

A noradrenalin szerepe a gerincvelő sérülése
és érzéstelenítése kapcsán kialakuló neurotoxicitásban
és a fogpulpa homeosztázisában

Doktori tézisek

Dr. Borbély Zoltán

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Varga Gábor, az MTA doktora, egyetemi tanár
Konzulens: Dr. Vizi E. Szilveszter, az MTA r. tagja, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Hársing László, az MTA doktora, tudományos tanácsadó
Dr. Szalma József, PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Fábián Tibor, CSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Rakonczay Zoltán, DSc, egyetemi tanár
Dr. Rózsa Noémi Katinka, PhD, egyetemi docens

Budapest
2017

BEVEZETÉS

A noradrenalinnak fontos szerepe van testünk homeosztázisában mint központi és vegetatív idegrendszeri neurotranszmitter és a véráram útján terjedő hormon. Elsődleges feladata az ember ébrenléti, készenléti állapotának, illetve stressz- és veszélyhelyzetekre adott reakcióinak szabályozása.

A számtalan fiziológiás hatása mellett a noradrenalinnak azonban neurotoxikus hatása is ismert, vagyis a transzmitter túlzott mértékű felszabadulása a környező idegsejtek károsodásához, elhalásához vezethet. Ilyen túlzott noradrenalin felszabadulást okozhat például, mint az értekezésben bemutatott vizsgálataink bizonyítják, a gerincvelő traumás sérülése, illetve helyi érzéstelenítése is.

Világszinten 180 000-re becsülik az új gerincvelői sérülések számát évente, ezek több, mint fele közlekedési baleset következménye. A sérülésben érintettek kétharmada 30 év alatti, és mivel a jelenlegi terápiás beavatkozások az idegi funkciókban nem tudnak érdemi javulást elérni, a sérültek egész életükben ágyhoz vagy kerekesszékhez kötötté válnak.

A gerincvelői sérülés gyógyítását az idegszövet korlátozott regenerációs képességén túl számos szekunder károsító tényező nehezíti, mint az ischaemia, a gyulladás és a neurotranszmitterek túlzott mértékű felszabadulásából adódó úgynevezett excitotoxikus hatás. Mindezek szoros kölcsönhatásban állnak a noradrenalin felszabadulásával, ezért a transzmitternek fontos szerepe lehet a gerincvelői sérülés patomechanizmusában.

A helyi érzéstelenítésben ugyancsak fontos lehet az érzéstelenítő szer hatása a noradrenalin felszabadulására. Gerincvelő preparátumon végzett vizsgálatok bizonyították, hogy a Na^+ - és K^+ -csatornákat blokkoló lidocain jelentősen megnövelheti a noradrenalin felszabadulását, ami a K^+ -csatorna gátlásával van összefüggésben. Ez egyrészt elősegítheti annak érzéstelenítő és érszűkítő hatását, másrészt viszont toxikus hatása is lehet a környező idegszövetre.

A noradrenalinnek a vegetatív idegrendszeri és hormonális szabályozás révén fontos szerepe van a szájüregi szövetek, így a fogpulpa homeosztázisának szabályozásában is. A noradrenalin az érösszehúzódás elsődleges mediátora, de ezen felül módosíthatja a szájüregi szövetek fájdalomérzetét és gyulladásos folyamatait is. Felszabadulása bizonyítottan hatással van a periapicalis elváltozás méretére és a terciér dentin termelésére, de még a fogsabályozás közbeni gyökér-felszívódás mértékére is.

CÉLKITŰZÉSEK

- 1) Gerincvelői sértéses modellben ex vivo mikroperfúziós kísérletekkel vizsgálni, hogy miként változik a gerincvelői noradrenalin felszabadulás a művi sértéstől caudalisan, az azt követő 1., 3. és 14. napon.
- 2) Ugyancsak gerincvelői sértés után vizsgálni a noradrenalin felvételért felelős transzporter funkcióját, amelynek fontos szerepe van a nem-szinaptikus noradrenalin felszabadulásban patológiás viszonyok között.
- 3) Gerincvelői szeleteken meghatározni a helyi érzéstelenítő hatású, Na⁺- és K⁺-csatornákat blokkoló lidocain noradrenalin felszabadulásra kifejtett hatását és összevetni a szelektív Na⁺-csatorna blokkoló tetrodotoxin és a szelektív K⁺-csatorna blokkoló 4-aminopiridin hatásával.
- 4) Egy olyan fogpulpa kísérleti modellt tesztelni, mely alkalmas lehet annak vizsgálatára, hogy a pulpában a neurotranszmitterek felszabadulása hogyan módosul különböző gyógyszerek vagy patológiás változások hatására.

MÓDSZEREK

Szövetminták

A kísérleteinkhez használt gerincvelői szeleteket felnőtt nőstény Wistar patkányokból nyertük. A gerincvelői sérüléssel modellben 16 állatot használtunk az uptake kísérletekhez, 49 állatot a frakcionális felszabadulás kísérletekhez, és 2 állatot az elektronmikroszkópos felvételekhez. A helyi érzéstelenítéses modellben további 12 állatot használtunk.

A humán fogpulpa mintákat 25 év alatti páciensek egészséges bölcsességfogából izoláltuk.

Gerincvelői sértés

A gerincvelő sérülését művi, steril körülmények között, a negyedik lumbalis gerincvelői szegmens magasságában végzett féloldali átmetszéssel, azaz hemisectióval szimuláltuk. A patkányokat elaltattuk, az érintett gerincvelői szegmenst a csigolya részleges eltávolításával feltártuk, majd horgas szikével átmetsztük a gerincvelő jobb oldalát. 1, 3, illetve 14 nappal a gerincvelői sértés után a patkányokat dekapitáltuk, a gerincvelőt kireparáltuk, majd a sértéstől 2-5 mm-re caudalisan fekvő részét 400 µm vastag szeletekre vágtuk. Egy kísérlethez négy szeletet használtunk, össztömegük átlagosan $13,1 \pm 2,9$ mg volt.

[³H]noradrenalin jelölés

A gerincvelői szeleteket 20 percig karbogén gázzal (95% O₂, 5% CO₂) buborékoltatott Krebs-oldatban preinkubáltuk 37 °C-on, ehhez és az inkubációs oldathoz az uptake kísérletek felénél 1 µM nisoxetint adtunk, amely szelektíven gátolja a noradrenalin felvételéért felelős transzportert.

Ezután hozzáadtunk 5 $\mu\text{Ci/ml}$ radioaktív trícium-noradrenalin ($[^3\text{H}]\text{NA}$) és további 45 percig inkubáltuk. A radioaktív izotóppal jelölt transzmittert a noradrenerg idegvégződések specifikusan veszik fel a transzporterek működésének köszönhetően. Ezt követően a szeleteket mikroperfúziós kamrákba helyeztük. A kamrákon $37\text{ }^\circ\text{C}$ -os, karbogén gázzal buborékolatott Krebs-oldatot keringettünk át $0,5\text{ ml/perc}$ sebességgel. 60 perces preperfúzióval mostuk ki a szövetből a fel nem vett $[^3\text{H}]\text{NA}$ -t.

Noradrenalin felvétel mérése

Az uptake kísérleteknél a preperfúziót követően a szövetszeleteket triklóracetát oldatban homogenizáltuk, majd folyadék szcintillációs spektrométerrel határoztuk meg a radioaktivitásukat. A radioaktivitást Bq/g-ban fejeztük ki (radioaktív bomlás/másodperc/szövet tömeg).

Stimulált noradrenalin felszabadulás

A frakcionális felszabadulás kísérleteknél a preperfúziót követően a mikroperfúziós kamrákból kiáramló folyadékot 19 darab, egyenként 200 másodperces frakcióban gyűjtöttük. A harmadik és tizenharmadik frakciók első 80 másodpercében elektromos téringerlést (40 V , 3 Hz , 1 ms) alkalmaztunk a mikroperfúziós kamra falába helyezett platina elektródokon keresztül. A kísérletek felében $1\text{ }\mu\text{M}$ nisoxetint adtunk a perfúziós oldathoz a nyolcadik frakciótól kezdődően. A gyűjtés után meghatároztuk a frakciók radioaktivitását, ami a felszabadult $[^3\text{H}]\text{NA}$ mennyiségével arányos. Stimulált felszabadulásnak tekintettük a nyugalmi szinten felüli $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulást az elektromos stimulációt követő négy frakcióban.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk kontroll, illetve a gerincvelői sértés után 3 nappal nyert mintákról. A minta a sértés oldaláról, az L5-ös gerincvelői szegmensből elülső szarvából származott, a sértéstől kb. 2 mm-re.

Helyi érzéstelenítők

Az érzéstelenítő szerekkel végzett vizsgálataink protokollja jórészt megegyezett a fent leírt, a gerincvelői sértéses kísérletek során alkalmazottakkal. A Na⁺- és K⁺-csatorna blokkoló lidocaint 5 mM-os koncentrációban alkalmaztuk, mert klinikai körülmények között a gerincvelői érzéstelenítése során ekkor koncentrációt érhet el. A szelektív Na⁺-csatorna blokkoló tetrodotoxint 1 μM-os, a szelektív K⁺-csatorna blokkoló 4-aminopiridint pedig 300 μM-os koncentrációban alkalmaztuk.

Fogpulpás kísérletek

Humán fogpulpán végzett méréseink protokollja szintén hasonló volt az előbbieken leírtakhoz. A mikroperfúziós kamrából kiáramló folyadékot 32 darab, egyenként 5 perces frakcióba gyűjtöttük. A 7. frakció kezdeténél végeztük az első elektromos téringerlést, mely 30 másodperc hosszú volt (40 V, 5 Hz, 1 ms). A 17. és 27. frakció kezdeténél végzett stimulációk 100 másodperc hosszúak voltak.

EREDMÉNYEK

Morfológiai változások a gerincvelői sértés után

A hemisectio után a patkányok a hemiplegia jellegzetes tüneteit mutatták, jobb hátsó végtagjuk teljes bénulásával. A sértés után 1, illetve 3 nappal a gerincvelő makroszkópos megjelenése az egészséges szövetéhez hasonló volt. Az elektronmikroszkópos felvételek a sértés után 3 nappal az általános szöveti degeneráció jeleit mutatták, ennek ellenére számos ép szinapszist is találtunk.

[³H]noradrenalin felvétel

[³H]NA jelölés után a gerincvelői szeletek átlagos transzmitter felvétele a kontroll csoportban 149 ± 32 kBq/g volt. Érdekes módon a gerincvelői sértés után 3 nappal ez az érték hasonló volt, 158 ± 10 kBq/g. A noradrenalin felvételét gátló nisoxtin a jelölés és preinkubáció ideje alatt $1 \mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmazva hatékonyan gátolta a [³H]NA felvételét, így az átlagos radioaktivitás 37 ± 9 kBq/g, ami 75%-os csökkenés a kontroll kísérletekhez képest. Gerincvelői sértés után 3 nappal ez a gátlás szignifikánsan kisebb mértékű volt (61 ± 16 kBq/g), ami 62%-os csökkenésnek felel meg.

[³H]noradrenalin felszabadulás a kontroll kísérletekben

Frakcionális felszabadulás kísérleteinkben egy 200 másodperces nyugalmi frakcióban (FRR₁) az átlagos felszabadulás a teljes radioaktivitás $0,67 \pm 0,13\%$ -a volt. Elektromos stimuláció hatására a szövetben lévő [³H]NA-nak ezen felül $2,73 \pm 0,68\%$ -a szabadult fel (FRS₁), majd lassan visszatért a nyugalmi értékére.

A második elektromos stimuláció hatására kisebb mértékben nőtt meg a felszabadulás ($FRS_2 = 1,94 \pm 0,57\%$), így az FRS_2/FRS_1 hányados $0,73 \pm 0,21$ lett.

Gerincvelői sértés hatása a [³H]noradrenalin felszabadulásra

A gerincvelő művi sértése után mind a nyugalmi, mind a stimulált [³H]NA felszabadulás fokozatos emelkedést mutatott. A nyugalmi felszabadulást jellemző FRR_1 értéke a gerincvelői sértés után 1 nappal $0,81 \pm 0,09\%$, a sértés után 3 nappal $0,81 \pm 0,12\%$, a sértés után 14 nappal pedig $1,01 \pm 0,46\%$ volt. Mindhárom szignifikánsan magasabb a kontroll értékénél, a sértés utáni értékek között nincs statisztikailag szignifikáns különbség. A stimulált felszabadulást jellemző FRS_1 a gerincvelői sértés után 1 nappal $3,01 \pm 0,95\%$, a sértés után 3 nappal $3,21 \pm 0,74\%$, a sértés után 14 nappal pedig $3,40 \pm 0,95\%$ volt. Utóbbiak közül csak a sértés után 3 nappal mért érték volt szignifikánsan magasabb a kontrollnál.

A mérési eredményeket úgy foglalhatjuk össze, hogy gerincvelői hemisectio hatására a harmadik napra 20%-kal nő a nyugalmi felszabadulás, ezen felül pedig további 18%-kal a stimulált noradrenalin felszabadulás a kontrollhoz képest.

Uptake gátlás hatása a [³H]noradrenalin felszabadulásra

A felszabadulás kísérletek felében nisoxtint adtunk a perfúziós oldathoz a 8. frakciótól kezdve a [³H]NA újrafelvétel gátlása végett. Ennek következtében a második elektromos stimuláció után (FRS_2) több transzmitter maradt a perfúziós oldatban, így a [³H]NA felszabadulás mért értéke szignifikánsan magasabb lett mindegyik csoportban.

Megfigyelhetjük azonban, hogy miként az uptake kísérleteknél is, a nisoxetin a gerincvelői sértés után kevésbé volt hatásos a noradrenalin felvétel gátlásában. Míg a kontroll csoportban 73%-kal nőtt az FRS₂ értéke nisoxetin hatására, a gerincvelői sértés után 1 nappal csak 61%-os, a sértés után 3 nappal pedig csak 37%-os növekedés történt (utóbbi szignifikáns különbség a kontrollhoz képest).

Ioncsatorna gátlás hatása a [³H]noradrenalin felszabadulásra

Amikor a feszültségfüggő Na⁺- és K⁺-csatornákat gátló lidocaint (5 mM) adtuk a perfúziós oldathoz a 8. frakciótól kezdődően, a nyugalmi [³H]NA felszabadulás fokozatos emelkedését lehetett megfigyelni, ami a 13. frakcióra érte el a maximumát, majd a kísérlet végéig fokozatosan csökkent. Az FRR₂/FRR₁ hányados $5,22 \pm 0,20$ volt ($p < 0,001$). A stimulált felszabadulás ezzel szemben gátolva lett.

A szelektív Na⁺-csatorna blokkoló tetrodotoxin 1 μM-os koncentrációban nem volt hatással a nyugalmi felszabadulásra, viszont szinte teljesen gátolta a stimulált felszabadulást. Az FRS₂/FRS₁ hányados $0,19 \pm 0,05$ volt, ami a kontroll értékének negyede ($p < 0,001$).

A szelektív K⁺-csatorna blokkoló 4-aminopiridin 300 μM-os koncentrációban mind a nyugalmi, mind a stimulált [³H]NA felszabadulást többszörösére növelte (FRR₂/FRR₁ = $5,02 \pm 0,17$; FRS₂/FRS₁ = $3,40 \pm 0,24$; $p < 0,001$).

[³H]noradrenalin felvétel és felszabadulás a fogpulpában

A humán fogpulpa [³H]NA felvétele 30 perc [³H]NA-jelölés után 116 ± 69 kBq/g volt. Amikor a noradrenalin felszabadulás a kezdeti frakciók és elő-ingerlés után elérte a stabil, nyugalmi szintjét, egy 5 perces frakció ideje alatt a teljes [³H]NA-tartalomnak $1,66 \pm 0,46\%$ -át bocsátotta ki (FRR₁). 100 másodperc elektromos stimuláció (S₁) hatására a nyugalmi szinten felüli felszabadulás (FRS₁) a fogpulpában $5,86 \pm 1,87\%$ volt. A második stimuláció (S₂) hatására a felszabadulás valamivel kisebb mértékű, $4,60 \pm 1,42\%$ volt (FRS₂), majd ismét visszatért a nyugalmi szintre.

KÖVETKEZTETÉSEK

1) Vizsgálatainkban elsőként mértük a noradrenalin felszabadulás változását a gerincvelő sérülése után, melyet féloldali, művi átmetszéssel (hemisectióval) szimuláltuk patkányokon. 3 nap után a decentralizált idegvégződésekből a noradrenalin felszabadulás szignifikánsan megnőtt, nyugalomban és ingerlés után egyaránt. Az elektronmikroszkópos felvételek a szöveti degeneráció jeleit mutatták.

2) A noradrenalin újrafelvételét szelektíven gátló nisoxetin hatása a sérülés után lecsökkent a kontrollhoz képest.

Arra következtetünk, hogy gerincvelői sérülés után a noradrenalin magas koncentrációja a metabolitjai és a glutamát felszabadulás serkentése által neurotoxikus hatású.

3) Méréseinkkel elsőként jellemeztük a gerincvelő noradrenalin felszabadulásának változásait lidocain és szelektív Na⁺- és K⁺-csatorna blokkolók szerek adása után. A Na⁺-csatorna blokkolása felelős a stimulált felszabadulás gátlásáért, a K⁺-csatorna blokkolása pedig a nyugalmi és stimulált felszabadulás fokozódásáért. A mindkét csatornát gátló lidocain szignifikánsan megnövelte a noradrenalin felszabadulást, ami hozzájárulhat fájdalomcsillapító hatásához, de neurotoxikus mellékhatásaihoz is.

4) Humán fogpulpán végzett méréseink bizonyítják, hogy a pulpa noradrenerg idegvégződése hatáson ingerelhetőek elektromosan, a transzmitter felszabadulás az idegszövetéhez hasonló karakterisztikát mutat. Ezért a technika alkalmas lehet különböző farmakológiai ágenseknek, illetve patológiás jelenségeknek a fogpulpai neurotranszmisszióra kifejtett hatásának vizsgálatára.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Sircuta C, Lazar A, Azamfirei L, Baranyi M, Vizi ES, Borbély Z. (2016) Correlation between the increased release of catecholamines evoked by local anesthetics and their analgesic and adverse effects: Role of K⁺ channel inhibition. Brain Res Bull, 124: 21-26.

IF: 3,033

Borbély Z., Csomó BK, Kittel Á, Gerber G, Varga G, Vizi ES. (2017) Effect of rat spinal cord injury (hemisection) on the ex vivo uptake and release of [³H]noradrenaline from a slice preparation. Brain Res Bull, 131: 150-155.

IF: 3,033