

A „Capsaicin-szenzitív neurogén mechanizmusok a meningeális nocicepcióban és a dura mater vaszkuláris reakcióinak modulációjában” c. OTKA pályázat zárójelentése

Korábbi vizsgálataink szerint a meningeális vérátáramlás szabályozásában jelentős szerepet játszanak a TRPV1- (capsaicin-) receptort expresszáló nociceptív érző idegek (Dux és mtsai, *J. Physiol*, 552:859-67, 2003). Számos irodalmi és saját megfigyelés utal a fájdalomérző rendszer aktiválásában és lokális regulatorikus működésekben egyaránt szerepet játszó capsaicin-érzékeny afferens idegrostok károsodására diabetes mellitusban. Ezért jelen vizsgálatainkban streptozotocinnal kiváltott kísérletes diabetes mellitusban szenvedő felnőtt Wistar patkányokban vizsgáltuk a meningeális neurogén szenzoros vaszkuláris reakciókat lézer-Doppler áramlásméréssel nyitott koponya-ablak technikával. Az állatokat 2, 4 illetve 6 héttel a diabetes indukcióját követően használtuk kísérleteinkhez. Kettő illetve 4 héttel a streptozotocin kezelést követően nem találtunk eltérést a kontroll és diabéteszes állatok vaszkuláris reakcióiban; hat héttel a kezelést követően azonban szignifikánsan csökkent a capsaicinnal kiváltható vazodilatáció mértéke. Emellett megállapítottuk, hogy ezekben a diabéteszes állatokban a capsaicin már alacsony koncentrációk alkalmazása esetén is a szokásos vazodilatációs válasz helyett vazokonstriktiót vált ki. A diabéteszes állatok meningeális érreakcióit egyéb vazoaktív mediátorok alkalmazása után is megvizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy diabéteszes állatokban a calcitonin gén-rokon peptid (CGRP), hisztamin és acetilkolin lokális applikációjára adott véráramlás-válaszok nem különböztek a kontrollhoz képest. A capsaicin érzékeny idegrostok funkcionális károsodását neurokémiai vizsgálataink is igazolták. ELISA módszerrel mérve 5 percig tartó *in vitro* capsaicin stimulációt követően mind kontroll, mind diabéteszes dura mintákban fokozott CGRP-felszabadulást mértünk a stimulust megelőző állapothoz képest, a diabéteszes állatokban azonban az emelkedés mértéke szignifikánsan elmaradt a kontroll mintákban mért értékektől. Tartós insulin kezelés (szubsztitúció) mind a vaszkuláris (vazodilatációs) válaszokat, mind pedig az *in vitro* mért CGRP-felszabadulást a kontrollhoz hasonló szintre állította vissza. Eredményeink alapján az alábbi következtetéseket vonhatjuk le: 1) Kísérletes diabetes mellitusban a capsaicin meningeális vérátáramlást fokozó hatása jelentősen gátolt vagy eltűnik; 2) Diabéteszes állatokban szignifikánsan csökken a capsaicin által kiváltott CGRP felszabadulás az afferens idegekből; 3) A diabéteszes állatokban a vizsgált vazoaktív mediátorok – amelyek döntően nem a capsaicin-szenzitív érző idegek aktiválása útján hatnak – véráramlás-fokozó hatásukat változatlanul kifejtik; 4) Az érző idegek által közvetített neurogén vaszkuláris reakciók károsodása szerepet játszhat a meningeális nociceptor-funkció diabetesben megfigyelt zavarainak kialakulásában.

Eredményeinkről hazai és nemzetközi tudományos kongresszusokon illetve külföldi szakfolyóiratokban számoltunk be:

Schwenger N, Dux M, de Col R, Carr R, Messlinger K, Interaction of calcitonin gene-related peptide, nitric oxide and histamine release in neurogenic blood flow and afferent activation in the rat cranial dura mater. *Cephalalgia* 27: 481-491, 2007.

Impact factor: 2,808

Dux M, Rosta J, Pinter S, Santha P, Jancso G, Loss of capsaicin-induced meningeal neurogenic sensory vasodilatation in diabetic rats. *Neuroscience* 150: 194-201, 2007.

Impact factor: 3,352

Dux M, Messlinger K, Neurogenic vascular responses in the dura mater and their relevance for the pathophysiology of headaches. *Jancsó G. (Vol. ed), NeuroImmune Biology, Vol. 8: Neurogenic Inflammation in Health and Disease, Elsevier, Amsterdam, pp.193-209, 2009.*

További vizsgálataink a 2-es típusú proteáz aktivált receptor (PAR-2) meningeális nociceptor funkcióban betöltött szerepének tisztázására irányultak. A PAR-2 aktiválása fontos szerepet játszik gyulladásos reakciók, így a neurogén gyulladás mechanizmusában is, amelynek kiemelt jelentőséget tulajdonítanak a migrén pathomechanizmusában. Kísérleteinkben a migrén egyik elfogadott állatkísérletes modelljében, az a. meningeális ill. ágai véráramlásának mérésére alkalmas lézer-Doppler áramlásméréssel tanulmányoztuk a PAR-2 aktivációját követően a meningeális erek áramlási viszonyait nyitott koponya-ablak technikával patkányban. Megállapítottuk, hogy mind a tripszin, a PAR-2 természetes aktivátora, mind pedig a PAR-2 receptort aktiváló agonista peptid, a SLIGRL-NH₂ véráramlás-fokozódást vált ki, amelyet jelentős részben a capsaicin-szenzitív idegek mediálnak. Előzetes szisztémás és/vagy lokális capsaicin deszenzibilizálás szignifikánsan gátolta a PAR-2 által kiváltott vazodilatációt. Ugyancsak gátolta a PAR-2 aktiválás hatását a CGRP antagonistá CGRP8-37 és a nitrogén monoxid szintetáz gátlása (L-NAME). A neuronális nitrogén monoxid szintetáz gátlása (1-(2-trifluoromethylphenyl)imidazol) azonban nem befolyásolta a vazodilatációs választ. A SLIGRL-NH₂ PAR-2 agonista peptid előzetes adagolása jelentősen fokozta a capsaicin vazodilatációs hatását; a capsaicin igen alacsony dózisainak alkalmazása, amelyek önmagukban nem hatásosak, szignifikánsan fokozták a meningeális véráramlást. Eredményeink arra utalnak, hogy a PAR-2 receptorok a capsaicin-szenzitív idegeken lokalizáltak, aktiválásuk meningeális áramlásfokozódást vált ki, amelynek mechanizmusában szerepet játszik a NO és a dura nociceptív idegeiből felszabaduló CGRP. A PAR-2 aktiválása a meningeális afferens idegeket szenzibilizálja, ami szerepet játszhat a dura szenzoros működéseiben a nociceptor működés és a CGRP felszabadulásának modulációja révén.

Morfológiai vizsgálataink retrográd jelölés és immunhisztokémiai módszerek alkalmazásával direkt bizonyítékot szolgáltatottak a patkány dura materének peptiderg és TRPV1-pozitív trigeminovaskuláris beidegzésére vonatkozóan. Elsőként mutattuk ki, hogy a TRPV1 és a PAR-2 a meningeális idegekben kolokalizációban fordul elő, ami morfológiai alapját szolgáltatja a két receptor funkcionális interakciónak. Eredményeinkről nemzetközi tudományos konferenciákon és közleményekben számoltunk be és a projekt során végzett munka alapján egy Ph.D. értekezés is megvédésre került.

Dux M, Rosta J, Sántha P, Jancsó G, Involvement of capsaicin-sensitive afferent nerves in the proteinase-activated receptor 2-mediated vasodilatation in the rat dura mater. *Neuroscience. 161: 887-894, 2009*
Impact factor: 3,556

Rosta Judit: „Neurogenic vascular responses mediated by capsaicin-sensitive nociceptive afferents in the rat dura mater encephali: Implications for the pathomechanism of headaches”
Ph.D. Szeged, 2010.

A jelen projekt keretében vizsgálatokat végeztünk az elsődleges érzőganglionsejtek által expresszált és a nociceptív folyamatokban alapvető szerepet játszó, a különböző nociceptív ingereket molekuláris szinten integráló TRPV1 receptor funkcióját/expresszióját moduláló/reguláló molekuláris mechanizmusok feltárására. A gerincvelői és trigeminális

primer afferens terminálisok perifériás idegsérülést követő plaszticitásának vizsgálata során kimutattuk, hogy a károsodott capsaicin-érzékeny C rost afferensek fokozottan kötik és transzportálják az A β rostok specifikus markerének tekintett cholera toxin B alegység-tormaperoxidáz konjugátumot (CTB-HRP). Megfigyelésünk a CTB-HRP receptorának, a GM1 gangliozid anyagcseréjének idegsérülést követő változására utalt. A GM1 és más gangliozidok a detergens-rezisztens membrán mikrodomének (lipid raftok) alkotóelemei, amelyek számos neuronális folyamatban, például az idegnövekedési faktor (NGF) szignalizációban is szerepet játszanak. Tekintettel a membrán gangliozidok, az NGF szignalizáció és a vanilloid 1. típusú transziens receptor potenciál (TRPV1) receptor funkciók közötti összefüggésekre, vizsgáltuk a gangliozid szintézis farmakológiai befolyásolásának a szenzoros neuronok capsaicin érzékenységre, a TRPV1 csatorna expressziójára és aktiválására kifejtett hatásait.

Kísérleteinket patkány hátsógyöki és trigeminális ganglionjaiból készített neuron kultúrákon végeztük. A glukozilceramid-szintáz, a gangliozid szintézis kulcsenzimét D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-propanol (D-PDMP) adásával (10-50 μ M) gátoltuk. A neuronok CTB kötésének konfokális mikroszkópos vizsgálata igazolta, hogy a D-PDMP kezelés idő- és koncentráció-függő módon csökkentette a sejtmembrán GM1 gangliozid tartalmát. Kobalt felvétel technikával kimutattuk, hogy a D-PDMP előkezelés reverzibilisen csökkentette a capsaicinnel (1 μ M) aktivált neuronok arányát (kontroll: 29,7% vs. 50 μ M D-PDMP: 11,6%). A calcitonin gén rokon peptid (CGRP) felszabadulás vizsgálata kimutatta, hogy a D-PDMP kezelés csökkentette a 100 nM capsaicinnel kiváltott CGRP felszabadulást, de nem befolyásolta a 60 mM-os KCl-dal kiváltott választ. Immuncitokémiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a D-PDMP a TRPV1 csatorna expressziójának jelentős, közel 40%-os csökkenését okozta, de más, a nociceptorokra jellemző biokémiai markerek expressziója (CGRP, IB4) nem változott. A TRPV1 expresszió egyik legfontosabb regulátorának, az NGF szignalizációjának zavarára utal, hogy a D-PDMP kezelés gátolta az NGF akut szenzitizáló hatását a capsaicinnel kiváltott kobalt felvételre. Eredményeink rávilágítanak a TRPV1 csatorna és a neuronális capsaicin érzékenység szabályozásának új, a membrán gangliozidok és a gangliozidokban gazdag membrán mikrodomének által közvetített mechanizmusára. A nociceptív funkciók sejtmembrán összetételhez és annak szupramolekuláris szerveződéséhez köthető szabályozásának megismerése további lehetőséget teremthet a fájdalomérzés perifériás mechanizmusainak vizsgálatára és befolyásolására. Eredményeinkről nemzetközi tudományos konferenciákon és közleményekben számoltunk be.

Jancsó G., Dux M., Oszlács O., Sántha P.: Activation of the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV 1) channel opens the gate for pain relief. *Br. J. Pharmacol.* 155, 1139-1141, 2008

Impakt faktor: 4.902

Jancsó G., Katona M., Horváth V., Sántha P., Nagy J.: Sensory nerves as modulators of cutaneous inflammatory reactions in health and disease. *In: Jancsó G. (Vol. ed.), NeuroImmune Biology, Vol. 8: Neurogenic Inflammation in Health and Disease (Elsevier, Amsterdam) pp. 3-36, 2009*

Jancsó G., Oszlács O., Dobos I., Sántha P.: Glucosylceramide synthase regulates the capsaicin sensitivity of cultured dorsal root ganglion neurons. *6th Forum of European Neuroscience Societies. Geneva, Switzerland, July 12-16, 2008*

Sántha P, Oszlács O, Dux M, Dobos I, Jancsó G. Inhibition of glucosylceramide synthase reversibly decreases the capsaicin-induced activation and TRPV1 expression of cultured dorsal root ganglion neurons.

Pain, 2010 Apr 26. [Epub ahead of print]

Impakt faktor: 6,03