



**Endogén és exogén ligandok, valamint a szociális izoláció hatásai
a fájdalomérzékenységre**
Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Tuboly Gábor
Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Élettani Intézet

Szeged
2010

Bevezetés

A Nemzetközi Fájdalom Társaság (IASP) 1979-es definíciója szerint a fájdalom „olyan kellemetlen szenzoros és emocionális élmény, amelyet a szövetek aktuális vagy potenciális károsodása okoz”. Többek között az különbözteti meg a többi érzéskvalitástól, hogy nem rendelkezik speciális receptorral, ill. szövettel, valamint jellegénél fogva olyan érzelmi, kognitív és szenzoros tartalmat továbbít, mely befolyásolni képes az egész szervezet működését. A fent leírtak értelmében természetesen igen fontos szerepe van abban, hogy megóvja a szervezetet a lehetséges károsodásoktól, azonban a klinikai gyakorlatban a fájdalom eredetének felderítése mellett a fájdalomcsillapítás gyakran legalább ugyanakkora szerepet kap.

A fájdalomérző képletek szabad idegvégződések, melyek a fájdalomérzetet vékony myelinhüvelyes (A-delta) ill. myelinhüvely nélküli (C) rostokon keresztül szállítják a központi idegrendszer (KIR) felé. Az axonok sejtteste a hátsó gyöki érző idegdúcban (dorsal root ganglion: DRG) található, ahonnan az ingerületet a gerincvelő hátsó szarvába (dorsal horn: DH) továbbítják. A hátsó szarv lamináiban az ingerület egyrészt interneuronokon keresztül interlaminárisan ill. interszegmentálisan továbbítódik, másrészt a

projekciós neuronok révén, 5 főbb pályán keresztül halad a felsőbb központok felé.

A KIR-en belül az agytörzs, azon belül is a periaqueductalis szürkeállomány (PAG), a rostralis ventromedialis medulla (RVM) és a locus coeruleus (LC); a thalamus lateralis és medialis magcsoportjai, ill. több corticalis struktúra (sensoros cortex, anterior gyrus cinguli, insula, amygdala, hypothalamus, hippocampus és a törzsdúcok) is szerepet játszik a fájdalom feldolgozásában valamint a fájdalomérzés befolyásolásában.

Jól ismert, hogy a szervezetben jelen lévő (endogén) kémiai anyagok és receptorok közül nagyon sok részt vesz a fájdalomérzés továbbításában, egyesek képesek fokozni, míg mások csökkentik azt. Neurotranszmitterek, neuromodulátorok, hormonok, cytokinek, stb. mind-mind képesek az ingerület átvitelében résztvevő neuronok aktivitását befolyásolni centrálisan és perifériásan is. Mivel a képződésükhöz és lebontásukhoz szükséges enzimek megtalálhatók a szervezetben, valamint sok szintetikus vegyületnél nagyobb affinitással kötődnek receptoraikhoz, célszerűnek tűnik ezen természetes vegyületek működésén keresztül új, potenciális fájdalomcsillapító kezelések kifejlesztését megcélozni.

A természetes és szintetikus cannabinoid származékok fájdalomcsillapító hatása régóta ismert. Mivel ezen kívül számos

mellékhatással rendelkeznek, valamint a hozzá szokás és függőség veszélye is igen nagy, szükségesnek tűnt a cannabinoid rendszerben résztvevő endogén anyagok felderítése. Az eddig felfedezett cannabinoid receptorok (CB1, CB2) jelen vannak a központi és perifériás idegrendszerben, valamint számos egyéb szövetben is. Közös tulajdonságuk, hogy spontán aktivitásuk általában gátolja az ingerületátvitelt, és hatásukat leginkább gátló G-proteineken keresztül fejtik ki. Felfedezésük után nem sokkal rájöttek, hogy az agy termel különböző endogén vegyületeket, melyek nagy affinitással kötődnek ezekhez a receptorokhoz. Az első ilyen vegyület az arachidonoyl-ethanolamine (anandamide: AEA) volt, melyet Devane és mtsai 1992-ben izoláltak sertés agyból. Ez az eicosanoid, mely közepes affinitással kötődik mind a CB1, mind a CB2 receptorokhoz, képes egyéb G-proteines receptoron és ioncsatornán keresztül is hatást kifejteni. Az egyik legismertebb ilyen receptor a tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1), amely igen jelentős szerepet játszik a fájdalomérzet befolyásolásában. Mivel a központi és a perifériás idegrendszeren belül több helyen is kimutatták, hogy a cannabinoid és a TRPV1 receptorok együttesen előfordulnak, logikusnak tűnik a feltételezés, hogy van közöttük valamiféle kölcsönhatás, mely magyarázatot adhat az endocannabinoidok fájdalmat befolyásoló hatására.

Évszázadok óta ismert a morfin, ill. egyéb opiátszármazékok erős fájdalomcsillapító hatása, és gyakorlatilag minden létező analgetikum hatását hozzájuk hasonlítják. Ennek ellenére a kiterjedt mellékhatások, a hozzászokás valamint a függőség kialakulása miatt ebben az esetben is célszerűbbnek tűnik a hasonlóan hatékony, ám kevesebb veszélyt rejtő endogén anyagok felderítése. Az opiátszármazékok három fő receptoron keresztül fejtik ki hatásukat. Ezek a μ -, δ - és κ -receptorok, melyek a gátló G-proteinek családjába tartoznak. Aktiválódásuk a cAMP szint csökkenésén, a Ca^+ beáramlás gátlásán valamint a K^+ csatornák nyitására keresztül csökkentik a neuronok ingerlékenységét és ezzel a transzmitterek felszabadulását. Az opioid receptorok antinociceptív hatásukat egyrészt a periférián (főleg gyulladási folyamatokban), másrészt a gerincvelői valamint felsőbb központokon, ill. a leszálló fájdalom pályákon keresztül fejtik ki.

Több mint 10 évvel ezelőtt Zadina és mtsai két specifikus μ -opioid receptor agonista peptidet izoláltak előbb szarvasmarha, majd emberi agyból, és ezeket endomorfinknak nevezték el (endomorfín-1: EM1, endomorfín-2: EM2). Azóta kiterjedt vizsgálatok történtek az endomorfínok fájdalomcsillapító hatásaival kapcsolatban. Az eddigi tapasztalatok azt mutatják, hogy általában részleges és rövidebb hatásúak, mint a morfin, azonban sikerrel

alkalmazták különböző gyulladássos, neuropátiás ill. krónikus fájdalommodellekben.

Az adenzin (ADE) egy endogén purin nukleotid, mely a szervezetben ATP-ből képződik, és mint az utóbbi évtizedben kiderült, neurotranszmitterként részt vesz többek között az alvás-ébredés, anxiétás, a kognitív működések, a memória, valamint a fájdalom szabályozásában. Az ADE receptorok közül az A1 receptorok jelen vannak a DRG neuronjainak sejttestjein valamint az afferens idegsejtek axon terminálisán. Az A1 receptorok aktiválódása a cAMP szint csökkentésén keresztül képesek gátolni az ingerületátvitelt. Az A2 receptorok ezzel ellentétben a cAMP szintet ugyanitt emelik, míg az A3 receptorokról azt feltételezik, hogy a fehérvérsejtekből fokozzák a hisztamin és szerotonin felszabadulást. Ezen kívül in vitro adatok arra utalnak, az ADE képes gátolni a TRPV1 receptort is. Több tanulmány is vizsgálta az évek során az ADE fájdalomcsillapító hatását. Ezek során kiderült, hogy a számos mellékhatás miatt nem feltétlenül ideális szer, de egyes gyulladássos és neuropátiás modellben képes a fájdalmat csökkenteni, a fájdalomérzékenység megváltoztatása nélkül.

A fent részletezett endogén anyagokról az évek során elvégzett kísérletsorozatok révén az mindenképpen kiderült, hogy önmagukban általában gyengébb hatásúak, mint szintetikus

változataik. Egy potenciális megoldás lehetne erre a problémára különböző dózisú kombinációk alkalmazása.

Klinikai beszámolók szerint sok szkizofréniában szenvedő beteg kevésbé érzékeny a fájdalomra, és valószínűleg ez is összefügghet a kórkép magas morbiditásával, ill. mortalitásával. Már az elmúlt század ötvenes éveitől kezdve jelentek meg közlemények, melyek megfigyelték, hogy szkizofréniában megváltozik a fájdalomérzékenység. Néhány újabb tanulmány kimutatta, hogy elektromos ingerrel kiváltott érzés- és fájdalomküszöb, fájdalomtolerancia megváltozott a betegek esetén. Mások a hőérzékenységet vizsgálták, olyan szkizofrén betegekben, akik legalább 8 hete nem részesültek antipszichotikus kezelésben. Azt tapasztalták, hogy mind a meleg érzékenység, mind pedig a fájdalomküszöb emelkedett volt a beteg csoportban, melyet 3 napos akut antipszichotikus kezelés sem változtatott meg. Ugyanakkor a hőfájdalom tolerancia nem változott meg sem a kezelés előtt, sem a kezelés hatására. Hooley és mtsai (2001) a szkizofrén betegek egészséges rokonainak mérte fel a fájdalomküszöbét. Azt találták, hogy ezen rokonokban is magasabb volt a mechanikai fájdalomküszöb az olyan egészségesekhez képest, akik családjában nincs hasonló betegség.

Sajnos a mechanizmusra vonatkozóan kevés bizonyíték áll rendelkezésre. Ezekből a vizsgálatokból nehéz megállapítani, hogy a fájdalompálya mely részében lehet a zavar. A fájdalomérzékenység csökkenése tulajdonítható mind az emelkedett fájdalomküszöbnek, mind pedig a csökkent fájdalom expresszióknak. Sokan feltételezik, hogy valójában a végrehajtó működés (vagyis a fájdalmas reakció, affektív komponens) szenvedhetett zavart. Kimutatták, hogy a percepció, a figyelem, a vigilance (éberség) és a végrehajtó funkció is megváltozik ezen betegségben, melyek mind hozzájárulhatnak a fájdalomküszöb megváltozásához is, ugyanakkor nem zárható ki az afferens pálya alacsonyabb szintű zavara sem.

A szkizofrénia vizsgálatára a kutatók már régóta próbálnak megfelelő állatmodellt kifejleszteni. A legtöbb ezek közül általában rövid ideig idéz elő valamilyen pszichotikus állapotot, mások születés után vagy fiatal korban egyes központi idegrendszeri struktúrák sértésével, génkiütött állatok, gyógyszeres kezelés vagy krónikus stressz alkalmazásával viszonylag hosszabb ideig tartó állapotot tudnak vizsgálni. Sajnálatos módon ezek az állatmodellek eddig nem voltak képesek a szkizofrénia összes tünetét reprodukálni, az állatok fájdalomküszöbének megváltozásáról pedig igen kevés adat áll a rendelkezésünkre.

Célkitűzések

Kísérleteink célja egyrészt a fájdalmat befolyásoló endogén ill. exogén anyagok valamint azok kölcsönhatásának vizsgálata volt, másrészt a szociális izoláció és a fájdalomérzékenység közötti összefüggést szeretnénk felvilágosítani.

Konkrét céljaink az alábbiak voltak:

- Az intratekálisan adott AEA ill. EM1 dózis-hatás összefüggésének vizsgálata patkányban, gyulladásos fájdalommodellen,
- Az AEA és EM1 lehetséges kölcsönhatásának tanulmányozása gerincvelői szinten
- Az ADE, az A1 receptor antagonistá koffein (CAFF) ill. AEA antinociceptív kölcsönhatásainak feltárása.

Egy 2006-os tanulmányban Becker és mtsai felnőttkori szubkrónikus ketaminkezelés és szociális izoláció után vizsgálták patkányok fájdalomküszöbét. Mivel számos tanulmány szerint a fiatalkori szociális izoláció feltehetőleg erőteljesebb hatású a felnőttkorban végzettnél, a mi kísérleteinkben az elválasztás utáni elkülönítést

kombináltuk krónikus, NMDA antagonistá ketaminnal való kezeléssel, majd a kezelések után vizsgáltuk az állatok fájdalomküszöbét.

Ezen kísérleteinkben célunk volt:

- Meghatározni az elválasztás utáni ketamin kezelés valamint a szociális izoláció hatását az akut hő-fájdalom érzékenységre külön-külön ill. együttesen.
- Megvizsgálni a gyulladásos hyperalgesia esetleges változásait.
- Feltárni a morfin analgetikus hatását carrageenan kiváltotta gyulladásos hő-fájdalom modellen.

Módszerek

Kísérleteink során hím Wistar patkányokat használtunk. Az endogén anyagok vizsgálata előtt a felnőtt állatokba ketamin-xylozin anesztéziában intratekális kanült ültettünk be. Az operációt követően legalább 4 nap gyógyulási időt hagytunk az anyagok beadása előtt.

Az endogén ligandok valamint azok kombinációinak hatását a hő-fájdalom küszöbre carrageenan okozta gyulladáshoz hasonló modellben, lábélváltási (paw withdrawal: PWD) teszttel vizsgáltuk. Az első kísérletsorozat során az anyagokat (AEA: 1.5, 10, 30, 100 µg, EM1: 0.01, 0.1, 1, 10 µg, ADE: 100 µg és CAFF 400 µg) önmagukban, különböző dózisú kombinációkat, ill. placebót adtuk intratekálisan. A ligandok beadása után 10 percnként mértük a latenciákat 70 percig.

A második kísérletsorozatban a szociális izolációhoz 21 napos állatokat használtunk, amelyeket az elválasztás napján 4 csoportba osztottunk. Két csoportba azok az állatok kerültek, melyek közül 5-6 darab került egy ketrecbe, 2 másik csoportba pedig azok, amelyekből 1-1 állatot tettünk egy ketrecbe. A két-két csoportból az állatok egyik fele 14 napig naponta 30 mg/kg ketamint, míg az állatok másik fele fiziológiás sóoldatot kapott intraperitoneálisan. A szociális izolációt az elválasztás napján kezdtük, a ketamin kezelést

pedig 6 nap múlva. A két hetes kezelés után az állatok fájdalomküszöbét a farkelrántási (Tail-Flick: TF) teszttel vizsgáltuk 48 és 52 °C-os hőmérsékleten. Ezután az addig izolált patkányokat reszocializáltuk (5-6/ketrec), majd két és négy hét múlva megismételtük a fájdalomtesztet. A PWD teszten meghatároztuk különböző dózisu morfin (1-3 mg/kg; subcutan) hatását is a carrageenan indukálta gyulladási modellben.

Eredmények

A kísérleteink során beadott carrageenan az alkalmazott oldalon minden esetben szignifikánsan fokozta a fájdalomérzékenységet. Az AEA dózis-dependens fájdalomcsökkenést okozott, 30 és 100 µg dózisoknál már szignifikáns és hosszan tartó hatást figyeltünk meg. Az EM1 önmagában szintén erőteljes fájdalomcsökkenést okozott nem csak a gyulladt, de az ép oldalon is, bár ez a hatás viszonylag rövidebb ideig tartott. Az ADE és CAFF esetében nem találtunk különbséget a kontroll csoporttal összehasonlítva.

Az alkalmazott kombinációk közül 30 µg AEA jelentősen fokozta mind a 0.01 µg, mind a 0.1 µg EM1 hatását. A CAFF és az ADE együttes adása rövid ideig bár, de csökkentette a gyulladási

fájdalomérzékenységet. A CAFF vagy ADE előkezelés kismértékben csökkentette a 100 μg AEA hatását, azonban a szerek hármas kombinációjának az alkalmazása esetén rövid időtartamú hatásfokozódást tapasztaltunk.

A szociális izoláció valamint a ketaminkezelés után a TF látenciákat 48 °C-on vizsgálva azt találtuk, hogy az izoláció hatására, valamint a korrrel szignifikánsan nőtt a reakcióidő, a ketaminkezelés azonban nem befolyásolta azt. 52 °C-on mérve a reakcióidőt csak a korrrel nőtt a látencia, a különböző csoportok között nem volt szignifikáns eltérés. 48 °C-on mérve csak a harmadik mérés során volt szignifikáns különbség az első méréshez képest, míg 52 °C-on a második és harmadik mérés során is jelentősen nőtt a fájdalomküszöb. A PWD teszten a gyulladáscsökkentő fájdalomküszöb kevésbé csökkent az izolált állatoknál, bár az eltérés éppen nem volt szignifikáns ($p=0.14$). 2 mg/kg morfin a kontroll csoport kivételével az összes csoportban szignifikánsan csökkentette a gyulladáscsökkentő fájdalomérzékenységet, míg 1 ill. 3 mg/kg esetén nem találtunk eltérést a csoportok között.

Összefoglalás

Kísérleteink során kimutattuk, hogy az AEA és az EM1 jelentősen csökkentették a gyulladáshoz kapcsolódó hyperalgesiát, egy kombinációban pedig additív hatást figyeltünk meg. Ez alapján feltételezhető, hogy a két ligand speciális arányú kombinációja kevesebb mellékhatást okozva alkalmas lehet fájdalomcsillapításra.

Sem az ADE, sem a CAFF nem fokozta az AEA fájdalomcsillapító hatását gerincvelői szinten, sőt további vizsgálataink során azt találtuk, hogy mérsékelten csökkentették azt. Valószínűnek tűnik, hogy az ADE és AEA kombinációja nem ideális a gyulladáshoz kapcsolódó fájdalom kezelésére, bár a továbbiakban érdemes lenne megvizsgálni egyéb (pl.: neuropátiás) fájdalomokra kiváltott hatását.

Első kísérletsorozatunk révén arra szeretnénk rámutatni, hogy bár az endogén ligandokkal kapcsolatos kutatások révén az utóbbi években számos receptor és receptor-rendszer szerepe körvonalazódni látszik, valódi hatásmechanizmusukat feltehetőleg tovább bonyolítja a különböző rendszerek kölcsönhatása.

Vizsgálataink során elsőként mutattuk ki, hogy az elválasztás utáni 3 hetes szociális izoláció hosszú távú csökkenést okozott az akut hőfájdalom érzékenységben alacsony hőmérsékleten, a morfin hatékonyságát viszont a ketaminkezelés is növelte. Jól ismert, hogy

két párhuzamos nociceptív idegpálya szállítja a fájdalominformációkat, ahol a fájdalom, annak jellege szerint velőhüvelyes (Adelta) vagy velőhüvely nélküli (C) rostokon érkezik a központi idegrendszerbe. Számos tanulmány igazolta, hogy az alacsonyabb hőinger elsősorban a C-típusú rostokat aktiválja, tehát eredményeink arra utalnak, hogy szociális izoláció, és talán a szkizofrénia is, elsősorban ezt a pályarendszert érinti.

Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Benedek György Professzor Úrnak, Dr. Horváth Gyöngyinek a rengeteg segítséget, valamint hogy lehetővé tették, hogy az Élettani Intézetben dolgozzak. Köszönöm Dr. Jancsó Gábor Professzor Úrnak, hogy csatlakozhattam az Idegtudományok Doktori Iskolához.

Köszönöm a Magatartástudományi Laboratóriumban dolgozó összes munkatársamnak, Dr. Szikszay Margitnak, Dr. Kékesi Gabriellának, Dr. Joó Gabriellának, Ábrahám-Tandari Ágnesnek, Hajduné Petrovszki Zitának, Liszli Péternek, és az összes Kollégámnak az Élettani Intézetben azt a sok segítséget és támogatást, amit az évek során tőlük kaptam.

Köszönettel tartozom Dr. Vécsei László Professzor Úrnak, valamint minden munkatársamnak a Neurológiai Klinikán, hogy lehetővé tették, hogy dolgozatomat befejezzem.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm a családomnak és barátaimnak a támogatást és biztos háttérrel az életben és a munkában.

Tézis alapjául szolgáló közlemények:

1. **Tuboly G.**, Mecs L., Benedek G., Horvath G. Antinociceptive interactions between anandamide and endomorphin-1 at the spinal level. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 36(4):400-5. (2009) **IF: 1.780**
2. **Tuboly G.**, Kekesi G., Nagy E., Benedek G., Horvath G. The antinociceptive interaction of anandamide and adenosine at the spinal level. *Pharmacol Biochem Behav.* 91(3):374-9. (2009) **IF: 2.092**
3. **Tuboly G.**, Benedek G., Horvath G. Selective disturbance of pain sensitivity after social isolation. *Physiol Behav.* 8;96(1):18-22. (2009) **IF: 2.445**
4. Horvath G., Kekesi G., **Tuboly G.**, Benedek G. Antinociceptive interactions of triple and quadruple combinations of endogenous ligands at the spinal level. *Brain Res.* 25;1155:42-8. (2007) **IF: 2.296**
5. **Tuboly G.**, Horváth G. Pain sensitivity changes in schizophrenic patients and animal models. Part 1. *Ideggy Szle.* 30;62(1-2):4-11. (2009)
6. **Tuboly G.**, Horváth G. Pain sensitivity changes in schizophrenic patients and animal models. Part 2. *Ideggy Szle.* 30;62(5-6):148-53. (2009)