynia nagysága a stimulus intenzitásának függvényében (Sandkühler J. 2009 alapján szerkesztve).

A centrális szenzitizáció kialakulása után jelentősen romlik a migrénes roham kezelhetősége (Burstein R. és mtsai. 2004), ennek következtében a migrén patomechanizmusának megismeréséhez és hatékony terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez nélkülözhetetlen a szenzitizációs folyamatok feltérképezése.

#### *3.1.4.3. A Gasser–dúc elektromos ingerlése*

A fájdalom tudatosulása, szellemi és fizikai megélése a betegségek során egyénenként nagyon különböző lehet, azonban a sejt szintű folyamatok maga a fájdalom, valamint a kísérő tünetek hozzávetőlegesen azonosak egy – egy betegségben. A migrén során kialakuló nociceptív és kísérő tünetek rohamokban jelentkeznek, ami nagymértékben nehezíti a szignalizációs utak feltárását. Eddigi ismereteink, mint a trigemino-vascularis rendszer anatómiája és működése, hosszas nagyjából állatmodelleken végzett munka eredménye.

A Gasser-dúc (ganglion trigeminale) elektromos ingerlése egy alkalmazott állatkísérletes modell, ahol a trigeminalis érző dúcba vezetett elektródával történik a stimuláció.

Megfigyelték, hogy az elektromos ingerlés hatására kialakuló morfológiai és funkcionális változások a stimulus hosszától függően eltérően mutatkoznak. Rövid stimulus esetén a pszeudounipoláris dúcsejtek perifériás axon terminálisában morfológiai változás jön létre, amit fokozott CGRP immunreaktivitás jelzett. Tartós ingerlésnél pedig a felhalmozódott neuropeptidek, mint CGRP, neurokinin A, és SP kerülnek ki a durális erekbe (Samsam M. és mtsai. 1999). A neurokinin A részt vesz az érfal permeabilitásának szabályozásában, az SP-nek szerepe van a hízósejtek aktiválódásában, míg a CGRP mint már korábban is említettük erős vazodilatátor hatással rendelkezik (Goadsby P. J. és Edvinsson L. 1993; Schuh-Hofer S. és mtsai. 2006). A CGRP, neurokinin A és SP felszabadulása plazma protein extravazációhoz vezet, amely hozzájárul a neurogén gyulladás kialakulásához.

Az ingerlés nemcsak perifériás, de centrális változásokat is okoz, aktiválja a TNC részében és a felső nyaki gerincvelő hátsó szarvában (C1-C2) lévő másodlagos neuronokat.

Az aktiválódott idegsejtekre emelkedett c-Fos expresszió jellemző, amely immunhisztokémiával jól detektálható nukleáris protein (Knyihár-Csillik E. és mtsai. 1997; 2007).

#### **3.1.5. A nitrogén monoxid szerepe a fejfájás kialakulásában**

A szerves nitrátokból keletkező nitrogén-monoxidot (NO) (Taylor S. 1995) értágító hatású molekulaként tartják számon, és cardio-vascularis betegségek kezelésénél használják. Ezen

alkalmazásának mellékhatásaként számos páciens esetében fejfájás jelentkezett (Iversen H. K. 2001), így felmerült, hogy a NO szerepet játszhat a fejfájások patomechanizmusában.

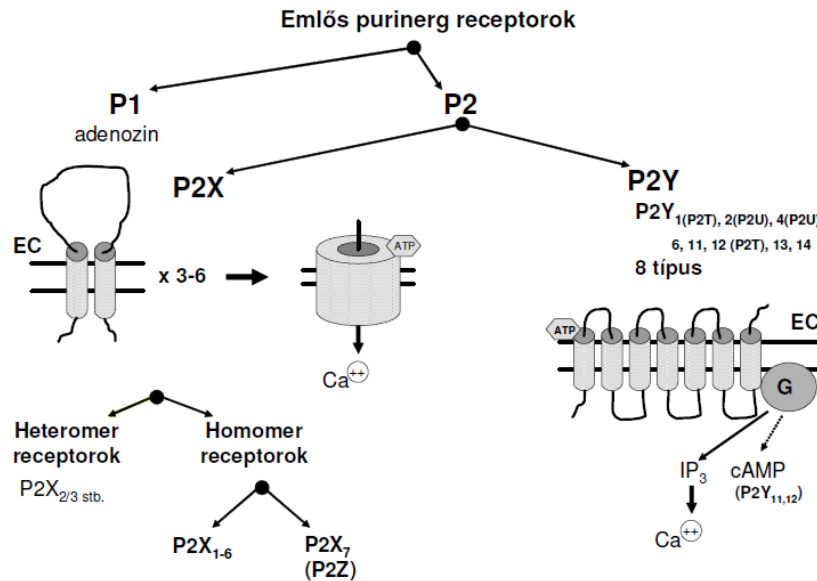
Fizikai paramétereit tekintve a NO egy igen labilis, kis molekulású, gáz halmazállapotú extracelluláris messenger molekula. Rövid féléletidejét diffúzibilitással kompenzálva gyorsan átjut a biológiai membránokon és kifejti értágító hatását. Patológias körülmények között fontos szerepet játszik a dura érhalózatának tónusának szabályozásában is (Murad F. 1994; Akerman S. és mtsai. 2002). Az értágító folyamat hátterében a guanilat-cikláz aktivációja áll, amelyhez hozzákötve (Braugher J. M. és mtsai. 1979) a NO növeli a ciklikus guanozin-monofoszfát szintet, ami a simaizom sejtek relaxációját okozza az intra- és extracraniális erekben egyaránt (Bigal M. E. és mtsai. 2004).

Celluláris lokalizációjának vizsgálata immuncitokémiai vizsgálatokkal gyors lebomlása miatt csak közvetett módon lehetséges, a szintetizáló enzimének kimutatása által. Ez az enzim a nitrogén-oxid szintáz (NOS), amely L-argininből képez L-citrullint és NO-t, a szintézishez nélkülözhetetlen kofaktorok az oxigén és a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát. Struktúrájuk és lokalizációjuk szerint az eukarióta szervezetekben indukálható (iNOS), endotheliális (eNOS) és neuronális (nNOS) izoformákat különböztetünk meg. Az iNOS patológias körülmények között szintetizálódó szolubilis enzim, amely a kalcium-ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) szinttől független, az eNOS konstitutív kalcium-kalmodulin függő enzim és aktivációjához emelkedett nyíró erő is szükséges, az nNOS pedig konstitutívan is előforduló  $\text{Ca}^{2+}$  influx függő szolubilis enzim (Nathan C. és Xie Q. W. 1994). A trigeminalis fájdalom kialakulásának szempontjából a patológias hatásra aktiválódott nNOS által szintetizált, neurotransmitterként működő NO játszik szerepet.

A szakirodalomban NO-donorként számon tartott nitroglicerint (NTG) számos migrénnel foglalkozó vizsgálatban alkalmazták és azt tapasztalták, hogy szisztémás adása migrénes pácienseknél egy azonnali fejfájást provokált, majd ezt követően néhány órán belül egy típusos aura nélküli migrénes roham jelentkezett. Ugyanakkor egészséges személyeknél egy enyhébb fejfájás volt jellemző (Iversen H. K. és Olesen J. 1996), ebből adódóan alkalmazták, mint humán migrén modellt. A NTG hatására jelentkező migrénes rohamról elmondható, hogy hasonló a spontán kialakuló rohamokhoz, ezért azt feltételezik, hogy mindkét esetben hasonló folyamatok zajlanak le. A sejtszintű folyamatok tanulmányozásához állatkísérletekben alkalmazzák a NTG kezelést, ezáltal modellezve a trigeminalis rendszer aktiválódását (Tassorelli C. és Joseph S. A. 1995).

### 3.2. Purinerg receptorok

A purinerg receptorok nevükből is adódóan purin-nukleotidokat és –nukleozidokat kötő sejtfelszíni receptorok. A receptor család tagjai ligand kötés alapján csoportosíthatók, vannak adenozint kötő P1 és adenozin-trifoszfátot (ATP), adenozin-difoszfátot (ADP), uridin-trifoszfátot kötő P2 receptorok. A P2 receptorok szignál transzdukciós sajátosságai alapján tovább osztható P2X ionotróp és P2Y metabotróp receptorokra (6. ábra).



6. ábra; A purinerg receptorok csoportjai és alap szerkezetük (Deli T. 2006).

A P2X receptor családnak hét alosztályát különböztethetjük meg, több tagjáról beigazolódott a fájdalom iniciálásában betöltött szerepük. Az altípusokat az alap aminosav (AS) sorrend szerint csoportosíthatjuk. A P2X receptorokat 384-595 AS építi fel, 2 transzmembrán (TM) doménből, intracelluláris C- és N-terminálisból és egy nagy extracelluláris hurokból álló térszerkezetet vesznek fel, homo- vagy heteromultimerizációs folyamatot követően alakulnak funkcionális receptorokká.

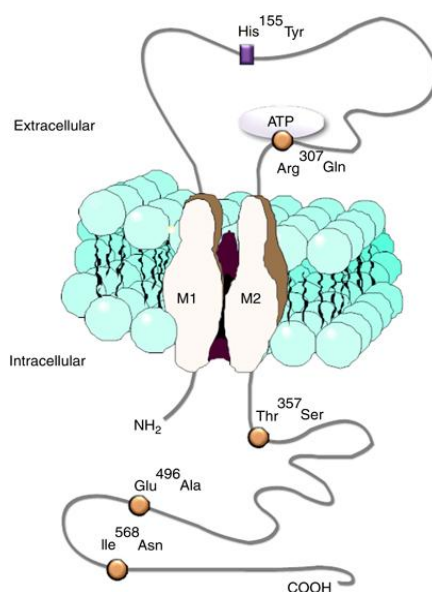
A P2X receptorok ioncsatornaként funkcionálnak, az ATP kötődést követően  $\text{Ca}^{2+}$  influx alakul ki, ennek következtében a sejt depolarizálódik. A tartósan magas ATP koncentráció megváltoztatja az ioncsatorna szenzitivitását, eszerint beszélhetünk lassan és gyorsan deszenzitizálódó ionotróp receptorokról, és egy kivételt képező altípus a P2X7 receptor, amely nem deszenzitizálódik, sőt szenzitizációja révén különíthető el a többi csoporttól.

Az élő szervezetben szinte minden sejtben előfordulnak. Általában egy sejtben több altípus is jelen van, de még nem ismert, hogy az esetleges interakciók karaktere, relevanciája, ennél

fogva a purinoreceptor-mintázat differenciája a sejtre milyen hatást gyakorol (Ralevic V. és Burnstock G. 1998).

### 3.2.1. P2X7 receptor

Napjainkban a kutatások középpontjába az előbb említett különálló altípus a P2X7 receptor (P2X7R) került, amely 595 aminosav hosszú, fehérje egységekből álló oligomer. Szerkezeti és funkcionális szempontból is eltér a P2X receptor család többi tagjától, a karboxil terminálisa az általánosan jellemző 27-129 AS helyett 239 AS hosszú (7. ábra).



7. ábra; A P2X7 receptor funkcionális szerkezete (Gartland A. és mtsai. 2012).

A P2X7R extracelláris doménjének közelében az M1 és M2 TM régiók között lokalizálták az ATP ligand kötőhelyét, egy béta-lemez szerkezetű, ciszteinben gazdag régióban, a karboxil terminálison pedig lipopoliszacharid kötőhely található (Denlinger L. C. és mtsai. 2003; Worthington R. A. és mtsai. 2002). A P2X7R agonistái a 2–3-O-(4-benzoil-benzoil)-ATP, a 2-metiltio-ATP és az ADP, amelyek hatáserősségi rangsor szerint lettek felsorolva (Bianchi B. R. és mtsai. 1999; Sperlágh B. és mtsai. 2002). A kalcium, magnézium, cink és réz kétértékű kationjai gátolják a P2X7R közvetítette ionáramokat, a cink-ion a P2X7R-ra szelektív.

Szelektív, de irreverzibilis antagonistaként elsőként az oxidált ATP-t alkalmazták, azonban magas citotoxicitása miatt ma már háttérbe szorult. Szelektív, nem kompetitív antagonistája többek között a Brilliant Blue G (BBG) és a szuramin.

A P2X7R három jelátviteli útvonalon keresztül befolyásolja a sejtválaszt. Az elsőként azonosított útvonalon a nagy extracelláris ATP koncentrációra bekövetkező receptor

aktiváció membrán pórus keletkezéséhez vezet, ami akár 900 Da-os molekulákra (pl.: N-metil-D-glükamin) is permeábilissá válik. Ez  $\text{Ca}^{2+}$  független enzim kaszkád mechanizmust indít el, amely a sejt pusztulásához vezet (North R. A. 2002; Bulanova E. és mtsai. 2005).

Előzőekkel szoros összefüggésben a membrán „blebbing” okozta morfológiai változás eredményezhet apoptózist. A P2X7R intracelluláris C-terminálisa közvetlenül befolyásolja a citoszkeletális elemek átrendeződését és hólyagképződést indukál (Kim M. és mtsai. 2001).

A harmadik esetben rövid idejű extracelluláris ATP koncentráció növekedése aktiválja a P2X7R-okat, amelyek nem szelektív ioncsatornaként viselkednek (Hide I. és mtsai. 2000), és az így meginduló ionáramok által másodlagos jelátviteli útvonalak elindításán keresztül befolyásolja az élettani folyamatokat. A nocicepció szabályozásában a három közül ez a mechanizmus játszik fontos szerepet.

A P2X7 receptor a szervezet szintjén sokféle sejttípuson kimutatható, az idegrendszerben is előfordul, ebből adódóan feltételezik idegsejt működés szabályozó funkcióját. Az egyes agyterületek receptor sűrűség paritása közel azonos (frontális cortex, hippocampus, bulbus olfactorius, agytörzs, gerincvelő), míg a legtöbb P2X receptorra a régió specifikus előfordulás jellemző (Sperlágh B. és mtsai. 2003). Korábbi tanulmányok a P2X7R patológiás működését feltételezték több központi idegrendszeri megbetegedésben (Alzheimer-kór, gerincvelői sérülés, neuropátiás fájdalom) (Parvathenani L. K. és mtsai. 2003; Franke H. és mtsai. 2001; Chessell I. P. és mtsai. 2005), így potenciális terápiás célponttá vált. Ennek eredményeként a gyógyszergyárak számos P2X7 receptor antagonistát fejlesztettek az utóbbi években (Donnelly-Roberts D. L. és Jarvis M.F. 2007).

Kísérletesen igazolták, hogy P2X7R agonisták ATP influxon keresztül aktiválják a p38 MAPK jelátviteli útvonalat, ezáltal eredményeznek hosszantartó szinaptikus gátlást a hippocampusban (Armstrong J. N. és mtsai. 2002). A hippocampus a limbikus rendszer része, így a migrénes fájdalmat közvetítő centrális felszálló pálya részeként feltételezik, így felmerült, hogy az ezen az agyterületen lévő P2X7R-ok modulálásával is csökkenteni lehetne a fájdalmat. Napjainkban egy patkány hippocampusz neuronkultúrában végzett kísérletekben azt az eredményt kapták, hogy az exogén ATP által kiváltott P2X7R aktiváció indukálta NO felszabadulást a BBG koncentráció függő módon antagonizálta (Codocedo J. F. és mtsai. 2013).

Korábbi eredmények szerint az aktivált P2X7R-ok alapvető szerepet játszanak a gyulladásos és neuropátiás fájdalom kialakulásában, ugyanis P2X7R knock out egerekben adjuváns indukált és ideglekötéses modellben is hiányzott a gyulladásos és neuropátiás hiperszenzitivitás, míg a normál nociceptív érzékelés megmaradt (Lord B. és mtsai. 2014).

Emellett neuropátiás betegekből származó sérült idegszövetekben és hátsó gyöki ganglionban a receptor túlműködését mutatták ki (Chessel I. P. és mtsai. 2005) és a P2X7R aktiválása a biológiailag aktív interleukin-1 $\beta$  és egyéb citokinek felszabadulásának stimulálásával vesz részt a gyulladásos folyamatokban (Jane P. H. és mtsai. 2007).

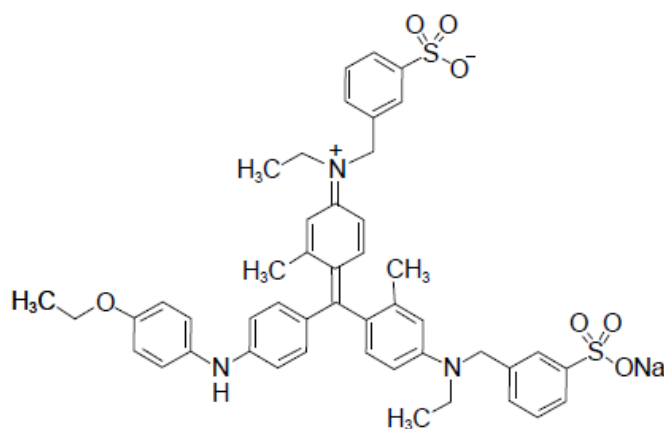
Az állandósuló neuropátiás fájdalom kialakulásához a P2X7R aktiváció az indukált mikroglia szignalizáción keresztül járul hozzá, ezt igazolja, hogy a BBG kezelés mérsékelte az ülőideg sérülés okozta mechanikai allodyniát és termikus hiperszenzitivitást patkány modellben (He W. J. és mtsai. 2011).

Egyre több adat utal arra, hogy a P2X7R nemcsak a krónikus, hanem az akut gyulladásban is szerepet játszik. A perifériás gyulladás által indukált P2X7R aktivitás  $\text{Ca}^{2+}$  influxon és citokin felszabaduláson keresztül vesz részt a centrális szenzitizáció kialakulásában. In vivo állat kísérletben a BBG jelentősen gátolta a centrális szenzitizációt (Itoh K. és Chiang C. Y. 2011).

Mindezek ellenére még a P2X7R funkciójáról a trigeminalis rendszer aktivációjának és szenzitizációjának vonatkozásában kevés információ áll rendelkezésre a migrén patomechanizmusa során, ezért fontos további kísérletes kutatások kivitelezése minél hatékonyabb terápiák kidolgozása érdekében.

### **3.3. Brilliant Blue G**

A BBG (8. ábra) egy szelektív P2X7R antagonist (Jiang L. H. és mtsai. 2000). Toxicitása és hatékonysága kísérleti körülmények között ideális, mivel áthalad a vér-agy gáton és átalakulás nélkül ürül a szervezetből (Peng W. és mtsai. 2009). Ennek köszönhetően széles körben használják a preklinikai vizsgálatokban.



8. ábra; A Brilliant Blue G molekuláris szerkezete (Franka G. 2007).

Számos P2X7R antagonistáról leírták, hogy dózis-függő fájdalomcsillapító hatású akut és neuropátiás fájdalom során (Dell'Antonio G. és mtsai 2002; Nelson D. és mtsai 2006). A BBG egyszeri kis koncentrációban neuropátiás patkány modellben hiperalgéziás tendenciát mutatott, míg magasabb dózisban nem igazolódott a hatása (Andó R. D. és mtsai. 2010).

A P2X7R antagonizációjának terápiás lehetősége számos központi idegrendszeri sérülés esetén beigazolódott, miszerint a BBG kezelés javította a neuronális sejthalált okozó rendellenességek végkimenetelét (Friedle S. A. és mtsai. 2010).

Ugyanakkor újabb kísérletekben a P2X7R hatásait akut gyulladásos fájdalom modellben is vizsgálták. A kísérletben patkány moláris fog pulpába adtak mustár olajat, amely aktiválja a TNC nociceptív neuronjait. Az adatok kiértékelése alapján a BBG kezelés csökkentette a centrális szenzitizációt, ez a nociceptív neuronok spontán aktivitásának, a receptív mező méretének és a mechanikai aktivációs küszöb értékének modulálásában nyilvánult meg (Itoh K. és Chiang C. Y. 2011).

#### **4. Célkitűzés**

Kísérletünk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a Gasser-dúc elektromos ingerlése következtében létrejövő c-Fos és nNOS immunreaktivitás változások modulálhatóak-e a P2X7 receptor antagonistá BPG előkezelés által.

## **5. Anyagok és módszerek**

### **5.1. Állatok**

Az alkalmazott eljárások megfeleltek Európai Közösség Tanácsának (86/609/ECC) és a Nemzetközi Fájdalomkutató Társaság (IASP) ajánlásának. A kísérleteket a Csongrád Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága (XXIV./352/2012.), és a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága engedélyezte. Mindent megtettünk annak érdekében, hogy a felhasznált állatok számát minimalizáljuk illetve az okozott szenvedésüket mérsékeljük. Az állatokat standard körülmények között tartottunk elegendő étellel, ivóvízzel ellátva, 12 órás megvilágítási ciklust alkalmazva. Kísérleteinkhez 21db hím Sprague-Dawley (SPRD) patkányt használtunk fel.

### **5.2. A kísérletek menete**

Az állatokat 2 csoportra osztottuk, az első csoport tagjai (n=11) fiziológiás sóoldatot, míg a második csoport állatai (n=10) 50 mg/kg BBG-t kaptak a farok vénájukba. Az oltást követően 90 perccel az állatokat elaltattuk klorál-hidrátal (400 mg/kg, i.p.), fejüket sztereotaxiás készülékbe fogtuk, koponyájukat feltártuk és fogászati fúró segítségével lyukat fúrtunk a bregmától 3,3 mm-re posterior, és 2,9 mm-re laterális irányba a jobb oldalon. Ezt követően egy koncentrikus bipoláris elektródát (CBBRE75, FHC Inc. USA) engedtünk a Gasser-dúcba. A sóoldattal kezelt csoportból 6, míg a BBG-vel kezelt csoportból 4 állatnak az elektródát 30 percig a ganglionban tartottuk, de elektromos ingerlést nem végeztünk. A többi állat (sóoldattal kezelt 5 db és BBG-vel kezelt 6 db) jobb oldali Gasser-dúcát 10 Hz, 0,5 mA, 5 ms négyszögimpulzusokkal 30 percig ingereltük az elektróda beleengedése, illetve az ingerlése megkezdése minden esetben a vénás oltások után 2 órával történt, valamint az állatok 4 órát éltek túl a beleengedést/ingerlést követően végig mély anesztéziában.

### **5.3. Immunhisztokémia**

Az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk 50 ml 0,1 M foszfát pufferelt sóoldattal (PBS) egy perisztaltikus pumpa segítségével. A PBS-es átmosást követően az állatokat 250 ml 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk, és az agyat, a gerincvelő cervikális szakaszát, valamint mindkét oldali trigeminális gangliont eltávolítottuk. Az elektróda megfelelő elhelyezkedését minden esetben ellenőriztük. Mintáinkat egy éjszakán át posztfixáltuk, majd emelkedő koncentrációjú szacharóz oldatban krioprotekciót végeztünk és kriosztát segítségével 30 µm

vastagságú transzverzális metszeteket készítettünk a TNC-ből. Annak érdekében, hogy az azonos magasságból származó metszeteket tudjuk majd a későbbiekben összehasonlítani, a metszeteket a canalis centralis-4. agykamra átmenettől számítva kezdtük gyűjteni. A kontroll (bal) oldalt bevágással jelöltük meg.

A metszeteket 18, 0,1% nátrium-azidos PBS-t tartalmazó tégelybe gyűjtöttük, így az egymást követő metszetek közötti távolság 540  $\mu\text{m}$  volt. A metszeteket 30 percig 0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  oldatban inkubáltuk, majd többször átmostuk 1% Triton X-100-at tartalmazó foszfát pufferelt sóoldatban (PBS-T). Ezt követően 10% normál kecske szérumos blokkolást alkalmaztunk a nem specifikus kötőhelyek gátlására. Metszeteinket az 1:2000 koncentrációban alkalmazott poliklonális c-Fos ellenes antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, sc-52) egy éjszakán át, míg az 1: 5000 koncentrációban alkalmazott nNOS poliklonális (EuroProxima, B220-1, Hollandia) antitesttel 2 éjszakán át inkubáltuk. Metszeteinket többször átmostuk PBS-T-vel, majd a másodlagos antitesttel (anti rabbit IgG made in goat, Vector Laboratories BA-1000) való 2 órás inkubálás következett. A színreakciót Vectastain Elite ABC kittel vizualizáltuk, 3'3-diaminobenzidin kromogén és nikkel enhancer jelenlétében. A festés specificitását az elsődleges antitest elhagyásával ellenőriztük. A metszeteket tárgylemezre vittük, megszáritottuk, majd lefedtük. A sejtszámolást egy Nikon Optiphot fénymikroszkóp 20X nagyítású objektívje alatt végeztük, külön az jobb és kontroll bal oldalakon.

#### **5.4. Statisztikai elemzés**

A statisztikai összehasonlításokat SPSS program segítségével végeztük (IBM SPSS Statistics 20). A sejtszámokat magasságonként hasonlítottuk össze, a kontroll és az ingerelt oldalakat külön csoportként kezelve ismételt méréses variancia analízis (RM ANOVA) segítségével, Sidak post hoc teszt alkalmazásával.

0,05-nél kisebb p érték esetén tekintettük a különbségeket statisztikailag szignifikánsnak.

## 6. Eredmények

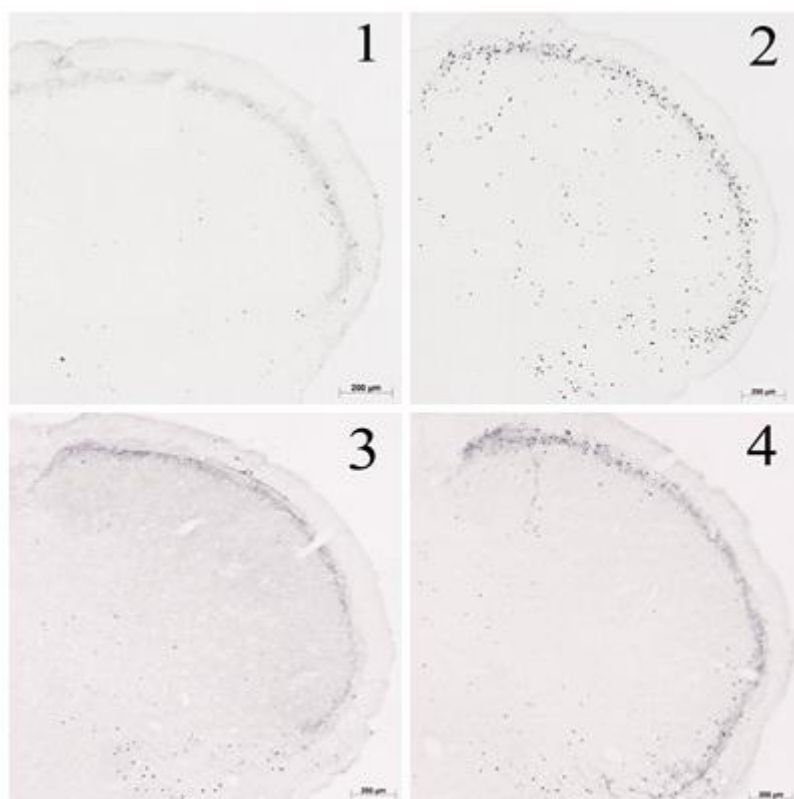
A TNC-ből származó transzverzális metszeteken az I-es és II-es laminában számos c-Fos immunreaktív (c-Fos-IR) sejt volt látható. A TNC-ben a sejtek magasságonkénti eloszlás változása megfelel a mag nagyságbeli változásának, nem volt olyan magasság, ahol különösen nagy sejtszám emelkedés lett volna megfigyelhető az ingerlés után.



9. ábra; Az obextól caudálisan kb. 1 mm-re készített transzverzális nyúlt velői metszetet ábrázoló mikroszkópos felvétel. A metszet BBG előkezelést kapott, ingerelt állatból származik. A bal oldali kontroll oldal ventrálsan bevágással jelölt, a jobb oldal az ingerelt oldal. Jól látható a c-Fos-IR sejtek számbeli különbsége a kontroll, illetve ingerelt oldalak között.

Lépték: 200μm

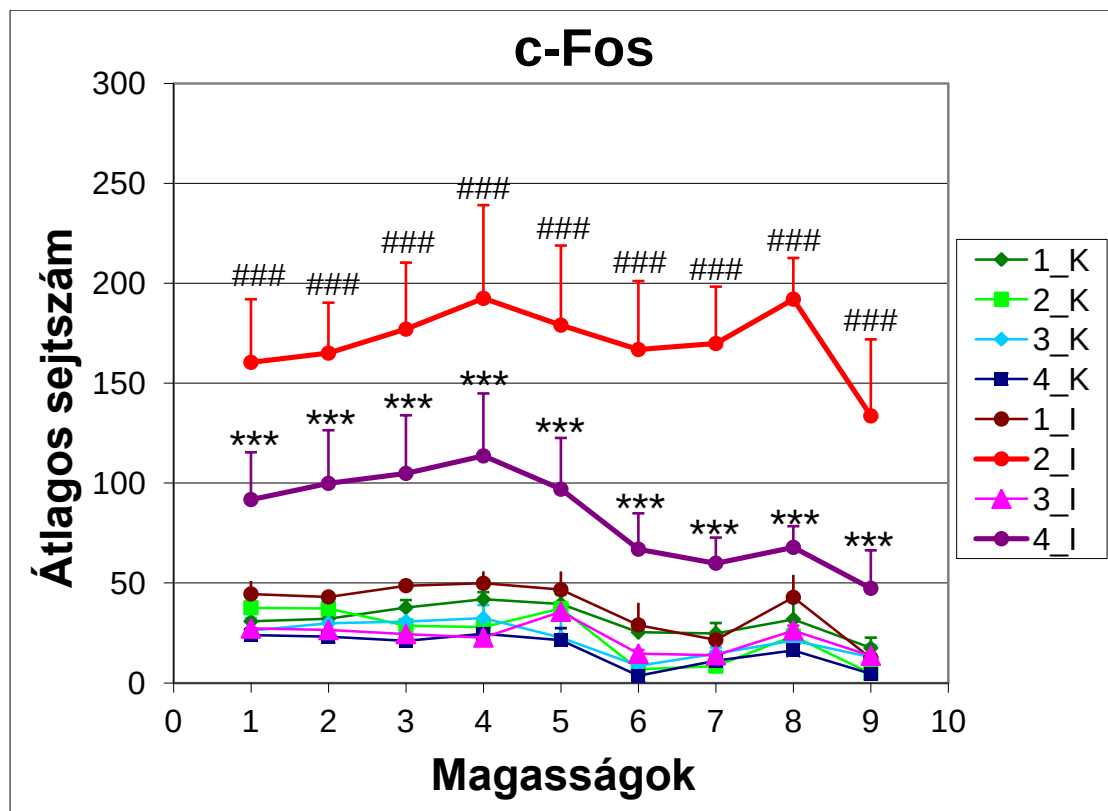
Az 9. ábrán, amely egy BBG előkezelt, ingerelt állat TNC-jének a c-Fos immunreaktivitását mutatja, látható, hogy az I-es és II-es lamina területén eltérő a c-Fos-IR sejtek száma a kontroll és ingerelt oldalak között. Vizsgálatainkban a kontroll oldalak között nem volt különbség, ezért a 10. ábrán már csak az ingerelt oldalokról készült képek szerepelnek.



10. ábra; c-Fos-IR sejtek patkány TNC-ben. (1) fiziológiás sóoldattal előkezelt álműtött csoport, (2) fiziológiás sóoldattal előkezelt ingerelt csoport, (3) BBG előkezelést kapott álműtött csoport, (4) BBG előkezelést követő ingerléses csoport ingerelt oldalairól készített felvételek. A jobb oldali metszeteken egyértelműen látható az ingerlés IR sejtek számára gyakorolt hatása. A 2-es és 4-es képeken számos c-Fos-IR sejt festődött az álműtött (1,3) csoportokhoz képest. Továbbá a BBG előkezelés hatása a 2-es és 4-es csoportokat összevetve figyelhető meg, ahol a 4-es csoportban kevesebb az IR sejtek száma a 2-eshez képest.

Lépték: 200µm

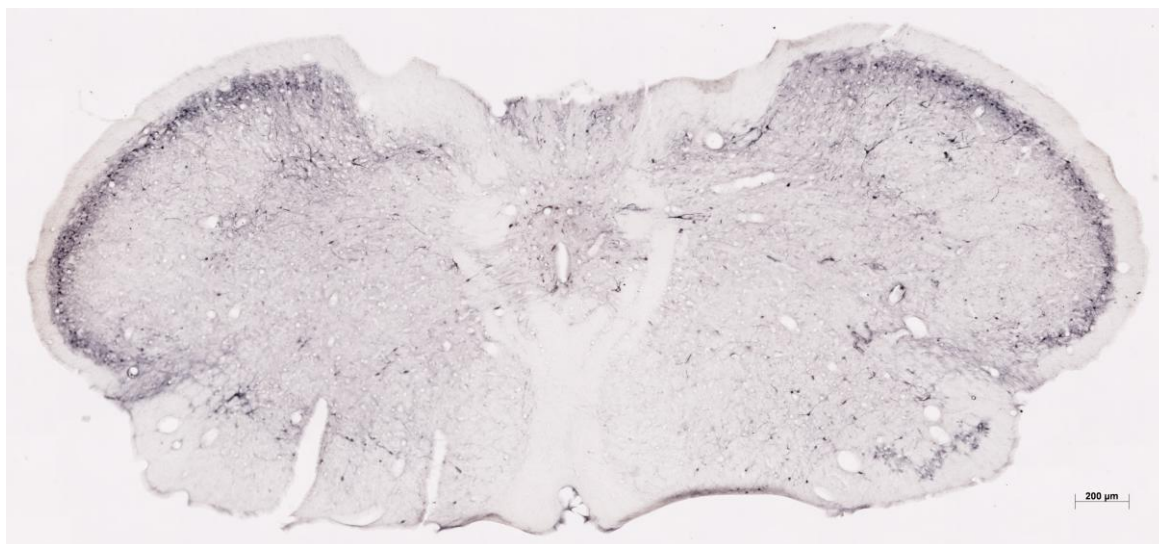
A fiziológiás sóoldattal előkezelt álműtött csoportban az elektróda beleengedése, illetve a műtéti folyamat nem okozott szignifikáns sejtszám emelkedést. A fiziológiás sóoldattal kezelt ingerelt csoportban a kontroll oldal és ingerelt oldal között szignifikáns növekedés mutatkozott a c-Fos-IR sejtek számában az ingerelt oldalon. Továbbá ha az álműtött állat elektródával érintkező oldalát, valamint az ingerelt állatok ingerelt oldalát hasonlítottuk össze szintén szignifikáns eltérést tapasztaltunk az elektromosan stimulált csoportokban (10. ábra 1 és 2). A BBG előkezelés az alap expressziós szintet (10. ábra 3) nem befolyásolta, míg az ingerlés okozta emelkedést csökkenteni volt képes (10. ábra 4).



11. ábra; A c-Fos immunhisztokémiai eredményeket összegző diagram a TNC rostrocaudalis tengelye mentén. Az 1. magasság a TNC caudalis, míg a 9. a rostralis végét jelöli. Az egyes vonalak az egyes csoportok (1 fiziológiás sóoldattal előkezelt álműtött, 2 fiziológiás sóoldattal előkezelt ingerelt, 3 BBG-vel előkezelt álműtött, 4 BBG-vel előkezelt ingerelt) kontroll és ingerelt oldalainak az átlag értékeit és a hozzá tartozó SEM (standard error of the mean) adatokat ábrázolják. A kettős kereszt a fiziológiás sóoldattal kezelt álműtött illetve ingerelt csoportok ingerelt (elektrodával érintkező) oldalai között lévő sejtszámbeli szignifikanciát mutatja, a csillag pedig a fiziológiás sóoldattal, illetve BBG-vel előkezelt csoportok ingerelt oldalai közti szignifikáns eltérést jelöli.

A sejtszámolások statisztikai kiértékelése után arra az eredményre jutottunk, hogy az álműtött (1,3) – ingerelt (2,4) és BBG-vel előkezelt (3,4) és nem előkezelt (1,2) csoportok között is különbség mutatkozik a c-Fos-IR sejtek számában, valamint a kontroll és ingerelt oldalak között az ingerelt csoportoknál áll fenn eltérés (11. ábra).

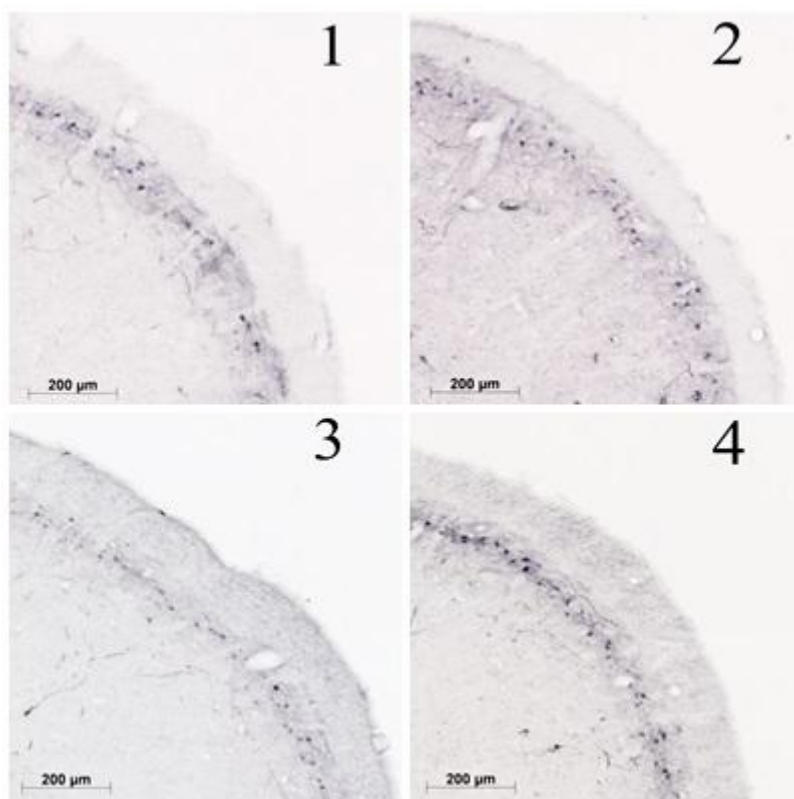
Az nNOS immunhisztokémiai festés metszetei közül a 12. ábrán a negyedik csoportból (BBG előkezelt ingerelt) készült felvétel látható, amelyen nem okozott változást sem az ingerlés, sem az antagonistá BBG előkezelés az nNOS immunreaktív (nNOS-IR) sejtek számának tekintetében. Ebben az esetben sem volt különbség a kontroll oldalak között egyik csoport metszetein sem, így az 13. ábrán csak az ingerelt oldalakat tüntettük fel.



12. ábra; Az obextól caudálisan kb. 1mm-re készített transzverzális nyúlt velői metszet képe, amely BBG-vel előkezelt, ingerelt állatból származik. A kontroll oldal ventrálisan bevágással jelölt. Megfigyelhető, hogy az nNOS-IR sejtek közel azonos számban festődtek a kontroll és ingerelt oldalon.

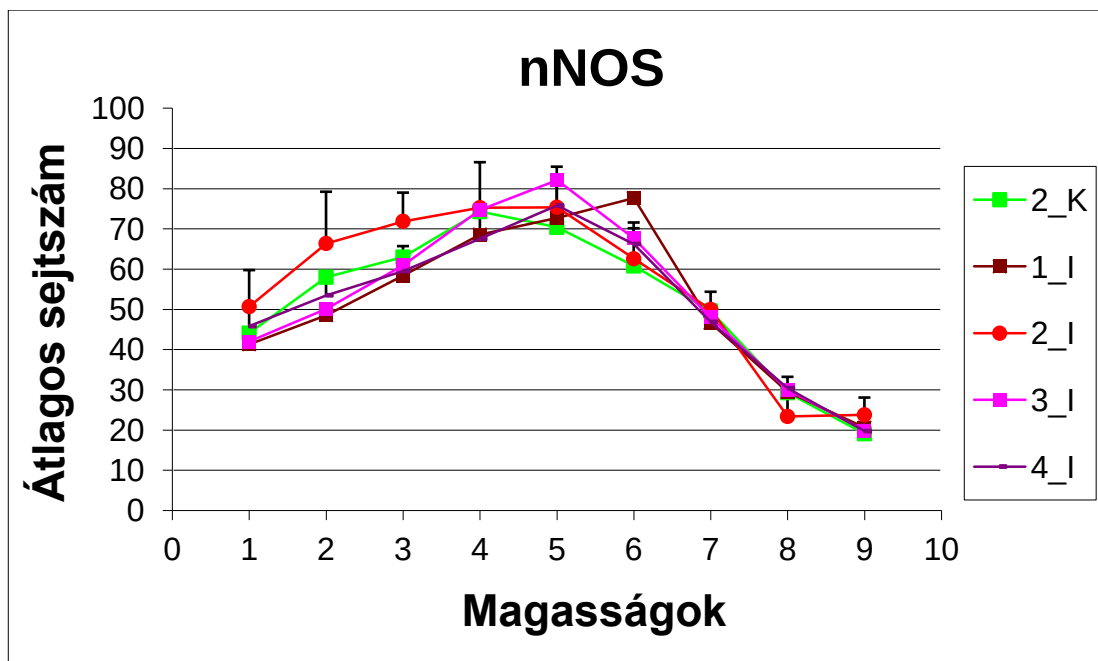
Lépték: 200μm

Az nNOS sejtszámok összehasonlítását követően nem tapasztaltunk különbséget az álműtött és ingerelt csoportok (13. ábra 1 és 2) között, az ingerlés nem okozott változást az immunreaktivitásban a TNC-ben. A BBG előkezelt csoportokban (13. ábra 3 és 4) a kezelés nem befolyásolta az nNOS alap szintjét, valamint az ingerlést követően sem modulálta az nNOS-IR sejtek számát.



13. ábra; nNOS-IR sejtek patkány TNC-ben. (1) fiziológiás sóoldattal előkezelt álműtött csoport, (2) fiziológiás sóoldattal előkezelt ingerelt csoport, (3) BBG előkezelést kapott álműtött csoport, (4) BBG előkezelést követő ingerelt csoport ingerelt oldalairól készült TNC metszeti képek. Mind a négy csoportban hasonló a sejtek száma az I-es és II-es laminában is.

Lépték: 200µm



14. ábra; nNOS-IR sejtek száma az egyes magasságokban, ahol az 1. magasság a TNC caudalis, a 9. a rostralis végét jelöli. A vonalak az egyes csoportok (1 fiziológiás sóoldattal előkezelt álműtött, 2 fiziológiás sóoldattal előkezelt ingerelt, 3 BBG-vel előkezelt álműtött, 4 BBG-vel előkezelt ingerelt) ingerelt oldalait és egy kontroll (2) oldalt reprezentálnak. A csoportátlagokat ábrázoltuk, illetve az ingerelt csoportok (2,4) estén a SEM értékeket is feltüntettük. A többi oldal illetve a SEM értékek ábrázolásától az ábra jobb átláthatósága érdekében tekintettünk el.

A statisztikai adatok kiértékelése után arra az eredményre jutottunk, hogy sem az álműtött (1 és 3) – ingerelt (2 és 4), sem a BBG-vel előkezelt (3 és 4) – nem előkezelt (1 és 2) csoportok között nem áll fenn szignifikáns különbség az nNOS adatokat tekintve. Mindemellett a kontroll és ingerelt oldalak között sem figyelhető meg szignifikáns különbség az immunreaktivásban egyik csoportnál sem (14. ábra).

## **7. Megbeszélés**

A migrén patomechanizmusának kutatására a preklinikai kísérletek során alkalmazott egyik modell a Gasser-dúc elektromos ingerlése. Számos irodalmi adat igazolja a trigeminalis rendszer perifériás és centrális aktivációját a trigeminalis ganglion elektromos ingerlését követően (Buzzi M. G. és mtsai. 1995; Knyihár-Csillik E. és Tajti J. 1995). Az elektromos ingerlés okozta perifériás szenzitizáció neurotranszmitter felszabaduláson keresztül a durális erek vazodilatációját, plazma protein extravazációt és steril gyulladást vált ki (Markowitz S. és mtsai. 1987). A szignalizációs folyamat tovább terjed a másodlagos érző neuronokra, ezt az aktivitást sejt szinten c-Fos immunreaktivitás növekedés jelzi, amely immunhisztokémiai módszerrel jól detektálható (Knyihár-Csillik és mtsai. 1997; 2000). A c-Fos onkoprotein megjelenését, illetve a trigeminalis aktivációt a Gasser-dúc ingerlésén kívül nitroglicerinn és kapszaicin stimulációs modellekben is kimutatták (Tassorelli C. és Joseph S. A. 1995; Ter Horst G. J. és mtsai. 2001). Korábbi eredményekkel megegyezően, kísérletünk során a harminc perces Gasser-dúc ingerlés szignifikánsan növelte a c-Fos-IR sejtek számát a TNC-ben, amely igazolja a trigeminalis rendszer aktivációját.

Napjainkban intenzíven kutatott terület a purinerg szignalizáció és a fájdalom kapcsolata. Számos tanulmányban leírták, hogy a P2X7R részt vesz a krónikus gyulladásban és a neuropátiás fájdalom kialakulásában és fenntartásában. A P2X7R többnyire preszinaptikusan fordul elő, amely egy kezdeti rövid stimulus, mint például az extracelluláris ATP szint növekedés hatására nem szelektív kation csatornaként működik és modulálja az idegvégződések neurotranszmitter leadását. Ezen mechanizmust feltételezik a fájdalom szignalizációs folyamatának hátterében (North R. A. 2002).

A P2X7R fiziológiai funkciójára utaló eredményeket kaptak gyulladásos modellben. A hátsó gyöki ganglion gliális szatellita sejtjeiben lévő P2X7R-ok tónusosan gátolják a P2X3R-okat neuronokban azáltal, hogy ATP felszabaduláson keresztül serkentik a neuronális P2Y1R-okat, majd ezek gátolják a P2X3R-ok expresszióját. Ezen elképzelés alapján arra következtettek, hogy a P2X7R-ok közvetlen gátlása nem a legjobb módszere lehet a fájdalom csökkentésének. Ugyanis a BBG kezelés az allodynia csökkenés mellett a gyulladás mértékét növelte a periférián, következésképp a centrális hatásának érvényesülését valószínűsítik (Chen Y. és mtsai 2008).

Egy in vivo fogbél gyulladásos patkányokon végzett kísérletben bizonyították szerepét akut gyulladásban is egy szelektív antagonistájának a BBG-nek az alkalmazásával. A BBG kezelés a gyulladást mérsékelni volt képes, tehát csökkentette a trigeminalis aktivációt és

szenzitizációt. Azonban meg kell jegyezni, hogy a BBG nem blokkolta a centrális szenzitizáció összes paraméterét, ebből arra lehet következtetni, hogy más P2 receptorok is befolyásolják a folyamatot (Itoh K. és Chiang C. Y. 2011).

Ezen eredmények alapján vizsgáltuk meg a BBG előkezelés c-Fos immunreaktivitásra gyakorolt hatását a Gasser-dúc elektromos ingerlését követően. Kísérleteinkben a BBG csökkentette a c-Fos-IR sejtek számát az ingerelt csoportok TNC-jében az álműtöttekhez képest, tehát a P2X7R antagonizmus kísérletünkben képes volt mérsékelni a trigeminalis aktivációt. Ebből az eredményből arra következtethetünk, hogy a BBG főként a perifériás területeken mérsékelheti az ingerlés következtében létrejövő neurogén gyulladást, ezáltal csökkentve a trigeminalis rendszer aktivációját a másodlagos neuronok szintjén. A BBG hatását úgy is kifejezheti, hogy bejutva a központi idegrendszerbe, magában a TNC-ben modulálhatja az elsődleges neuronról a másodlagosra történő információ terjedését, ezáltal csökkentve az aktivációt.

A BBG alkalmazása megfelelő lehet a P2X7R jelenlétének és a blokkolást követő hatásának megállapítására, amelynek egyik potenciális módja a c-Fos expressziós szintjének meghatározása. Egy NTG indukálta egér migrén modellben a P2X7R antagonizmusának és genetikai deléciójának következményét vizsgálták és azt az eredményt kapták, hogy a BBG előkezelés csökkenti a c-Fos immunreaktivitást a TNC és a nyaki gerincvelői szegmens területén (Gölöncsér F. és Sperlágh B 2014). Az előbb említett közleménytől eltekintve a trigeminalis rendszer és a P2X7 receptorok vonatkozásban meglehetősen kevés adat áll rendelkezésre. A kérdés vizsgálatával fontos információkat nyerhetünk a trigeminalis nocicepció folyamatáról, amely közelebb vihet a fejfájások patomechanizmusának megértéséhez.

Számos korábbi vizsgálat nNOS immunreaktivitás növekedést írt le a TNC-ben NTG, illetve formalin adása után (Párdutz A. és mtsai. 2000; Lam H. H. és mtsai. 1996), tehát ezen vizsgálatokban a trigeminalis rendszer aktivációja és szenzitizációja is észlelhető volt. A megállapítás igazolására NOS inhibitorokat alkalmaztak, amelyek mérsékeltek a trigeminalis rendszer aktivitását és az állatoknál megfigyelhető fájdalmas viselkedést (Lassen L. H. és mtsai. 1997), ezáltal utalva a NO szerepére a trigeminalis szenzitizációban.

Kísérletünkben arra is kíváncsiak voltunk, hogy az általunk kiváltott trigeminalis aktiváció vezet-e szenzitizációhoz is, amelyre közvetve az nNOS immunreaktivitás változás megfigyelésén keresztül próbáltunk következtetni.

A trigeminalis ganglion elektromos ingerlése nem okozott szignifikáns változást a TNC nNOS-IR sejtek számában, oldalkülönbség sem volt tapasztalható a csoportokon belül. A

trigeminalis ganglion elektromos ingerlése az általunk alkalmazott paraméterekkel egy meglehetősen erős stimulus, amely a másodlagos érző neuronok aktivációjához vezet. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy bár az aktiváció megtörténik, azonban a szenzitizációs folyamatok nem jönnek létre. Ebből arra következtethetünk, hogy az általunk alkalmazott trigeminalis ingerlés nem okoz szenzitizációt, azonban ezen feltételezésünket még további kísérletekkel meg kell erősítenünk.

Korábbi kísérletekben számos ingerlési időtartamot, frekvenciát és áramerősséget alkalmaztak a trigeminalis ganglion stimulálására (Buzzi M. G. és mtsai. 1991; Takemura M. és mtsai. 2000), de a szenzitizációs jelenségeket ezekben a kísérletekben nem vizsgálták, így nem rendelkezünk irodalmi adattal arról, hogy a trigeminalis ganglion elektromos ingerlése következtében kialakul-e a trigeminalis rendszer szenzitizációja.

Kísérleteinkben a P2X7R antagonistá BBG nem befolyásolta az nNOS-IR sejtek számát sem az álműtött sem az ingerelt csoportban. Eredményeink alapján azonban nem lehet kizárni, hogy a P2X7 receptorok szerepet játszanak a trigeminalis rendszer aktivációjában és szenzitizációjában, hiszen az nNOS immunreaktivitás az ingerlés hatására önmagában sem változott, így a BBG esetleges hatásának nem volt alkalma érvényesülni, ezért más modellekben is meg kell vizsgálni.

Számos tanulmány arra utal, hogy a P2X7R aktiváció NO termeléshez vezet, de ezen vizsgálatok többnyire asztrocitákból származnak, ezért kevés bizonyíték áll rendelkezésre ahhoz, hogy alátámassza, hogy ez a szabályzó mechanizmus neuronokban is jelen van-e. Más kísérletes adatokból arra következtethetünk, hogy az exogén ATP növeli a NO termelését a P2X7R aktivációján keresztül, amely glutamát – NMDA R aktivációtól független útvonal (Codocedo J. F. és mtsai. 2013). Ezek alapján a P2X7 receptorok modulálása által befolyásolni lehetne a NO felszabadulását, ezáltal a szenzitizációs folyamatok alakulását a trigeminalis rendszerben.

Vizsgálataink konklúziójaként elmondható, hogy a P2X7R BBG-vel való antagonizálása alkalmas lehet a trigeminalis rendszer aktivációjának mérséklésére. Ezzel szemben a trigeminalis ingerlés és a P2X7R blokkolásának hatása nem igazolódott be a szenzitizációs folyamatokban, ezért további vizsgálatokra van szükség, hogy tisztázhassuk a P2X7R trigeminalis rendszerben és centrális szenzitizációban betöltött szerepét.