

Országos Tudományos Diákköri Konferencia

XXXII. OTDK

Biológia Szekció

**TÓNIKUS KANNABINOID HATÁS ÁLTAL KIVÁLTOTT MOLEKULÁRIS
VÁLTOZÁSOK A GERINCVELŐ HÁTSÓ SZARVÁBAN**

Barti Benjám

Biológus MSc hallgató; II. évfolyam

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

Ideg tudomány és Humánbiológia szakirány

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA - KÍSÉRLETI ORVOSTUDOMÁNYI KUTATÓINTÉZET

Molekuláris Neurobiológia Kutatócsoport



Témavezetők: Dr. Stephen Woodhams, Dr. Katona István



Budapest, 2015

Tartalomjegyzék

Rövidítések.....	3
Összefoglaló	4
Abstract	5
I. Bevezető.....	6
I/a A fájdalom anatómiája	6
I/b Fájdalom és endokannabinoidok.....	10
II. Célkitűzések	13
III. Anyagok és módszerek	14
III/a A kísérletben felhasznált állatok.....	14
III/b Perfúzió és a szövetek előkészítése	14
III/c Peroxidáz-immunreakció.....	14
III/d Kettős jelöléses immun-fluoreszcens reakció	15
III/e Konfokális mikroszkópiai analízis	16
III/f Statisztikai analízis.....	17
IV. Eredmények	18
IV/a CB ₁ jelölés intenzitás-változásának vizsgálata a hátsó szarvi régióban	18
IV/b Peptiderg nociceptív afferens neuronok és CB ₁ receptor kolokalizációs vizsgálatok.....	20
IV/c Serkentő interneuronok és CB ₁ receptor kolokalizációs vizsgálatok	20
IV/d Gátló interneuronok és CB ₁ receptor kolokalizációs vizsgálatok	21
V. Diskusszió	25

Rövidítések

2-AG:	2-arachidonoil-glicerín
AEA:	Anandamid
CB ₁ :	(Cannabinoid receptor Type-1) kannabinoid receptor
CGRP:	(Calcitonin Gene Related Peptid) kalcitonin génhez kapcsolódó fehérje
DAB:	3,3'-Diaminobenzidin
DGL- α :	Diacyl-glicerín lipáz- α
DLF:	(Dorsal Lateral Funiculus) hátsó szarvi fehérállományi köteg
FAAH:	(Fatty Acid Amide Hydrolase) zsírsav-amid-hidroláz
IB4:	Izolektin-B4
MGL:	Monoacyl-Glicerín Lipáz
PB:	(Phosphate Buffer) foszfát puffer
PFA:	Paraformaldehid
TBS:	(Tris Buffered Saline) Tris-só
vGluT2:	(vesicular Glutamate Transporter – 2) vezikuláris glutamát transzporter
VIAAT:	(Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter) vezikuláris gátló aminosav transzporter
Δ^9 -THC:	Δ^9 - tetrahidrokannabinol

Összefoglaló

A krónikus fájdalom a világ népességének ~5% át sújtja, jelentős negatív hatást gyakorolva az egyének életminőségére. Mivel a jelenlegi kezelések hatékonysága nem megfelelő, ezért az alternatív lehetőségek felfedezése fontos célja a fájdalomkutatásnak. Egy ígéretes út lehet az endokannabinoid szignalizációs rendszeren keresztüli terápia, az endokannabinoidok (eCB) ugyanis kulcs szerepet töltenek be a fájdalomérzékelés szabályozásában. Nemrég kiderült, hogy az eCB hidrolizáló enzim, a Monoacil-Glicerín Lipáz (MGL) gátlása hatékony fájdalomcsillapító hatású azáltal, hogy hiányában megemelkedik az eCB 2-arachidonil-glicerín szintje, ezzel CB₁ receptor mediálta fájdalomcsillapítást vált ki az eCB-k pszichoaktív mellékhatásai nélkül. Azonban a hosszú távú fájdalomcsillapító hatását eredményességét csökkenti a tolerancia jelensége. Ezért kísérletünkben célul tűztük ki, hogy felderítsük a jelenség hátterében álló molekuláris mechanizmusokat. Az MGL génkiütött egerekben nem figyelhető meg antinociceptív fenotípus, ezért potenciális tolerancia-modellként szolgálhat.

Immunhisztokémiai módszereket alkalmazva megfigyeltük, hogy az MGL^{-/-} egerekben a vad típushoz képest drámai, 50%-os régió-specifikus csökkenés észlelhető a CB₁ kannabinoid receptor jelölés intenzitásában a gerincvelő hátsó szarvi régió felső rétegeiben. A változás celluláris alapjainak feltárásához kettős immunjelölést alkalmaztunk. A peptiderg nociceptív afferens neuronok (CGRP⁺), valamint a gátló (VIAAT⁺) és serkentő interneuronok (vGluT2⁺) idegvégződéseiben nem találtunk számottevő CB₁ szintváltozást. Ezzel szemben azonban a CGRP és vGluT2 immunjelölés esetében markáns csökkenést figyeltünk meg. Meglepő módon csekély CB₁ szint csökkenést figyeltünk meg az axon terminálisokon, emellett azonban szignifikáns csökkenést találtunk a CGRP és a vGluT2 jelölés intenzitásának szintjében.

Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a krónikusan növekedett 2-AG szint változást vált ki a nociceptív hálózatok organizációjában. A hálózatban lévő serkentő neuronok markerszintjének csökkenése a KO állatban egy kompenzációs mechanizmus eredménye lehet, ami a 2-AG/CB₁ szignalizáció fejlődésben betöltött szerepét hangsúlyozza. A fájdalomérzékelésben részt vevő rostok molekuláris és celluláris adaptációja tehát hozzájárulhat a tolerancia mechanizmusának kialakulásához.

Abstract

Chronic pain afflicts ~5% of the global population, and represents a considerable burden on society. Currently available analgesics lack efficacy, and thus alternative strategies present an important target for pain research. One promising approach is modulation of the endocannabinoid (eCB) system. Endocannabinoids plays a key role in the regulation of pain sensation. Enhancing levels of the eCB 2-arachidonoylglycerol (2-AG) via blockade of its degradative enzyme monoacylglycerol lipase (MGL) produces CB₁ receptor-mediated analgesia in the absence of cannabinoid-like side effects. However, despite initially promising reports, recent evidence reveals a loss of analgesia following chronic MGL inhibition, and functional antagonism of CNS eCB signalling which may even potentiate tonic pain states. To investigate the possible mechanism underlying this effect, we studied changes in CB₁ expression in spinal cord dorsal horn pain circuitry in mice lacking MGL.

Using immunofluorescence staining, we observed a dramatic region-specific loss of >50% of CB₁ staining in the spinal superficial dorsal horn of MGL^{-/-} versus MGL^{+/+} animals. To determine the cellular localization of this change, we probed spinal cord sections for expression of CB₁ in key cell types of the nociceptive circuitry; peptidergic (CGRP+) nociceptive primary afferents, inhibitory (VIAAT+) and excitatory (vGluT2+) interneurons. Surprisingly, we observed only a small reduction of CB₁ expression in axon terminals of the investigated neuronal cell types. However, we did observe significant decreases in CGRP-, and vGluT2-immunostaining in the absence of MGL.

These data demonstrate a significant alteration in organisation of the nociceptive circuitry in the presence of chronically elevated 2-AG levels. We show reduction in markers of excitatory, pro-nociceptive axon terminals possibly representing a compensatory structural adaptation. These data point to a potential developmental role for 2-AG/CB₁ signalling in synapse formation, and/or an ongoing role for MGL in maintaining synaptic stability. In either case, a functional eCB system may be critical for the maintenance of normal nociceptive neural circuitry in the spinal cord. Thus, molecular and cellular adaptations of the nociceptive neural circuitry in the spinal cord can be a key cause in the development of tolerance.

I. Bevezető

I/a A fájdalom anatómiája

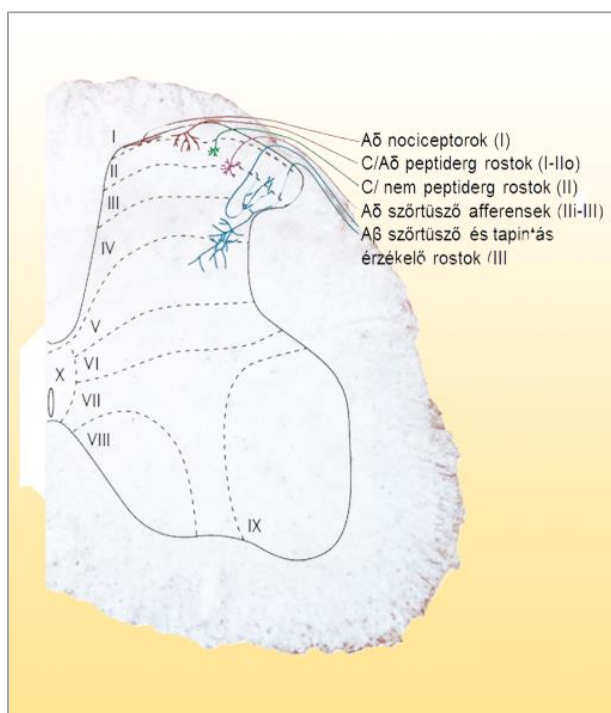
Az élő szervezetet érő mechanikai behatásokat, hőmérsékleti változásokat, külső vagy endogén kémiai anyagok által okozott stimulusokat az idegrendszer érzékeli és értelmezi. Ezen stimulusok intenzív behatása fájdalom kialakulását eredményezi. A fájdalom egy komplex pszichológiai jelenség, mely szenzoros, emocionális és motivációs elemekből épül fel. A negatív emóciók és a motiváció, hogy a fájdalmas ingertől minél előbb megszabaduljunk, elősegíti a szöveti sérülések elkerülését vagy minimalizálását. A fájdalom szenzoros érzékelése komplex idegrendszeri folyamatok által valósul meg.

Bár jelentőségéhez képest még mindig keveset tudunk a fájdalomérzetet processzáló hálózatok pontos felépítéséről és a molekuláris komponenseiről, főbb anatómiai struktúrái jól körülhatároltak.

A külső környezetből vagy az endogénen érkező stimulusokat a perifériás idegsejtek egy specifikus szubpopulációja érzékeli, amiket nociceptoroknak nevezünk. Ezen neuronok pseudo-unipoláris felépítésűek, egy perifériás és egy centrális axonnyúlvánnyal is rendelkeznek. Perikaryonjaik a törzs szintjén a hátsó szarvi ganglionokban, a feji régió esetén a trigeminális ganglionban helyezkednek el. Perifériás axonjuk a subcutisban és a tápcsatorna falát képező izomszövetben végződik, ahol a szöveti sérülés esetén a sejtekből felszabaduló különböző kémiai anyagokat képes érzékelni és hatására ingerületet továbbítani a központi idegrendszer felé. A fájdalomérző sejtek ingerküszöbe magas, így fiziológiásan csak a megfelelő szintű kulcsinger hatására depolarizálódnak. Az elsődleges afferens, gerincvelőbe projektáló neuron-rostokat funkciójuk és felépítésük szerint több csoportba oszthatjuk [Basbaum és mtsai, 2009, Todd, 2010]. Ezen neuron-csoportok integráns működése teszi lehetővé a szenzoros és a fájdalmi érzetek kialakulását. A nagy átmérőjű, alacsony ingerküszöbű A β rostok a mechanikai ingerekre reagálnak, érzékelik a tapintást, a nem fájdalmas behatásokat. A fájdalmat érzékelő nociceptorokon belül két főbb sejtpopulációt különíthetünk el. A közepes átmérőjű, myelinizált delta (A δ) rostokon történik a gyors, szűrő fájdalom elvezetése, míg a kis átmérőjű myelin hüvely nélküli C-rostokon pedig a nehezen lokalizálható, égető jellegű, lassú fájdalomérzet továbbítása történik. Aszerint, hogy a nociceptorok milyen molekulákat termelnek, további altípusokra oszthatjuk őket. A C-rostokon belül megkülönböztethetünk két főbb alpopulációt: a peptiderg és nem-peptiderg

nociceptív afferens idegsejtek. Újabb kutatásokban átfogó transzkriptum-analízis segítségével 11 szenzoros neuron populációt különítettek el: három különböző alacsony küszöbű mechanoreceptort, két proprioceptív populációt, valamint további hat altípust, melyek elsődlegesen termoszenzitív, viszketésre érzékeny, C-típusú alacsony küszöbű mechanikai ingerre érzékeny és nociceptív ingerek érzékelésének funkcióját látják el [Usoskin és mtsai, 2014].

A nociceptor perifériás axonnyúlványa által detektált ingerület a centrális axonnyúlványon halad tovább a gerincoszlop felé. A centrális nyúlvány a gerincvelő hátsó szarvi régiójában végződik, ahol az első szinaptikus kapcsolatot formálja a fájdalomérzékelésben. Itt anatómiailag jól elkülönült sejtrétegeket figyelhetünk meg, amelyet már az 1950-es évek elején leírt egy svéd kutató, Bror Rexed (1. ábra). A különböző típusú nociceptorok precízen rendezett módon végződnek a hátsó szarv felsőbb rétegeiben. Ezek a Rexed-laminák, melyek közül főként az I, II, felelős a perifériás fájdalomérzékelésben és processzálsban [Todd, 2010].



1. ábra - A gerincvelői Rexed-laminák sematikus ábrázolása és az elsődleges afferens neuronok projekcióinak területe. A szomatikus területről nociceptív információt szállító neuronok a hátsó szarv területén felsőbb rétegeibe futnak. A II. lamina, a substantia gelatinosa két részre osztható: külső (IIo) illetve belső (IIi) rétegekre. A peptiderg C-rostok és a myelinizált Aδ-rostok főként az I. lamina nagyobb méretű projekciós neuronjain végződnek, valamint interneuronokon a IIo rétegben. A nem-peptiderg rostok a II. lamina belső rétegeiben (IIi) lévő interneuronokon végződnek. A mélyebb (III-V) rétegekben a Aδ szörtűsző afferensek és tapintás érzékelő receptorok (Aβ) terminációja figyelhető meg [Todd, 2010 alapján, módosítva].

A hátsó szarvi régióban számos serkentő és gátló idegsejt-típus található, amik szabályozzák az afferens rostok és a projekciós neuronok közötti információáramlást. Egyes hátsó szarvi rostok interneuronokon keresztül kapcsolatot teremtenek a mellső szarvi mozgató idegsejtekkel is, így kialakítva a nociceptív reflexívet. A gerincvelői fájdalom-érzékelő hálózatok neuronjai a primer fájdalomérzékelő afferenseken kívül kapnak projekciókat az alacsony ingerküszöbű A β mechanoreceptoroktól is. Ez azonban a substantia gelatinosa (II. lamina) területén található gátló interneuronokon keresztül feed-forward szabályzással ún. kapuzási mechanizmust hoz létre [Melzack és Wall, 1967]. Csupán az interneuronok morfológiája alapján is elkülöníthetünk négy főbb típust, tovább növelve a rendszer komplexitását. Ezek a sziget sejtek, a centrális sejtek, a vertikális- és radiális sejtek [Lu és Perl, 2005]. Az elsődleges afferens neuronokon érkező információ tehát a felsőbb laminákban elhelyezkedő projekciós neuronokon keresztül éri el az agyat. A fájdalomérzetnek nincs kijelölt agyi központja, a neuronok nyúlványai számos területre vetülnek. A projekciót kapó főbb területek között van a laterális parabrachiális area, a periaqueductális szürkeállomány és a thalamus egyes magcsoportjai, melyekből a cinguláris- és szomatoszenzoros kéregbe futnak a rostok (2. ábra).

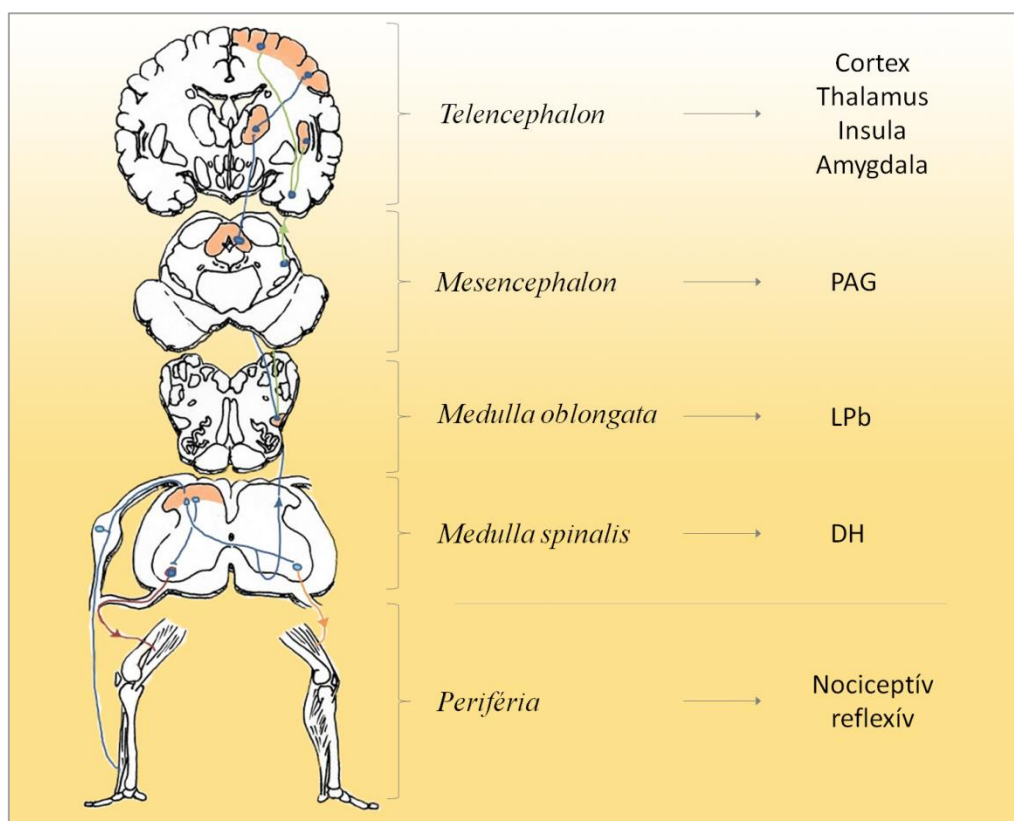
A laterális parabrachiális area (LPb) a legfőbb célterülete az I. Rexed lamina projekciós neuronjainak. Erről a régióról aztán a limbikus rendszer egyes struktúrái, például az amygdala és a hipothalamus kapnak bemenetet. Valószínűsíthető, hogy ez a pálya felelős a fájdalom emocionális hátteréért, hogy negatív élmény társuljon a fájdalmas behatáshoz és így a jövőben az élőlény elkerülje azt.

A periaqueductális szürkeállomány (PAG) feladata különböző stratégiák kidolgozása, amivel az élőlény megbirkózhat a fennálló stresszorral (beleértve a fájdalmat is). Az erről a területről érkező neuronális projekciók egyes agyalapi és nyúltvelői struktúrákban, például a rostrális ventromediális medulla területén végződnek, majd az innét eredő leszálló pályáknak kulcs fontossága van a fájdalmi ingerek módosításában, ezért mondhatjuk a gerincvelőt egy integratív régiónak a fájdalomérzékelésben.

Számos thalamikus régió kap bemenetet a gerincvelői hátsó szarvi régióból például a ventrális posterolaterális nukleusz (VPL), melyből aztán az elsődleges szomatoszenzoros kéreg kap projekciókat, valamint a posterior trianguláris nukleusz, amely pedig a másodlagos szomatoszenzoros kéreg és az insula területére érkeznek axonok.

A fájdalom-érzékelő hálózatok thalamusban található neuronjai a magasabb rendű telencephalikus kérgi központokba futnak, ahol az információ tudatosul.

Ezen területeket érintő veleszületett vagy fizikai károsodások következtében azonban a fájdalomérzet kóros, krónikus fennállása léphet fel. Krónikus fájdalomérzékelésben szenvedőknél az egyén fokozott fájdalmi reakcióval reagál egy nem fájdalmas érintésre is. Neuropátiás fájdalom esetén a fájdalomérzékelés teljes hiánya lép fel, aminek következtében fájdalmi ingerre nem indul el védekező mechanizmus, amivel elháríthatnák a veszélyt, ez pedig sok esetben halálos végekimenetelű lehet. A krónikus és neuropátiás fájdalom a világ népességének több mint 5%-át érinti, jelentős negatív hatást gyakorolva ezzel az egyének életminőségére.

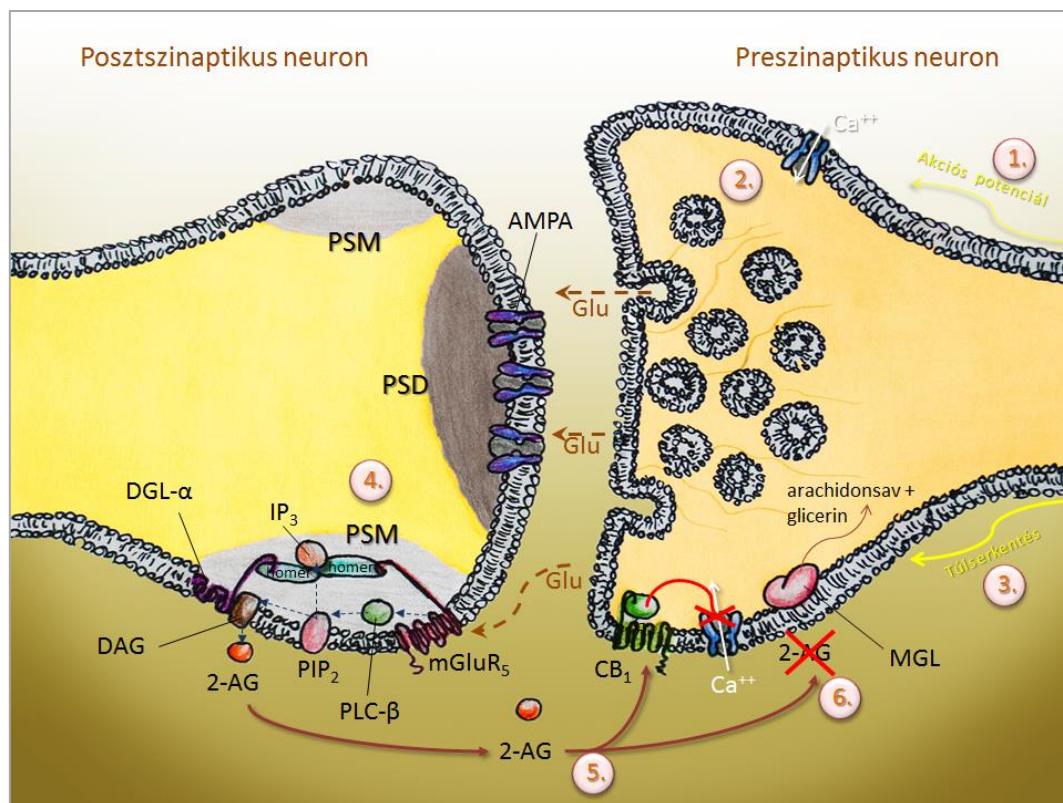


2. ábra – Felszálló fájdalmi információt közvetítő főbb központi idegrendszeri állomások. A nociceptorok érzékelik a periféria szöveti sérülését, axonjaik a gerincvelő hátsó szarvi (DH) régiójában végződnek. Itt átkereszteződnek ellenoldali projekciós neuronokra, kialakulhat a nociceptív reflexív (sárga nyíl). Az átkereszteződött neuronok kollaterálisai aztán magasabbrendű idegi struktúrákba projektálnak. a nyúltvelő területén a laterális parabrachiális areába (LPb), a középgagy területén a periaqueductális szürkeállományba (PAG), a thalamus területére valamint az előagy területén pedig számos különböző kérgi struktúrába, mint az amygdala, az insuláris és szomatoszenzoros kéregés. A szerző ábrája.

I/b Fájdalom és endokannabinoidok

Az indiai kender (*Cannabis sativa*) fájdalomcsillapító hatása már több mint 5000 éve ismert. A kender hatóanyaga, a Δ^9 - tetrahidrokannabinolt (Δ^9 -THC) napjaink farmakológiájába főként a neuropátiás megbetegedéseknél és rákos pácienseknél alkalmazzák fájdalomcsillapítóként. A Δ^9 -THC molekula az 1-es típusú kannabinoid receptorhoz (CB₁) való kötődésen keresztül fejti ki hatását. Az endokannabinoidok fájdalomérzékelésben betöltött jelentős szerepét az elmúlt évtized kutatásai állították az idegtudomány fókuszába [Guindon és Hohmann, 2009]. Az útvonal fő feladata az idegsejtek közötti szinaptikus transzmisszió szabályozása, a szinaptikus túlserkentés megakadályozása.

Fiziológiásan a CB₁ receptor endogén ligandjait a lipid természetű anandamid (AEA) és a 2-arachidonil-glicerin (2-AG) képezi, melyeket kannabinoid molekuláknak nevezünk. A vízzoldékony neurotransmitter molekulákkal ellentétben az endokannabinoidok lipid természetűek, így raktározásuk nehezen megoldható. Ez okból az AEA és a 2-AG mindig a hatás helyén és idejében szintetizálódik, amikor arra éppen igény van [Marsicano és mtsai, 2003]. A CB₁ receptor preszinaptikusan lokalizálódik az axon terminálisokban [Katona és mtsai, 1999; Kawamura és mtsai, 2006]. Az endokannabinoid molekulák posztzinaptikus szintézisük után a preszinaptikus CB₁ receptorhoz kötődnek, ezzel egy retrográd szignalizációs útvonalat létrehozva (3. ábra). A receptorok aktiválása gátolja az N és a P/Q-típusú Ca²⁺ csatornákat, így megakadályozza a membrán depolarizáció során fellépő Ca²⁺ beáramlást a sejtbe. A lokális Ca²⁺ -szint emelkedése nélkülözhetetlen ahhoz, hogy az adott sejtben végbemenjen a neurotranszmitterek exocitózisa, így a Ca²⁺ csatornák blokkolásával a CB₁ receptor képes gátolni a szinaptikus transzmisszió kialakulását [Mackie, 2006]. Ez a mechanizmus a fájdalomérzékelő hálózatokban részt vevő idegsejtekben is működik, ahol a preszinaptikus idegsejt gátlásával a fájdalomérzet kialakulását és annak mértékét szabályozzák. Erre számos tanulmány bizonyítékul szolgál, amikben viselkedési tesztekkel vizsgálták a hatást [Martin és mtsai, 1993, Walker és Hohmann, 2005]. A CB₁ főbb endogén agonistái, az AEA és a 2-AG perifériás alkalmazása által is csökkenti a fájdalomérzékelést [Calignano és mtsai, 1998, Guindon és mtsai, 2006]. A környezeti stresszor hatására kialakuló stressz indukált fájdalomérzet csökkenése hátterében is endokannabinoid mechanizmus áll, mely során a gerincvelőben növekszik a 2-AG szintje [Drew és mtsai, 2000; Suplita és mtsai, 2006]. Révén, hogy a kannabinoid molekulák szintézise direkt a hatás helyén és idejében zajlik, az őket lebontó enzimek is kulcsszerepet töltenek be a szabályozásukban. A kannabinoid molekulák szintjének endogén növelése a lebontó enzimek gátlásán keresztül is



3. ábra – Az endokannabinoid retrográd szignalizációs útvonal. Idegsejtek között az ingerület membrán depolarizáción keresztül kialakuló akciós potenciál hullámokon terjed tovább. **1.** A preszinaptikus idegsejtek membránján végigterjedő akciós potenciál hullám hatására az axon terminálisok területén Ca^{++} csatornák nyílnak. **2.** Az így sejtekbe áramló Ca^{++} -több más faktor mellett- lehetővé teszi a neurotransmitter (az ábrán: Glu-glutamát) szekréciót. A neurotranszmittereket a posztzinaptikus sejt membránjában ülő megfelelő receptorok (itt: AMPA) érzékelik, kialakulhat rajtuk a membrán depolarizáció, az ingerület tovább terjedhet. **3.** A preszinaptikus sejt túlserkentése esetén azonban fokozott Ca^{++} beáramlás fog történni, melynek eredménye növekedett neurotransmitter ürítés lesz. A neuronok túlzott tüzelésének kivédésére szolgál az endokannabinoid jelpálya, amit az AMPA receptorok telítődése után periszinaptikus régió (PSM) területére diffundáló neurotransmitter indít be. **4.** Ebben a régióban a glutamát transzmitter aktiválja az $mGluR_5$ receptort, ami a foszfolipáz-C- β (PLC- β) enzimaktivitását indukálja. A PLC- β inozitol-trifoszfátra (IP_3) és diacil-glicerolra (DAG) hasítja a foszfatidil-inozitol bifoszfát (PIP_2) molekulát. A DAG molekulát ezt követően a diacil-glicerol-lipáz (DGL- α) enzim alakítja a 2-arachidonoyl-glicerol (2-AG) endogén kannabinoid molekulává, ami aztán visszajutva a preszinaptikus axon terminálhoz (**5.**) CB_1 receptorok aktiválásával közvetetten kiváltja a Ca^{++} csatornák áteresztésének gátlását, így megszűnik a neurotransmitter szekréció. **6.** A 2-AG lebontását a fiziológiásan, hogy a normál állapot visszaállhasson a Monoacil-glicerol lipáz (MGL) végzi, ami arachidonsavra és glicerolra bontja az endokannabinoid molekulát. A szerző ábrája.

elérhető. Az AEA lebontását a zsírsav-amid-hidroláz (FAAH), a 2-AG lebontását pedig a Monoacil-Glicerín Lipáz (MGL) végzi [Cravatt és mtsai, 1996, Dinh és mtsai, 2002]. Több kutatásban is kimutatták, hogy az MGL endokannabinoid hidrolizáló enzim gátlása fájdalomcsillapító hatású a központi idegrendszerben [Desroches és mtsai, 2008, Kinsey és mtsai, 2009]. A lebontó enzim hiányában a megemelkedett 2-AG szint aktiválta a fájdalomérző idegsejteken lévő CB₁ receptorokat, így okozva antinocicepciót. Ugyanakkor a hosszan tartó, krónikus MGL gátlás farmakológiai vagy genetikai MGL delécióján keresztül a fájdalomcsillapító hatás megszűnésével jár [Schlosburg és mtsai, 2010]. Ilyenkor az emelkedett 2-AG szint egyes agyterületeknél adaptív változásokat eredményez a CB₁ receptor szintben. Az így fellépő tolerancia-szerű jelenség miatt a krónikus MGL gátlás nem használható terápiás kezelésekre a klinikumban. Mindazonáltal perifériás vagy gerincvelői fájdalomcsillapítás ígéretes út lehet a fájdalomcsillapítók fejlesztésének terén tekintve, hogy így elmaradnak a nem kívánatos pszichoaktív mellékhatások, amik az endokannabinoidok alkalmazása során a legnagyobb problémát jelentik [Hohmann, 2007].

Annak ellenére, hogy az MGL gátlás által indukált fájdalomcsillapító hatás részben a gerincvelő szintjén történik [Woodhams és mtsai, 2012], erről a területéről nem áll rendelkezésre információ a szakirodalomból arról, hogy tónikusan magas 2-AG szint milyen molekuláris vagy sejtszintű változásokat eredményez, és hogy ez összefüggésben állhat-e a kialakuló tolerancia jelenségével. Ugyanakkor fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy a 2-AG szintetizáló enzime, a Diacil-glicerín lipáz- α (DGL- α), receptora, a CB₁, valamint a szintén preszinaptikus MGL a felsőbb I. és II. laminákban, heterogén neuronpopulációkban nagy mennyiségben előfordul [Nyilas és mtsai, 2009, Horváth és mtsai, 2014].

Ezért kísérletünk célja az volt, hogy felderítsük a változásokat a gerincvelőben, amik az MGL inaktivációját követően megnövekedett 2-AG szintre léphetnek fel válaszul. Annak érdekében, hogy definiáljuk, hogy a CB₁ receptor milyen sejtípusokon belül fordul elő, megvizsgáltuk a CB₁ receptor kolokalizációját adott sejtípusra jellemző molekuláris markerekkel kettős immunjelöléses immunfluoreszcens módszereket alkalmazva. Kettős jelölést alkalmaztunk a CB₁ receptor és a nociceptív peptiderg afferens neuronokban lévő CGRP (Calcitonin Gene Related Peptid) fehérje detektálására. Ezen kívül vizsgáltuk a hátsó szarvi serkentő interneuron terminálisokat a vezikuláris glutamát transzporter molekula (vGluT2) alapján, a gátló interneuronok axon terminálisait pedig VIAAT (Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter) fehérje segítségével jelöltük meg.

II. Célkitűzések

- Kísérletünk fő célja az volt, hogy definiáljuk, van-e változás a gerincvelő szintjén a CB₁ receptorok kifejeződésében a vad típushoz képest az olyan állatokban, amelyekben az MGL genetikai deléciója következtében krónikusan magas 2-AG szint jellemző.
- Amennyiben fenn áll bármi féle változás, célunk volt megállapítani, hogy mennyire specifikusan jellemző az a fájdalomérzékelő hálózatokban szerepet játszó sejtpopulációkra.
- Továbbá, az MGL^{-/-} egerekben annak a meghatározása, hogy sejt szintű, avagy, vagy molekulárisan végbemenő változások állnak-e a háttérben.

III. Anyagok és módszerek

A kísérletekben felhasznált minden vegyszer a Sigma-Aldrich Kft, a Merck Kft, a Roche Kft vagy a Reanal Kft budapesti kirendeltségétől származik.

III/a A kísérletben felhasznált állatok

Az állatokon végzett kísérleteket az intézményi etikai szabályoknak megfelelően, valamint a Magyar Állatvédelmi Törvény. 243/1998 (XII.31.) az állatkísérletek végzéséről szóló kormányrendelete alapján végeztük, ami megegyezik az Európai Unió Tanácsa által 1986. november 24.-én hozott 86/609/EEC rendeletében foglaltakkal.

A kísérleteket C57BL/6N törzshöz tartozó vad típusú (MGL+/+), MGL génkiütött (MGL-/-) és CB₁ génkiütött (CB₁-/-) egereken végeztük (n=18 db állaton, életkoruk: 30-33 nap). Az összehasonlító vizsgálatokhoz mindig egy alomból származó, eltérő genotípusú egyedeket használtunk.

III/b Perfúzió és a szövetek előkészítése

Az egereket ketamin-xylazin (25 mg/mL ketamin, 5 mg/mL xylazin, 0,1 w/w% prometazin H₂O-ban feloldva, 1 mL/ 100 g) intraperitoneális injekcióval altattuk el. Ezt követően az egereken transzkardiális perfúziót végeztünk. 0,9%-os só oldattal 2 percig mostuk át a keringési rendszert, majd 20 percig 100 mL fixálóval, ami 4% paraformaldehidet (PFA) tartalmazott 0,1 mólos foszfát pufferban oldva (PB, pH: 7,4). A perfúzió után az állatokból kipreparáltuk a gerincvelőt, majd 2 óráig 4%-os PFA/PB oldattal posztfixáltuk, ezt követően 0,1 M-os PB-ben mostuk. A gerincvelőből Leica VTS-1000 vibratómmal (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) 50 µm-es transzverzális szeleteket vágunk, amelyeket felhasználásig 0,1 M PB oldatban tároltunk.

III/c Peroxidáz-immunreakció

A szeletek elkészítését és számos mosási lépést követően (0,1 M PB-ben) a peroxidáz alapú immunhisztokémiai festésekhez a gerincvelő szeleteket egy éjszakán keresztül 30%-os cukor oldatban inkubáltuk. Másnap folyékony nitrogén segítségével permeabilizáltuk a metszeteket. A cukor oldat eltávolításához a szeleteket alapos 0,1 mólos PB oldatban való mosásnak vetettük alá. Az endogén peroxidázok deaktiválása végett 1% H₂O₂-PB oldatba helyeztük a szöveteket 10 percre. 3×10 perc PB-ben történő mosás és 3×10 perc Tris-só (TBS, 0,05%, pH: 7,4) oldatban történő mosást követően a mintákat 5% szarv szérum tartalmú TBS blokkoló oldatban inkubáltuk szobahőmérsékleten 90 percig. Ezt követte a poliklonális

elsődleges ellenanyaggal való inkubáció 1 órán át szobahőmérsékleten, majd további 48 órán át 4°C-on. Az inkubációs idő lejártával a szeleteket TBS-ben mostuk 3×10 percig, majd biotinált másodlagos ellenanyagba helyeztük 4 órára. A mosást követően a szeleteket éjszakára TBS oldatba helyeztük 4°C-ra, majd másnap avidin-biotinizált torna-peroxidáz komplex-el kezeltük 3 óráig. Újabb 3×10 perces TBS, majd 2×10 perc TB (0,05 M, pH: 7,6) mosást követően adtuk hozzá a kromogén 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, 0,05 TBS-ben) oldatot, mellyel a szöveteket fénytől védett helyen inkubáltuk 15 percig. A DAB-reakció 0,01% H₂O₂ hozzáadásával lett indukálva, majd 15 perc után az oldat TB-re cserélésével lett megállítva. A metszeteket a reakció végén TB-ben, majd PB-ben mostuk és tároltuk.

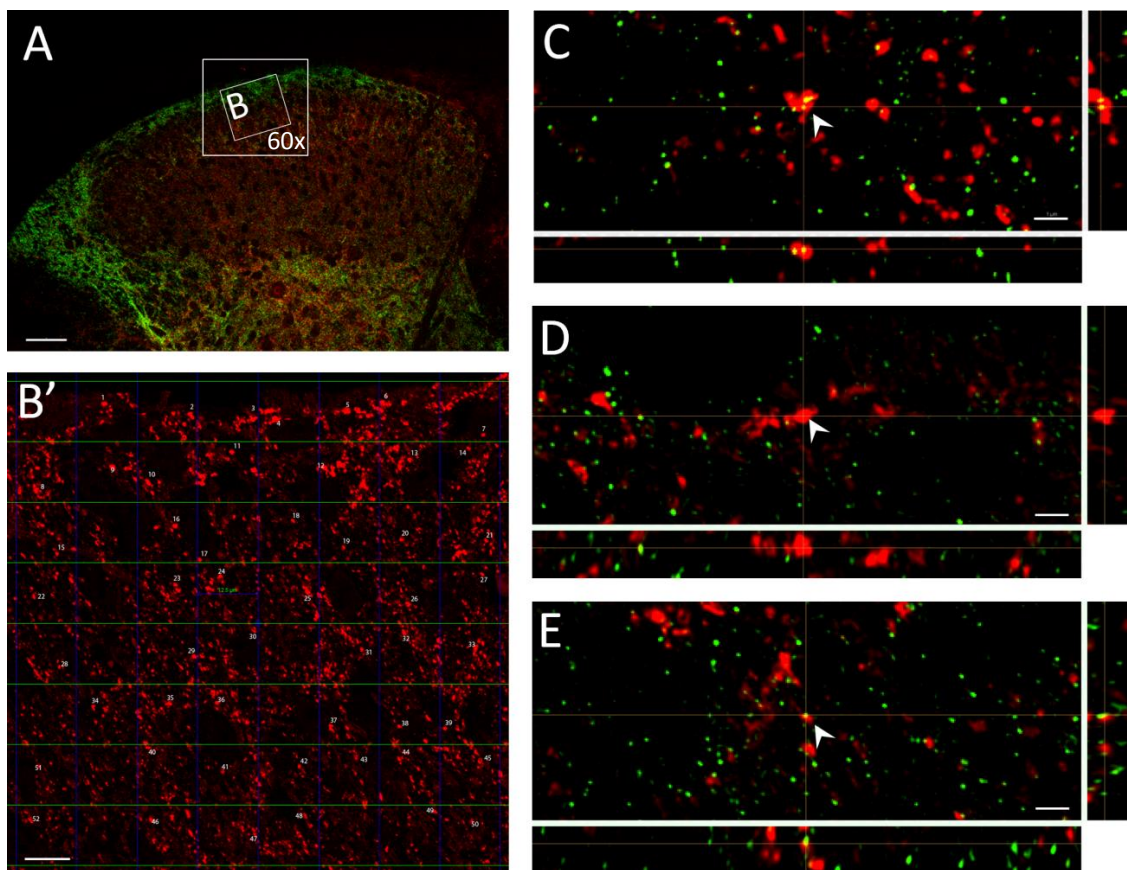
III/d Kettős jelöléses immun-fluoreszcens reakció

A gerincvelői szövetből készített metszeteket először 0,1 M PB pufferben majd 1% H₂O₂ oldatban mostuk. Ezt követően a szöveteket 3×10 percig 0,1 M PB, majd 3×10 percig 0,05 M TBS-ben (pH:7,4) mostuk. A lumbáris MGL+/, MGL-/- és CB1 -/- állatokból származó gerincvelő szeleteket 90 percig inkubáltuk 5% szarv szérum, 0,3% Triton X-100, TBS oldatban. Kísérleteinkben a CB₁ receptor jelöléséhez előinkubált tengerimalac anti-CB₁ antitestet használtunk (1:500, Watanabe labor). Emellett az egyes szeleteket különböző típusú axon-terminálisok megjelölésére alkalmas sejtípus specifikus markereket alkalmaztunk. A nociceptív peptiderg afferens neuronokban lévő CGRP (Calcitonin Gene Related Peptid) jelöléséhez poliklonális bány, anti-CGRP (1:1000, Enzo Life Sciences), gátló neuronok jelöléséhez (VIAAT – Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter) egér anti-VIAAT (1:500, Synaptic Systems), serkentő interneuronok specifikus vGlut2 (vesicular Glutamate Transporter 2) markerének jelöléséhez pedig kecske anti-vGlut2 (1:500, Frontier Science) ellenanyagokat használtunk. Az elsődleges antitesttel a szövetek 1 óráig szobahőmérsékleten, majd egy estén át 4°C-on inkubálódtak. Az elsődleges ellenanyagokat faj-specifikus, CB₁ esetén Alexa Fluor 488, axon terminálisok esetén Alexa Fluor 594 fluoreszcens molekulával ellátott másodlagos ellenanyagokkal jelöltük meg (1:400, Jackson ImmunoResearch). A másodlagos inkubáció 4 órán át tartott, szobahőmérsékleten. A kísérlet végén a minták 0,1 M PB oldatban mosódtak 3×10 percig, majd tárolódtak. A mikroszkópos megfigyelések elvégzéséhez a metszeteket tárgylemezre helyeztük és Vectashield-el (Vector) fedtük le.

III/e Konfokális mikroszkópiai analízis

A mintáinkon a lumbáris gerincvelő hátsó szarvi rétegeit fotóztuk Nikon A1R konfokális mikroszkóppal. A mikroszkóp beállításait (lézer intenzitás, reprezentatív pixel méret, konfokális apertúra) az MGL +/- metszeteken optimalizáltuk, majd azonos beállításokat használtunk a további mintáknál is. A mintákat 4×, 20× és 60× nagyításon fotóztuk. A kolokalizációs analízis kivitelezéséhez a metszetek tetejétől számított 4 µm-től kezdve 15 µm-enként z mélységbe haladva készítettünk optikális szeleteket. Az analízis készítése során a Nyqvist mintavételezésnek megfelelően jártunk el.

Az analízis kivitelezéséhez 20× nagyítású felvételeket készítettünk a gerincvelő hátsó szarvi régiójából (4. ábra/A). Ezt követően a felsőbb mediális területről 60x nagyítású felvétel készült. Ezen a felvételen lett kijelölve a mintavételezési területünk 72×72 µm-es négyzetben, a fehérállomány határvonalával párhuzamosan (4. ábra/B-B'). Ezt követően, az optikai szeletek közepéről vett képen 12,5×12,5 µm-es négyzetekre osztottuk a vizsgált területet azon a csatornán, amelyiken a különböző markerekkel jelölt terminálisok voltak láthatóak (4. ábra/B). Az így kapott területeken véletlenszerűen kijelöltünk négyzetrácsonként egy terminálist, hogy mintavételezésünk egyenletes legyen. Az így kijelölt terminálisokban vizsgáltuk az adott marker és a CB₁ receptor kolokalizációját, két csatornán NIS-Elements szoftver használatával (4. ábra/C-E). A kolokalizációs arányok megállapításához manuálisan, vizuálisan megvizsgáltuk a terminálisokat a tér három dimenziójában, hogy kizárjunk minden aspecifikus kolokalizációs jelet, amit szoftveresen nem tudnánk megtenni. Csak azokat a terminálisokat tekintettük pozitívnak, amelyekben a CB₁ fluoreszcens jel teljesen a terminális területén belül volt található (4. ábra/C). Bármely terminális, amelyek az első vagy utolsó optikai szeletre estek, vagy amelyekben a CB₁ jelölés a területen kívülre esett negatívnak volt nyilvánítva (4. ábra/D, E). Ezen vizsgálatokat követően lettek kiszámítva a kolokalizációs értékek. Méréseinkkel párhuzamosan az ImageJ szoftver használatával lemértük az egyes pozitív terminálisokra jellemző marker- és CB₁ intenzitást, területének méretét. Ezzel vizsgálhattuk az ezekben az értékekben történt esetleges változásokat is a genotípusok között.



4. ábra – A kolokalizációs analízis folyamata. **A:** A kolokalizációs vizsgálatokhoz 20x felvételt készítettünk a hátsó szarvi régióról, melynek mediális részéről továbbá 60x nagyítású felvétel készült. Ennek a területnek a közepén jelöltük ki mintavételezési területünket (B-B') a fehérállomány rostjaival párhuzamosan. **B:** A kijelölt területről optikai szeletek készültek, amelyeken az adott marker csatornáján (a CB₁ jel nélkül) megtörtént a terminálisok azonosítása és kiválasztása. A terminálisok vizsgálata két csatornán manuálisan, három dimenzióban történt. **C-E:** Példa az azonosított terminális típusokra: pozitív terminális (C/nyílhegy), negatív terminális (D/nyílhegy), hamis-pozitív terminális (E/nyílhegy). Skála: A: 50 μ m, B: 10 μ m, C-E: 1 μ m.

III/f Statisztikai analízis

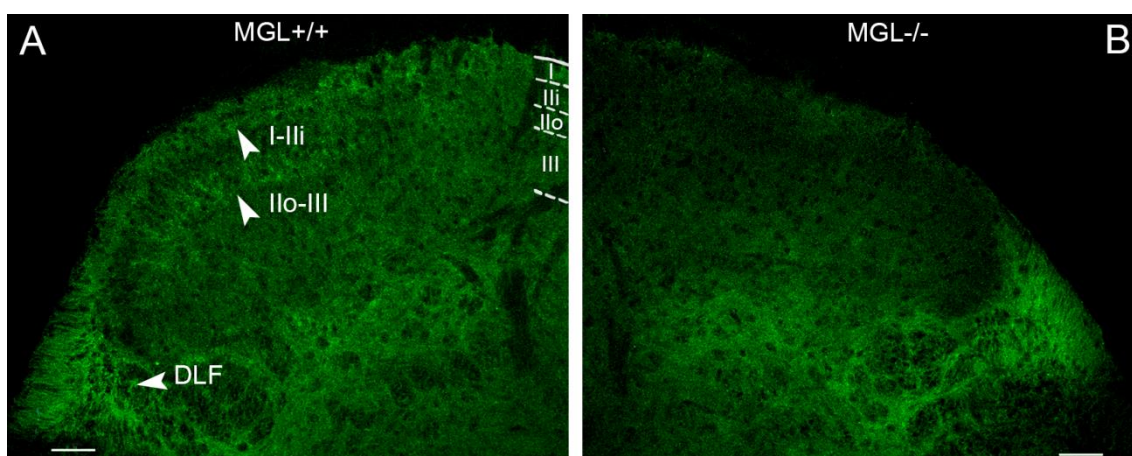
A CB₁ intenzitás csökkenésének statisztikai kimutatásához és a genotípusokon belüli eltérések vizsgálatához egymintás t-próbát (Kruskal-Wallis-teszt) alkalmaztunk. A CGRP, VIAAT és vGluT2 markerek jelölés intenzitásában fellépő lehetséges MGL^{+/+} és MGL^{-/-} genotípusok közti eltérések meghatározására kétmintás t-próbát (Mann-Whitney U-teszt) végeztünk az adatokon. A p-értéket $p < 0,05$ -től fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak. Az egyes kísérletekhez tartozó p-értékek az adott ábrákon vannak feltüntetve. A szignifikancia mértékét az ábrákon csillagok (*) jelzik: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

IV. Eredmények

Vizsgálataink során több mint 2100 terminálist vizsgáltunk meg, genotípusonként 3-3 állatból és állatonként 3 szeletből kiválasztva.

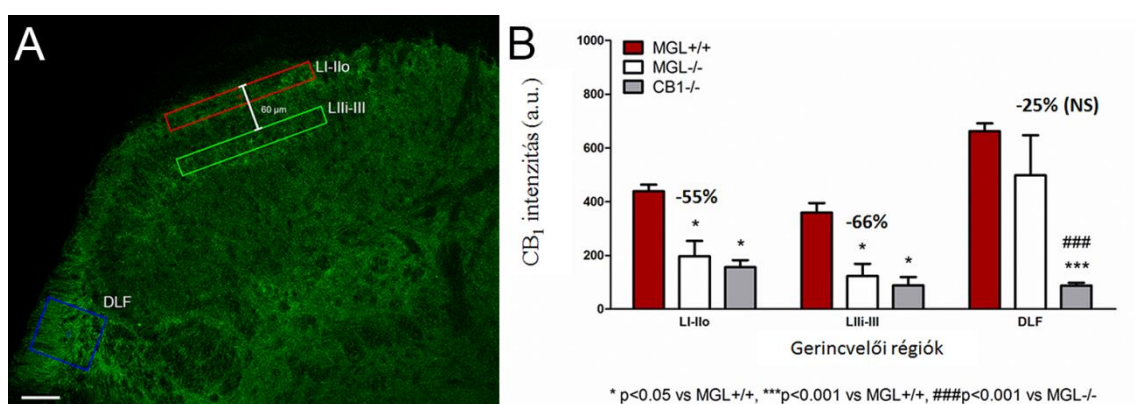
IV/a CB₁ jelölés intenzitás-változásának vizsgálata a hátsó szarvi régióban

Kísérleteink során elsőként arról szerettünk volna tudomást szerezni, hogy az MGL^{+/+} és MGL^{-/-} állatokban milyen a CB₁ receptor eloszlása a gerincvelő lumbális szakaszán lévő hátsó szarvi régióban. A CB₁ receptor jelölés az immunfluoreszcens reakcióval előhívott szeleteknél jól láthatóan kijelölt két sávot a hátsó szarvi régió felsőbb rétegeiben (I. és IIo., III.), ahol a fehérje expressziója a legmagasabb (5. ábra/A). Az immunperoxidáz reakcióval történt receptor specifikus jelölés alapján azt tapasztaltuk, hogy a CB₁ receptorok elleni immunreaktivitás szintje markáns csökkenést mutat az MGL^{-/-} állatokban (5. ábra/B), a gerincvelő hátsó szarvi régiójában. A receptorszint ugyanakkor nem csökkent a kontrollként használt hátsó szarvi fehérállomány kötegben (DLF). A kísérleteket vad és MGL génkiütött egerek mellett CB₁ génkiütött állatokban is elvégeztük, itt, a jelölés hiánya validálta, hogy a szövetben specifikus CB₁ immunreaktivitást detektáltunk. Az MGL^{-/-} állatoknál látszólag a IIo.-III. laminában lévő CB₁ receptorok intenzitásának szintje eltűnik, az I.-III. laminában pedig markáns csökkenést mutat.



5. ábra – CB₁ receptor immunjelölés MGL^{+/+} és MGL^{-/-} egér gerincvelői hátsó szarvi régióban. **A:** MGL^{+/+} genotípusú állat gerincvelőjében megfigyelhető CB₁ jelölés. A hátsó szarv felsőbb Rexed-lamináiban magas fokú CB₁ expresszió jellemző (fehér nyilak), főként az I-IIi és a IIo-III rétegekben. Szintén magas CB₁ expresszió figyelhető meg a hátsó szarvi fehérállományi köteg területén is (DLF). A réteghatárok ábrázolása az ábra jobb szélén látható. **B:** MGL^{-/-} állatban az előbb említett területeken jelentősen csökken a CB₁ expresszió, a DLF területén azonban változatlan marad. Skála: 50 µm.

Annak érdekében, hogy kvantifikáljuk a mért intenzitásváltozást, NIS-Elements számítógépes szoftver segítségével intenzitásméréseket végeztünk a hátsó szarvi régió magas CB₁ intenzitású területein. Három főbb területet jelöltünk ki, amelyek nagyrészt lefedték az egyes anatómiailag definiált régiókat: az I-IIo réteget, a IIi-III réteget, valamint a hátsó szarvi köteg területét (6. ábra/A). A mérésekből egyértelművé vált, hogy az MGL^{-/-} állatokban a vad típushoz képest jelentős csökkenés jelentkezik a vizsgált területek CB₁ jelölés intenzitásában (6. ábra/B). A változás nem jelentkezik a DLF területén, ami alapján kijelenthetjük, hogy régió specifikus csökkenésről beszélhetünk.



6. ábra – CB₁ receptor immunjelölés intenzitásának vizsgálata. **A:** Azokon a területeken, amelyeken a legnagyobb CB₁ intenzitásbeli különbség lépett fel a két genotípus között (valamint kontrollként a DLF területéről), intenzitásméréseket végeztünk. Az ábrán látható kijelölt régiók reprezentálták a vizsgált területet. Skála: 50 μm. **B:** Az intenzitás vizsgálat eredményeit ábrázoló grafikon. Mind az I-IIo., mind a IIi-III. laminák területén jelentős mértékű, szignifikáns csökkenés figyelhető meg a CB₁ jelölés intenzitásában. Nincs szignifikáns változás azonban a DLF régiójában, ahol a fehérállományi rostok haladnak.

Korábbi eredményekből ismert, hogy a CB₁ receptor többsége preszinaptikusan van található a gerincvelőben [Nyilas és mtsai, 2009]. Ezért megfigyelésünket követően azt a kérdést tettük fel, hogy vajon a CB₁ szint régió-specifikus csökkenése melyik axonterminális-populációkon belül következik be. Ennek megállapításához a hátsó szarvi régióban megtalálható három főbb idegrost populációban vizsgáltuk a terminálisokat definiáló marker és a CB₁ receptor jelölésének kolokalizációját kettős immunfluoreszcens módszerekkel. A három vizsgált idegi sejtpopuláció pedig: a peptiderg nociceptív afferens idegvégződések, a gátló, valamint a serkentő interneuronok axon terminálisai voltak.

IV/b Peptiderg nociceptív afferens neuronok (CGRP+) és CB₁ receptor kolokalizációs vizsgálatok

A perifériáról a fájdalom információ elsősorban a peptiderg nociceptív, CGRP fehérjét expresszáló neuronok segítségével jut a központi idegrendszer gerincvelői részébe. Ezek az idegsejtek a hátsó szarvi régióba projektálnak és itt alakítanak ki szinaptikus kapcsolatot interneuronokkal és projekciós neuronokkal (7. ábra).

A CGRP markerrel jelölt mintákon n=3 MGL+/+ egerből származó, egerenként 3 metszetben 256 terminálist vizsgáltunk, ebből 98 bizonyult pozitívnak CB₁ receptorral való kolokalizáció szempontjából. MGL-/- állatok esetén szintén n=3 állatból vizsgáltunk állatonként 3 szeletet, amelyeken összesen 258 terminálisból 102 tartalmazott CB₁ jelölést. A kolokalizációs arány így mindkét esetben ~40% (7. ábra/E).

A kolokalizációs arány az MGL-/- egerekben sem csökkent, habár CB₁ expresszió a teljes hátsó szarv területén alacsonyabb volt, ahogy azt az intenzitás vizsgálataink is igazolták (7. ábra/F). Az MGL genetikai delécióját követően azonban megfigyeltünk az ilyen genotípusú állatokban egy markáns csökkenést a CGRP immunjelölés intenzitásában is (7. ábra/G).

IV/c Serkentő interneuronok (vGluT2+) és CB₁ receptor kolokalizációs vizsgálatok

A lokális serkentő szinaptikus kapcsolatokat glutamát jelátvivő molekulát használó idegsejtek formálják a gerincvelőben, amelyekre egyedileg jellemző a vezikuláris glutamát transzporter molekula (vGluT2) intracelluláris jelenléte. Az előző kísérlethez hasonlóan kettős immunjelölést alkalmazva jelöltük meg fluoreszcensen ezt a molekulát és az ilyen neuronokon található CB₁ receptorokat mind a vad, mind az MGL génkiütött állatokból származó szövetekben (8. ábra).

A vGluT2 markerrel jelölt mintákon n=3 MGL+/+ egerből származó, egerenként 3 metszetben 393 terminálist vizsgáltunk, ebből 122 bizonyult pozitívnak CB₁ receptorral való kolokalizáció szempontjából. MGL-/- állatok esetén szintén n=3 állatból vizsgáltunk állatonként 3 szeletet, amelyeken összesen 417 terminálisból 125 tartalmazott CB₁ jelölést. A kolokalizációs arány így mindkét esetben ~30% (8. ábra/E).

Az analízis alapján az ez esetben is megjelenő CB₁ intenzitásbeli csökkenés mellett (8. ábra/F) egy 20%-os intenzitásbeli csökkenés figyelhető meg a vGluT2 szintben is az MGL génkiütött egerek esetében (8. ábra/G).

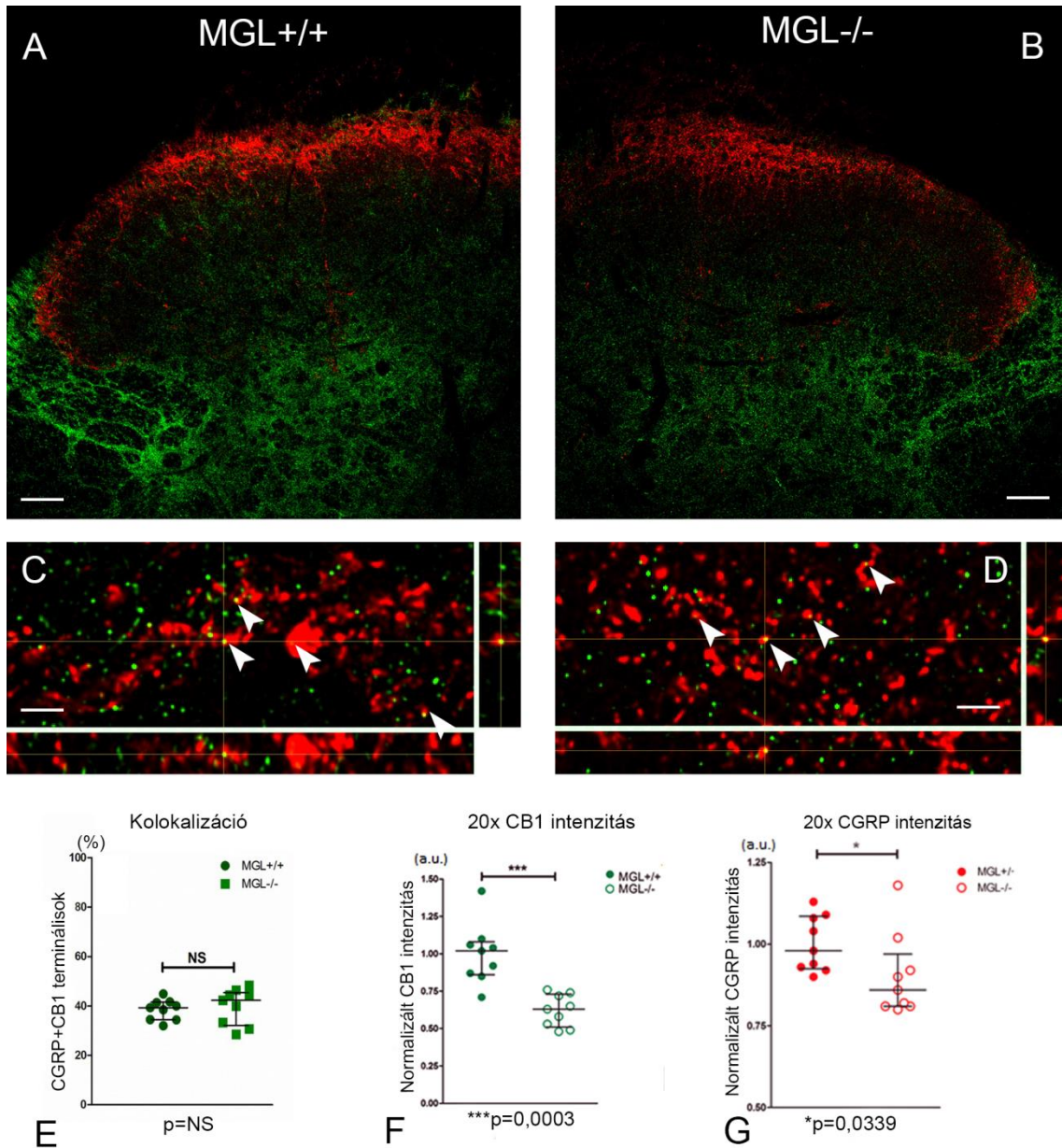
A legnagyobb mértékű kolokalizáció a CGRP pozitív és a vGluT2 pozitív neuronok esetében volt megfigyelhető (7. ábra/E, 8. ábra/E).

IV/d Gátló interneuronok (VIAAT+) és CB₁ receptor kolokalizációs vizsgálatok

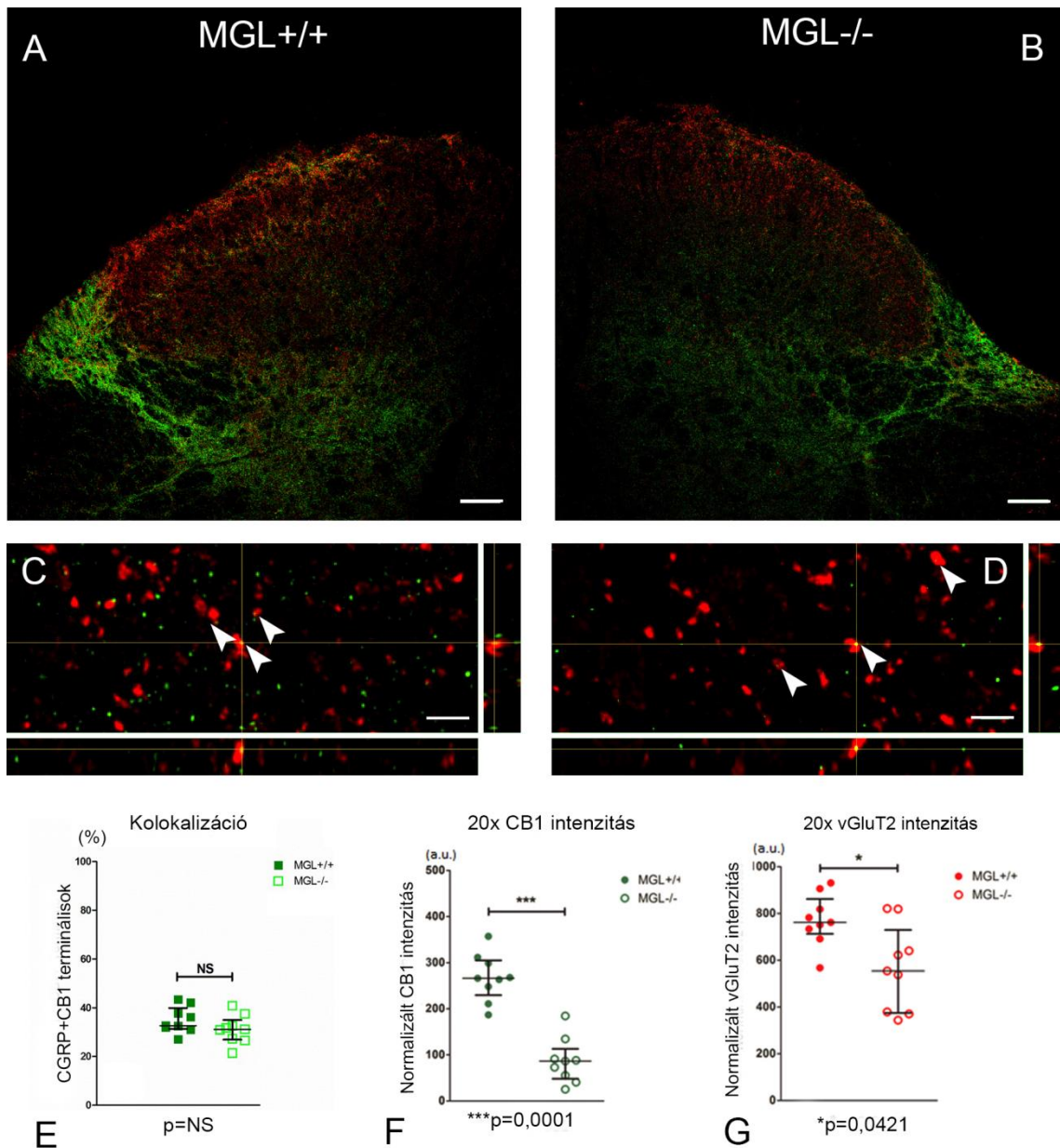
A gátló interneuronok neurotranszmitterként a gamma-amino vajsavat (GABA) használják a szinapszisokban, ezzel gátolják a posztzinaptikus sejt aktivitását. A sejtekre specifikus marker a vezikuláris gátló aminosav transzporter (VIAAT), mely segítségével a többi sejtpopulációtól elkülöníthetjük az ilyen interneuronok axon-terminálisait (9. ábra).

A VIAAT markerrel jelölt mintákon n=3 MGL^{+/+} egérből származó, egerenként 3 metszetben 415 terminálist vizsgáltunk, ebből 26 bizonyult pozitívnak CB₁ receptorral való kolokalizáció szempontjából. MGL^{-/-} állatok esetén szintén n=3 állatból vizsgáltunk állatonként 3 szeletet, amelyeken összesen 437 terminálisból 25 tartalmazott CB₁ jelölést. A kolokalizációs arány így mindkét esetben ~6% (9. ábra/E).

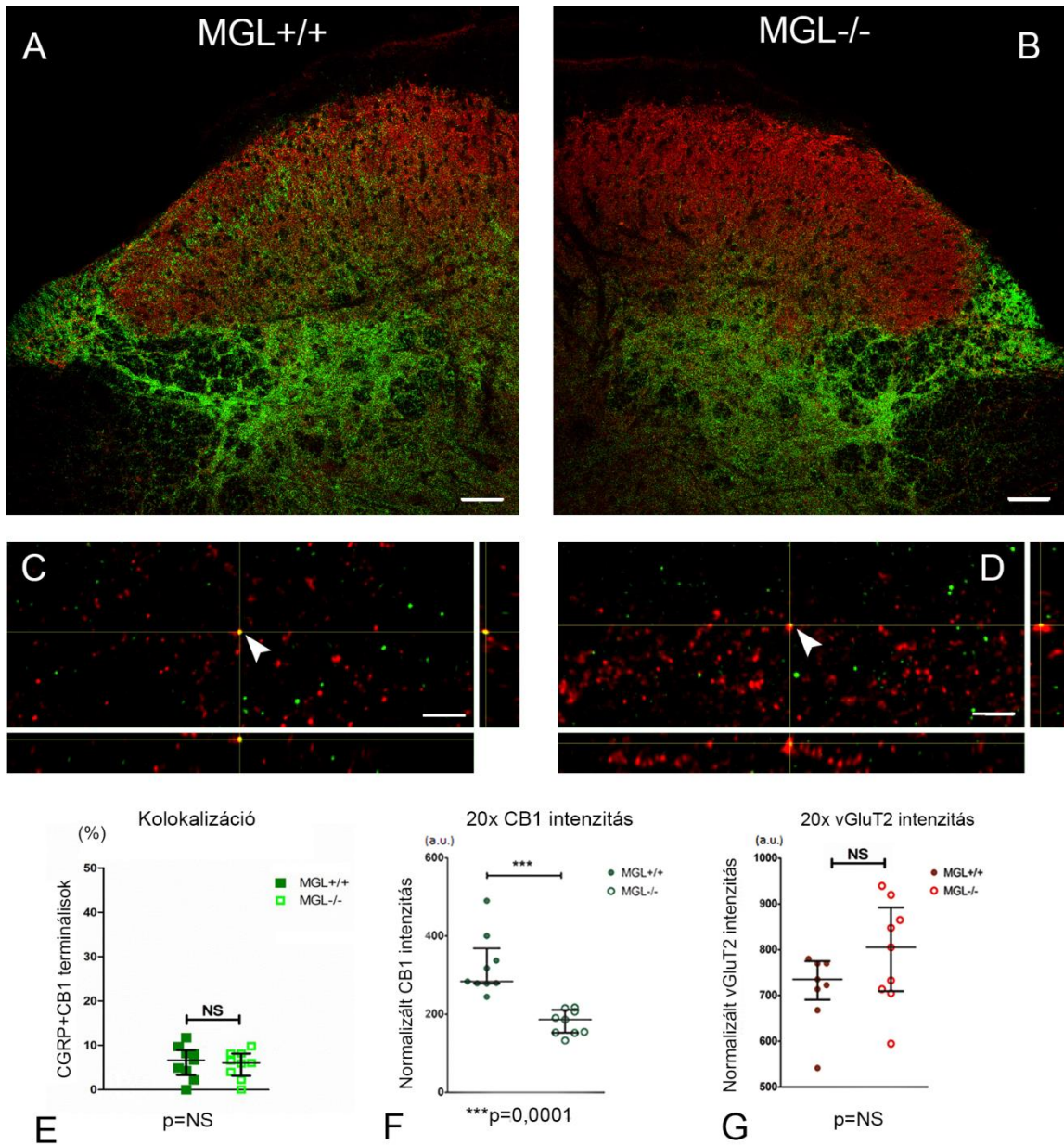
Megfigyeléseink alapján arra következtettünk, hogy az MGL genetikai delécióját követően nem mutatható ki szignifikáns különbség a gátló interneuron terminálisain lévő CB₁ receptorok számában. A VIAAT jelölés intenzitása nem különbözik vad és KO állatokban (9. ábra/G), a CB₁ intenzitása viszont ebben az esetben is jelentős csökkenést mutat (9. ábra/F).



7. ábra – CGRP és CB₁ kolokalizációs analízis. **A, B:** 20x konfokális felvétel MGL+/+ és MGL-/- egér gerincvelő hátsó szarváról. Piros csatornán a CGRP, zöld csatornán a CB₁ jelölést láthatjuk. **C, D:** 500x nagyítású felvételek mutatják a CB₁ receptorral pozitívan kolokalizáló CGRP+ terminálisokat (fehér nyilak) **C:** MGL+/+ illetve **D:** MGL-/- egerekben. **E:** A kolokalizációs arányban nincs különbség a két genotípusban, a vizsgált CGRP+ terminálisok 40% tartalmaz CB₁ receptort. **F:** CB₁ jelölés intenzitásának összehasonlítása vad típusú és génkiütött állatokban. Az MGL-/- mintákban 40% csökkenés figyelhető meg a CB₁ szintben (medián: MGL+/+: 1,020±0,22 (a.u.), MGL-/-:0,63±0,22 (a.u.)). **G:** CGRP jelölés intenzitása, szintén a vad és génkiütött állatokban. A CGRP jelölésnél is megfigyelhetünk egy ~20%-os intenzitásbeli csökkenést (medián: MGL+/+: 0,98±0,16 (a.u.), MGL-/-:0,86±0,16 (a.u.)). Skála: A, B: 50 µm, C, D: 1 µm.



8. ábra – vGluT2 és CB₁ kolokalizációs analízis. **A, B:** 20x konfokális felvétel MGL^{+/+} és MGL^{-/-} egér gerincvelő hátsó szarváról. Piros csatornán a vGluT2, zöld csatornán a CB₁ jelölést láthatjuk. **C, D:** 500x nagyítású felvételek mutatják a CB₁ receptorral pozitívan kolokalizáló vGluT2+ terminálisokat (fehér nyilak) **C:** MGL^{+/+} illetve **D:** MGL^{-/-} egerekben. **E:** A kolokalizációs arányban nincs különbség a két genotípusban, a vizsgált vGluT2+ terminálisok 35% tartalmaz CB₁ receptort. **F:** CB₁ jelölés intenzitása a vizsgált vad típusú és génkiütött állatokban. Az MGL^{-/-} mintákban 60% csökkenés figyelhető meg a CB₁ szintben (medián: MGL^{+/+}: 243±71 (a.u.), MGL^{-/-}: 79±47 (a.u.)). **G:** vGluT2 jelölés intenzitása a vad és génkiütött állatokban. A vGluT2 marker intenzitása a génkiütött állatokban ~20%-os szignifikáns intenzitásbeli csökkenést mutat (medián: MGL^{+/+}: 761±150 (a.u.), MGL^{-/-}: 554±355 (a.u.)). Skála: **A, B:** 50 µm, **C, D:** 1 µm.



9. ábra – VIAAT és CB₁ kolokalizációs analízis. **A, B:** 20x konfokális felvétel MGL^{+/+} és MGL^{-/-} egér gerincvelő hátsó szarváról. Piros csatornán a VIAAT, zöld csatornán a CB₁ jelölést láthatjuk. **C, D:** 500x nagyítású felvételek mutatják a CB₁ receptorral pozitívan kolokalizáló VIAAT⁺ terminálisokat (fehér nyilak) C: MGL^{+/+} illetve D: MGL^{-/-} egerekben. **E:** A kolokalizációs arányban nincs különbség a két genotípusban, a vizsgált VIAAT⁺ terminálisok 8-10% tartalmaz CB₁ receptort. **F:** CB₁ jelölés intenzitása a vizsgált vad típusú és génkiütött állatokban. Az MGL^{-/-} minták CB₁ intenzitás-szintjében 40% csökkenés figyelhető meg (medián: MGL^{+/+}: 283±90 (a.u.), MGL^{-/-}:186±59 (a.u.)). **G:** VIAAT jelölés intenzitása a vad és génkiütött állatokban. A VIAAT jelölés intenzitása nem mutat szignifikáns csökkenést (medián: MGL^{+/+}: 735±85 (a.u.), MGL^{-/-}:805±183 (a.u.)). Skála: A, B: 50 µm, C, D: 1 µm.

V. Diszkusszió

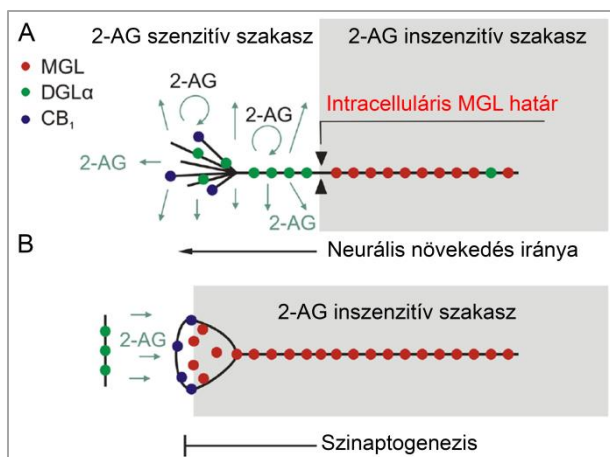
A kannabinoidok fájdalomcsillapító hatását először Ernest Dixon publikálta 1899-ben, aki arra lett figyelmes, hogy azok a kutyák, melyek kannabisz füstöt lélegeztek be, nem mutattak fájdalmi reakciókat a tűszúrásra. Azóta számos kutatás megerősítette, hogy a kannabinoidok a CB₁ receptor aktiváción keresztül csökkenthetik a fájdalmat [Richardson és mtsai, 1998, Dogrul és mtsai, 2003]. Neuropátiás modellekben a 2-AG endokannabinoidot lebontó MGL enzim akut farmakológiai gátlása (a 2-AG szint endogén növekedésén keresztül) hatékony fájdalomcsillapítóként használható [Long és mtsai, 2008; Desroches és mtsai, 2008]. Az MGL tehát potenciális célpontja a gyógyszerkutatásnak, hiszen ez úton a pszichoaktív mellékhatások kiküszöbölésével lehetne elérni a fájdalom megszüntetését. Ugyanakkor, hosszabb távú folyamatos gátlásra tolerancia lép fel a szervezetben, a fájdalomcsillapító hatás megszűnik. Éppen ezért, kimagaslóan fontos, hogy ismerjük a molekuláris és celluláris hátteret, ami a tolerancia kialakításáért felelős.

Az MGL krónikus gátlásán alapuló fájdalomcsillapító molekulák hatásmechanizmusára jó vizsgálati modellként szolgálnak az olyan genetikailag módosított egerek, melyben az MGL protein szintéziséért felelős gén hiányzik [Chanda és mtsai, 2010]. Az ilyen genotípusú egerektől azt feltételeznénk, hogy csökkent fájdalomérzékelést mutatnak az emelkedett 2-AG szint miatt. Az MGL^{-/-} egerek azonban meglepő módon a vad típushoz hasonló módon érzékenyek a fájdalomra. Sőt, viselkedési tesztekkel kimutatták, hogy szignifikánsan növekedett fájdalomérzet jellemzi őket a krónikus fájdalmi tesztekben [Petrenkoa és mtsai, 2014]. Ez a hatás az MGL krónikus farmakológiai gátlása során is fellép, ezért valószínűsíthetjük, hogy a mechanizmus az MGL molekulán keresztül szabályozódik [Petrenkoa és mtsai, 2014]. Ennek valószínűleg az az oka, hogy a megemelkedett 2-AG szint következtében az agyban a CB₁ receptorok deszenzitizálódnak, így ha fellép a fájdalom inger, nem képesek hatékonyan gátolni a nociceptív afferensek neurotranszmitter-ürítését [Schlosburg, 2010]. Feltételezhetjük azonban, hogy a nociceptív pályán már az agyi struktúrák előtt, a gerincvelő szintjén is megjelenik valamiféle változás az ilyen genotípusú állatokban, hiszen a gerincvelői lokális farmakológiai MGL gátlás is fájdalomcsillapító hatást eredményez [Woodhams, és mtsai, 2012], erről azonban napjainkig nincs kísérletes adat.

Munkánk során a gerincvelői hátsó szarvi nociceptorok által kialakított szinapszisok szintjén tanulmányoztuk, hogy a tónikusan megnövekedett 2-AG szint ebben a régióban milyen molekuláris- és celluláris szintű változásokkal jár. Vizsgálataink során a manuálisan

végzett 3-dimenziós analízisnek köszönhetően minden eddiginél pontosabban határoztuk meg a CB₁ receptor lokalizációjának mértékét a gerincvelő hátsó szarvában található három főbb idegrost-alpopulációkon belül. Ez alapján a vizsgált CGRP pozitív axon terminálisok ~40%-ában, a VIAAT pozitív terminálisok ~6%-ában és a vGluT2 pozitív terminálisok ~30%-ában található CB₁ receptor jelölés. Kísérletünkben elsőként mutattuk ki, hogy az MGL-/- állatokban egy 50%-os régió specifikus csökkenés jelentkezik a CB₁ receptor szintjében a hátsó szarvi régióban. A csökkenés hátterében hipotéziseink szerint vagy molekuláris, vagy celluláris változások állhatnak, azaz vagy a receptorok mennyisége csökken adott és változatlan számú neuron axon terminálisán, vagy a neuronok/terminálisok száma csökken. Célkitűzéseinkhez hűen sejttípus-specifikus markerek és a CB₁ receptorral végzett kollokalizációs vizsgálatokból megállapítottuk, hogy meglepő módon, a tanulmányozott idegsejt típusokon belül a CB₁ receptor szintje nem változik a génkiütött egerekben. E szerint feltételezhetjük, hogy a csökkenést az axon terminálisok mennyiségének redukciója váltotta ki az immunfluoreszcens jelölésben. Feltevésünket tovább erősíti, hogy a CB₁ intenzitás csökkenés mellett szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a CGRP és vGluT2 pozitív rostok immunjelölésében. Ezen vizsgálatok alapján felvethető egy olyan hipotézis, miszerint az MGL krónikus hiánya befolyásolja a fájdalom érzékelésében részt vevő serkentő neuron populációk rendeződését a gerincvelőben.

Az agy embrionális fejlődése során is elengedhetetlen szerepet játszik a normál endocannabinoid szignalizáció mind az agy rétegeinek kialakítása, mind az idegsejtek közti szinapszisok kiépülésében. [Harkány és mtsai, 2007]. Az axonok növekedésük során vonzó és taszító szignálokkal kommunikálnak egymással, ezek segítségével képesek a megfelelő szinaptizáló partnert megtalálni [Xiang és mtsai, 2002]. Bisogno és munkatársai azonosították a DGL- α jelenlétét az axonok növekedési kúpjában [Bisogno és mtsai, 2003], a DGL- α által szintetizált 2-AG-vel pedig ez alapján megvalósulhat a sejt autokrin kommunikációja is [Williams és mtsai, 2003]. A növekedő axon azonban egy idő után a növekedési kúppal ellenben már nem reagál ezekre a motilis szignálokra. Ebben pedig, hogy a nyúlvány végső helyére kerülhessen fontos szerepet játszik az MGL. Az axonban ugyanis az MGL nagymértékű expressziójával, a 2-AG lebontás fokozódik, mely egy elmaradhatatlan szignál a nyúlvány végső helyzetének-, illetve a szinaptogenezis kialakulásához (10. ábra) [Keimpema és mtsai, 2010].



10. ábra – Az endokannabinoid szignalizáció szerepe fejlődő agyszövetben. Sematikus ábra a DGL- α – 2-AG – CB $_1$ – MGL molekuláris kaszkád idegi fejlődésben betöltött szerepéről. A parakrin és autokrin 2-AG szignalizációnak jelentős szerepe van mind az axonnövekedés szabályozásában (**A**), mind pedig a szinaptogenezisben (**B**). Az axon azon részein, amelyen már nincs szükség további motilitásra, a sejt az itt kifejeződő MGL enzim segítségével akadályozhatja meg, hogy a 2-AG kifejtsen hatását a különböző molekuláris szignalizációs útvonalakon [Keimpema és mtsai, 2010 – módosítva].

A munkánk által feltárt adaptív celluláris változások potenciális magyarázatként szolgálhatnak arra a jelenségre, hogy a transzgenikus állatok miért nem mutatnak a vad típustól eltérő fájdalmi fenotípust. A vizsgált serkentő neuronális markerek szintjének csökkenéséből következtethetünk rá, hogy a területen az axon terminálisok száma csökkent, ezért figyelhető meg CB $_1$ szint csökkenés anélkül, hogy a vizsgált terminálisokban változna a CB $_1$ expresszió kolokalizációs aránya a két genotípuson belül. Az axon terminálisok csökkenésének jelensége a KO állatban egy kompenzációs mechanizmus eredménye lehet, ami a 2-AG/CB $_1$ szignalizáció fejlődésben betöltött szerepét hangsúlyozza. A krónikus MGL delécia tehát eredményezheti a gerincvelői fájdalomérző neuronhálózatok reorganizációját.