

**Migrén kapcsolat molekulák vizsgálata az aktivált
trigeminovaszkuláris rendszerben**

Körtési Tamás

Ph.D. tézis összefoglaló



Neurológiai Klinika

Általános Orvostudományi Kar

Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető: Prof. Dr. Tajti János

Szeged

2020

BEVEZETÉS

A migrén egy rohamokban jelentkező, lüktető, görcsös fejfájással járó neurológiai kórkép, melyet jellegzetes vegetatív tünetek (hányinger, hányás, fény-, és hangérzékenység) kísérnek. Epidemiológiai adatok szerint e primer fejfájásbetegség a felnőtt populáció mintegy 12 %-át érinti és leggyakrabban a fiatal felnőtt nőknél jelentkezik. A kiesett, valamint a csökkent hatékonysággal ledolgozott munkaórák miatt a betegség világszerte jelentős gazdasági terhet ró a társadalomra. A migrénnek alapvetően 2 fő típusát különböztetjük meg: aurás és aura nélküli. Mindkét forma esetében megfigyelhető az interiktális-, (rohammentes periódus) és az iktális fázisok (roham alatti periódus) váltakozása. A migrén terápiás stratégiáit tekintve elkülönítünk roham specifikus gyógyszerelést, valamint a prevenciót célzó intervallum terápiát. Fontos megjegyezni, hogy jelenleg nincs olyan alternatíva, amely a betegek mindegyikénél megoldást nyújtana a migrén okozta panaszokra. Ennek legfőbb oka, hogy a betegség komplex patofiziológiája még napjainkban sem teljesen tisztázott, azonban a nemzetközi szakirodalom megegyezik abban, hogy a trigeminovaskuláris rendszer (TR) aktivációja és szenzitizációja kardinális szerepet tölt be a rohamok kialakulásában. A rendszert alkotó pseudounipoláris neuronok szómája a trigeminális ganglionban (TRIG) lokalizálódik. Az itt található neuronok centrális ágai az agytörzsi trigeminális caudális mag (TNC) másodlagos

érző neuronjait kontaktálják, míg a perifériás afferensek a durális vaszkulaturához adnak projekciót.

A TR aktivációjából eredeztethető számos vazo-, és neuroaktív peptid felszabadulása, mint pl.: a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), vagy a hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid (PACAP). Utóbbiak, a migrén vonatkozásában meghatározó számos folyamat kialakításában kulcsszerepet töltenek be, ez okból kifolyólag a neuropeptideket célzó terápiai stratégiák az elmúlt évtized legmeghatározóbb kutatási irányvonalát képviselik.

A neuropeptidek mellett, a glutamáterg rendszernek is hatalmas szerepe van a migrénre jellemző hiperexcitábilis agy kialakulásában. Ezt az egységet célozza meg a triptofán metabolizmusának egy kevésbé ismert, de annál nagyobb jelentőséggel bíró útvonala, a kinurenin rendszer. A kinurenin útvonal számos biológiailag aktív metabolittal rendelkezik, mint pl.: a neuroprotektív kinurénsav (KYNA), amely egy endogén glutamát N-metil-D-aszparaginsav (NMDA) receptor antagonistája. Mialatt az NMDA receptor mediálta excitotoxicitás döntő jelentőséggel bír a betegség patomechanizmusában, a glutamáterg rendszer modulálása új terápiai alternatívát kínálhat a kór vonatkozásában.

CÉLOK

Kutatásunk fókuszában állt:

- 1.) a kór vonatkozásában eszenciális neuropeptidek, vagyis a CGRP, valamint a PACAP expresszió változásának nyomonkövetése a TR állatmodelljeiben.
- 2.) a PACAP és a glutamáterg mechanizmusok között fennálló potenciális kapcsolatok vizsgálata.
- 3.) a KYNA és szintetikus analógja, az SZR72 esetleges terápiás szerepének felderítése.

Feltételeztük, hogy:

- 1.) a CFA indukálta szenzitizáció növelheti a CGRP és PACAP release-t a TNC-ben, amely a mechanikai hiperalgémia változásában is manifesztálódhat.
- 2.) a KYNA és az SZR72 hatással lehet a PACAP kifejeződésére fehérje és génexpressziós szinten egyaránt.
- 3.) a vizsgálatunkban alkalmazott kezelések eltérő mértékben és módon befolyásolhatják a PACAP expresszióját.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálatainkba 106 db fiatal-felnőtt, hím SPRD patkányt vontunk be, majd a TR aktivációját két, széleskörben elterjedt állatkísérletes modellben hoztuk létre.

1.) Orofaciális Complete Freund's Adjuvant (CFA) kezelés

Az altatott állatok jobb oldali bajuszpárnájába 50 μ l CFA oldatot injektáltunk. A patkányokon az oltást megelőzően, valamint azt követően 24, 48, 72 és 120 óra elteltével von Frey allodynia tesztet végeztünk, majd transzkardiális perfúziót követően kiperaráltuk a TNC-t. A mintákat -80°C -on tároltuk, majd western blot analízissel detektáltuk a CGRP és preproPACAP fehérjék expresszióját.

2.) TRIG elektromos stimulációja

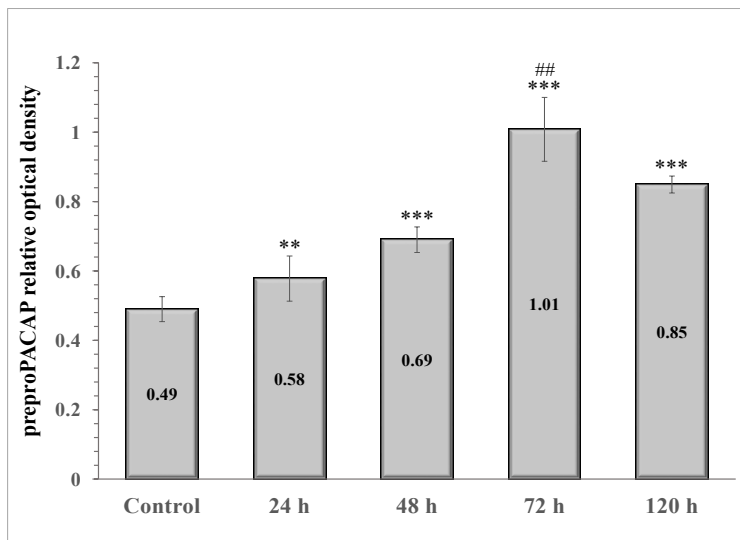
Altatott patkányokban a TR-t az egyik oldali TRIG elektromos ingerlésével (ES-TRIG) aktiváltuk. A stimulációt megelőzően az állatok csoportonként KYNA, SZR72, valamint MK-801 intravénás kezelést kaptak. A modell kialakítását követően 180 perccel az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk, majd a kiperarált TNC-t -80°C -on tároltuk. A PACAP₁₋₃₈ immunreaktivitását (IR) radioimmunoassay módszerrel, a preproPACAP fehérje expresszióját western blot analízissel, továbbá a PACAP₁₋₃₈ relatív mRNS kifejeződését valósídejű polimeráz láncreakcióval mértük.

EREDMÉNYEK

1.) Orofaciális hiperalgéria modell

A.) Az orofaciális CFA kezelés hatása a preproPACAP expressziójára

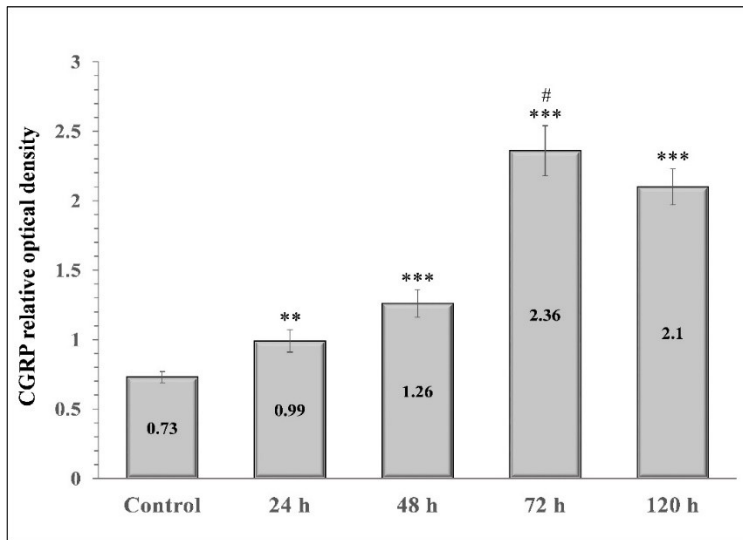
Az orofaciális CFA kezelés szignifikáns ($p < 0.01$) preproPACAP expresszió növekedést okozott a TNC-ben már 24 órával az oltást követően (0.58). A peptid kifejeződésének maximumát 72 órával a kezelést követően detektáltuk (1.01).



Ábra 1. Az orofaciális CFA kezelést követő preproPACAP fehérje expresszió változás a TNC-ben. *** $p < 0.001$ vs. kontroll csoport, ** $p < 0.01$ vs. kontroll csoport, ## $p < 0.01$ vs. 120 h csoport, átlag \pm SD, $n = 6$.

B.) Az orofaciális CFA kezelés hatása a CGRP expressziójára

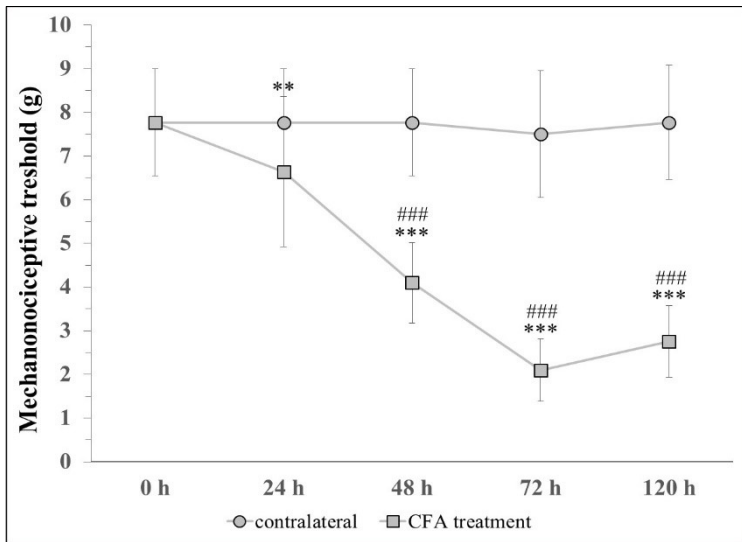
Szignifikáns ($p < 0.01$) CGRP expresszió emelkedést mutattunk ki már 24 órával a CFA kezelést követően a TNC-ben (0.99) a kontroll csoporthoz képest (0.73). A CGRP expressziós csúcsát, a preproPACAP-hoz hasonlóan, 72 órával a kezelést követően detektáltuk (2.36).



Ábra 2. Az orofaciális CFA kezelést követő CGRP fehérje expresszió változás a TNC-ben.. *** $p < 0.001$ vs. kontroll csoport, ** $p < 0.01$ vs. kontroll csoport, # $p < 0.05$ vs. 120 h csoport, átlag \pm SD, $n = 6$.

C.) Az orofaciális CFA kezelés hatása a mechanikai allodyniára

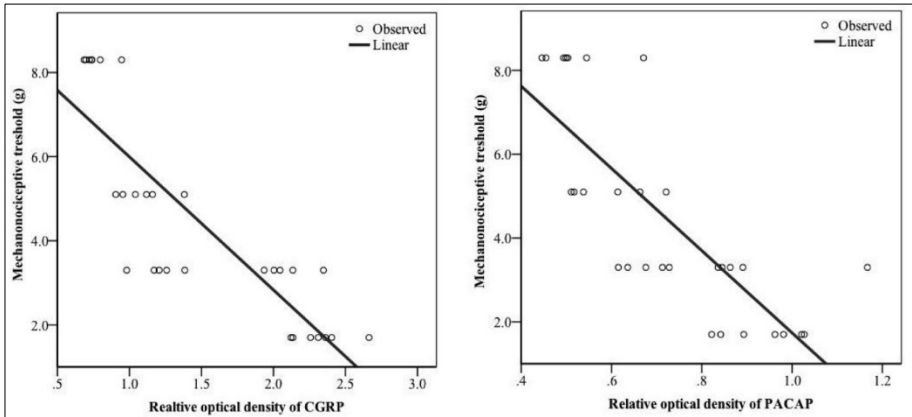
Az orofaciális CFA kezelést követően szignifikáns ($p < 0.001$) csökkenést detektáltunk az állatok bajuszpárnáján mért mechanonocéptív küszöbben (allodynia mértékével fordítottan arányos) a kezelt oldalon, mind a kontralaterális oldalhoz, mind a kezelt oldal kontroll méréséhez képest. Az empirikus és statisztikai különbség minden mérési időpontban kimutatható volt.



Ábra 3. A CFA kezelést követő mechanonocéptív küszöb változása. *** $p < 0.001$ vs. kontroll mérés (0 h) a CFA kezelt csoportban, ** $p < 0.01$ vs. kontroll mérés (0 h) a CFA kezelt csoportban, ### $p < 0.001$ vs. kontralaterális bajuszpárna, átlag \pm SD, $n = 6 - 24$.

D.) A neuropeptidok expressziója és a mechanikai hiperalgémia közötti korreláció

Reverz kapcsolatot mutattunk ki a neuropeptidok koncentrációja és az idő függvényében változott mechanonociceptív küszöb között ($p_{\text{CGRP}} < 0.001$, $R_{\text{CGRP}} = -0.846$; $n = 30$, $p_{\text{PACAP}} < 0.001$, $R_{\text{PACAP}} = -0.792$).

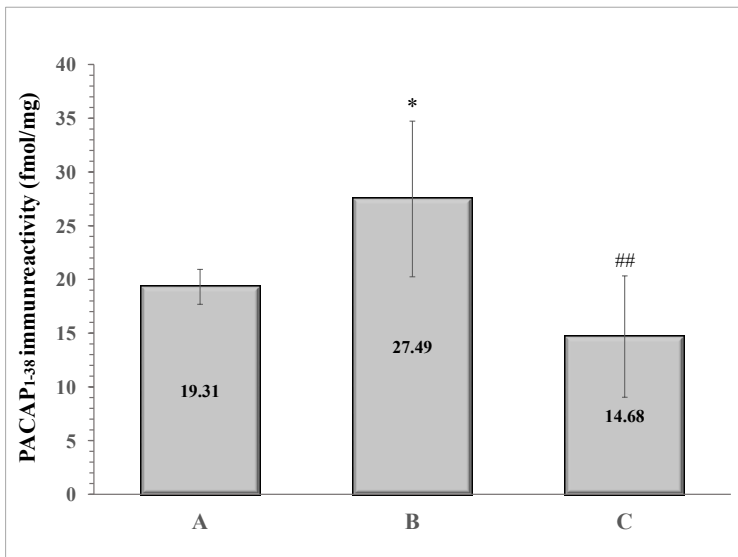


Ábra 4. A vizsgált neuropeptidok expressziója és a mechanonociceptív küszöb közötti negatív, lineáris korreláció.

2.) ES-TRIG model

A.) Az SZR72 kezelés hatása az ES-TRIG indukálta PACAP₁₋₃₈ fehérje overexpresszióra

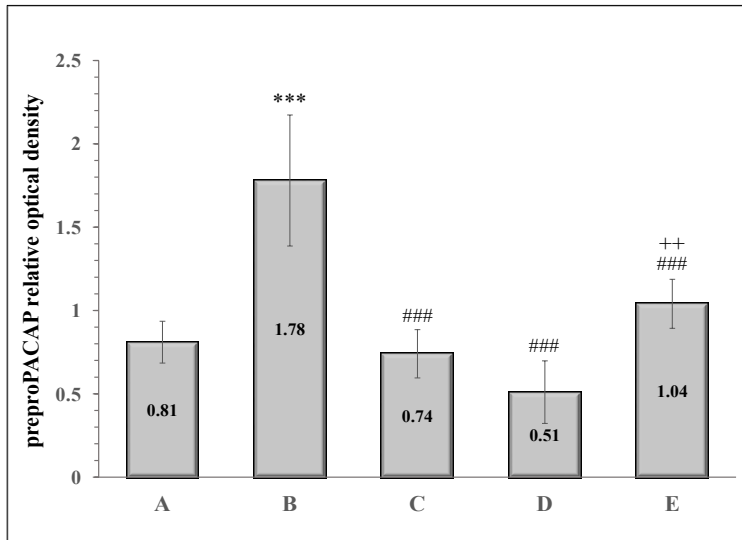
Az ES-TRIG szignifikáns ($p < 0.05$) PACAP₁₋₃₈ felszabadulást okozott a TNC-ben (27.49), melyet az SZR72 előkezelés szignifikánsan ($p < 0.01$) lecsökkentett (14.68).



Ábra 5. Az SZR72-t előkezelést követő ES-TRIG indukálta PACAP₁₋₃₈ IR változás a TNC-ben. A: kontroll csoport B: fiziológias sóoldat kezelt ES-TRIG csoport C: SZR72 kezelt ES-TRIG csoport * $p < 0.05$ vs. kontroll, ## $p < 0.005$ vs. fiziológias sóoldat ES-TRIG csoport, átlag \pm SD, $n = 6$.

B.) A KYNA, az SZR72 és az MK-801 kezelés hatása az ES-TRIG indukálta preproPACAP fehérje overexpresszióra

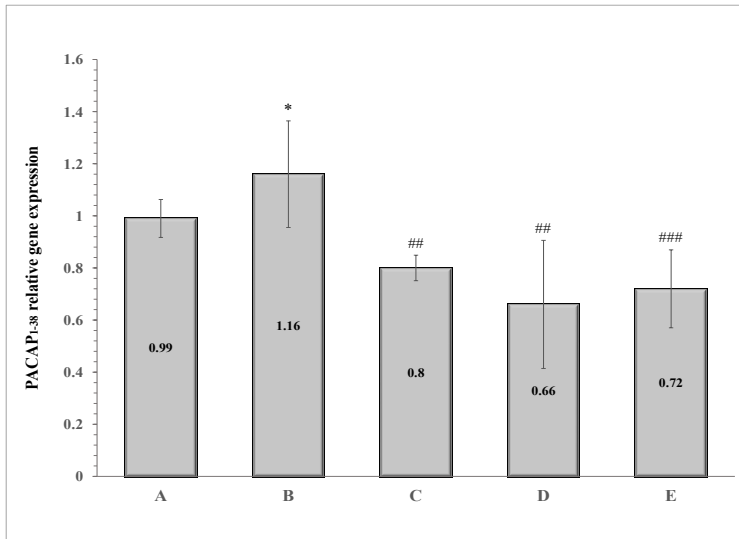
Az ES-TRIG indukálta jelentős preproPACAP felszabadulást (1.78) szignifikánsan ($p < 0.001$) lecsökkentette a KYNA (0.74), az SZR72 (0.51) és az MK-801 (1.04) kezelés. Szignifikáns ($p < 0.01$) különbséget detektáltunk továbbá az SZR72- és az MK-801 kezelt ES-TRIG csoportok között.



Ábra 6. Az ES-TRIG indukálta preproPACAP relatív optikai denzitás változás a TNC-ben. A: kontroll csoport B: fiziológiai sóoldat kezelt ES-TRIG csoport C: KYNA kezelt ES-TRIG csoport D: SZR72 kezelt ES-TRIG csoport E: MK-801 kezelt ES-TRIG csoport *** $p < 0.001$ vs. kontroll csoport. ### $p < 0.001$ vs. fiziológiai sóoldat kezelt ES-TRIG csoport, ++ $p < 0.01$ vs. SZR72 kezelt ES-TRIG csoport, átlag \pm SD, $n = 6$.

C.) A KYNA, az SZR72 és az MK-801 kezelés hatása az ES-TRIG indukálta PACAP₁₋₃₈ mRNS overexpresszióra

Az ES-TRIG szignifikáns ($p < 0.05$) PACAP₁₋₃₈ mRNS felszabadulást okozott a TNC-ben (1.16), amelyet a KYNA (0.80), az SZR72 (0.66) és az MK-801 (0.72) kezelés nagymértékben csökkentett. Génexpressziós szinten a kezelt csoportok összehasonlításában nem találtunk jelentős eltérést.



Ábra 7. Az ES-TRIG indukálta PACAP₁₋₃₈ relatív mRNS expresszió változás a TNC-ben. A: kontroll csoport B: fiziológias sóoldat kezelt ES-TRIG csoport C: KYNA kezelt ES-TRIG csoport D: SZR72 kezelt ES-TRIG csoport E: MK-801 kezelt ES-TRIG csoport * $p < 0.05$ vs. kontroll csoport ## $p < 0.01$ vs. fiziológias sóoldat kezelt ES-TRIG csoport. ### $p < 0.001$ vs. fiziológias sóoldat kezelt ES-TRIG csoport, átlag \pm SD, $n = 5$.

MEGBESZÉLÉS

Az elmúlt évek migrén kutatásai a neuropeptidekre fókuszáltak, mint kóroki tényezők és potenciális terápiás alternatívák. A neuronális glutamáterg rendszer kórfolyamatai szintén megfigyelhetőek a primer fejfájásbetegségek patomechanizmusában, ezáltal az NMDA receptoron antagonistá hatást kifejtő KYNA és szintetikus analógjai új terápiás stratégiákat kínálhatnak a migrén kezelésében.

Eredményeink alátámasztják az aktivált TR kialakulásában szerepet játszó centrális neuropeptid felszabadulás elméletét. Munkánkkal igazoltuk, hogy a kísérletes körülmények között kialakított TR aktiváció szignifikáns PACAP₁₋₃₈/preproPACAP és CGRP felszabadulást okoz a TNC-ben.

Az orofaciális CFA modellben szimultán jelentkező centrális neuropeptid expresszió 72 órával a kezelést követően platózott. Ebben a modellben a neuropeptidok TNC-ben mért koncentrációjának emelkedésével egyidőben, szignifikánsan megnőtt az allodynia mértéke mind a kezeletlen, kontralaterális oldalhoz, mind a kezelt oldalon mért kontroll méréshez képest. Utóbbi változások összefüggése felhívja a figyelmet a neuropeptidok fontosságára a mechanikai hiperalgészia kialakulásában és súlyosbodásában.

Az ES-TRIG modellben szignifikáns preproPACAP/PACAP₁₋₃₈ expresszió emelkedést tudunk kimutatni mind proteom, mind transzkriptóm szinten. A KYNA, az SZR72 és az MK-801 kezelés képes volt az ES-

TRIG által indukált PACAP₁₋₃₈/preproPACAP overexpresszió gátlására. További figyelemreméltó eredménye ezen vizsgálatoknak, hogy szignifikáns különbség mutatkozott az SZR72 és az MK-801 kezelt ES-TRIG csoportok között, amely arra utalhat, hogy a nem-NMDA típusú rendszereknek (AMPA, kainát, aril-hidrokarbon, GPR35, opiát stb.) is jelentősége lehet a KYNA-analógok hatásmechanizmusában illetve a migrén kialakulásában.

KÖVETKEZTETÉS

Eredményeink szolgáltatják az első direkt bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy a CFA indukálta TR aktiváció szimultán CGRP és PACAP felszabadulást okoz a TNC-ben. A neuropeptid koncentráció változása és a mechanikai hiperalgésia között feltárt korreláció a vizsgált fehérjék allodiniában betöltött szerepére reflektál.

Munkánkkal elsőként igazoltuk továbbá, hogy az NMDA receptoron antagonistá hatást kifejtő vegyületek alkalmazása képes a TR aktiváció által indukált PACAP overexpresszió gátlására. Jelentős különbséget detektáltunk az SZR72 és az MK-801 kezelés hatékonysága között, amely felveti új terápiás célpontok azonosításának lehetőségét.

Eredményeink által közelebb kerülhetünk a migrén patomechanizmusának precízebb megismeréséhez, amely segítségünkre lehet a jövőbeni migrén terápia hatékonyságának növelésében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni őszinte hálámat témavezetőmnek Prof. Dr. Tajti Jánosnak kutatómunkám koordinálásáért, szakmai iránymutatásáért.

Köszönettel tartozom továbbá Prof. Dr. Vécsei Lászlónak, aki mindvégig támogatta a munkámat és lehetőséget adott arra, hogy a klinikán dolgozhassak.

Szeretném megköszönni közvetlen munkatársamnak, Dr. Tuka Bernadettnek azt a szakmai és erkölcsi támogatást, amit az évek alatt felém tanúsított. Sokat tanított nekem a tudományos gondolkodásmódról, valamint az idegtudományról.

Végül de nem utolsósorban köszönöm családomnak és menyasszonyomnak a szeretetüket és támogatásukat, amely nélkül ez a munka nem tudott volna megvalósulni.

A Ph.D. téziszhez kapcsolódó közlemények listája:

I. **Körtési Tamás**, Tuka Bernadett, Tajti János, Bagoly Teréz, Fülöp Ferenc, Helyes Zsuzsanna, Vécsei László. Kynurenic Acid Inhibits the Electrical Stimulation Induced Elevated Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Expression in the TNC. *Frontiers in Neurology*. 2018 Jan 16;8:745. *Impact Factor: 2.635, Citation:6*

II. **Körtési Tamás**, Tuka Bernadett, Nyári Alíz, Vécsei László. Tajti János. The effect of orofacial complete Freund's adjuvant treatment on the expression of migraine-related molecules. *Journal of Headache and Pain*. 2019 Apr 29;20(1):43. *Impact Factor: 3.918, Citation: 0*

A Ph.D. téziszhez kapcsolódó közlemények kumulatív impakt faktora: **6.553**

A Ph.D. tézishez közvetlenül nem kapcsolódó közlemények listája:

I. Tuka Bernadett, Szabó Nikolett, Tóth Eszter, Kincses Zsigmond Tamás, Párdutz Árpád, Szok Délia, **Körtési Tamás**, Bagoly Teréz, Helyes Zsuzsanna, Edvinsson Lars, Vécsei László, Tajti János. Release of PACAP-38 in episodic cluster headache patients - an exploratory study. *Journal of Headache and Pain*. 2016 Dec;17(1):69. Impact factor: 3.580 Citation: 35

II. Cseh Edina Katalin, Veres Gábor, **Körtési Tamás**, Polyák Helga, Nánási Nikolett, Tajti János, Párdutz Árpád, Klivényi Péter, Vécsei László, Zádori Dénes. Neurotransmitter and tryptophan metabolite concentration changes in the CFA model of orofacial pain. *Journal of Headache and Pain*. Publishing under process. Impact factor: 3.580 Citation: 0

A Ph.D. tézishez közvetlenül nem kapcsolódó közlemények kumulatív impakt faktora: **7.160**

Összesített impakt faktor: **13.713**