

**Szintetikus kinurénsav származékok moduláló hatása a
nitroglicerín-indukálta trigeminális aktivációra és
szenzitizációra patkányban**

FEJES-SZABÓ ANNAMÁRIA

Ph.D. Tézis összefoglalója

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ
Általános Orvostudományi Kar
Neurológiai Klinika

Szeged

2014

Ph.D. tézishez közvetlenül kapcsolódó eredeti közlemények:

- I. **Fejes-Szabó A**, Bohár Z, Vámos E, Nagy-Grócz G, Tar L, Veres G, Zádori D, Szentirmai M, Tajti J, Szatmári I, Fülöp F, Toldi J, Párdutz A, Vécsei L.

Pre-treatment with new kynurenic acid amide dose-dependently prevents the nitroglycerine-induced neuronal activation and sensitization in cervical part of trigemino-cervical complex.

J. Neural. Transm. 2014 Jul;121(7):725-38.

IF: 2.871

- II. Vámos E, **Fejes A**, Koch J, Tajti J, Fülöp F, Toldi J, Párdutz Á, Vécsei L.

Kynurenate derivative attenuates the nitroglycerin-induced CamKIIalpha and CGRP expression changes.

Headache 2010 May;50(5):834-43.

IF: 2.642

Teljes impact factor: 5.513

Ph.D. tézishez nem közvetlenül kapcsolódó eredeti közlemények:

- I. Vámos E, Párdutz Á, Fejes A, Tajti J, Toldi J, Vécsei L.
Modulatory effects of probenecid on the nitroglycerin-induced changes in the rat caudal trigeminal nucleus.
Eur. J. Pharmacol. 2009 Oct 25;621(1-3):33-7.
IF: 2.585
- II. Tajti J, Párdutz A, Vámos E, Tuka B, Kuris A, Bohár Z, Fejes A, Toldi J, Vécsei L.
Migraine is a neuronal disease.
J. Neural. Transm. 2011 Apr;118(4):511-24.
IF: 2.730
- III. Fejes A, Párdutz Á, Toldi J, Vécsei L.
Kynurenine metabolites and migraine: experimental studies and therapeutic perspectives.
Curr. Neuropharmacol. 2011 Jun;9(2):376-87.
IF: 2.847
- IV. Párdutz Á, Fejes A, Bohár Z, Tar L, Vécsei L.
Kynurenines and headache.
J. Neural. Transm. 2012 Feb;119(2):285-96.
IF: 3.052
- V. Bohár Z, Fejes-Szabó A, Tar L, Varga H, Tajti J, Párdutz A, Vécsei L.
Evaluation of c-Fos immunoreactivity in the rat brainstem nuclei relevant in migraine pathogenesis after electrical stimulation of the trigeminal ganglion.
Neurol. Sci. 2013 Sep;34(9):1597-604.
IF: 1.495
- VI. Fejes-Szabó A, Bohár Z, Nagy-Grócz G, Vámos E, Tar L, Pődör B, Tajti J, Toldi J, Vécsei L, Párdutz A.
Effect of probenecid on the pain-related behaviour and morphological markers in orofacial formalin test of the rat.
CNS Neurol Disord Drug Targets. 2014 Aug 6. [Epub ahead of print]
IF: 2.702

Teljes impact factor: 15.411

Összesített impact factor: 20.924

List of abbreviations

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionát
α 7-nACh	α 7-nikotinos acetilkolin
C1-C2	<i>nucleus tractus spinalis nervi trigemini pars caudalis</i> cervikális szakasza
CaMKII α	kalcium/kalmodulin-függő protein kináz II alfa
CGRP	kalcitonin gén-relációs peptid
GPR-35	G-protein-kapcsolt-35 receptort
HPLC	nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
i.p.	intraperitoneális
IR	immunreaktív
KYNAa1	<i>N</i> -(2- <i>N,N</i> -dimetilaminoetil)-4-oxo-1 <i>H</i> -quinolin-2-karboxamid hidroklorid
KYNAa2	<i>N</i> -(2- <i>N</i> -pirrolidiniletil)-4-oxo-1 <i>H</i> -quinolin-2-karboxamid hidroklorid
L-KYN	L-kinurenin
NMDA	N-metil-D-aszpartát
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintáz
NO	nitrogén-monoxid
NTG	nitroglicerín
PROB	probenecid
TNC	<i>nucleus tractus spinalis nervi trigemini pars caudalis</i>
tskg	testsúly kg

Bevezetés

Migrén

Az elsődleges fejfájások közé tartozó migrén az egyik leggyakoribb neurológiai betegség, amelynek pontos patomechanizmusa nem ismert. A migrénes rohamok kialakulásában azonban alapvető a trigeminális rendszer aktiválódása és szenzitizációja, amelynek során az elsődleges trigeminális neuronok centrális és perifériás idegvégződéseiből neurotranszmitterek szabadulnak fel, mint például a glutamát vagy a kalcitonin gén-relációs peptid (CGRP). Következésképpen migrénesekben a roham alatt a vena jugularis externában emelkedett CGRP szint mérhető. A centrálisan felszabadult neuroaktív anyagok a másodlagos trigeminális neuronokat aktiválják, amelyek a nyúltvelőben lévő, de az első két cervikális gerincvelői szegmentumig lehúzódó *nucleus tractus spinalis nervi trigemini pars caudalis* (TNC) magban helyezkednek el. Az aktiválódás általánosan használt markere a c-Fos transzkripció faktor. A perifériáról érkező folyamatos, hosszan tartó ingerlés hatására a másodlagos idegsejtekben létrejön a centrális szenzitizáció, amelyben a glutamát receptorok, a neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) és a kalcium/kalmodulin-függő protein kináz II alfa (CaMKII α) fontos szerepet játszanak. A centrális szenzitizáció a migrénes roham során az allodynia jelenségében nyilvánul meg, amely terápiás szempontból kritikus, hiszen kialakulása után jelentősen romlik a roham kezelhetősége.

A migrénes fejfájás nitroglicerinnel

A nitrogén-monoxid (NO) donor nitroglicerinnel (NTG) szisztémás adása a migrén egyik humán és állatkísérletes modellje. A NTG általánosan ismert mellékhatása egy, a beadást követően azonnal kialakuló fejfájás, amelyet migrénesekben néhány óra elteltével egy típusos, aura nélküli migrénes roham követ, amelyet a migrén preventív és rohamterápiájában használt gyógyszerek képesek kivédeni vagy megszüntetni. Humán vizsgálatokban az NTG képes aktiválni és szenzitizálni a trigeminális rendszert és ez a jelenség állatkísérletes körülmények között is kimutatható: a TNC cervikális szakaszán (C1-C2) a NTG (i) csökkenti a CGRP-t tartalmazó rostok által lefedett területet, amely a transzmitter felszabadulást és az elsődleges trigeminális nociceptorok aktiválódását jelzi, (ii) növeli a c-Fos expressziót tükrözve a

másodlagos trigeminális idegsejtek aktiválódását, valamint (iii) fokozza a nNOS és CaMKII α immunreaktivitást, amelyek a centrális szenzitizációs folyamatok jelenlétére utalnak.

Kinureninek

A kinurénsav L-kinureninből (L-KYN) keletkezik az endogén triptofán metabolizmus 95%-áért felelős kinurenin útvonal során. Kísérletes eredmények alapján a kinurénsav neuroprotektív és hatékony a fájdalomcsillapításban is, amely feltehetően annak köszönhető, hogy képes gátolni a fájdalomérzés patomechanizmusában is fontos szerepet játszó ionotróp glutamát N-metil-D-aszpartát (NMDA) és α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionát (AMPA), valamint az α 7-nikotinos acetilkolin (α 7-nACh) receptorokat, továbbá képes serkenteni a G-protein-kapcsolt-35 receptort (GPR-35). Terápiás alkalmazhatóságának viszont határt szab az, hogy csak kis mennyiségben képes átjutni a vér-agy gáton, ezért kísérletes körülmények között sokszor az L-KYN-t használják, amely önmagában nem neuroaktív vegyület, viszont könnyen átjut a vér-agy gáton és dóziszfüggő módon képes megemlíni a kinurénsav koncentrációját a központi idegrendszerben. Ez utóbbi jelentősen fokozható probeneciddel (PROB), amely a vér-agy gáton is jelenlévő és a kinurénsav központi idegrendszerből történő kiürüléséért is felelős szerves sav transzportereket gátolva éri el hatását. További lehetőséget jelent az olyan, újonnan szintetizált kinurénsav származékok használata, amelyek feltételezhetően jobban átjuthatnak a vér-agy gáton és megtartják a kiindulási vegyület biológiai hatásait, és/vagy a központi idegrendszerben visszaalakulnak kinurénsavvá.

Célok

A fentiek alapján kísérleteink célja az volt, hogy PROB-el kombinált L-KYN-el és két újonnan szintetizált kinurénsav származékkal történt kezelést követően (i) megmérjük a kinurénsav koncentrációját a C1-C2-es régióban; (ii) megvizsgáljuk az esetleges moduláló hatásukat a NTG-indukálta trigeminális aktivációra és szenzitizációra; továbbá (iii) kimutassuk és moduláljuk a NTG kezelés állatok viselkedésére gyakorolt hatását.

Anyagok és módszerek

Az állatkísérleti irányelveket követő és a helyi hatóságok által engedélyezett kísérleteinkben felnőtt hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. A két új, oldallánc szubsztituált kinurénsav amidot a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerkémiai Intézetében szintetizálták (*N*-(2-*N,N*-dimetilaminoetil)-4-oxo-1*H*-quinolin-2-karboxamid hidroklorid - KYNAa1 és *N*-(2-*N*-pirrolidiniletíl)-4-oxo-1*H*-quinolin-2-karboxamid hidroklorid - KYNAa2). A C1-C2 régió kinurénsav tartalmának meghatározásához intraperitoneális (i.p.) fiziológiás sóoldattal (n=4) vagy i.p. L-KYN (300 mg/testsúly kg (tskg)) és PROB (200 mg/tskg) kombinációjával (n=4) vagy i.p. KYNAa2-vel (1 mmol/tskg, n=2x5) kezeltük az állatokat. Meghatározott időpontokban (60 perc a kontroll és L-KYN-PROB csoportban; 60 és 300 perc a KYNAa2 csoportban) az eltávolított C1-C2-es szegmentumok kinurénsav tartalmát nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) segítségével mértük. A morfológiai vizsgálatokhoz a patkányokat i.p. fiziológiás sóoldattal (n=12) vagy i.p. L-KYN (300 mg/tskg) és PROB (200 mg/tskg) kombinációjával (n=12) vagy i.p. KYNAa1-el (1 mmol/tskg, n=12) vagy különböző dózisu i.p. KYNAa2-vel kezeltük (0,1, 0,5 és 1 mmol/tskg, n=10/csoport), amelyek után egy órával az állatok i.p. NTG-t (10 mg/tskg) vagy i.p. Placebo injekciót kaptak (n=5/6 csoportonként). Négy óra elteltével a C1-C2-es régiót eltávolítottuk és CGRP, c-Fos, nNOS és CaMKII α immunhisztokémiai festéseket végeztünk rajtuk. A C1-C2-es régió I-II laminájában a CGRP rostok által lefedett területet mértük és a c-Fos-, nNOS- és CaMKII α -immunreaktív (IR) neuronokat számoltuk. A Western blot analízishez a patkányokat i.p. fiziológiás sóoldattal (n=10) vagy i.p. KYNAa2-vel (1 mmol/tskg, n=10) kezeltük, amit egy óra elteltével i.p. NTG (10 mg/tskg) vagy i.p. Placebo injekció követett (n=5/csoport), majd négy órával ez után a C1-C2-es szegmentumokat eltávolítottuk és Western blot technika segítségével meghatároztuk a CGRP, nNOS és β -actin tartalmukat. Az Open Field Teszthez az állatok i.p. fiziológiás sóoldatot (n=20) vagy i.p. KYNAa2-t (1 mmol/tskg, n=20) kaptak, amit egy óra után i.p. NTG (10 mg/tskg) vagy i.p. Placebo injekció követett (n=10/csoport), majd három óra negyven perc elteltével 15 percig mértük a mozgással töltött időt, a megtett távolságot, a nyugalomban töltött időt és az ágaskodások számát.

Eredmények

HPLC eredményeink alapján a kinurénsav koncentrációja egy órával az L-KYN-PROB kombinált kezelés után és a KYNAa2 kezelést követően is szignifikánsan megemelkedett a C1-C2-es régióban a kontroll csoporthoz viszonyítva, majd öt órával az utóbbi kezelés után visszacsökkent alap szintre. A C1-C2-es szakasz transzverzális metszetein a NTG szignifikánsan lecsökkentette a CGRP rostok által lefedett területet, és szignifikánsan megemelte a c-Fos-, nNOS- és CaMKII α -IR sejtek számát a Placeboval kezelt állatokhoz képest, amelyet az L-KYN-PROB, KYNAa1 és dóziszfüggő módon a KYNAa2 képes volt kivédeni. A Western blot mérésekből származó eredmények megerősítették az immunhisztokémiai adatokat, miszerint a CGRP mennyisége szignifikánsan csökkent és az nNOS mennyisége szignifikánsan nőtt a C1-C2-es szegmentumban NTG hatására a Placebohoz képest, amelyet a KYNAa2-vel történt előkezelés kivédett. Az Open Field Tesztben a NTG szignifikánsan lecsökkentette a patkányok által megtett távolságot a Placebo csoporttal összehasonlítva, míg ez a különbség a KYNAa2 előkezelést kapott állatoknál nem volt megfigyelhető.

Összefoglalás

L-KYN-PROB kezelése hatására megfigyelhető jelentős kinurénsav emelkedés a C1-C2-es szegmentumban megerősíti a korábbi kísérleti eredményeket. A kinurénsav koncentrációjának növekedése KYNAa2 kezelést követően a C1-C2-ben arra enged következtetni, hogy ez a származék legalább részben képes visszaalakulni a kiindulási vegyületté hasonlóan a KYNAa1-hez, amelyről kimutatták, hogy egér szérumban a kinurénsav koncentrációt is jelentősen megemeli. Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy ezen származékok központi idegrendszeri hatásai részben direkt módon hatva és részben indirekt módon, visszaalakulva kinurénsavvá valósulnak meg.

A migrén patomechanizmusának egyik főszereplője a CGRP, amelynek NTG-indukálta csökkenése a C1-C2-es régióban az elsődleges trigeminális neuronokból történő transzmitter felszabadulást és egyben ezen idegsejtek aktiválódását jelzi, amely korábbi kísérletek alapján specifikus a trigeminális rendszerre. Ezek az adatok összhangban vannak más eredményekkel,

amelyek szerint a trigeminális rendszer aktiválódása CGRP felszabadulással jár a perifériás és a centrális nyúlványokból és ennek következtében a migrénes roham során emelkedett CGRP szint mérhető. Mivel az L-KYN-PROB, KYNAa1 és dóziszfüggő módon a KYNAa2 képes volt kivédeni a NTG-indukálta CGRP csökkenést, feltételezhetjük, hogy ez a hatás a fájdalomérzésben fontos szerepet játszó, és a perifériás trigeminális rendszerben jelen lévő glutamát és $\alpha 7$ -nACh receptorok gátlása vagy a GPR-35 receptorok serkentése révén valósulhat meg, amely hatások bizonyítottan képesek csökkenteni a CGRP felszabadulást vagy annak következményeit vagy modulálni a nociceptív jelátvitelt.

A másodlagos trigeminális neuronok NTG-indukált aktiválódását jelzi a C1-C2 felszíni rétegeiben megfigyelt c-Fos immunreaktivitás növekedés, ami korábbi vizsgálatok alapján szintén specifikus a trigeminális rendszerre és feltételezhetően az elsődleges trigeminális neuronok aktiválásán keresztül valósul meg. A c-Fos expresszió növekedését a KYNAa2-vel történt előkezelés dóziszfüggő módon védte ki, amely egyrészt megvalósulhat a perifériás nociceptorok gátlása révén, de ugyanakkor központi idegrendszeri hatás is valószínűsíthető. Ez utóbbit alátámasztja az, hogy a glutamát és $\alpha 7$ -nACh receptorok jelen vannak az agyban elhelyezkedő trigeminális területeken és gátlásukkal csökkenthető a c-Fos expresszió vagy a glutamát felszabadulás. Továbbá, a közvetlenül a központi idegrendszerbe juttatott kinurénsav és analógjai fájdalomcsillapító hatásúak, és a perifériásan adagolt kinurénsavval ellentétben a KYNAa1 képes volt csökkenteni a NTG-indukált c-Fos expressziót a C1-C2-ben.

Irodalmi adatok alapján az önerősítő folyamatokban fontos szerepet játszó nNOS és CaMKII α expressziójának emelkedése a C1-C2-ben a NTG hatására kialakuló és a migrén patogenezisében is nagyon fontos szerepet játszó centrális szenzitizációs folyamatokat mutatja a trigeminális rendszerben, amely korábbi eredmények alapján szintén specifikus. Ezek a megfigyelések összhangban vannak azokkal az adatokkal, amelyek szerint fájdalmas stimulus hatására expressziójuk megemelkedik a másodlagos fájdalomérző neuronokban, és amelyek egyben azt is bizonyítják, hogy szerepük van a fájdalom idegrendszeri feldolgozásában a trigeminális rendszer területén is. A KYNAa2 dóziszfüggő módon kivédte a NTG-indukált nNOS expresszió emelkedését és az L-KYN-PROB, KYNAa1 és szintén dóziszfüggően a KYNAa2 csökkentette a CaMKII α -IR sejtek számát, amely eredmények arra utalnak, hogy ezek az anyagok képesek kivédeni a centrális szenzitizációs folyamatokat, feltételezhetően főként az ionotróp glutamát receptorok gátlása révén. Az NMDA és AMPA receptorok

alapvetőek a fájdalmas inger hatására kialakuló plasztikus anatómiai és funkcionális változások létrejöttében, amelyet az is bizonyít, hogy ezen receptorok gátlásával csökkenthetőek a centrális szenzitizációra utaló morfológiai és magatartásbeli változások. Ugyanakkor valószínűsíthető, hogy az előkezelések gátló hatásában a preszinaptikus $\alpha 7$ -nACh receptorok blokkolása is szerepet játszhat csökkentve a glutamát felszabadulását az idegvégződésekből.

Az Open Field Teszt során a megtett távolságban NTG hatására megfigyelt csökkenés párhuzamba állítható más kísérletekkel, ahol a fájdalmas stimulus szintén csökkentette a megtett távolságot. Ez a csökkenés a KYNAa2 előkezelést követően nem jelent meg jelezve annak esetleges fájdalomcsillapító hatását. Érdekes módon, a megtett távolság alapszintje a KYNAa2-vel és Placeboval kezelt állatokban kismértékben mérséklődött, amely utalhat a kinurénsav származék közvetlen központi idegrendszeri hatására, amelyet alátámaszt az a megfigyelés is, hogy egy, a vér-agy gáton jól penetráló NMDA antagonistá szintén csökkentette ezt a paramétert ellentétben egy nem jól penetráló antagonistával.

Konklúziók

Összefoglalva, az L-KYN-PROB és a két kinurénsav származékkal történt előkezelések hatékonyak a NTG-indukált perifériás és centrális trigeminális aktiváció és szenzitizáció csökkentésében, amely egyrészt annak köszönhető, hogy megemelik a kinurénsav koncentrációját a központi idegrendszerben vagy az utóbbiak direkt módon is hathatnak feltehetően a kiindulási vegyület támadáspontjain. Adataink újabb és szélesebb körű eredményekkel támasztják alá azt a korábbi felvetést, miszerint a kinurénsav vagy származékai potenciális gyógyszerjelöltként jöhetnek szóba a migrén kezelésében.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálámat Prof. Dr. Vécsei László tanszékvezető egyetemi tanárnak a szakmai tanácsaiért és hogy lehetővé tette, hogy a Neurológiai Klinikán dolgozhassak.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Párdutz Árpádnak a szakmai irányításért, a hasznos tanácsokért és a folyamatos támogatásért.

Köszönet illeti minden munkatársamat, kiemelve Dr. Vámos Enikőt, Bohár Zsuzsannát, Dr. Tar Lillát, Nagy–Grócz Gábort és Dr. Zádori Dénest.

Hálás vagyok Vékonyné Széll Valáriának a labor munkában nyújtott segítségéért, az építő jellegű észrevételeiért és türelméért.

Szeretném kifejezni külön hálámat családomnak és barátaimnak, hogy végig támogattak a munkám során.