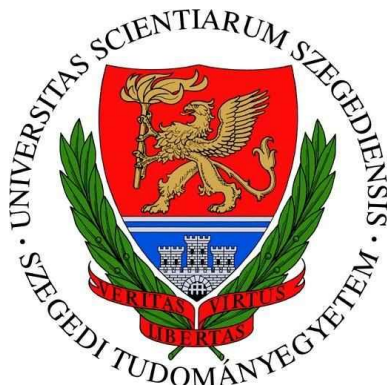


SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék
és
Általános Orvostudományi Kar
Neurológiai Klinika

XXXII. OTDK BIOLÓGIA SEKCIÓ

Migrén: a PACAP és a kinurénsav kapcsolata

Mészáros Ádám
Biológia MSc II. évfolyam



Témavezető: Dr. Tajti János MD, habil
Dr. Tuka Bernadett, PhD
Belső konzulens: Dr. Fekete Éva PhD, DSc

TARTALOMJEGYZÉK

I. BEVEZETÉS	- 3 -
1. Migrén, korunk népbetegsége	- 3 -
2. Patofiziológia, anatómia	- 4 -
3. Transzmitterek	- 5 -
4. Glutamát	- 10 -
5. Kinurenin-rendszer	- 13 -
II. CÉLKITŰZÉS	- 16 -
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	- 17 -
1. Állatok.....	- 17 -
2. Etika	- 17 -
3. A TR elektromos ingerlése	- 17 -
4. A vérplazma és a szövetek PACAP-38-IR-ának meghatározása radioimmunoassay-el	- 19 -
5. Statisztikai elemzés.....	- 20 -
IV. EREDMÉNYEK	- 21 -
1. PACAP-38-IR változása az elektromos stimuláció hatására patkány vérplazmában	- 21 -
2. A TR elektromos ingerlésére bekövetkezett PACAP-38-IR változás patkány TNC-ben.....	- 21 -
3. PACAP-38-IR változása patkány TRG-ben a TRG elektromos ingerlését követően.....	- 22 -
V. MEGBESZÉLÉS	- 24 -
1. Eredmények megvitatása	- 24 -
2. PACAP és NMDA közötti molekuláris kölcsönhatás	- 24 -
2.1. PACAP génexpressziót a Ca^{2+} -ion és a cAMP koordinálja	- 25 -
2.2. A cAMP útvonal.....	- 27 -
3. Összegzés.....	- 28 -
VI. KÖVETKEZTETÉSEK.....	- 28 -
VII. ÖSSZEFOGLALÁS.....	- 29 -
VIII. IRODALOMJEGYZÉK.....	- 30 -
IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	- 40 -
X. TÉTELES SZAKMAI HOZZÁJÁRULÁS	- 41 -

I. BEVEZETÉS

1. Migrén, korunk népbetegsége

A migrén egy komplex és multifaktoriális, paroxysmusokban jelentkező önálló fejfájás betegség. Epidemiológiai tanulmányok alapján magas prevalenciát mutat, a fejlett országokban a felnőtt lakosság közel 12%-a érintett. A betegség nagymértékben hat az általános életminőségre, a munkavégzésre, a családi és társadalmi kapcsolatokra és az iskolai teljesítőképességre is. A Nemzetközi Fejfájás Társaság (International Headache Society, IHS) 2013-as kritériumrendszere szerint két fő altípusra oszthatjuk a betegséget: 1. az aura nélküli és 2. az aurával járó migrénre.

Az aura nélküli migrén során visszatérő fejfájás-rohamok 4-72 óráig is eltarthatnak. A fejfájás jellegzetesen unilaterális, lüktető jellegű, gyakran autonóm (hányás, hányinger) és szenzoros (osmo-, photo- és phonophobia) tünetek kíséretében lép fel.

Az aurás migrént elsődlegesen reverzibilis neurológiai góctünetek jellemzik, amelyek fokozatosan alakulnak ki és vagy a típusos migrénes fejfájás előtt, vagy azzal egyidejűleg jelennek meg. Azonban vannak olyan esetek, amikor az aura fejfájás nélkül (migraine sans migraine) alakul ki. Az aura tulajdonképpen nem más, mint vizuális (szcintillációs scotoma, fortifikációs spektrum), szenzoros (paresthesia) tünetek és beszédzavar (aphasia) együttes jelensége vagy ezek kombinációja.

A migrén terápiáját illetően léteznek gyógyszermentes és gyógyszeres kezelések. A gyógyszerelést nélkülöző stratégia felállításában indikált a provokáló tényezők kiiktatása, valamint léteznek olyan alternatívák, mint az akupunktúra, biofeedback, hipnózis, autogén tréning vagy a homeopátia.

A kivizsgált és diagnosztizált migrénes betegeknél fellépő fejfájások és a társtünetek orvoslására gyógyszeres kezeléseket alkalmaznak, amin belül megkülönböztetjük a roham megszüntetését megcélzó rohamkezelést, másrészt a preventív intervallumterápiát. Számos klinikailag hatásos migrénellenes készítmény van forgalomban, amelyek közül enyhébb esetben analgetikumok (fájdalomcsillapító szerek), nem-szteroid gyulladásgátlók (NSAID), antiemetikumok (hányáscsillapítók) segítenek megszabadulni a roham alatti tünetektől. A rohamok oldására elsődlegesen használt készítmények közül az ergot származékok és az aminofenazon tartalmú gyógyszerek mellett a szerotonin (5-hidroxitriptamin, 5-HT) 1B és 1D agonista triptánok és a calcitonin gén-rokon peptid (CGRP) receptor antagonistá ún.

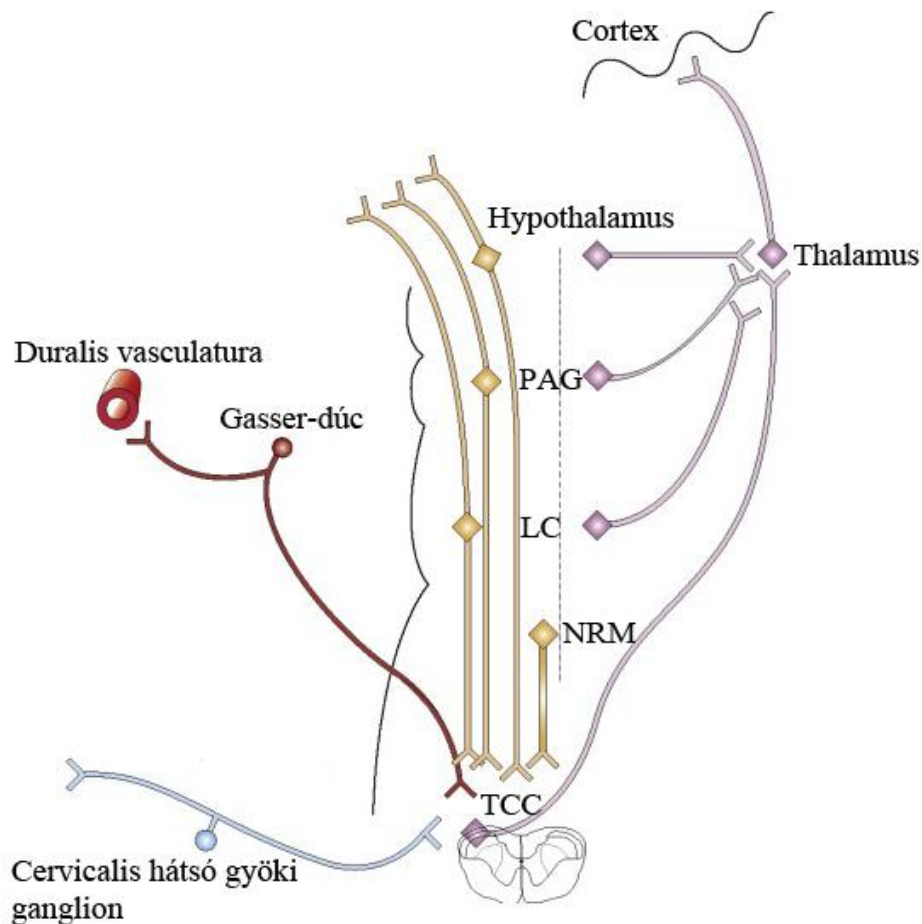
gepántok fejtik ki legjobban hatásukat. A migrénes roham profilaxisaként használt intervallumterápia során adható gyógyszerek közé tartoznak a bétareceptor-gátlók, kalciumcsatorna-blokkolók, 5-HT₂-antagonisták, triciklikus antidepresszánsok, antikonvulzívumok vagy a riboflavin (B₂-vitamin) és magnézium. Azonban a fentiekben említett szerek nem minden esetben hatásosak, a migrén-specifikus farmakonok pedig olykor nem kívánt, erős mellékhatásokat produkálnak.

2. Patofiziológia, anatómia

A migrén patofiziológiája a tudomány egy intenzíven kutatott területe. Óriási előrehaladás történt a betegség hátterében álló mechanizmusok megismerésében, pontos kórélettani folyamata azonban mindmáig nem tisztázott. A betegség kialakulásának magyarázatára különféle hipotézisek láttak napvilágot. Ezek közül jelenleg az egyik legelfogadottabb a Moskowitz és kutatócsoportja által lefektetett trigeminovascularis elmélet, ami azon alapszik, hogy a Gasser-dúc elektromos ingerlésének hatására vazodilatáció és ödéma következik be a dura mater (kemény agyhártya) területén [1]. Elméletüket erősíti, hogy a trigeminalis ideg 5-HT receptoraira ható triptánok és ergot alkaloidok megakadályozzák ezeket a vazomotoros válaszokat [2, 3].

A trigeminovascularis rendszernek (TR) egyedi és kiemelkedő szerepköre van a cerebrovascularis folyamatokban, ugyanis főként ez a rendszer látja el szenzoros afferentációval az agyi ereket. Alapját képezi a cavum Meckeliben fekvő trigeminalis ganglion (ggl. semilunare Gasseri; TRG), ahol a nervus trigeminus (háromosztatú agyideg, V.) szenzoros részének pseudounipoláris sejttestjei tömörülnek. Ezek a protopátiás (hő, fájdalom, nyomás, elemi tapintás) érzéseket szállító elsőrendű neuronok perifériás nyúlványaikkal elsősorban az ophthalmicus ágon keresztül innerválják a meningealis vasculaturát, míg centrális rostjaik a híd dorsomedialis oldalán belépnek az agytörzsbe, kialakítva ezzel a spinalis trigeminalis pályát. A rostok a nucleus tractus spinalis nervi trigemini pars interpolaris és pars caudalis (továbbiakban: trigeminal nucleus caudalis = TNC) magjaival, a gerincvelő C₁ és C₂ szegmentumának hátsószarvi neuronjaival és a hátsógyöki centrális nyúlványokkal szinaptizálnak. Az agytörzsi migrén generátorok, vagyis a nucleus raphe magnus és dorsalis (NRM és NRD), a periaqueductalis szürkeállomány (PAG) és a locus coeruleus (LC), továbbá a leszálló kérgi gátló rendszerek leszálló pályáikon keresztül szabályozzák a trigeminalis komplex másodlagos neuronjait. A fájdalom impulzusok diszkriminatív része ezt követően contralateralisan a thalamus nucleus ventralis

posteromedialisán a szomatoszenzoros cortex (SS1 és SS2) irányába, míg affektív-motivációs része contralateralisan a thalamus nucleus dorsomedialisán át az insularis és anterior cingularis kéreg felé szállítódik (1. ábra).



1. ábra: A trigeminovascularis rendszer (TR) felépítése és kapcsolatai

(Goadsby P. J., Neurologic Clinics, 2009. 27:2, 335–360)

LC: locus coeruleus; NRM: nucleus raphe magnus; PAG: periaqueductalis szürkeállomány; TCC: trigeminocervicalis complex

3. Transzmitterek

A TR aktivációjával a n. trigeminus antidróóm irányban különböző neuropeptideket és vazóaktív anyagokat szállít a supratentorialis dura mater érrendszerébe, valamint az agy felszínén végighúzódo pialis arteriolákba. A perifériás terminálisokból kibocsátott neuropeptidek vazodilatációt, hízósejt degranulációt, plazmaprotein extravazációt és az érfal lokális steril gyulladását eredményezik, amelyek együttesen hozzájárulnak a migrénes fájdalomhoz.

Az egyik legrégebbi ideje kutatott potenciális vazodilatátor a CGRP, amely széles körben expresszálódik mind a környéki, mind a központi idegrendszerben, valamint a cardiovascularis rendszerben. Hisztokémiai tanulmányok leírták, hogy a humán TRG sejtestjeinek közel 40%-a tartalmaz CGRP-t [4, 5], illetve receptorai is megtalálhatók itt [4, 6]. A CGRP-pozitív axonok javarészt nem mielinizált C-rostok vagy kis átmérőjű mielinizált A δ rostok, amelyek polimodális nociceptorokként behálózják az agyi és duralis ereket. Kísérletes eredmények bizonyítják, hogy macskán végzett TRG elektromos ingerlés, míg humán vonatkozásban a TRG rádiófrekvenciás termokoagulációja CGRP emelkedéshez vezet az extracerebrális keringésben [7]. Migrénes rohamok idején a CGRP-immunreaktivitás megnövekedett szintjét mérték migrénes betegek nyálában és juguláris vénájában [8-10]. Lassen és munkatársai pedig azt tapasztalták, hogy az intravénásan beadott α -CGRP fejfájás rohamot váltott ki migréneseknél [11]. A 37 aminosavból álló peptid a calcitonint, adrenomedullint, amylin és a nemrégiben klónozott calcitonin receptor-stimuláló peptidet is felölelő peptidcsalád tagja. Az emlősökben két izoformáját ismerjük: a calcitonin génről alternatív módosulással képződő α -CGRP-t és a génről közvetlen átíródó β -CGRP-t. A CGRP receptorok három alegységből állnak (CRLR – calcitonin receptor-szerű receptor, RAMP – receptor aktivitást módosító fehérje, RCP – receptor komponens fehérje), melyek együttes működése szükséges ahhoz, hogy a G-protein rendszeren keresztül fokozzák az adenilát-cikláz, a nitrogén-monoxid (NO) és ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP), illetve a K⁺ csatornák aktivitását és így vazodilatációt okozzanak. Az ortodrómon módon felszabaduló CGRP hozzájárul a nociceptív neurotransmisszióhoz, de ennek egzakt mechanizmusát nem sikerült még teljesen tisztázni.

A TRG sejtestjei CGRP-n kívül P-anyagot (substance P, SP) és neurokinin-A-t (NKA) is termelnek [12, 13]. A tachikininek fő képviselői közé tartozó SP és NKA evolúciósan konzervált peptid transzmitter. cDNS szekvenáláson alapuló technikával három különböző SP prekuzort (α -, β -, γ -preprotachikinin A) azonosítottak, amelyekből proteolitikus hasítással az α -prekuzorból csak SP keletkezik, a β -, és γ -preprotachikininből SP és NKA is képződik. Ezek gyakran mutatnak kolokalizációt a CGRP-vel a perivascularis rostokban [14-16]. Ultrastrukturális szinten kettős immunogold festéssel igazolták az SP és CGRP együttes előfordulását a nagy dense-core vezikulumokban tengeri malac és humán szenzoros ganglionok szómáiban, valamint a perivascularis idegrostok varikozitásaiban egyaránt [17-19]. Az emberi TRG-ben a CGRP-immunreaktív (-ir) neuronokhoz képest az SP-ir rostok száma jóval alacsonyabb (18%) [4, 14]. Nagyszámú SP-ir rostot azonosítottak a TNC-ben és a C₁-C₂ gerincvelői szakasz szintjén a Rexed-féle I.- és II. laminákban [20]. A

korábban említett elektromos stimuláció és termokoagulációs teszt az SP esetében is növekedést jelzett a plazmában [7], továbbá kísérleti adatok alátámasztják azt a koncepciót, miszerint a TNC-ben a CGRP mellett neurotransmitterként és/vagy neuromodulátorként az SP és az NKA is részt vesz a trigeminalis nociceptív útvonalban [21].

A migrén patogenezisében új molekula jelölt a hypophysis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid, vagy más néven PACAP (pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide). Miyata és munkatársai 1989-ben új releasing faktor keresése során izolálták juh hypothalamusból azon tulajdonsága alapján, hogy serkenti a ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP) képződést patkány agyalapi mirigy sejtjeiben [22].

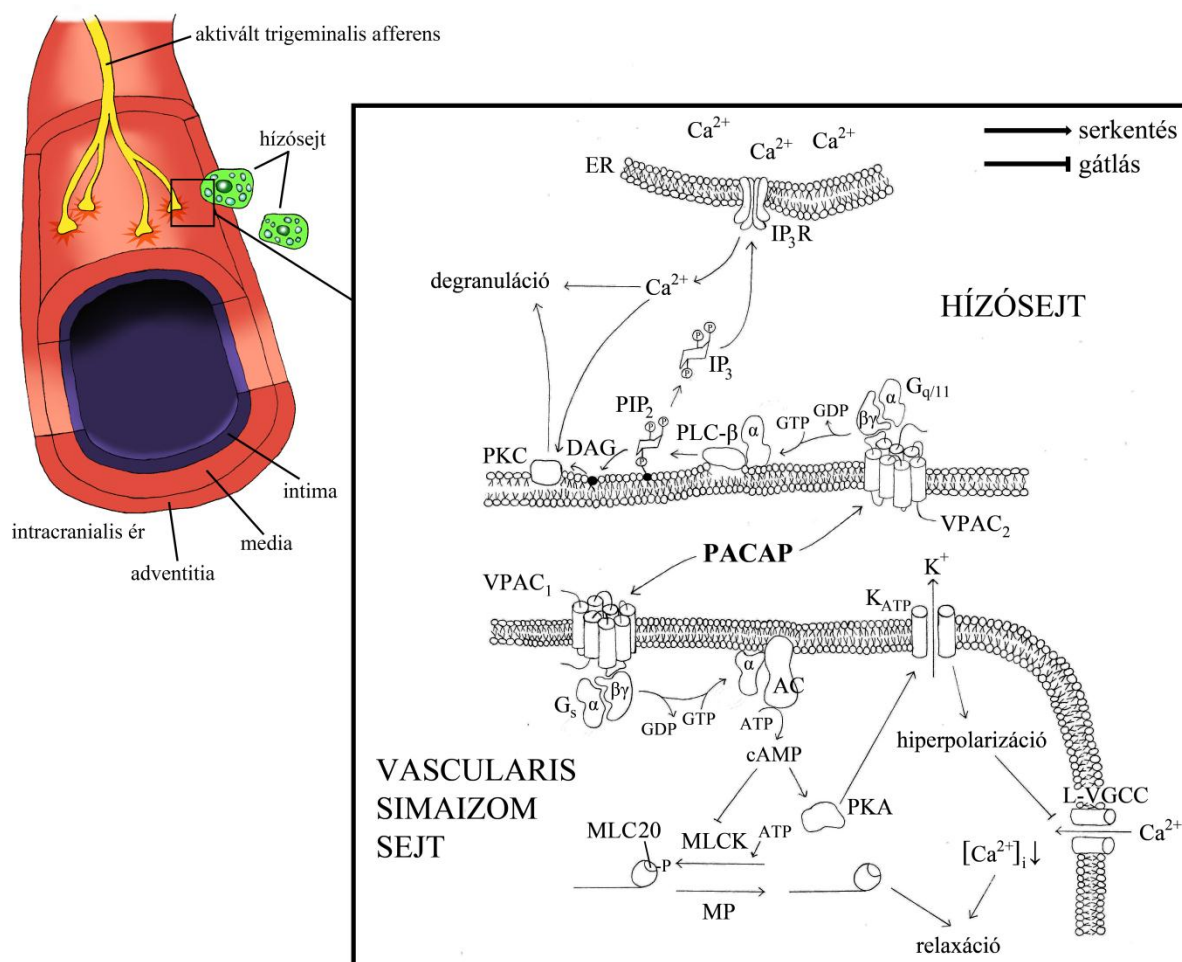
Az emberi genomban a PACAP gén (ADCYAP1) a 18-as kromoszóma rövid karjának 11-es lókuszában található. Ez a gén egy 176 aminosavból felépülő prekursor (prepro-PACAP) kódol, amelyről prohormon konvertáz hasítással PACAP és PACAP-related peptide (PRP) keletkezik. A PACAP szerkezetét tekintve a VIP-glukagon-GRF-szekretin család tagja, amelyen belül legközelebbi rokonságban a vazoaktív intesztinális polipeptiddel (VIP) 68%-os strukturális homológiát mutat. Két biológiailag aktív, amidált formáját ismerjük, egyik a 38 aminosavból (PACAP-38), a másik a 27 aminosavból (PACAP-27) álló peptid. Az előbbi az emlős szövetek PACAP-össztartalmának 90%-át teszi ki.

In situ hibridizációs és immuncitokémiai módszerek extenzív előfordulására mutattak rá az egész szervezetben. A centrális és perifériás idegrendszeren [23-27] kívül megjelenik az endokrin mirigyekben [28-31], a gonádokban [23, 32], a légzőrendszerben [33, 34] és a gyomor-bél traktus mentén [35-37]. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal igazolták, hogy a PACAP a CGRP-vel a szenzoros ganglionokban, ezen belül a TRG-ben és a trigeminocervicalis komplexben (TCC) is kolokalizál [4, 38, 39]. Széleskörű szöveti megoszlásából arra következtethetünk, hogy számtalan élettani folyamatot befolyásol. Különböző szervrendszerekben szabályozza a szekréciót [40, 41], szerepet játszik a sejtproliferációban [42, 43], biztosítja a sejt túlélést [44], gátolja a sejt migrációt [45] és serkenti a differenciációt [46]. Ezen kívül részt vesz a nocicepcióban és a gerincvelői szenzitizáció kialakulásában [47], illetve erős vazodilatátorként [48, 49] is funkcionál. Warren és kutatócsoportja megállapította, hogyha mikromoláris koncentrációban a PACAP mindkét formájával 1 percig kezeltek egy érzékszervet, a relaxáció hozzávetőleg 2 órán át tartott. Kísérletükkel létjogosultságot nyert az is, hogy a PACAP vazodilatatív hatása endotél-független módon megy végbe [50]. Hazai tanulmányok leírták, hogy a PACAP szintje megemelkedik mind a trigeminovascularis állatmodellekben [51], mind a migrénes betegek vérplazmájában [10]. Ezt a megfigyelést arra alapozták, hogy dán kutatók vizsgálatai szerint

a PACAP-38 intravénás adagolása egészséges önkéntesekben hosszantartó fejfájást, míg migrénesekben migrén-szerű rohamokat indukál [52]. A PACAP pleiotróp hatását három G-protein kapcsolt receptoron fejti ki: VPAC₁, VPAC₂ és PAC₁. A VPAC receptorok közel azonos disszociációs állandóval kötik a PACAP mindkét formáját és a VIP-et, ezzel szemben a PAC₁ receptor két-három nagyságrenddel nagyobb, specifikus affinitással köti a PACAP-ot, mint a VIP-et. Receptorhoz kötődése két fő szignál transzdukciós útvonalat indít el.

1.) Serkentő G-protein (Gs) aktivációjával a heterotrimer fehérje α -alegysége az adenilát-cikláshoz vándorol, ami az adenosin-trifoszfát (ATP) cAMP-vé alakulását katalizálja. A vasculáris simaizomsejtek VPAC receptorain keresztül az így keletkezett cAMP a protein kináz A-hoz (PKA) kapcsolódva feloldja annak inaktivitását és így a PKA képes foszforilálni az ATP-szenzitív káliumcsatornákat (K_{ATP}). Ennek hatására a káliumionok (K⁺) kiáramolnak az extracelluláris térbe és a sejt hiperpolarizálódik. Az L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatornákon (L-VGCC) át megszűnik a Ca²⁺-influx, ami az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció csökkenésén, illetve a cAMP miozin könnyűlánc kináz (MLCK) gátlásán keresztül simaizom relaxációt és ezáltal vazodilatációt idéz elő [53, 54] **(2. ábra)**.

2.) A PACAP-receptor kapcsolat másik metabotróp útvonala a Gq/11-protein közvetítésével a foszfolipáz C-béta (PLC- β) működését serkenti. A PLC- β a plazmamembránban lévő foszfoinositol-difoszfátot (PIP₂) diacil-glicerollá (DAG) és inozitol-trifoszfáttá (IP₃) alakítja. Az IP₃ az endoplazmatikus retikulum Ca²⁺-raktárait mobilizálja, a DAG pedig a protein kináz C-t (PKC) a sejtmembránhoz horgonyozza és a felszabadult Ca²⁺-ionok segítségével aktiválja. Az agyi erek mentén elhelyezkedő hízósejtekben a PKC és a megnövekedett intracelluláris Ca²⁺-koncentráció hatására hisztamin és egyéb gyulladásos mediátor szekretálódik az extracelluláris térbe. Ennek következményeként neurogén gyulladás alakul ki [55-57] **(2. ábra)**.



2. ábra: A TR aktivációja által kiváltott PACAP szignáltranszdukció vascularis simaizom sejtben és hízósejtben (Mészáros Á.)

AC: adenilát-cikláz; ATP: adenosin-trifoszfát; Ca^{2+} : kalcium-ion; cAMP: ciklikus adenosin-monofoszfát; DAG: diacil-glicerol; ER: endoplazmatikus retikulum; GDP: guanosin-difoszfát; Gq/11: heterotrimer G-fehérje alcsalád; Gs: serkentő G-fehérje; GTP: guanosin-trifoszfát; IP₃: inozitol-trifoszfát; IP₃R: inozitol-trifoszfát receptor; K_{ATP}: ATP-érzékeny káliumcsatorna; L-VGCC: L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatorna; MLC20: miozin 20 kDa könnyűlánc; MLCK: miozin könnyűlánc kináz; MP: miozin foszfatáz; P: foszfátcsoport; PIP₂: foszfoinoszitol-difoszfát; PKA: protein kináz A; PKC: protein kináz C; PLC-β: foszfolipáz C-β; VPAC_{1,2}: PACAP receptorok

A TR-ben felszabaduló neuropeptidek mellett kulcsfontosságú molekula az NO, amely egy vazodilatatív gázhalmazállapotú szignálmolekula. Az NO-t három szorosan kapcsolt nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) izoenzim szintetizálja. Ezek az enzimek a konstitutív, Ca^{2+} -függő izoformák közé tartozó neuronális (nNOS/NOS-1) és endoteliális NOS (eNOS/NOS-3), valamint a makrofágokban kimutatható Ca^{2+} -független indukálható

NOS (iNOS/NOS-2). Nevükkel ellentétben különféle sejtípusokban átfedő eloszlással expresszálódnak. Kísérletes vizsgálatok kimutatták, hogy a NOS-ok gátlása enyhíti a spontán jelentkező migrénes rohamok tüneteit [58]. Másrészt megfigyelték, hogy az NO donorként használatos nitroglicerín (NTG) szisztemás adagolása aura nélküli rohamot vált ki migréneseben [59], míg egy klinikai eset igazolta, hogy egészséges alanyok nagyobb arányban (73%) tapasztaltak fejfájást a cardialis célokra (pl.: koszorúér betegségben) alkalmazott NTG mellékhatásaként [60]. A perifériás afferenseken keresztül az NTG fokozza az nNOS és a Ca^{2+} /calmodulin-függő protein kináz II (CaMKII) expresszióját patkány TNC-ben, amely centrális szenzitizációs folyamatokhoz vezet [61, 62]. Emellett az NTG képes növelni a c-fos (protoonkogén) expresszióját is a TNC-ben lévő másodlagos neuronokban [63]. Mivel az idegsejtekben a c-fos depolarizációs hullámmal létrejövő Ca^{2+} -beáramlás hatására expresszálódik, így a c-fos fehérjével immunhisztokémiai célból kiválóan nyomon lehet követni az idegi aktivitást [64]. Immuncitokémiai festések alkalmazásával a TRG-ben NOS marker pozitív sejtesteket azonosítottak [4]. Az L-arginin-L-citrullin átalakulásból származó NO fő effektora a szolubilis guanilát-cikláz (sGC), hatására guanozin-trifoszfáttól (GTP) cGMP keletkezik. A cGMP másodlagos hírvivőként aktiválja a protein kináz G-t (PKG), amely specifikus fehérjét foszforilál a vérerek simaizom elemeiben. Ennek eredményeként a duralis artériák kitágulnak, amely aktiválja a fájdalomérzékeny képleteket a véredények körül.

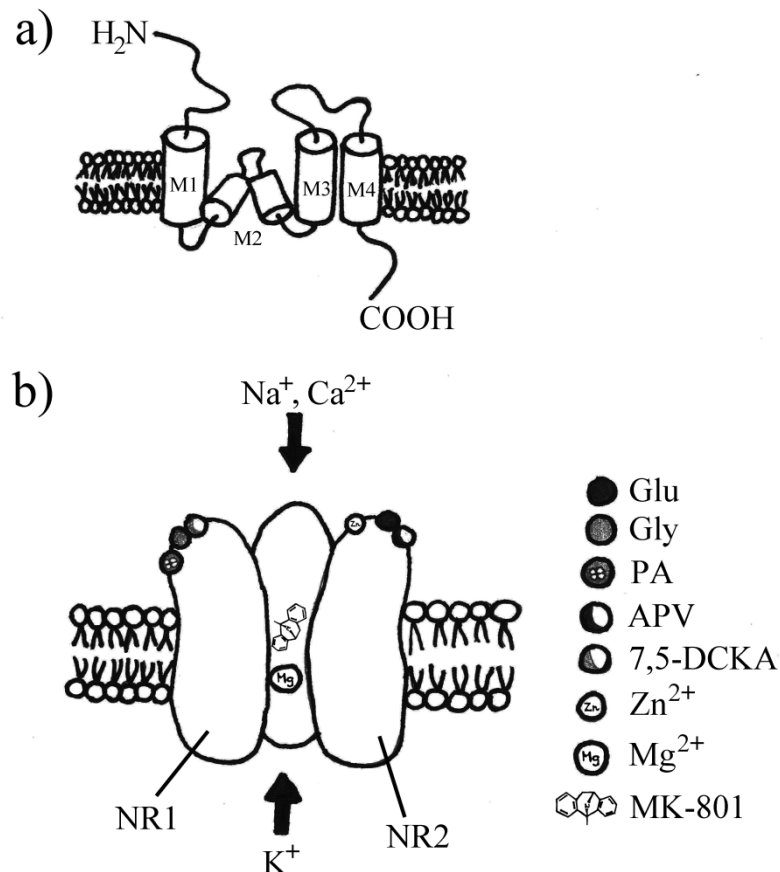
4. Glutamát

Az emlősök idegrendszerében az egyik legáltalánosabb serkentő aminosav a glutamát. Gyakorlatilag minden központi idegrendszeri neuron (kérgi principális sejtek, thalamicus relé sejtek és egyéb magcsoportok) rendelkezik glutamát receptorokkal. Szöveti lokalizációjukat továbbá leírták a migrén patogenezisében érintett idegi struktúrákban, azaz a TNC superficialis laminájában, a TRG-ben és a migrén generátorok területén [65, 66]. A auraért felelős ún. tovaterjedő kérgi gátlás (cortical spreading depression, CSD) kialakulását és terjedését [67], valamint az elsődleges és másodlagos trigeminalis érző neuronok szinaptikus transzmisszióját is részben glutamát receptorok látják el [68].

A glutamát különböző pre- vagy poszt-szinaptikusan elhelyezkedő, ligandaktivált ioncsatornához (ionotróp) vagy G-fehérjével kapcsolt (metabotróp) receptorhoz kapcsolódik. Az ionotróp glutamát receptorokat két nagy csoportra oszthatjuk. Vannak az NMDA (N-metil-D-aszpartát) és a nem-NMDA típusú receptorok. Farmakológiai és molekuláris

biológiai profiljukat figyelembe véve a nem-NMDA típusú receptorokat további három alcsoportra tagolhatjuk: az α -amino-3-hidroxi-5-metil-izoxazolo-4-propionsav (AMPA), a kainsav (KAIN) és a delta receptorokra. A metabotróp glutamát receptorok három csoportjába pedig nyolc, hét transzmembrán doménből álló fehérje sorolható.

Az ionotróp glutamát receptorok közül az NMDA-receptort tanulmányozták legbehatóbban, ezért jól ismert az élettani folyamatokban betöltött funkciója. Tetramer szerkezete lévén (NR1, NR2A-D, NR3A-B) minden egyes alegység felépítésére jellemző az extracelluláris N-terminális és az intracelluláris C-terminális szakasz, három transzmembrán szegmens (M1, M3, M4) és a pórusformáló M2 domén (**3. ábra a**). Nyugalmi membránpotenciál esetén a csatorna belsejébe ékelődő Mg^{2+} -ion akadályozza a szabad ionáramot. Hipopolarizáció hatására azonban kiszabadul és a nyitott csatornán egyértékű (Na^+ - és K^+ -ion) és kétértékű kationok, elsősorban Ca^{2+} -ion áramlik át nagy mennyiségben. Az NMDA-receptorok aktiválásához glutamát és glicin kötése egyaránt szükség van. A glutamát kötésért az NR2 alegység, a glicin kötésért az NR1 alegység felel. Expressziós vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy az NR2 alegységekből összetevődő homomer receptorok rendszerint inaktívak szemben az NR1 homomer alegységekből felépülővel, amik funkcionális csatornákat hoznak létre [69]. Heteromer formában az NR1 és NR2 alegységek működőképes ioncsatornává állnak össze [70]. Az alegységek kombinálódásakor az NR1/NR2A és az NR1/NR2B heteromerek esetében nagyobb áramamplitúdókat mértek [71]. Ezekből arra lehet következtetni, hogy az NMDA-receptor funkcionalitása nagyban függ a glicint kötő NR1 alegység meglététől. A ligand-kötőhelyeken kívül többféle modulációs hellyel rendelkezik, pl. Zn^{2+} -kötőhely, protonérzékeny hely, redox modulációs és poliamin-kötőhely. Továbbá a csatornában is elkülöníthetünk farmakológiai szenzitív régiókat. A glutamát-kötőhelyen antagonistát hatást fejt ki a D-2-amino-5-foszfono-valeriánsav (APV), az amino-foszfono-heptánsav (APH) és a 3-(2-karboxipiperazin-4-il)-propil-1-foszfonsav (CPP). A glicin-kötőhelyet kompetitíven például a 7,5-diklór-kinurénsav (7,5-DCKA) gátolja. Az MK-801, a ketamin és a fenilciklidin (PCP) a legismertebb csatornába kötődő antagonisták közé tartoznak (**3. ábra b**).



3. ábra: a) Az NMDA-receptor alegységek szerkezete, **b)** az NMDA-receptor felépítése a farmakológiailag aktív molekulák kötőhelyeivel (Világi Ildikó Neurokémia c. könyve, Dialóg Campus Kiadó, 2003 alapján módosítva)

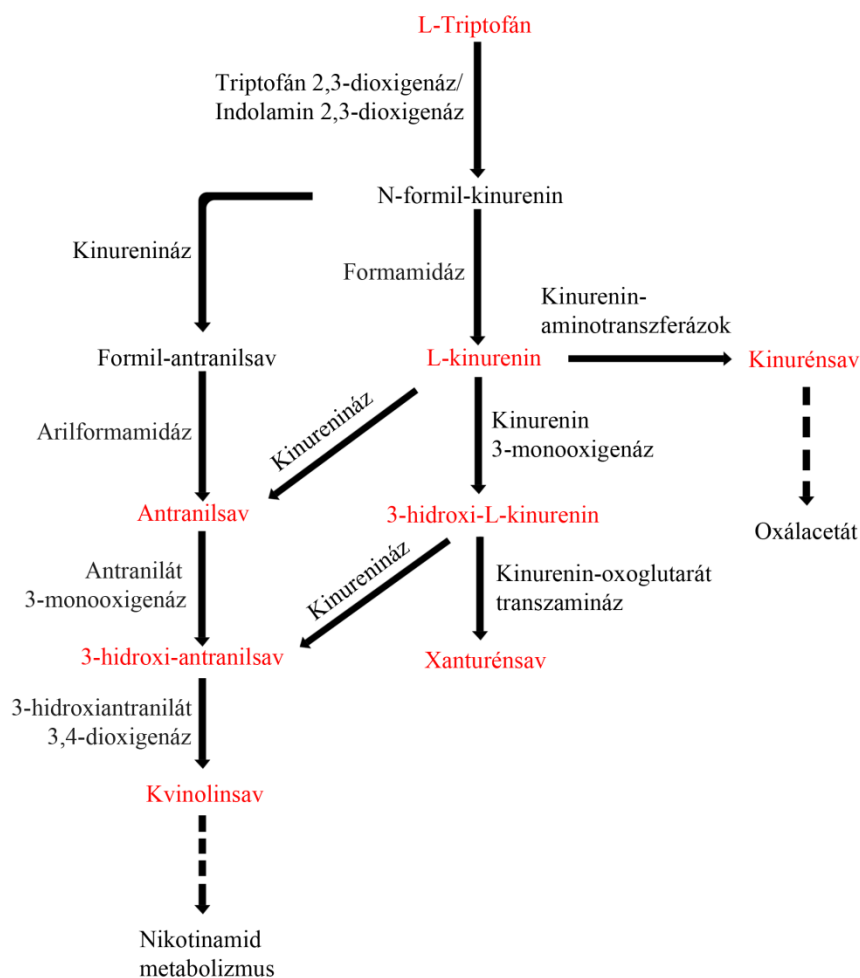
7,5-DCKA: 7,5-diklór-kinurénsav – glicin antagonist; APV: D-2-amino-5-foszfono-valeriánsav – glutamát antagonist; Ca²⁺: kalcium-ion; Glu: glutamát – agonista; Gly: glicin – ko-agonista; K⁺: kálium-ion; M1, M2, M3, M4: NMDA-receptor domének; Mg²⁺: magnézium-ion – csatornablokkoló; MK-801: [5R,10S]-[+]-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]cikloheptén-5,10-imin – csatornába kötődő antagonist; NR1: glicin-kötő alegység; NR2: glutamát-kötő alegység; PA: poliaminok – pozitív modulátorok; Zn²⁺: cink-ion – antagonist

A glutamát receptorokról szóló közlemények egy-egy kiragadott példája szemlélteti, hogy kutatások egész sora igyekszik lefedni a migrén patofiziológiájának pontos hátterét. Egyes tanulmányokban beszámoltak arról, hogy különféle glutamát receptor antagonisták hatékonyan csökkentik a TNC-ben a c-fos immunreaktív másodlagos neuronok számát [72, 73], a helyi vérátáramlást [68], a kiváltott potenciál válaszokat [74] és a duralis plazmaprotein extravazációt [75]. Ugyanakkor a talamikus NMDA-receptorok hozzájárulnak

a gyulladás-okozta hiperalgéria (fokozott fájdalomérzékenység) kialakulásához és fenntartásához [76]. Kimutatták, hogy az MK-801 blokkolja a trigeminovascularis nociceptív transzmissziót a TNC-ben [77]. Ezen kívül rávilágítottak arra, hogy a szenzoros idegrendszerben az NMDA-receptorok részt vesznek a migrén egyik fő eseményeként jelentkező centrális szenzitizációban [78, 79]. Újszülött malacok pialis ereinek dilatációját szintén NMDA-receptorok szabályozzák endotél-független módon [80]. Humán téren is végeztek vizsgálatokat a glutamát migrénben betöltött szerepéről. Megfigyelték azt, hogy glutamát és NMDA infúzióval CSD váltható ki [81], míg NMDA antagonistákkal ennek ellenkezőjét érték el. Ketaminnal például sikerült megszüntetni az aura tüneteket, de magát a fejfájást nem egyes migrénes betegekben [82]. Klinikai szempontból problémát jelent, hogy a ketamin használatát erős központi mellékhatásai korlátozzák. Egy másik humán esettanulmány során pedig jóval magasabb glutamát-szintet mértek migrénesek vérplazmájában és nyálmintájában, mint az egészséges kontroll alanyokéban [83]. Mindezek alapján leszögezhetjük, hogy a glutamát kiemelkedő szereppel bír a migrén patofiziológiájában.

5. Kinurenin-rendszer

Az emlősökben a triptofán (Trp) metabolizmusa rendkívül szerteágazó biokémiai folyamat. Amellett, hogy a fehérjeszintézis során beépül a növekvő polipeptidláncba, a Trp 1%-a 5-HT bioszintézisére fordítódik, míg 99%-a katabolizálódik. Az agyban a Trp lebontás fő ágát a kinurenin-útvonal képviseli, amely több biológiailag aktív köztiterméket foglal magában. Ide tartozik az L-kinurenin (L-KYN), a 3-hidroxi-L-kinurenin (3-OH-L-KYN), az antranilsav (ANA), a 3-hidroxi-antranilsav (3-HA), a xanturénsav (XA), a kvinolinsav (QUIN) és a kinurénsav (KYNA). Ezek a neuroaktív kinureninek mind az élettani, mind a kórélettani folyamatok szempontjából jelentős molekulák (**4. ábra**).



4. ábra: A triptofán-kinurenin útvonal

Pirossal jelölt vegyületek: a lebontási útvonal biológiailag releváns képviselői

A 3-OH-L-KYN és a 3-HA elősegíti a neuronokat károsító oxidatív szabad gyökök kialakulását, illetve az elsődleges vagy másodlagos excitotoxicitáshoz szintúgy hozzájárulnak. Nyugalomban lévő idegsejtben a 3-OH-L-KYN alacsony, nanomoláris koncentrációban van jelen, viszont kórélettani esetekben elérheti a mikromoláris tartományt. Hasonlóan a 3-HA-tartalom is megemelkedik számos neurológiai betegség során. Megfigyelték, hogy mindkét intermedier idegsejtenyészetek pusztulását okozza, tehát neurotoxikus vegyületek [84].

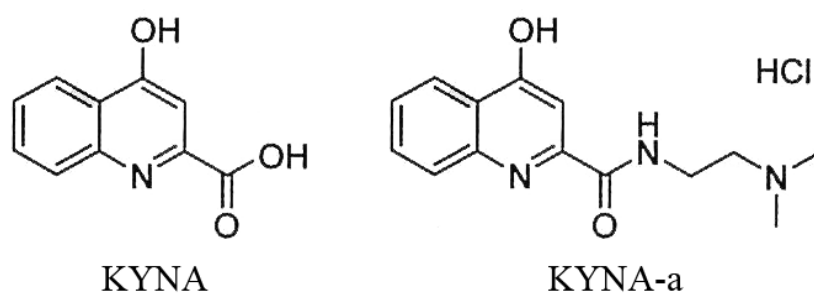
A kinurenin-útvonal egyik érdekessége, hogy a 3-OH-L-KYN transzaminálásával keletkező XA a 3-OH-L-KYN detoxifikációjában vesz részt. Fiziológiai körülmények között 1 μM körüli értéket mutat patkány agyban, míg szintje megemelkedik a vizeletben a depresszió egyik állatmodelljében. Magas dózisú adagolása megnyugtatja a patkányokat és analgéziát (fájdalomérzés hiánya) vált ki náluk. A XA vezikulákba csomagolva, axonális transzporttal a

szinapszisokba kerül, ahonnan Ca^{2+} -függő módon szabadul fel. Ez a sajátosság a XA szinaptikus jelátvitelben való szerepére és specifikus XA receptorok jelenlétére utal.

A kinurenin-rendszer végterméke a QUIN-ból kialakuló nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) és nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADP), amelyek meghatározott biokémiai folyamatok redox lépéseit szabályozzák. A QUIN az agyszövetekben nanomoláris (50-100 nM) vagy mikromoláris (0,05-1 μM) koncentrációban fordul elő. Gyengén, ellenben specifikusan kötődik az NMDA-receptorok NR2A és NR2B alegységéhez. Az elmúlt évek során folyamatosan bővült az ismeretanyag arra nézve, hogy a QUIN excitotoxikus hatását az NMDA-receptor agonizmus mellett a lipid peroxidáción és a reaktív oxigéngyökök képzésén keresztül fejt ki [85-87]. Patológias körülmények között (AIDS encephalopathia, epilepszia, Parkinson-kór, Huntington-kór, előagyi ischaemia) magas szintjét mérték a cerebrospinalis folyadékokban [88, 89]. A QUIN koncentrációjának változása tehát bizonyos neurodegeneratív betegségekben döntő szerepet játszik.

Az útvonal másik jellegzetessége, hogy a QUIN-val ellentétben a KYNA neuroprotektív ágensként funkcionál. Többek között meggátolja az excitotoxikus, ischaemia-indukált idegi károsodások következtében létrejött sejtpusztulást [90, 91]. Intracisternalis alkalmazása elnyomja a kapszaicin- és formalin-indukált nocicepciót állatokban [92, 93], illetve iontoforetikus úton a gerincvelőbe juttatott KYNA csökkenti a gerincvelői neuronok noxikus (káros) ingerekre adott nociceptív válaszát [94]. Szintézisét a citoplazmatikus vagy mitokondriális kinurenin-aminotranszferáz (KAT) enzimek katalizálják L-KYN-ből glia- és idegsejtekben. Elektromos ingerlés hatására kialakuló KAT csökkenés azzal magyarázható, hogy a KYNA termelődésével az enzim-pool kimerül. Tehát a KAT enzim mennyisége kiválóan jelzi, hogy a keletkezett KYNA effektíve képes kifejteni védő hatását az NMDA-receptorokon [95]. A KYNA agyszöveti koncentrációja 0,2-1,5 μM között mozog. Ennél magasabb koncentrációban ionotróp serkentő aminosav receptorok endogén antagonistája. Az NMDA-receptorokon 7,9 μM koncentrációban a sztrichnin-inszenzitív glicin-kötőhely telítésével megakadályozza a glicin kötődését a receptorhoz. A glicin az NMDA-receptor ko-agonistájaként nemcsak biztosítja a receptor aktiválhatóságát, hanem lassítja annak inaktivációját is. Tehát jelenléte nélkül a glutamáterg szinaptikus aktiváció teljesen megszűnik. Az NMDA-receptor antagonizmus mellett a KYNA kis mértékben blokkolja az AMPA és a KAIN receptorok működését [96]. Újabban kimutatták, hogy nemkompetitív módon befolyásolja az $\alpha 7$ -nikotinos acetilkolin receptor ($\alpha 7$ -nAChR) aktivitását a preszinaptikus idegvégződéseken, amely a glutamát-excitáció gátlásában nyilvánul meg [97]. Ezek alapján a KYNA sokrétű funkciót tölt be a jeltovábbításban. Azonban problémát jelent

az, hogy a vér-agy gát szinte impermeábilis a KYNA-ra. Ennek megoldására számos ötlet született, például egy szerves sav transzporterrel, a probeneciddel (PROB) kombinált L-KYN kezelés dózisfüggő módon növeli a KYNA koncentrációját az agyban [98]. Másik lehetőség olyan szintetikus analógok használata, amelyek könnyedén átjutnak a vér-agy gáton és hasonló hatékonysággal bírnak, mint a KYNA. Ilyen újonnan kifejlesztett analóg a 2-(2-*N,N*-dimetilaminoetilamin-1-karbonil)-1*H*-kvinolin-4-on hidroklorid (KYNA-a) (5. ábra), amelyről *in vitro* elektrofiziológiai tesztelés során kiderült, hogy a KYNA-hoz hasonlóan csökkenti a serkentő posztzinaptikus potenciálok (EPSP) amplitúdóját a hippocampus CA1 régiójában mikromoláris mennyiségben [99]. Kísérleti eredmények kimutatták, hogy a kombinált L-KYN-PROB és a KYNA-a előkezelés képes csökkenteni a c-fos és az nNOS szintet is patkány aktivált TR-ben [100-102], valamint léteznek arra vonatkozóan adatok, hogy az új analóg más migrén-kapcsolt faktor, a CaMKII α és a CGRP expresszióját negatívan szabályozza [103].



5. ábra: kinurénsav (KYNA) és származéka (KYNA-a)

II. CÉLKITŰZÉS

Tanulmányunkban célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a KYNA-a – amellet, hogy a migrénben bizonyítottan szerepet játszó géntermékek szintjét csökkenti – , milyen hatással van a PACAP-38-koncentráció változására. Ennek eléréséhez munkánk során megvizsgáltuk patkányban az elektromosan aktivált TR állatkísérletes modelljében a PACAP-38-immunreaktivitás (IR) - változást a vénás vérplazmában (vena cava cranialis), a TNC-ben és mindkét oldali TRG-ben a KYNA-a-val történő előkezelést követően.

Kísérleteinkben arra a kérdésre kerestünk választ, hogy van-e kölcsönhatás, összefüggés a PACAP és az NMDA közötti jelátviteli útvonalakban. Ezeknek az interakcióknak a pontos feltérképezése és megismerése nélkülözhetetlen specifikus gyógyszerek kifejlesztéséhez, melyek a jövőben egy új és hatékony terápiás lehetőséget jelenthetnek a fejfájás betegségek kezelésében.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Állatok

Kísérleteinkhez 250-370 g tömegű, fiatal felnőtt Sprague-Dawley (SPRD) patkányt használtunk fel: a KYNA-a-val előkezelt TRG elektromos stimulációs (ES) modellben n=7, a fiziológiás sóoldattal (0,9%-os NaCl oldat) előkezelt TRG-ES modellben n=7 állatot vontunk be a vizsgálatokba, valamint n=10 intakt állat kontrollként szolgált (**1. táblázat**). Az állatokat laboratóriumi körülmények között (24-25°C, kb. 80 % páratartalom) neveltük és tartottuk a Szegedi Tudományegyetem Orvostudományi Kar Neurológiai Klinika Laboratóriumi Állatházában. Az állatoknak korlátlan élelmet (standard rágcsálótáp) és csapvizet biztosítottunk 12 órás napszaki ingadozás mellett.

	Kontroll/intakt	Fiz.só ingerelt	KYNA-a ingerelt
Előkezelés	nincs	0,9%-os NaCl oldat (2 ml)	KYNA-a oldat (2 ml)
Elemszám (n)	10	7	7

1. táblázat: TRG-ES során alkalmazott állatcsoportok

2. Etika

Minden állatkísérletet a Magyar Parlament 1998/XXVIII. az állatok védelméről és kíméletéről szóló törvény, valamint a 243/1988. az állatkísérletek végzéséről szóló kormányrendelet irányelvei alapján végeztünk. Munkánk során a Nemzetközi Fájdalom Társaság és az Európai Közösségek Tanácsának (86/609/ECC) ajánlásait is figyelembe vettük. Kutatásainkat az Állatkísérletek Etikai Kódexével összhangban a Szegedi Orvostudományi Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával végeztük.

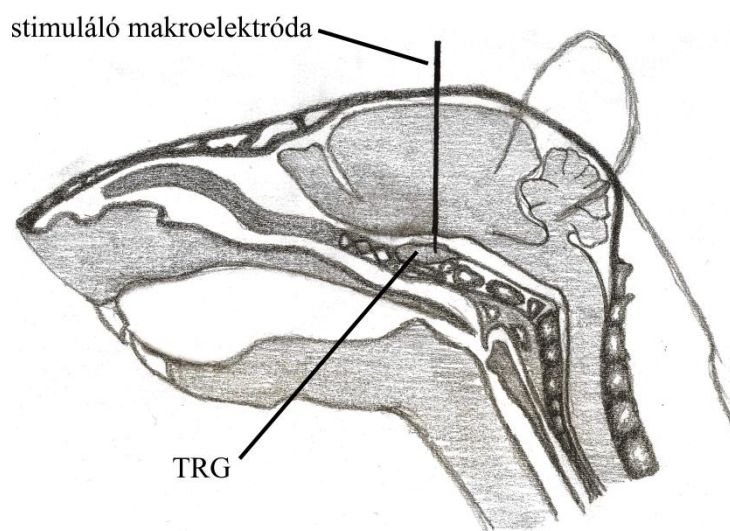
3. A TR elektromos ingerlése

Az aktivált TR egy általánosan elfogadott és széles körben használt modellje a TRG elektromos ingerlése. A modellben a perifériás trigeminalis afferensek közvetlen stimulálása mellett, az ES masztocita degranulációt indukál a dura materben és a nyelvben, ami neurogén gyulladásához vezet. Ennek következményeként különböző vazoaktív neuropeptidek és

gyulladásos mediátorok szabadulnak fel az agy felszínén. Ezek a jelenségek ezáltal aktiválhatják a centrális afferenseket, sőt strukturális elváltozásokat is okozhatnak az idegvégződésekből, így összességében nő a TRG excitabilitása.

Ebben a kísérletsorozatban 3 csoportot alakítottunk ki: 10 patkányt nem ingereltünk, a fizioiógias sóoldattal és a KYNA-a-val előkezelt csoportban pedig 7-7 állatot vizsgáltunk az ES-t követően.

A beavatkozás előtt az állatokat elaltattuk i.p adagolt 4%-os klorál-hidrát (KLH) oldattal (40 mg/ttkg) és a kellően mély anesztéziát pótlólagos dózisokkal tartottuk fenn a kísérlet teljes ideje alatt. Az állatok fejét stereotaxias készülékben rögzítettük és a skalp eltávolítása után a bregmától kimértük a jobb oldali TRG anatómiai pozícióját a Watson-Paxinos patkány agyatlasz koordinátái (antero-posterior: 3,2 mm; medio-lateralis: 2,9 mm) alapján. Ezen a ponton fogászati fúró segítségével megnyitottuk a koponyát és a furaton keresztül koncentrikus bipoláris elektródot (CBBRE75, FHC, Inc. Bowdoin, USA) vezettünk az agyba, a TRG eléréséig (**6. ábra**).

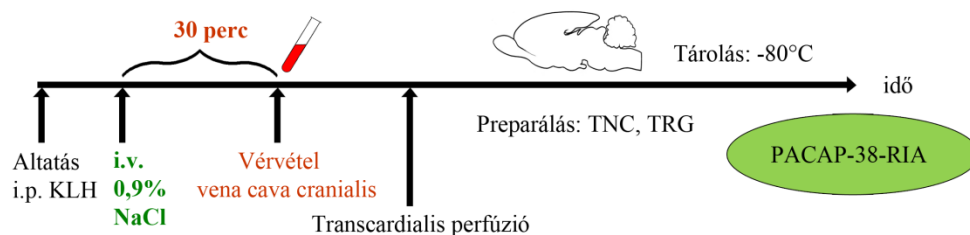


6. ábra: Patkány TRG-ES oldalnézet (Koga et. al. nyomán módosítva)

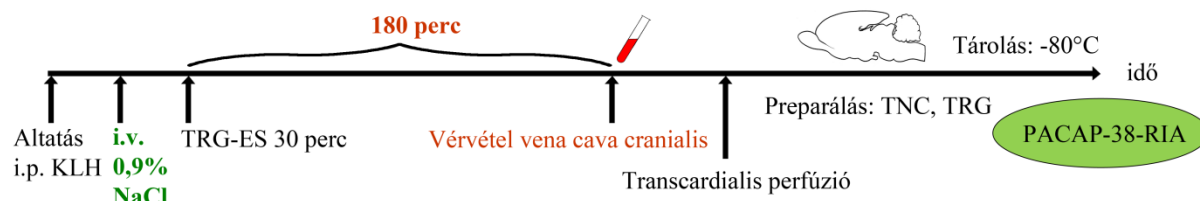
A gangliont egy Electrostimulator ST-3 típusú készülékkel (Medicor, Budapest, Magyarország) a következő paraméterek szerint ingereltük: 30 perc időtartam, 5 ms impulzus időtartam, 10 Hz áram frekvencia, 1 mA áramerősség, stimulációs módozat: CONTINUOUS. Az ingerlés megvalósulását az állkapocs rángásával (a stimuláció beállított paramétereinek megfelelően), majd a preparálás után a stimulált TRG-n az elektróda látható helyének megállapításával validáltuk. Az ES-t követő 180 perc elteltével az állatok jobb oldali vena cava cranialisából 5 ml vérmintát vettünk jéghideg, etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA; 12 mg/cső) és proteáz inhibitor aprotinint (Trasylol 1200IU/cső) tartalmazó csőbe. A mintákat

4°C-ra helyeztük a vérplazma elválasztásáig (centrifugálással – 3000 rpm, 10 perc, 4°C). A vérvétel után transcardialis perfúziót végeztünk, majd kipreparáltuk a különböző migrén-érintett idegi struktúrákat (TNC, TRG). Végül a mintákat -80°C-on tároltuk a PACAP-38-IR radioimmunoassay-el (RIA) történő meghatározásáig (7. ábra).

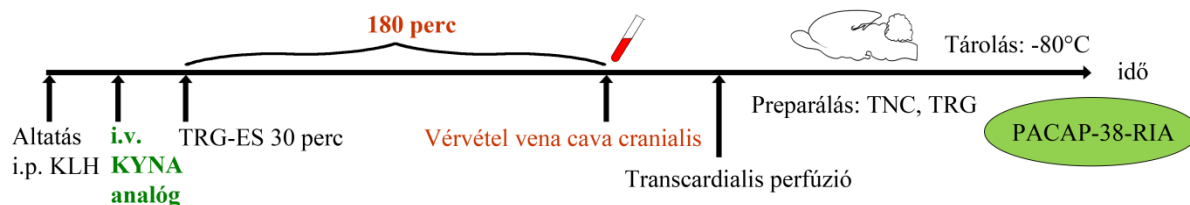
1.) TRG elektromos ingerlés-modell (TRG-ES) - kontroll/intakt csoport



2.) TRG elektromos ingerlés-modell (TRG-ES) - fizioológias sóoldat előkezelés



3.) TRG elektromos ingerlés-modell (TRG-ES) - KYNA analóg előkezelés



7. ábra: Sematikus folyamatábra a trigeminalis ganglion (TRG) elektromos stimuláció-modell vizsgálatokról kezelési csoportok szerint

4. A vérplazma és a szövetek PACAP-38-IR-ának meghatározása radioimmunoassay-el

A vérplazma PACAP-38 szintjét egy specifikus és szenzitív RIA technikával határoztuk meg. A nyúlban termeltetett szintetikus peptidet ("88111-3" PACAP-38 antiszérum) glutáraldehiddel vagy karbodiimiddel konjugáltuk marha szérum albuminhoz (BSA) vagy tireoglobulinhoz. Az antitest nagy specificitását és C-terminális érzékenységét keresztreakciós tanulmányokkal igazolták: nem találtak keresztreakciót sem PACAP-27-tel,

sem más neuropeptiddel. A vérminták centrifugálása után (2000 rpm, 10 perc, 4°C) a peptidet kivontuk a plazmából 3 térfogatnyi abszolút alkohol hozzáadásával. A kicsapás és a második centrifugálás (2000 rpm, 10 perc, 4°C) után, a RIA meghatározás előtt a mintákat nitrogén-áramlás alatt megszárítottuk és újraszuszpendáltuk 300 µl mérő pufferben, hogy 10x nagyobb koncentrációt érjünk el a RIA eljáráshoz.

A kipreparált agyszegmensek (TRG, TNC) tömegét megmértük és 1 ml jéghideg bidesztillált vízben kézi műszerrel homogenizáltuk. A minták tömegét megmértük és 1 ml jéghideg bidesztillált vízben kézi műszerrel homogenizáltuk. A homogenizátumot lecentrifugáltuk (10.000 rpm, 10 perc), majd újabb 10 percnyi centrifugálás után (12.000 rpm) a felülúszó 70 µl mintáját használtuk RIA mérésre.

Mono-¹²⁵I-nyomjelzővel jelölt, valamint szintetikus peptideket használtunk RIA standardként 0-1000 fmol/ml tartományban. A mérést 1 ml 0.05 mol/l (pH 7.4) foszfát puffer, 0.1 mol/l nátrium-klorid, 0.25 % (w/v) BSA és 0.05 % (w/v) nátrium-azidot tartalmazó oldat segítségével végeztük. Az antiszérumot (100 µl, 1:10000 hígításban), a RIA nyomjelzőt (100 µl 5000 cpm/cső), illetve a standard és az ismeretlen mintákat (100 µl) polipropilén csövekbe mértük a pufferrel. 4°C-on 48-72 óra inkubáció után az antitest-kötött peptidet elválasztottuk 100 µl szeparáló oldat hozzáadásával (10 g szén, 1 g dextrán és 0.5 g közönséges zsírmentes tejpor, 100 ml desztillált vízben). Centrifugálást követően (3000 rpm 15 min 4 °C) a csöveket óvatosan leöntöttük és a kicsapódások radioaktivitását gamma számlálóval mértük (NZ310 típusú spektrométer). Az ismeretlen minták PACAP-38 koncentrációját kalibrációs görbéről olvastuk le.

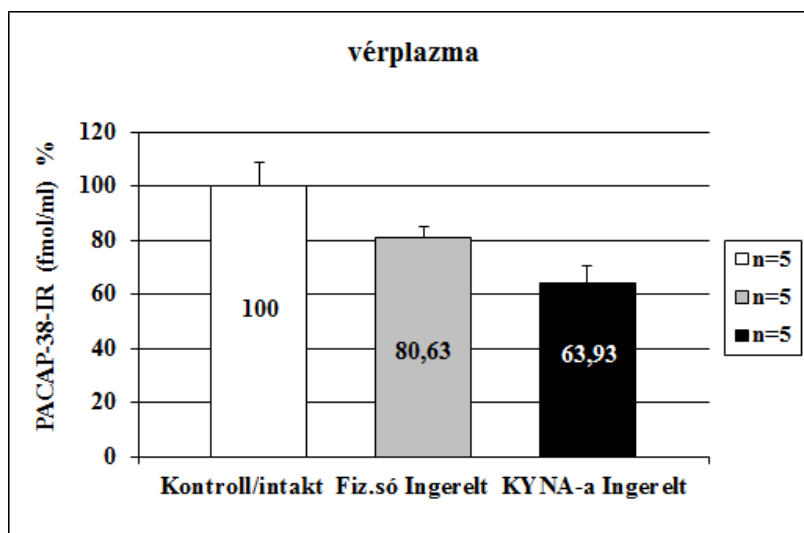
5. Statisztikai elemzés

Az ábrákon a mintákhoz tartozó adatok átlagának százalékos értékét (fmol/ml és fmol/mg %) és az átlagtól való standard eltérést (SEM) tüntettük fel. Eredményeink statisztikai kiértékelésére SPSS 17.0 verziójú szoftvert használtunk. Kolmogorov-Smirnov-féle (K-S) normalitás tesztet követően, $p < 0.05$ szignifikancia szint esetén a Mann-Whitney U non-parametrikus teszt eredményeit vettük figyelembe, míg $p > 0.05$ értéknél két-mintás páratlan t-próbát végeztünk. Az összehasonlítások számával korrigálva, minden esetben a $p < 0.016$ értéket tekintettük szignifikánsnak. A szignifikancia szintjeit ábráinkon a következők szerint jelöltük: $p < 0.05 = *$; $p < 0.01 = **$; $p < 0.001 = ***$

IV. EREDMÉNYEK

1. PACAP-38-IR változása az elektromos stimuláció hatására patkány vérplazmában

Az intakt és fiziológiás sóoldattal előkezelt, ingerelt patkányok vérplazmájához képest csökkent PACAP-38-IR-t detektáltunk a KYNA-a-val előkezelt, ingerelt csoportban ($100 \pm 8,88$ fmol/ml % és $80,63 \pm 4,27$ fmol/ml % vs. $63,93 \pm 6,38$ fmol/ml %), a megbízható eredmények érdekében további vizsgálatok szükségesek, mert a korábbiakban tapasztalt PACAP-38 emelkedés a fiziológiás sóoldattal előkezelt, ingerelt csoportban, jelen vizsgálatainkban nem volt kimutatható (8. ábra).

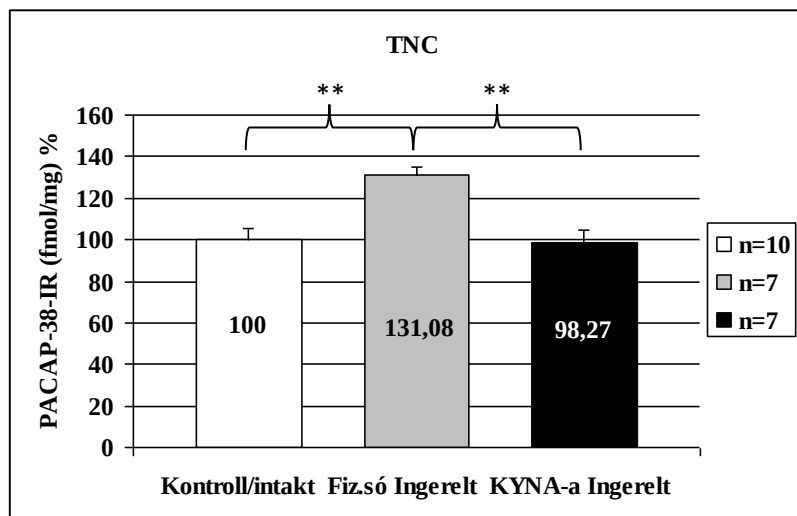


8. ábra: Patkány plazma PACAP-38-IR összehasonlítás a TRG-ES modellben a 3 csoport összehasonlításában (n=5; átlag + SEM; Kolmogorov-Smirnov-teszt és 2 mintás páratlan t-próba)

2. A TR elektromos ingerlésére bekövetkezett PACAP-38-IR változás patkány TNC-ben

A kontroll/intakt csoport TNC homogenizátumában $100 \pm 5,57$ fmol/mg %-os PACAP-38-IR-t mértünk, míg a fiziológiás sóoldattal előkezelt, ingerelt csoport TNC mintáiban szignifikánsan ($p < 0.005$) magasabb PACAP-38 koncentrációt detektáltunk a TR aktivációját követő 180. percben. Korábbi kísérletek alkalmával megfigyeltük, hogy a legnagyobb mennyiségű PACAP-38 az ES-t követő 180. percben szabadul fel a szövetekben (az adatokat nem tüntettük fel). A KYNA-a-val előkezelt, ingerelt állatcsoport esetében a PACAP-38-IR a

fiziológiás sóoldattal előkezelt, ingerelt csoporthoz képest szignifikánsan ($p < 0.004$) csökkent a 3 órás várakozási idő elteltével (**9. ábra**).

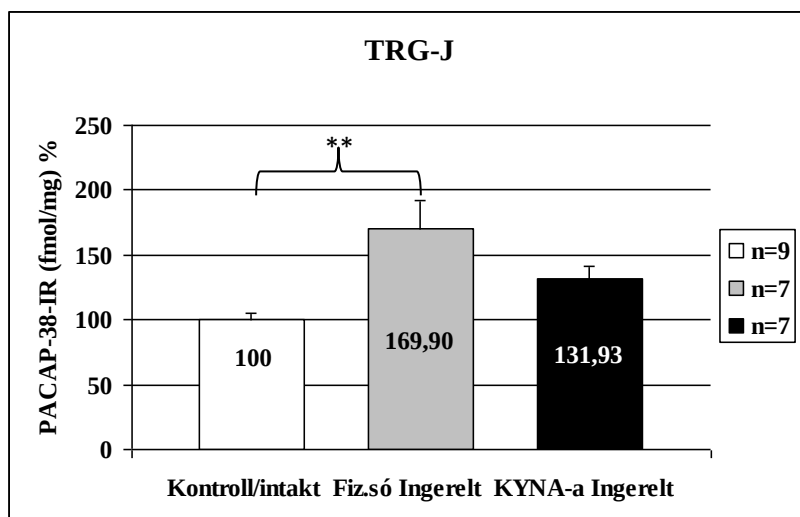


9. ábra: PACAP-38-IR patkány TNC-ben a TRG-ES modellben a 3 csoport összehasonlításában ($n_{\text{kontroll}}=10$; $n_{\text{kezelt csoportok}}=7$; átlag + SEM; Kolmogorov-Smirnov- és Mann-Whitney U-teszt)

3. PACAP-38-IR változása patkány TRG-ben a TRG elektromos ingerlését követően

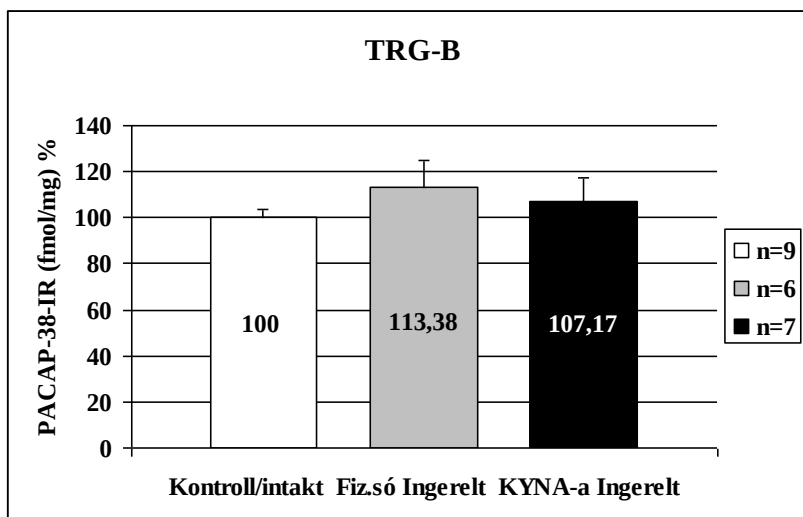
Az előzőekhez hasonlóan, a kontroll/intakt csoport jobb oldali TRG-ben mért $100 \pm 5,01$ fmol/mg %-os és a bal oldali TRG-ben kvantifikált $100 \pm 3,81$ fmol/mg %-os PACAP-38-IR-hez viszonyítottuk a másik két csoport értékeit.

A kontrollokhoz képest a jobb oldali TRG PACAP-38 szintjében az ES szignifikáns ($p < 0.008$) növekedést váltott ki a fiziológiás sóoldattal előkezelt, ingerelt csoportban. A KYNA-a-val előkezelt, ingerelt állatok TRG mintáiban csökkent PACAP-38-IR-t tapasztaltunk a fiziológiás sóoldattal előkezelt, ingerelt csoporthoz képest, de ez a változás nem volt jelentős (**10. ábra**).



10. ábra: Patkány jobb oldali TRG PACAP-38-IR változása a TRG-ES modellben a 3 csoport összehasonlításában ($n_{\text{kontroll}}=9$; $n_{\text{kezelt csoportok}}=7$; átlag + SEM; Kolmogorov-Smirnov-, Mann-Whitney U-teszt és 2 mintás páratlan t-próba)

A bal oldali TRG-ben nem találtunk szignifikáns változást sem a kontroll/intakt és a fizioológias sóoldattal előkezelt, ingerelt csoport között, sem a fizioológias sóoldattal előkezelt, ingerelt és a KYNA-a-val előkezelt, ingerelt csoport között (**11. ábra**).



11. ábra: PACAP-38-IR patkány bal oldali TRG-ben a TRG-ES modellben a 3 csoport összehasonlításában ($n_{\text{kontroll}}=9$; $n_{\text{fiz.só. ingerelt}}=6$; $n_{\text{KYNA-a ingerelt}}=7$; átlag + SEM; Kolmogorov-Smirnov-teszt és 2 mintás páratlan t-próba)

V. MEGBESZÉLÉS

1. Eredmények megvitatása

Experimentális és klinikai vizsgálatok arra utalnak, hogy a PACAP-38 kulcsfontosságú lehet a nociceptív szignalizációs folyamatokban a TR szintjén. A neuropeptid immunhisztokémiai előfordulását és humán migrénben való szerepét bizonyították már, illetve arra vonatkozóan is találunk irodalmi adatokat, hogy az általunk használt KYNA-a csökkenti egyes migrén-asszociált géntermékek expresszióját. Kísérleteinkkel elsődlegesen igazoltuk azt a feltevést, hogy az i.v. beadott KYNA-a a TR-ben felszabaduló PACAP-38 szintjét mérsékelni tudja. A TR aktivációjához a TRG-ES modellt választottuk, mert a beavatkozás az egyik leggyakrabban alkalmazott állatkísérletes modellje a trigeminovascularis aktivációnak. Az ingerlés a PACAP-38-IR emelkedését okozta a TNC-ben, amely a TRG centrális terminálisaiból származó PACAP-38 felszabadulásnak tulajdonítható. Emellett mindkét oldali Gasser-dúcban is detektáltunk PACAP-38-IR változást. A jobb oldali TRG intenzív PACAP-38 felszabadulását az akut ES eredményezte, míg az ellenoldali, nem ingerelt ganglionban minimális változás történt. Korábbi kísérleteinkben jól látszott, hogy a TRG elektromos stimulációja következtében a perifériás terminálisokból nagy mennyiségű PACAP-38 szabadul fel és jut a keringésbe. Jelen vizsgálatunkban a peptid plazmakoncentráció-emelkedésének hiányát feltehetően metodikai probléma miatt nem tudtuk kimutatni, melyet a kevés elemszám és a peptid gyors felezési idejével is magyarázhatunk. Mindazonáltal elmondható, hogy a KYNA-a előkezelés mindegyik esetben kivédte a PACAP-38 koncentráció-növekedést, ezáltal hatékony lehet a neuropeptidek által közvetített nociceptív mechanizmusok mérséklésében.

2. PACAP és NMDA közötti molekuláris kölcsönhatás

Annak ellenére, hogy számos PACAP-NMDA szignalizációs kapcsoltságot leíró közleménnyel találkozhatunk [104-107], az NMDA-receptorokon keresztül PACAP génexpresszióról csekély számú forrás áll rendelkezésre. Kísérleteink hátterében álló molekuláris mechanizmusok alátámasztására mindössze egy japán kutatócsoport értekezése szolgáltat alapot, akik patkány kérgi sejt kultúrán végzett PACAP mRNS aktivitás-függő stabilizációját vizsgálták különböző molekuláris biológiai eljárásokkal (RNS izolálás, reverz transzkripció kapcsolt polimeráz láncreakció (RT-PCR), promóter analízis, overexpresszió,

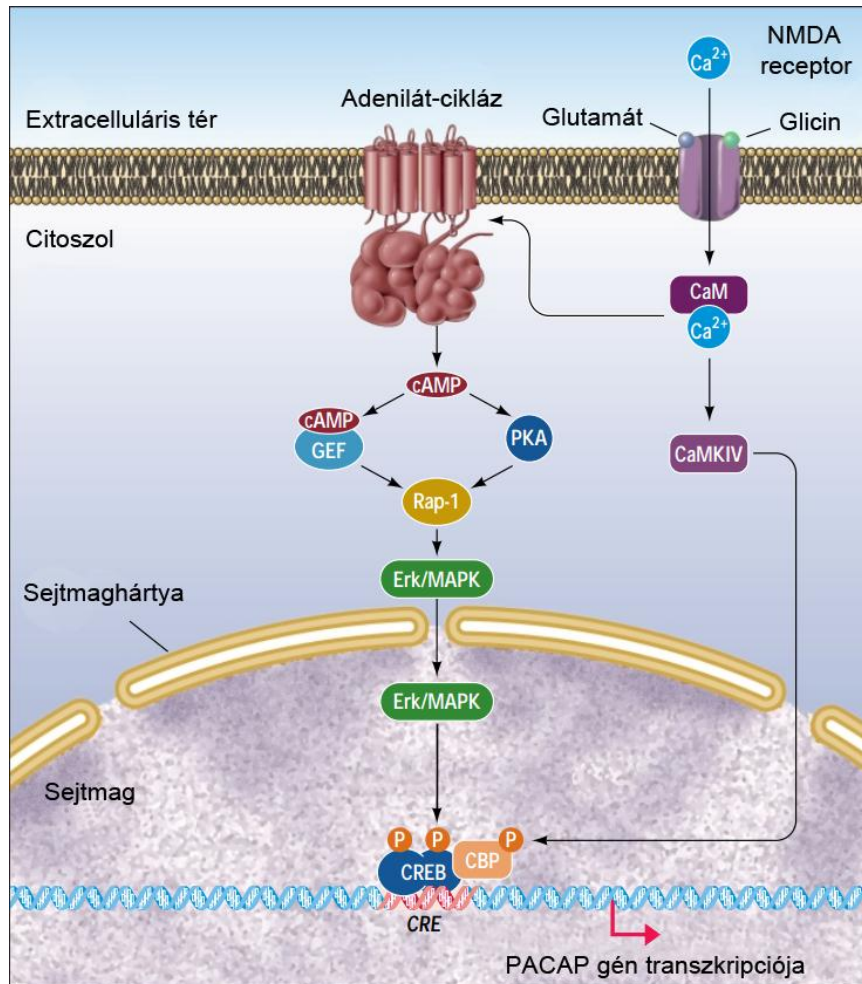
DNS transzfekció, luciferáz és β -galaktozidáz enzimaktivitás mérés, electro mobility shift assay (EMSA) és Western blot) [108].

2.1. PACAP génexpressziót a Ca^{2+} -ion és a cAMP koordinálja

Széles körben elfogadott tény, hogy a neuronokban az aktivitás-függő géntranszkripcióért átmenetileg a glutamáterg szinaptikus jelátvitelből származó Ca^{2+} szignálok felelősek. Ilyen Ca^{2+} szignál-mediált géntranszkripciót mutattak ki az agyi eredetű neurotrofikus faktor (BDNF) és a c-fos gének esetén, amelyek aktivációjában egy transzkripció faktor, a cAMP válasz elem (CRE) kötő fehérje (cAMP-response element binding protein; CREB) vesz részt. Hasonlóan ezekhez a génekhez, az idegsejtekben Ca^{2+} szignálok befolyásolják a PACAP génexpresszióját is. Azonban alapvető különbség, hogy míg a BDNF és a c-fos gének promótereit a CRE-n kívül más *cis* ható elem is szabályozza, például az upstream stimuláló faktor (USF) kötő elem, a Ca^{2+} válasz elem 1 (CaRE1) és a szérum válasz elem (SRE), a PACAP gén promóterét egyetlen glutamát-érzékeny CRE tartja kontroll alatt. Korábban megfigyelték, hogy PC12 sejtekben (patkány mellékvesevelő pheocromocytoma sejtvonala; PACAP neurotróf hatásainak modell sejtje) és patkány hippocampus sejtekben a CREB- és az extracelluláris szignál-regulált kináz/mitogén-aktivált protein kináz- (ERK/MAPK-) dependens transzkripcióhoz Ca^{2+} és cAMP szinergikus indukciója szükséges, amelyet depolarizáción és forskolin (adenilát-ciklázt serkentő növényi terpenoid) alkalmazásán keresztül értek el. Ez a jelenség párhuzamba állítható azzal a felfedezéssel, miszerint a PACAP génről a legnagyobb mennyiségű transzkript depolarizáció és forskolin hatására íródik át. A transzkriptek expresszióját teljes mértékben csökkenti a nikardipin (szelektív kalciumcsatorna blokkoló) és az APV. Tehát a Ca^{2+} influxból származó Ca^{2+} szignálok alapvetően meghatározzák a maximális expressziós szintet, a cAMP szignálok pedig elengedhetetlen szerepet játszanak a Ca^{2+} szignál-mediált jelátviteli útvonalak modulálásában.

A kísérlet teljessége érdekében megvizsgálták más targeteket is a celluláris folyamatban. Azt tapasztalták, hogy a promótert teljesen represszálja az U0126 (szelektív MAP kináz kináz (MEK) inhibitor) és a H89 (PKA inhibitor) vagy a KT5720 (szelektív PKA inhibitor) nevű szintetikumok együttes alkalmazása, viszont nem teljesen, ha csak az egyikkel kezelték a sejt kultúrát. Mindez felveti az ERK/MAPK és PKA útvonal összekapcsolódását a kaszkádrendszeren belül. A PKA útvonal szerepét az is igazolja, hogy katalitikus

alegységének kifejeződése a promóter szinergikus aktivációjában nyilvánul meg Ca^{2+} jelenlétében. Az ERK/MAPK és a PKA útvonal magába foglalhatja a monomer GTP-kötő fehérjék Ras szupercsaládjába tartozó Rap1 fehérjét (Ras proximate 1), illetve a szignalizációs hálózatban a CREB-kötő fehérje (CBP) szerepét is feltételezik, amelyet a CaMKIV aktivál (12. ábra).



12. ábra: Ca^{2+} - és cAMP-függő PACAP génexpresszió (Fukuchi et al., 2004; Ferguson és Storm nyomán módosítva)

CaM: calmodulin; CaMKIV: Ca^{2+} /calmodulin-függő protein kináz IV; cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát; CBP: CREB-kötő fehérje; CRE: cAMP válasz elem; CREB: cAMP válasz elem kötő fehérje; Erk: extracelluláris szignál-regulált kináz; GEF: guanin nukleotid kicserélő faktor, MAPK: mitogén-aktivált protein kináz; PACAP: hypophysis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid; PKA: protein kináz A; Rap-1: monomer GTP-kötő fehérje

A cAMP és a Ca^{2+} elengedhetetlenül fontos szerepére utal az is, hogy a transzkript szintjét a cAMP rendkívül gyorsan csökkenti, de a Ca^{2+} -koncentráció növekedése mellett helyreáll. Ez

a megfigyelés azt tükrözi, hogy a PACAP mRNS szintjét a sejt nemcsak a transzkripció szintjén szabályozza dinamikusan, hanem az mRNS degradáció szintjén is, méghozzá aktivitás-függő módon. Bizonyításképp azt találták, hogy a PACAP mRNS féléletidejét a depolarizáció meghosszabbította, amelyet nikardipinnel és APV-vel le tudtak gátolni, vagyis a Ca^{2+} szignálok felelnek a PACAP mRNS stabilitásának növekedéséért. Ugyanilyen stabilitási növekedést mértek a BDNF mRNS esetén is. Másrészt a forskolin-indukált PACAP mRNS csökkenésnek az oka még mindig tisztázatlan, mivel a transzkript degradációs sebességét a forskolin önmagában nem változtatja. A PC12 sejtekben a PACAP mRNS szintet a forskolin növelte, amely azt mutatja, hogy a cAMP által irányított PACAP mRNS expresszió mechanizmusa eltérhet a neuronok szubpopulációi között. A cAMP okozta csökkenés ellenére egyértelműen látszik, hogy a PACAP mRNS legmagasabb szintje depolarizáció és forskolin révén áll helyre.

Összegezve az eddigieket, a Ca^{2+} szignálok hatása dominánsnak bizonyul a cAMP szignálokhoz szemben a PACAP mRNS stabilizációs és destabilizációs szabályozásában. Ez fontos ahhoz, hogy a PACAP mRNS szintézis és degradáció szimultán ne menjen végbe a neuronokban [108, 109].

2.2. A cAMP útvonal

A japán tanulmány szerint a PACAP mRNS akkumulációját *in vivo* az NMDA-receptoron átfolyó Ca^{2+} -ionok és a G-protein-kapcsolt dopamin 1 (D1) receptor-aktivált cAMP szignálok együttes hatásának tulajdonítják [109]. Egyes források szerint a dopaminnak potenciális szerepe lehet a migrénben [110, 111], azonban mivel a TRG D2 receptort expresszál, D1 receptort nem [112], ezért a dopaminerg rendszer érintettsége kérdéses ebben a kontextusban. A D2 típusú receptorok általánosan gátló hatásúak, aktivációjukkor az adenilát-cikláz gátlása következtében csökken az intracelluláris cAMP-szint. Kimutatták azt, hogy a befelé irányuló Ca^{2+} -áram is csökken ilyenkor. Néhány előzetes vizsgálat eredménye azt mutatja, hogy a KYNA képes gátolni a D2 típusú receptorokat is, így kötődésével felszabadítja a gátlás alól az adenilát-cikláz. Ezek a megfigyelések kizárhatják annak a lehetőségét, hogy a PACAP génexpresszióban a dopamin lenne a cAMP fő upstream mediátora.

Ellenben a katekolaminokon belül az adrenalin és noradrenalin is G-fehérjével kapcsolt receptorokhoz kötődik. Az adrenerg receptorok vagy más néven adrenoreceptorok 3 fő osztályát azonosították eddig: az α_1 -, α_2 - és β -receptorokat, amelyek közül az utóbbi Gs

fehérjét aktivál, és így serkenti az adenilát-cikláz működését. Széles körben elismert tény, hogy a katekolaminok β -adrenoceptorokon át szabályozzák a CREB/CRE útvonalat, amely során megemelkedik a cAMP-szint és aktiválódik a PKA [113]. In situ hibridizációs, immunhisztokémiai és kvantitatív autoradiográfiás eljárások bizonyították a β -adrenoceptorok mRNS expresszióját a trigeminalis neuronokban [114]. A legújabb kutatások szerint a noradrenalin szintje hétszer magasabb krónikus migrénesek vérplazmájában, mint a kontroll alanyokban [115], valamint a noradrenalin migrénben betöltött szerepét a bétareceptor-gátlók migrén terápiában való használata is alátámasztja. A béta-blokkoló propranolol például együtt hat az NMDA-receptor gátlószerekkel és így csökkentik az idegi aktivitást [116]. Emellett korábbi vizsgálatok azt igazolták, hogy adott β -adrenerg receptor gátlók elnyomják a PACAP hatását [117, 118]. Azonban a bétareceptor-gátlóknak is van nem kívánt mellékhatása. Kontraindikációja fennáll asztma, krónikus obstruktív tüdőbetegség, kongesztív szívelégtelenség, atrioventricularis defektus, Raynaud-kór, perifériás érbetegségek és nehezen beállítható cukorbetegség (brittle diabetes) esetén.

3. Összegzés

A fentieket figyelembe véve tehát feltételezhető, hogy a PACAP génexpresszió az NMDA-receptorok és a β -adrenerg receptorok "cross-talk"-ja révén megy végbe. Ez az elmélet felveti a KYNA-a és bétareceptor-gátlók együttes alkalmazásának lehetőségét. Az NMDA-receptorok kation áteresztő képességének farmakológiai befolyásolásával a PACAP génexpresszió csökkenése várható. Ehhez a KYNA analógok fejlesztése a jövőben új anti-migrén lehetőségeket kínálhatnak a klinikumban.

VI. KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk – amely a TR állatkísérletes modelljében a PACAP-38 és a KYNA közötti kapcsolatok, valamint a TR aktivációját követő neurokémiai változások vizsgálatára irányultak – eredményei a következőkben foglalható össze: az ingerlés következtében a Gasser-dúc primer érző rostjaiból felszabaduló PACAP-38-ra, mind a szisztémás vérplazmában, mind az agytörzsben hatással van a KYNA-a. A PACAP és az NMDA közötti korreláció részletesebb képet adó, szubcelluláris feltérképezésére szándékunkban áll a jelenlegi ismereteinket további kísérletekkel kibővíteni. Az eddig szerzett tapasztalatok alapján a PACAP potenciális biomarker lehet a migrén tekintetében, illetve egy másik

alternatíva lehet a betegség jövőbeni kezelésében a KYNA és származékai, amelyek a vér-agy gáton könnyedén átjutva fejthetik ki hatásukat.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A migrén a primer fejfájások közé tartozó, krónikus neurológiai kórkép, amely különböző klinikai megjelenési formákban jelentkezik. Patomechanizmusának pontos ismerete hiányában kezelése mind a mai napig nem megoldott, ezért szükséges a kórokok több aspektusból való felderítése. Számos elmélet létezik a betegség megmagyarázására, amelyek közül az egyik legelfogadottabb a trigeminovascularis elmélet.

A teória alapját az a tény képezi, miszerint a trigeminalis ganglion (TRG) összeköttetést létesít perifériás ágaival az intracranialis erek és a dura szövetei valamint centrális ágaival az agytörzsi másodlagos neuronok között. A trigeminovascularis rendszerben (TR) különféle neuropeptidok és vazóaktív anyagok (CGRP, SP, NKA, VIP, 5-HT, NO) szerepét már kimutatták és széles körben tanulmányozták.

Az utóbbi évek migrén kutatásai, valamint saját állatkísérletes és klinikai adataink arra utalnak, hogy egy új molekula jelöltnek, a hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptidnek (PACAP) is fontos szerepe lehet a TR aktiválásában. A TR aktiválódásában emellett kiemelt jelentősége van a glutamáterg kapcsolatoknak, melyet az NMDA-receptor antagonistá, kinurénsav-analógokkal végzett állatkísérletes adatok igazolnak.

Tanulmányunk célja egy, az alapvegyületnél hatékonyabb, kinurénsav-származékkal történő előkezelés során a PACAP-38-immunreaktivitás (IR) vizsgálata a TR állatkísérletes modelljében, a Gasser-dúc elektromos ingerlésével.

A TR aktiválódása következtében az elsődleges érző neuronok perifériás és centrális terminálisaiból nagy mennyiségű PACAP-38 szabadul fel, mely kifejti vazodilatatív és szenzitizáló hatását. A kinurénsav-származék képes ezt részben meggátolni, melyet a PACAP és NMDA-receptorok kapcsoltságát leíró irodalmi adatokkal támaszthatunk alá.

Ezzel a megfigyeléssel közelebb kerülünk a PACAP és a glutamát közötti szignalizációs hálózat megismeréséhez. Mindezek tükrében a PACAP a jövőben egy potenciális biomarkere lehet a migrénnek, továbbá a kinurénsav-analógok fejlesztése hatásosabb migrén terápiát biztosíthat.