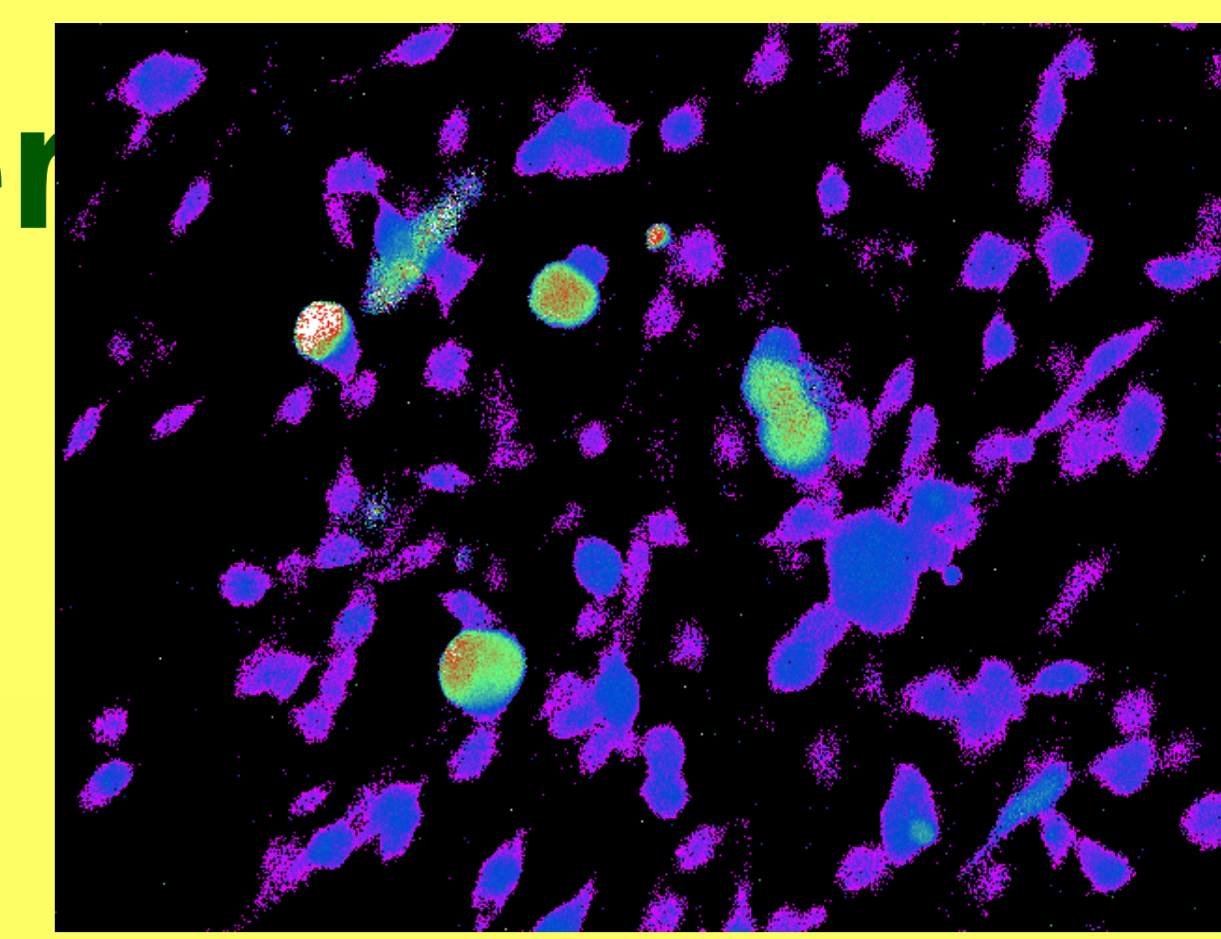


2/a. ábra

A PAC1, VPAC1/VPAC2 receptorok hatása a primer szenzoros ganglionsejteken és perifériás idegvégződésein



2/b. ábra

Bánki E¹, Szőke É², Csanaky K¹, Börzsei R², Bagoly T², Reglődi D¹, Helyes Zs²

¹Anatómiai Intézet, PTE-MTA Lendület PACAP Kutatócsoport, ²Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet, Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Bevezetés

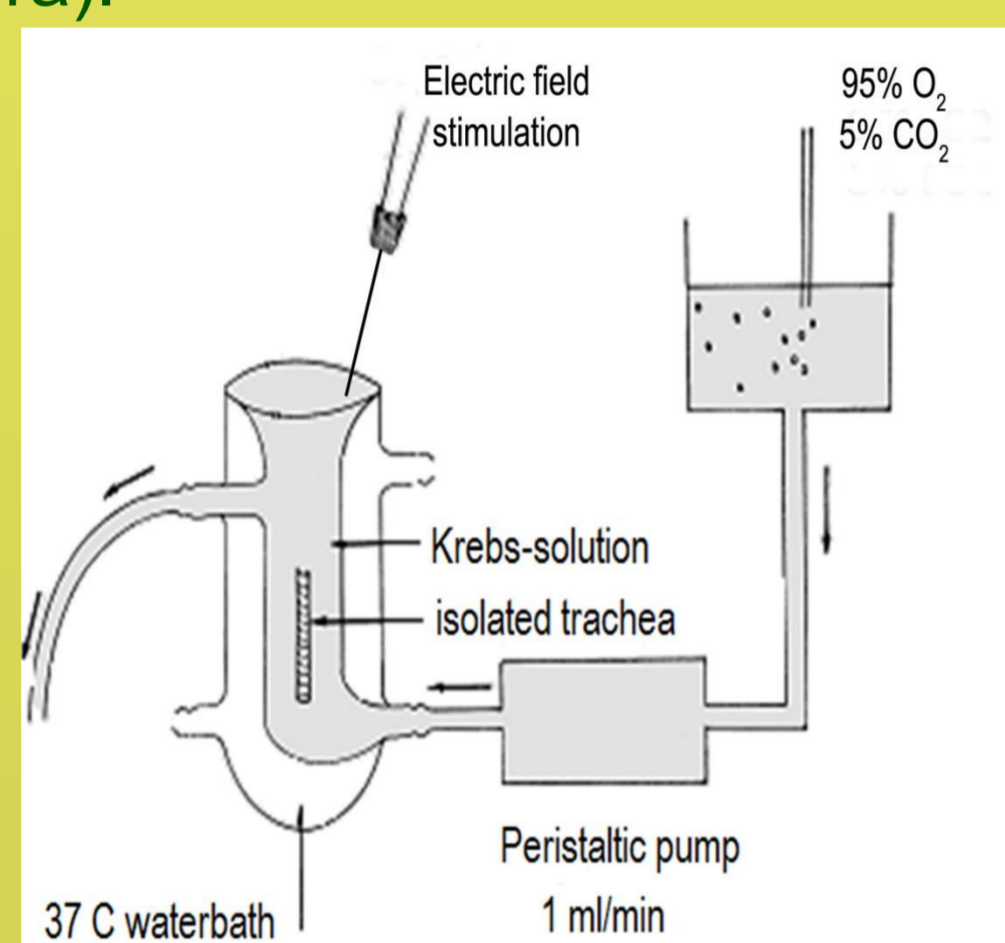
A PACAP1-38 (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) egy neurotrofik és neuroprotektív hormon, a VIP/glukagon/szekretin peptid család tagja. Receptorális hatásait G-proteinhez kötött receptorokon feje ki, specifikus receptora a PAC1 receptor, míg a VPAC1/VPAC2 receptorok egyforma affinitással kötik a VIP 1-28-at (vazoaktív intesztinális polipeptid) és a PACAP-ot. A PACAP6-38 ismert PAC1/VPAC2 antagonistá (Laburthe et al. 2007, Monaghan et al. 2008), a VIP6-28 pedig számos kísérletben alkalmazott VIP-antagonista. A maxadilan szelektív PAC1 receptor agonista, míg ugyanezen peptid fragmentuma, a MAXA65, specifikus PAC1 antagonistá. Az Ala^{11,22,28}VIP szelektív VPAC1 agonista, a BAY 55-9837 pedig szelektív VPAC2 agonista.

Korábbi kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy meglepő módon mind a PACAP1-38, mind pedig a PACAP 6-38 szignifikánsan csökkenti az elektromos tér által kiváltott neuropeptid-felszabadulást izolált patkány tracheák szenzoros idegvégződéseiből (Reglodi et al. 2006, 2008).

Jelen kísérletünk célja különböző PACAP receptor agonisták és antagonisták szenzoros idegvégzések működésére gyakorolt hatásának vizsgálata volt *in vitro* körülmények között.

Módszerek

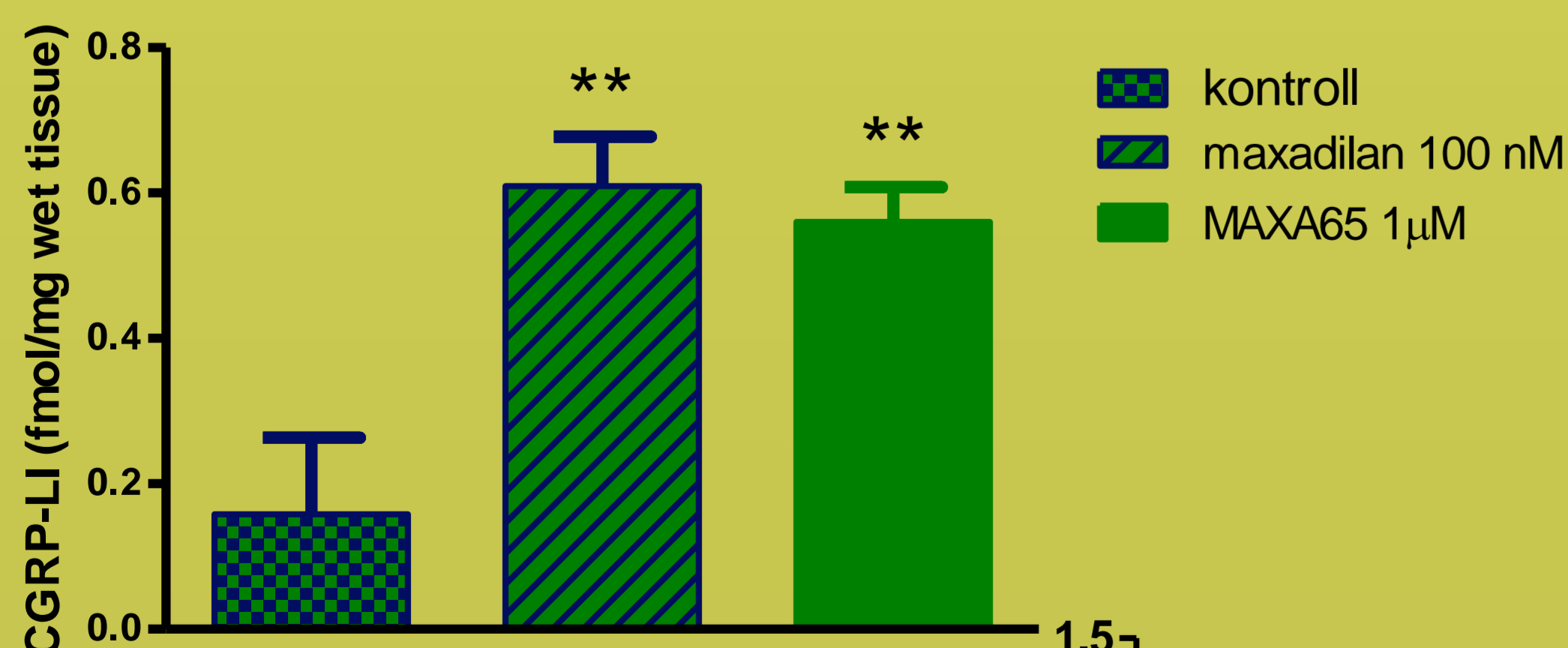
1. A patkányok tracheáját eltávolítottuk, majd 37°C-on oxigenizált Krebs oldatban 1 órán át inkubáltuk. Az inkubációt követően háromszor nyolcperces (prestimulált, stimulált és posztstimulált) frakciókat gyűjtöttünk. A második, stimulációs fázisban a tracheákat a vizsgálni kívánt agonisták (100nmol), valamint antagonisták (0,1µmol) oldatával kezeltük. A szenzoros neuropeptid-felszabadulás serkentésére elektromos stimulációt (EFS, 40 V, 0.1 ms, 10 Hz, 2perc) alkalmaztunk. A frakciók CGRP-tartalmát radioimmunoassay (RIA) módszer segítségével mértük, az értékeket fmol/mg tömeg formában fejeztük ki (1. ábra).
2. A trigeminus ganglionsejt-tenyészetben a sejtek intracelluláris kalciumion szintjét ([Ca²⁺]_i) mikrofluorometriás módszer segítségével mértük. Vizsgálatainkhoz patkány trigeminus ganglion (TRG) primer sejt kultúrákat használtunk, melyeket előkészítés után fluoreszcens Ca²⁺ indikátor festékkel, fura-2-AM-mal jelöltünk. Alternálón váltakozó 340 és 380 nm hullámhosszúságú fényvel világítottuk meg, majd az 510nm-nél nagyobb hullámhosszúságú emittált fényt mértük. A 340-380 nm alternációját monitoroztuk (2/a,b ábra).



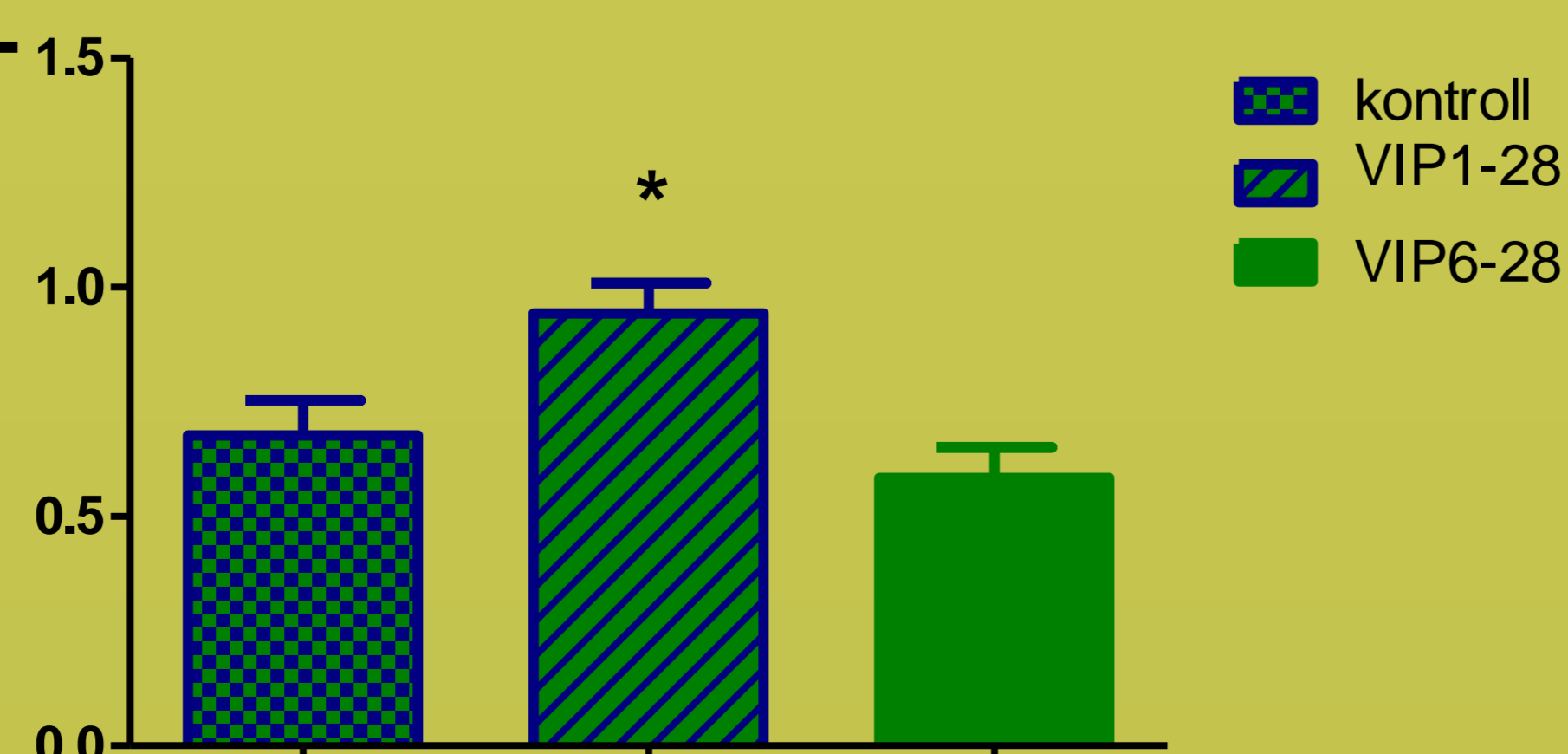
1. ábra

Eredmények

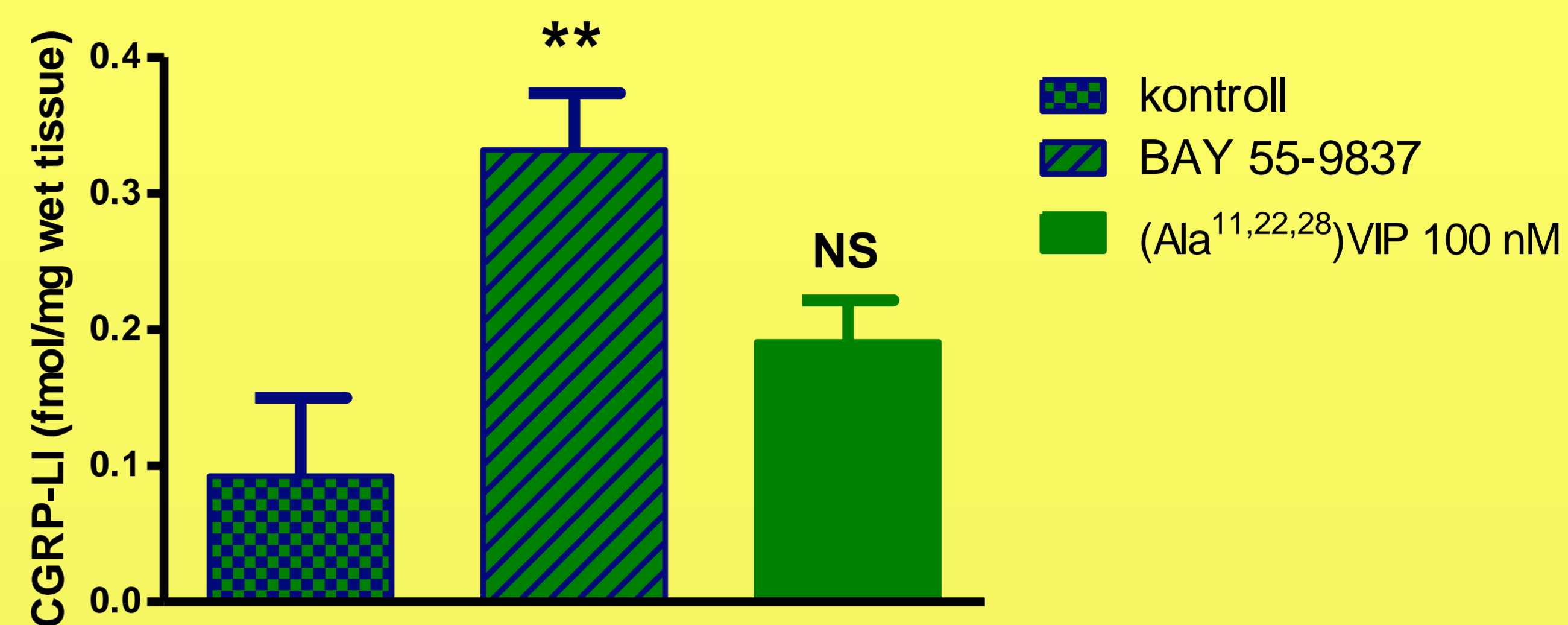
1. A tracheában a PACAP1-38 és PACAP6-38 esetén hasonló gátló hatást tapasztaltunk. A maxadilan, a MAXA65, a VIP1-28 és a BAY 55-9837 ezzel szemben serkentette a szenzoros neuropeptid-felszabadulást az idegvégzésekéből. A maxadilan esetében 80%-os, a MAXA65-nél 67%-os, míg BAY 55-9837 hatására 233%-os volt a CGRP-szint növekedése. A VIP6-28 és az Ala^{11,22,28}VIP nem befolyásolta a folyamatot (2,3,4. ábra).



2. ábra



3. ábra



4. ábra

2. A ganglionsejteken a G-proteinhez kapcsolt receptor-aktivációnak köszönhetően lassan emelkedő kalciumszintet regisztráltunk mind PACAP1-38 and PACAP6-38, valamint ezek együttes adása esetén.

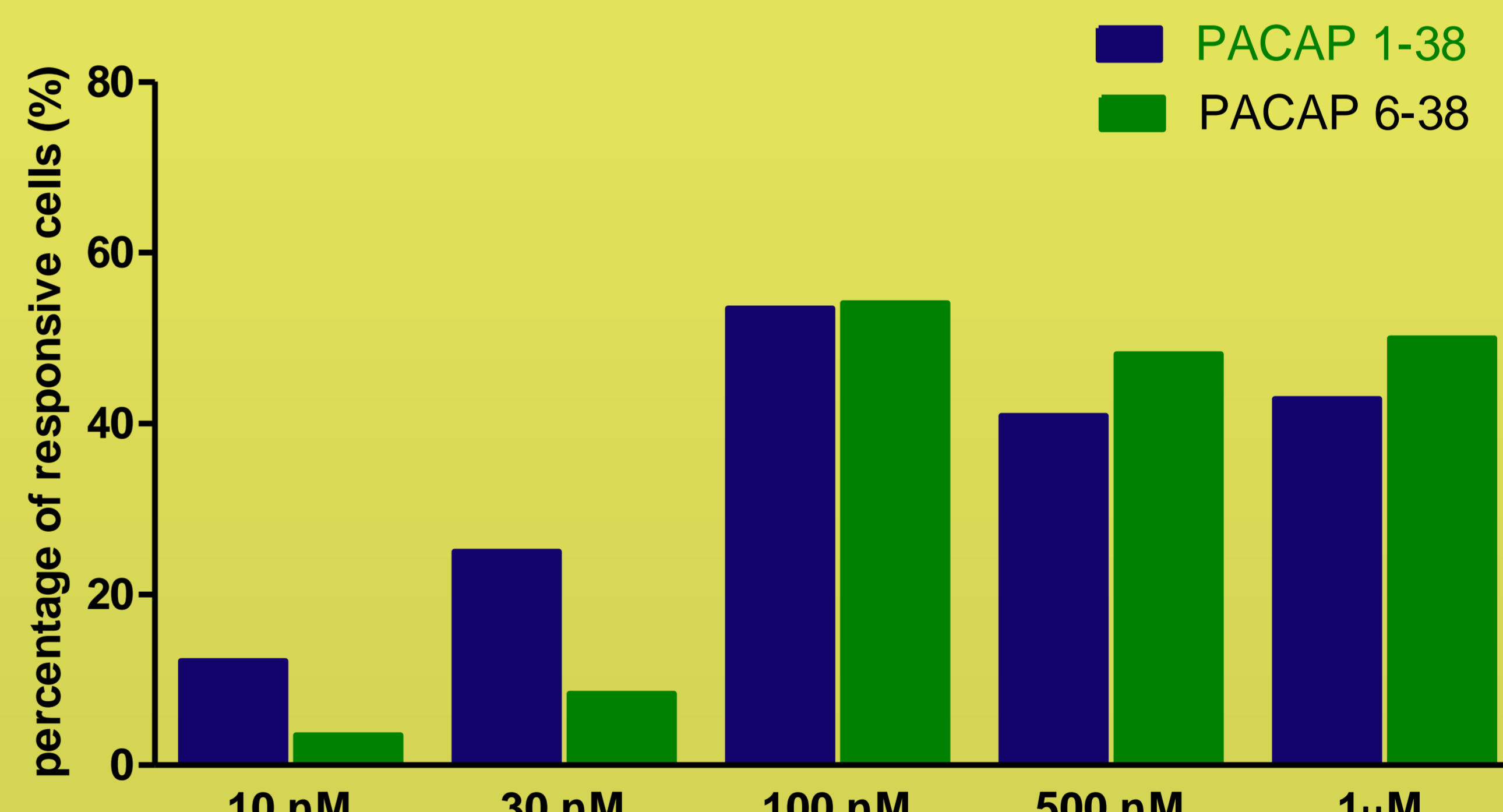
A PACAP1-38 10nM oldatára a neuronok 12,9% reagált, 30nM esetén 25%, 100 nM esetén 53,47%, 500nM esetén 40,9%, míg 1 µM esetén pedig 42,85%. Hasonló eredményeket tapasztaltunk a PACAP6-38 adását követően, melyek a következőképp alakultak: 3,5%, 8,3%, 54,08%, 48,14% and 50%. (5. ábra)

Ugyanezen peptidok együttes adása esetén (100nM) a neuronok 60%-ában detektáltunk fluoreszcencia-fokozódást.

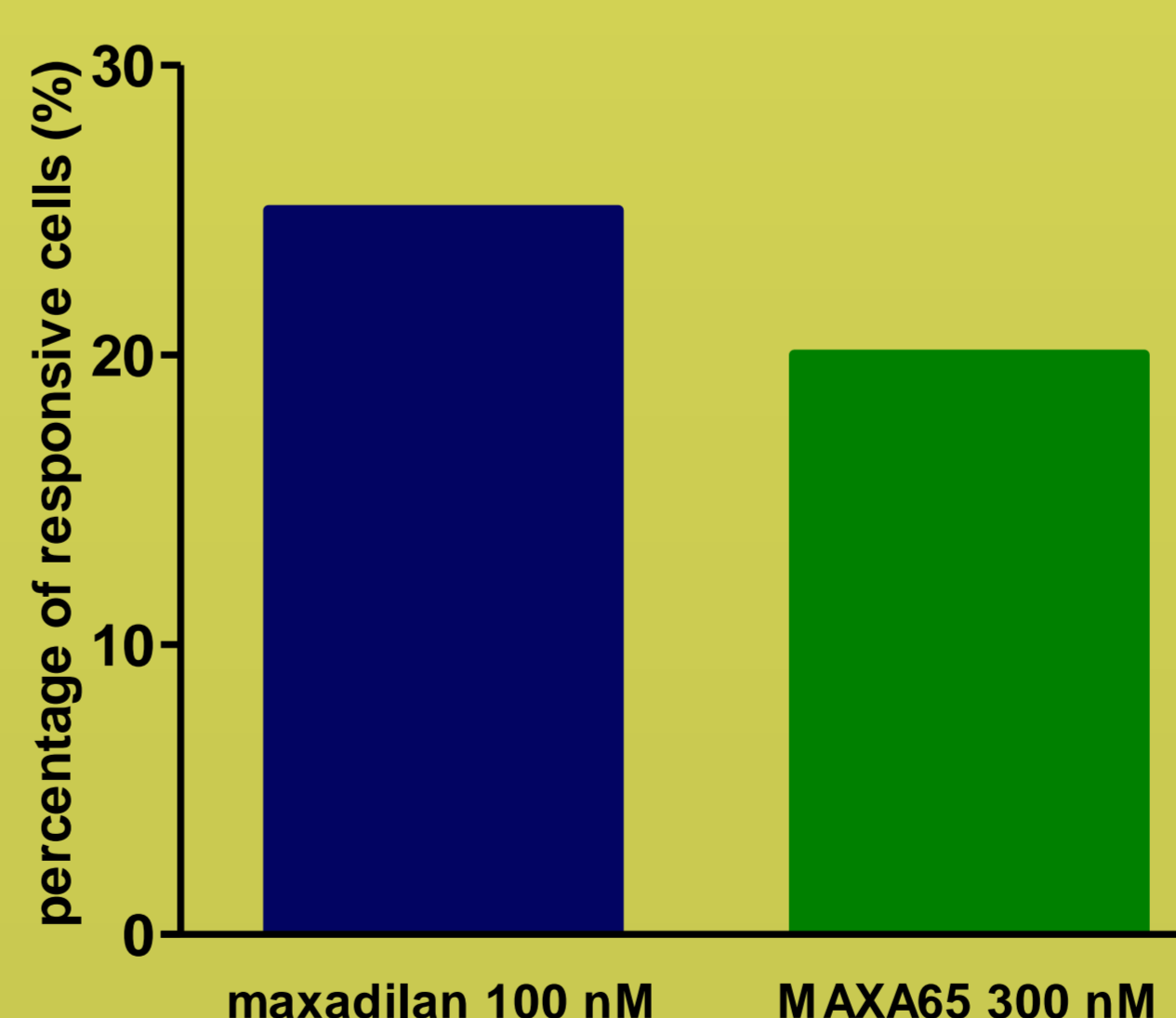
A szelektív PAC1 receptor agonista maxadilan és antagonistá MAXA65, valamint együttes adásuk esetén szintén hasonló hatásokat tapasztaltunk. A maxadilan 100nM koncentrációjú oldatának hatására a neuronok 25%-ában figyeltünk meg a G-proteinhez kapcsolt receptorra jellemző lassú Ca²⁺-beáramlást, míg a 300nM MAXA65 esetében a ganglionsejtek 20%-ában, együttes alkalmazásuk esetén a sejtek 22%-ában tapasztaltunk fluoreszcencia fokozódást. (6. ábra)

Szintén hasonló hatásokat figyeltünk meg a VPAC2 receptor szelektív agonista BAY 55-9837 alkalmazása esetén, a sejtek 33,7%-ában emelkedett a Ca²⁺-beáramlás.

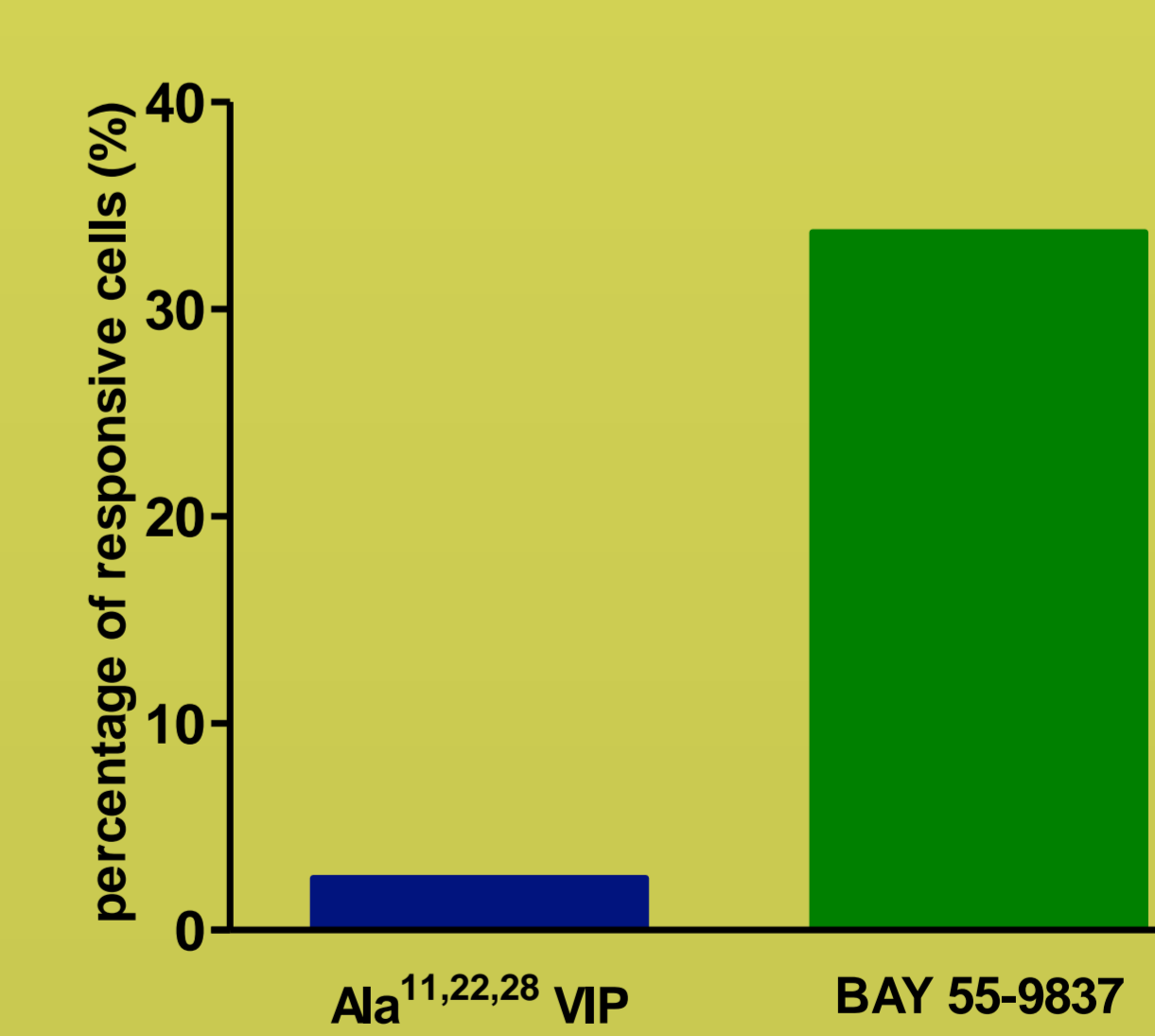
Az előzőekkel ellentétben a VPAC1 receptor agonista Ala^{11,22,28}VIP nem befolyásolta a Ca²⁺-influxot. (7. ábra)



5. ábra



6. ábra



7. ábra

Következtetés

A megfigyelt PACAP receptor agonista és antagonistá hatás pontos molekuláris mechanizmusának felderítése további vizsgálatokat igényel, feltehetően egy új, eddig nem ismert receptor vagy nem receptorális hatás lehet felelős ezen különleges, nem várt hatásokért.

Support: OTKA K72592, SROP-4.2.2/B-10/1-2010-0029, SROP 4.1.2.B-10/2/KONV-20/0-0002, MTA Lendület program