

# **Az endokannabinoidok és a kinureninek szerepe a migrénben: állatkísérletes adatok**

Nagy-Grócz Gábor

Ph.D. értekezés tézisei

**Szeged**

**2017**

**Az endokannabinoidok és a kinureninek szerepe a  
migrénben: állatkísérletes adatok**

Nagy-Grócz Gábor

Ph.D. értekezés tézisei

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

Témavezető: Dr. Párdutz Árpád

Szeged

2017

**A Ph.D. értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó eredeti közlemények:**

**I. Nagy-Grócz G,** Tar L, Bohár Z, Fejes-Szabó A, Laborc KF, Spekker E, Vécsei L, Párdutz Á.

*The modulatory effect of anandamide on nitroglycerin-induced sensitization in the trigeminal system of the rat*

Cephalalgia. 2016 Aug;36(9):849-61. doi: 10.1177/0333102415613766.

**IF: 3,609**

**II. Nagy-Grócz G,** Laborc KF, Veres G, Bajtai A, Bohár Z, Zádori D, Fejes-Szabó A, Spekker E, Vécsei L, Párdutz Á.

*The effect of systemic nitroglycerin administration on the kynurenine pathway in the rat*

Frontiers in Neurology. 2017 Jun;8:278. doi: 10.3389/fneur.2017.00278

**IF: 3,552 (2016)**

**A kapcsolódó közlemények impakt faktora: 7,161**

**A Ph.D. értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:**

**Nagy-Grócz G,** Zádor F, Dvorácskó S, Bohár Z, Benyhe S, Tömböly C, Párdutz Á, Vécsei L.

*Interactions between kynurenines and endocannabinoids with special emphasis on migraine*

Int. J. Mol. Sci. 2017;18:1617. doi:10.3390/ijms18081617.

**IF: 3,226 (2016)**

**Nagy-Grócz G,** Bohár Z, Fejes-Szabó A, Laborc F. K, Spekker E, Tar L, Vécsei L, Párdutz Á.

*Nitroglycerin increases serotonin transporter expression in rat spinal cord but anandamide modulated this effect*

J Chem Neuroanat. 2017 Jun 15;85:13-20. doi: 10.1016/j.jchemneu.2017.06.002. [Epub ahead of print]

**IF: 1,925 (2016)**

Tajti J, Szok D, **Nagy-Grócz G**, Tuka B, Petrovics-Balog A, Toldi J, Vécsei L.  
*Kynurenines and PACAP in migraine: medicinal chemistry and pathogenetic aspects*  
Curr Med Chem. 2017 Feb 27. doi: 10.2174/0929867324666170227115019. [Epub ahead of print]

**IF: 3,249 (2016)**

Veres G, Fejes-Szabó A, Zádori D, **Nagy-Grócz G**, László M. A, Bajtai A, Mándity I, Szentirmai M, Bohár Zs, Laborc F. K, Szatmári I, Fülöp F, Vécsei László, Párdutz Á.  
*A comparative assessment of two kynurenic acid analogs in the formalin model of trigeminal activation: a behavioral, immunohistochemical and pharmacokinetic study*  
J Neural Transm. 2017 Jan;124(1):99-112. doi: 10.1007/s00702-016-1615-5.

**IF: 2,392 (2016)**

Bohár Z, **Nagy-Grócz G**, Fejes-Szabó A, Tar L, László AM, Büki A, Szabadi N, Vraukó V, Vécsei L, Párdutz Á.  
*Diverse effects of Brilliant Blue G administration in models of trigeminal activation in the rat.*  
J Neural Transm. 2015 Dec;122(12):1621-31.

**IF: 2,587**

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. 2015;14(3):350-9.

**IF: 2,188**

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 Á, 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. doi: 10.1007/s00702-013-1146-2.

**IF: 2,402**

**A Ph.D. értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó közlemények összesített impakt faktora: 17,968**

**Összesített impakt faktor: 25,129**

## Bevezetés

A migrén egy krónikus neurológiai betegség, melyet visszatérő fejfájásrohamok jellemeznek. A rohamok gyakran járnak együtt hányingerrel, fény-és hangkerüléssel. A kórkép a teljes népesség közel 16%-át érinti és gyakorisága háromszor magasabb nőkben, mint férfiakban.

A migrénes betegek egészségügyi összköltségei Európában 18,4 milliárd eurót tettek ki 2010-ben.

Mára már ismert, hogy a migrénes roham háttérében lényeges szerepe van a trigeminális rendszer aktiválódásának és szenzitációjának. A perifériás trigeminális rostok folyamatos aktivációja váltja ki a perifériás szenzitizációt, amely klinikailag a lüktető fájdalomban nyilvánul meg, ami fizikai aktivitásra romlik. A hosszantartó perifériás nociceptív izgalom vezet a centrális szenzitizáció kialakulásához, melynél a másodlagos és harmadlagos nociceptorok receptív mezeje megnő és már nem fájdalmas stimulusra is aktiválódnak. Ez a jelenség klinikailag az allodyniában nyilvánul meg, ami a nem fájdalmas ingerek fájdalomként való megélését jelenti.

Az intenzív kutatások ellenére, a migrén pontos kialakulása nem teljesen ismert, de a glutamátnak fontos szerepet tulajdonítanak, mert részt vesz a trigeminális nociceptív aktiváció több szintjén. Az egyik, a szervezetben is előforduló glutamát receptor antagonist a kinurénsav (KYNA), amely a kinurenin-útvonal során keletkezik.

A KYNA egy neuroprotektívnek tartott molekula, amely a glutamát, az aril hidrokarbon és a G-fehérje kapcsolt receptor 35-ös receptorokon keresztül fejt ki a hatását. Számos kutatás bizonyítja, hogy a KYNA és az analógjai képesek fájdalomcsökkentő hatást kifejteni több migrén modellben is, feltehetően a trigeminális rendszer aktivációjának és szenzitizációjának gátlásán keresztül. A kinurenin-útvonal első lépése a triptofán átalakítása N-formil-L-kinureninné a triptofán 2,3-dioxigenáz (TDO2) és az indolamin 2,3-dioxigenáz (IDO1,2) enzimek segítségével. Az N-formil-L-kinurenin a formamidáz enzimmel alakul át L-kinureninné (L-KYN). Az L-KYN-ből keletkezik KYNA, amelyet a kinurenin aminosztransferáz enzimek (KAT) katalizálnak. Továbbá 3-hidroxi-kinurenin az L-kinurenin 3-monooxigenáz (KMO) enzim segítségével, illetve antranilsav az L-kinurenin hidrolázzal (KYNU).

A fájdalom állatkísérletes modelljeiben megfigyelték az endokannabinoid molekulák szintjének változásait az idegrendszerben, amely kapcsolatban állhat a fájdalom kialakulásával és a fájdalom csökkenésével. Az N-arachidonylethanolamid, más néven

anandamid (AEA) az elsőként felfedezett endokannabinoid molekula, amely agonistaként hat a kannabinoid receptorokon és a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) receptoron. Egyre több tanulmány bizonyítja, hogy a nitroglicerín (NTG) képes aktiválni és szenzitizálni a trigeminális rendszert. Az NTG egyik mellékhatása az azonnal jelentkező fejfájás, amely a nitrogén-oxid (NO) értágító hatásával magyarázható. Ezt egy átlagban négy órával később megjelenő típusos aura nélküli migrénes roham követi a migrénes betegekben, mely azonban már nem magyarázható az NO értágító hatásával. Az NO migrénben betöltött szerepét mutatja az is, hogy a nitrogén-oxid szintáz (NOS) gátlók képesek csökkenteni a migrént a betegek 67%-ában.

Ismert, hogy az AEA képes csökkenteni az NTG által kiváltott hiperalgéziát és a c-Fos expressziót a kaudális trigeminális mag (TNC) területén patkányokban, mely arra utal, hogy az AEA szabályozza a trigeminális rendszer aktivációját.

A TRPV1 egy nem szelektív kation csatorna, amelyet többek között a hő és a vanilloidok aktiválnak. Megtalálható a gerincvelőben és a fájdalmat kiváltó kémiai és fizikai stimulusok molekuláris integrátoraként tartják számon. Az NO képes aktiválni a TRPV1-et, így megemeli a sejten belüli kalcium koncentrációt különböző sejtípusokban, tehát a TRPV1 befolyásolható az NO-al.

Az NO argininből keletkezik a NOS segítségével, amelynek a neuronális formája (nNOS) a legfontosabb szereplő a fájdalom és a szenzitizációs folyamatok létrejöttében, és jelen van a trigeminális rendszerben. Az NO donor molekulák egy önerősítő folyamatot indítanak el a trigeminális rendszer rostjain megemelkedő NO szintjén keresztül, amely a centrális szenzitizáció kialakulásához vezethet. A nukleáris faktor kappá  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ )-nek fontos szerepe van a különböző gyulladási folyamatokban, hiszen számos gén szabályozását irányítja. Több tanulmány bizonyítja, hogy a gyulladási citokinek, amelyeket az NF- $\kappa\beta$  befolyásol, hozzájárulnak a fájdalom és a hiperalgézia kialakulásához. A ciklooxygenáz-2 (COX-2) szintén megtalálható a gerincvelő hátsó szarvában, és fontos szerepe van a fájdalom kialakulásában. Gao és Duan kimutatta, hogy a COX-2 expresszió megemelkedett a TNC-ben az orofaciális területet ért fájdalmas stimulus után.

## Célkitűzések

A jelen vizsgálatokkal célunk volt:

1. Megvizsgálni a kannabinoid agonista AEA hatását az NTG által kiváltott szenzitizációs markerek (TRPV1, nNOS, NF- $\kappa$ B, COX-2) expressziós szintjeire.
2. Továbbá feltárni az NTG lehetséges hatását a kinurenin-útvonal fontos enzimeire (TDO2, IDO1, KAT-II, KYNU, KMO).

## Anyagok és módszerek

A kísérletek elvégzését a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (I-74-14-16/2008; I-74-12/2012) és a Csongrád Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága engedélyezte (XI./15.1/02384/001/2007; XXIV/352/2012). Vizsgálatainkban 54 darab felnőtt hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk.

### Szenzitizációs markerek vizsgálata

A kísérletben felhasznált 44 patkányt négy csoportra osztottuk (n=6 csoportonként az immunohisztokémiai vizsgálatokhoz és n=5 a Western blothoz).

Az első csoport állatai intraperitoneális (i.p.) fiziológiás sóoldat injekciót (placebo) kaptak kezelésként. A második csoportban a patkányok i.p. NTG (10 mg/kg, Pohl Boskamp) kezelést kaptak.

A harmadik és negyedik csoport állatainak i.p. AEA injekciót adtunk, majd 30 perc múlva i.p. placebo, vagy NTG kezelést kaptak. A placebo, ill. NTG kezelés után egy órával újabb i.p. AEA (5 mg/kg) kezelést alkalmaztunk.

### Kinurenin-útvonal enzimeinek vizsgálata

A kísérletben felhasznált 10 patkányt két csoportra osztottuk. Az első csoport állatai i.p. fiziológiás sóoldat injekciót (placebo) kaptak kezelésként. A második csoportban a patkányok i.p. NTG (10 mg/kg, Pohl Boskamp) kezelést kaptak.

### Immunhisztokémia

A placebo/NTG kezelések után négy órával az állatokat mély klorál-hidrát altatásban perfundáltuk. Az így fixált állatokból a gerincevelő cervikális szakaszát az obextől számítva a (-5)-(-11) mm-es szakaszon eltávolítottuk a TRPV1, nNOS és NF- $\kappa$ B immunhisztokémiai festések céljából.



A megfestett metszeteket Zeiss AxioImager M2 fénymikroszkóp (Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY, USA) 20x-es nagyítású objektíve alatt lefényképeztük (AxioCamMRc (Carl Zeiss MicroImaging) (Pixelink, Ottawa, ON, Canada)).

A TRPV1 immunreaktív rostok által lefedett területet, az nNOS és az NF- $\kappa$ B pozitív sejteket az Image Pro Plus 6.1 (Windows XP, Media Cybernetics Inc. Silver Spring, USA) programmal mértük.

### **Western-blot**

Az állatokat mély klorál-hidrát altatásban transzkardiálisan perfundáltuk, majd a nyaki C1-C2 gerincvelői szegmentumokat az obextól számítva (-5)-(-11) mm-es szakaszon, valamint a TNC-t az obextól caudalisan 1 és (-5) mm között eltávolítottuk. A mintákat lefagyasztottuk, majd a későbbiekben nNOS, COX-2,  $\beta$ -actin, TDO2, IDO1, KAT-II, KYNU, KMO és gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) Western blot vizsgálatot végeztünk.

## **Eredmények**

### **Immunhisztokémia**

A nyaki gerincvelő transzverzális metszetein nagy mennyiségű TRPV1-immunreaktív rostokat, nNOS-immunreaktív neuronokat és NF- $\kappa$ B-pozitív sejteket találtunk a hátsó szarv felszíni rétegeiben. Nem találtunk eltérést a metszet jobb és bal oldala között, sem pedig a rostrocaudalis tengely mentén, a TNC és a C1-C2 magasságok között.

Az NTG kezelés hatására a TRPV1-immunreaktív rostok által lefedett terület szignifikánsan nőtt a placebo csoporthoz képest ( $p < 0,05$ ). Továbbá az NTG megemelte az nNOS-immunreaktív sejtek által lefedett terület nagyságát és az NF- $\kappa$ B-pozitív sejtek térfogsűrűségét a kontroll csoporthoz képest ( $p < 0,01$ ), ( $p < 0,05$ ).

Az AEA előkezelés a TRPV1-immunoreaktív rostok által fedett területet csökkentette ( $p < 0,05$ ), valamint az nNOS-immunreaktív neuronok által lefedett terület nagysága is csökkent ( $p < 0,001$ ). Az NF- $\kappa$ B-pozitív sejtekben is csökkenés volt megfigyelhető az AEA kezelés után ( $p < 0,05$ ).

### **Western blot**

A nyaki gerincvelő nNOS Western blot vizsgálata megerősítette az immunhisztokémiai eredményeket. Az nNOS fehérje (155 kDa) expressziót az NTG képes volt szignifikánsan

megemelni ( $p < 0,01$ ) a C1-C2 magasságában a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ezt a hatást az AEA csökkenteni tudta ( $p < 0,05$ ).

A COX-2 fehérje (68 kDa) expressziós vizsgálata azt mutatta, hogy az NTG megemeli a fehérje expresszióját a C1-C2-es szegmentumban ( $p < 0,01$ ). Az AEA kezelés képes volt az NTG hatását csökkenteni ( $p < 0,01$ ).

A TDO2 fehérje (50 kDa) Western blot vizsgálatának statisztikai elemzése igazolta, hogy az NTG csökkenti a fehérje expressziót a TNC-ben ( $p < 0,05$ ) a kontroll csoporthoz képest.

Hasonló eredményt kaptunk az IDO1 (45 kDa) vizsgálata során is. Az IDO1 fehérje expressziója szignifikánsan csökkent 4 órával az NTG beadása után ( $p < 0,05$ ).

A KAT-II fehérje (60 kDa) esetében a Western blot vizsgálat azt mutatta, hogy a fehérje mennyisége csökkent az NTG beadását követően ( $p < 0,05$ ).

A KYNU fehérjét 35 kDa-os magasságban vizsgáltuk. A TNC-ben a NTG injekció után 4 órával csökkent fehérje expressziót tapasztaltunk ( $p < 0,05$ ).

Az előzőekkel megegyező hatást váltott ki az NTG a KMO fehérje (56 kDa) esetében is. A KMO fehérje expressziós szintje szignifikánsan kevesebb volt az NTG-el kezelt csoportban ( $p < 0,05$ ).

## **Megbeszélés**

A TRPV1 megtalálható az érző neuronok végződésein a gerincvelő hátsó szarvában és kolakizáltan jelenik meg a kannabinoid 1-es típusú receptorokkal. Kísérletes eredmények arra engednek következtetni, hogy a TRPV1 részben hozzájárul a perifériás szenzitizáció, az allodynia és a hyperalgezia kialakulásához, valamint a receptor gátlásán keresztül a centrális szenzitizációs folyamatok is kivédhetőek. Eredményeink alapján látható, hogy az NTG megemelte a TRPV1 expressziót a gerincvelő C1-C2-es szegmentumaiban patkányokban. A TRPV1 ezek alapján, egy szenzitizációs marker lehet jelen kísérleteinkben.

Korábbi vizsgálatokból ismert, hogy az NO donorok képesek aktiválni a TRPV1-et különböző sejttípusokban, valamint azt is leírták már, hogy a gyulladással járó fájdalom modellekben megemelkedett a receptor expressziója. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az NTG hatása a TRPV1-re elsősorban indirekt lehet. Az NTG által kiváltott neurogén gyulladás és a gyulladással járó anyagok, köztük a szerotonin és a bradykinin a trigeminális rostok ingerlésén keresztül aktiválják a TRPV1-et. A Complete Freund Adjuváns által kiváltott gyulladással járó állatmodellben szintén megemelkedett a TRPV1 mRNS szintje a hátsó gyöki ganglionban, amely azt támasztja alá, hogy a gyulladás megemeli a TRPV1 expresszióját. Összefoglalva

azt feltételezhetjük, hogy az NTG gyulladási folyamatokon keresztül képes aktiválni a TRPV1-et. Másrészt azt is meg kell említenünk, hogy a kalcitonin gén-relációs peptid (CGRP) adásával is növelhető a TRPV1 expresszió patkány trigeminális ganglionban, aminek szintén szerepe lehet az általunk is tapasztalt receptor expresszió növekedésben. Az NTG-ről ugyanis tudjuk, hogy képes megemlíni a CGRP-felszabadulást az A $\delta$  és C rostok aktiválásán keresztül.

Eredményeinkből az is látható, hogy a kannabinoid és TRPV1 receptor agonista AEA gátolta az NTG által kiváltott TRPV1 expresszió emelkedést. A kannabinoid receptorok aktivációja a különböző fájdalom modellekben már hatásosnak bizonyult a fájdalom csökkentésében. Az intratékálisan beadott AEA csökkentette a hő által kiváltott fájdalomválaszt, amely hatást a TRPV1 antagonistákkal megváltoztatták. Ezen kívül, az AEA képes a TRPV1 receptorokat deszenzitizálni vázizom eregekben, ami arra utal, hogy az AEA befolyásolhatja a TRPV1 aktivitását. Másrészt az AEA gátolja a neurogén, a CGRP és az NO által kiváltott durális értágulást is. Nem tudhatjuk pontosan a TRPV1 receptor szerepét az AEA által szabályozott szenzitizációs folyamatokban, de az irodalmi adatok alapján azt gondoljuk, hogy a kannabinoid 1 receptornak fontosabb szerepe van a szenzitizációban mint a TRPV1-nek.

Kísérleti adatok alapján ismert, hogy az nNOS fontos résztvevője a fájdalomérzésnek, és a szenzitizációs folyamatban betöltött szerepét is intenzíven kutatják. Jelen vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy az NTG megemlíti az nNOS expresszióját a gerincvelő C1-C2-es szegmentumaiban, amely összhangban áll korábbi eredményeinkkel. A legjobban elfogadott magyarázat a folyamatra az, hogy az NO aktiválja a kis átmérőjű rostokat a trigeminális rendszerben és megemlíti az nNOS expresszióját a másodlagos neuronokban, amellyel egy öngerősítő folyamatot indít el. Az AEA képes volt gátolni ezt a hatást a kísérleteinkben. Számos tanulmány bizonyította, hogy kapcsolat van az NO és a kannabinoid rendszer között. Az nNOS és kannabinoid 1 receptorok kolokalizációját figyelték meg a gerincvelői neuronok II-es laminájában. Eredményeink összhangban állnak Hillard és munkatársai által kapottakkal, akik azt találták, hogy a kannabinoid 1 agonisták gátolják a KCl-általi nNOS aktivációt kisagyú szemcseséjtekkel készített sejt kultúrában. Emellett Carney és munkatársai leírták, hogy a kannabinoid agonisták leszabályozzák az nNOS fehérje és mRNS szintjét neuronális sejttenyészetben. Adataink arra utalnak, hogy az NTG kialakítja a szenzitizációs folyamatokat, amelyet az AEA képes gátolni, feltehetően az nNOS gátlásán keresztül.

Kísérleteinkben az NTG megemlíti az NF- $\kappa$ B expresszióját a gerincvelő C1-C2-es szegmentumainak hátsó szarvában. Hasonló hatást tapasztaltak Reuter és munkatársai is, akik az NTG infúzió után fokozott NF- $\kappa$ B aktivációt figyeltek meg a dura materben. Jelenleg nem

tisztázott, hogy az NTG hogyan képes aktiválni az NF- $\kappa$ B útvonalat, de talán az NTG direkt neuronális hatásának tudhatjuk be. Nem zárható ki azonban az sem, hogy egy indirekt úton, a durális gyulladáson keresztül váltja ki ezt a hatást. Fontos megemlíteni, hogy a TRPV1 és az nNOS is szerepet játszhat ebben a folyamatban. A TRPV1-en keresztül megvalósuló kalcium beáramlás szabályozhatja a sejtmagi transzlokációt és emelheti az NF- $\kappa$ B aktivitást. Másrészt a megemelkedő nNOS expresszió is okozhat emelkedett NF- $\kappa$ B expressziót. Ezen kívül, Sancho és munkatársai leírták, hogy az AEA gátolja a tumor nekrosis faktor  $\alpha$  indukálta aktivációt a citokin kaszkád gátlásán keresztül, továbbá Tassorelli és munkatársai azt tapasztalták, hogy az NF- $\kappa$ B gátló parthenolide csökkentette az NTG által okozott C-Fos aktivációt a TNC-ben. Ezen eredmények mind arra mutatnak rá, hogy az NF- $\kappa$ B fontos szerepet tölt be az NTG által kiváltott trigeminális aktivációban és szenzitizációban, valamint, hogy a gátlásával szabályozható a fájdalomérzés folyamata.

Az AEA csökkentette az NTG NF- $\kappa$ B expressziót emelő hatását. Az endokannabinoid molekulák egy negatív feedback mechanizmussal szabályozhatják a gyulladós folyamatokat azáltal, hogy leszabályozzák azokat a transzkripciós faktorokat, amelyeknek a gyulladásban szerepük van.

Ismert, hogy az NO okozhat neurogén gyulladást az NF- $\kappa$ B szint emelésével, amely a COX-2 felülszabályozásához is vezethet. Korábban már leírták, hogy a nem szteroid gyulladáscsökkentők sikeresen alkalmazhatóak a migrénes és a tenziós fejfájások kezelésben. Ezen gyógyszerek a hatásukat a COX-enzimek gátlásán keresztül fejtik ki. Állatkísérletes adatok alapján tudjuk, hogy a COX-2-nek fontos szerepe van az NTG által kiváltott trigeminális aktivációban, ill. szenzitizációban. Az indometacin (nem szelektív COX gátló) és az NS398 (szelektív COX-2 gátló) előkezelés alkalmas az NTG által okozott c-Fos, nNOS és kalmodulin-függő protein kináz II  $\alpha$  expresszió változásokat gátolni TNC-ben. Tassorelli és munkatársai leírták a COX-2 expressziójának emelkedését NTG adása után a hipotalamuszban és az agytörzsben, így az NTG által kiváltott neuronális aktiváció egyik közvetítőjének tartható.

Fontos megemlíteni, hogy az AEA a COX-2 egyik szubsztrátja, amelyből prosztaglandint és etanolamidot képez. Vizsgálatunkban azt tapasztaltuk, hogy az AEA csökkentette az NTG által megemelt COX-2 expressziót. Azt feltételezzük, hogy ezt egy negatív feedback mechanizmussal tehette, de az is elképzelhető, hogy az AEA lebontása során keletkező metabolitok alulszabályozták a COX-2 expressziót. Mivel az AEA csökkenti a citokinek által kiváltott folyamatokat és a gyulladós molekulák szintjét, így az sem zárható ki, hogy a gyulladós folyamatokon keresztül szabályozza le a COX-2 expresszióját.

Jelen munkánkban az NTG képes volt csökkenteni a kinurenin-út vonal enzimeinek expresszióját a TNC-ben és a gerincvelő C1-C2-es szakaszán. Ezek alapján azt mondhatjuk, hogy az enzimek változásának szerepe van a trigeminális aktivációban.

Korábbi vizsgálatok alapján tudjuk, hogy az NO képes a kinurenin-út vonalat befolyásolni. Az NO gátolja azIDO expressziót az enzim aktív kötőhelyéhez kötődve makrofágokban, ill. azIDO aktivitása is alulszabályozható az NO-al csontvelősejtekben. Másrészt a KMO expressziója befolyásolja az NO keletkezését humán HEK293 sejtekben. Emellett, Backhaus és munkatársai tömegspektrometriás vizsgálataikban leírták, hogy direkt kapcsolat van néhány kinurenin metabolit (például: 3-hidrokinurenin és 3-hidroxi-antranilsav) és az NO között.

Fontos megemlítenünk azt is, hogy a kinureninek lényeges szerepet töltenek be az immunrendszer működésében is. AzIDO, KAT-II, KMO, KYNU enzimek expressziója az interferonok által szabályozott, így tehát a gyulladásos citokinek befolyásolják a kinurenin-út vonalat. Lögters és munkatársai azt találták, hogy a kinurenin-triptofán arány megemelkedett poszttraumás szepszisben szenvedő betegek vérében, ezzel is alátámasztva, hogy a gyulladás befolyásolja a kinurenin-rendszert. Itt fontos újra megjegyeznünk, hogy az NO kiválthat neurogén gyulladást a központi idegrendszerben, amelyet bizonyítanak azok a vizsgálatok, ahol az NTG infúzió gyulladásos folyamatokat indított el humán alanyokban, amely gátolható volt a gyulladáscsökkentő prednizolonnal.

Másrészt, a migrén kialakulása kapcsolatba hozható a glutamát erg rendszer fokozott működésével, mind neurotranszmitter, mind receptorális szinten. Ez a folyamat párhuzamba állítható az alacsony KYNA szinttel, feltételezve, hogy a magas glutamát szint alacsony KVNA szinttel jár együtt. Emelkedett glutamát szinteket mértek migrénes betegek agygerincvelői folyadékában, plazmájában és vérlemezkéiben.

Eredményeink teljes összhangban vannak a humán vizsgálatokkal, ahol krónikus migrénben és cluster fejfájásban szenvedő betegekben megváltozott kinurenin metabolitokat találtak. Csökkent KYNA és L-KYN szintet mértek a betegek szérumában, amely jól illeszkedik abba a teóriába, hogy a megemelkedő glutamát következtében hiperexcitabilitás alakul ki.

Összefoglalva a humán és állatkísérletes eredményeket, azt mondhatjuk, hogy a kinurenin-út vonal alulműködik a fejfájások különböző típusaiban. Ezek az adatok bizonyítják, hogy a glutamát rendszer túlműködésével létrejövő hiperexcitabilitás fontos tényező a migrénes fejfájás létrejöttében szerepet játszó centrális szenzitizációban.

## **Következtetések**

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az (i) NTG kezelés képes aktiválni és szenzitizálni a trigeminális rendszert. Továbbá, hogy (ii) az NTG által kiváltott változásokat az AEA kezelés sikeresen csökkentette, amely a kannabinoid rendszer érintettségét mutatja a trigeminális fájdalomban. Ezen kívül (iii) az NTG a kinurenin-útvonal alulműködését okozta, így hathatott a glutamát rendszerre, amelynek lényeges szerepe van a trigeminális aktivációban és szenzitizációban.

Adataink arra engednek következtetni, hogy az endokannabinoid rendszer kiemelt szerepet játszhat a trigeminális szenzitizáció molekuláris mechanizmusaiban, így nagy valószínűséggel befolyásolja a migrén kialakulását. Jelen eredményeink megerősítik, hogy a kinurenin-rendszernek is kiemelt szerepe van a migrénes fejfájás létrejöttében és ennek modulációja lehetséges terápiás út lehet a jövőben.

## **Köszönetnyilvánítás**

Először szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Párdutz Árpádnak a végtelen támogatásáért, amit a PhD tanulmányaim alatt tanúsított felém. Az Ő irányítása segített a kutatási folyamatokban, a kéziratok összeállításában és a tézis megírásában. Köszönöm az iránymutatást és azt, hogy mindvégig bízott bennem.

Köszönet illeti Vécsei László Professzor Urat is a számtalan tanácsért, és amiért lehetőséget teremtett a kutatásaim elvégzéséhez. Személyisége, a kutatáshoz való hozzáállása nagy hatással volt rám.

Hálásan köszönöm közvetlen munkatársaimnak, Dr. Bohár Zsuzsannának és Dr. Fejes-Szabó Annamáriának a hasznos ötleteket, a motivációt, a hatalmas tudásukat és a jókedvet, amely végigkísérte nemcsak a PhD-tanulmányaimat, hanem az egyetemi éveket is a laboratóriumban.

Köszönetet szeretnék mondani a Fejfájás Kutatócsoport valamennyi tagjának (különösen Dr. Laborc Klaudiának, Spekker Eleonóranak, Dr. Szok Déliának és Dr. Tajti Jánosnak) a tanácsaikért.

Külön köszönöm Vékonyné Széll Valériának az immunhisztokémiai segítségét és azt, hogy megmutatta nekem a laboratóriumi munka szépségét.

Köszönöm Dr. Zádori Dénesnek és Dr. Veres Gábornak a segítségüket.

Külön köszönöm Fekete Éva Professzor Asszonynak és Toldi József Professzor Úrnak, hogy megszerettették velem az anatómiát és a neurobiológiát.

Hálás vagyok Dr. Barnai Máriának, Dr. Jármay Katalinnak, Dr. Gábor Katalinnak, Dr. Gunics Gyöngyinek és Dr. Joó Gabriellának az Egészségtudományi és Szociális Képzési Karról a támogatásukért.

Köszönettel tartozom szüleimnek, nagyszüleimnek, húgomnak és öcsémnek a szeretetükért és a végtelen támogatásukért, amelyet a tanulmányaim során kaptam tőlük.

Hálás vagyok és köszönetet mondok barátaimnak, különösen Andrisnak, Lillának és Adriennek, akik mindig mellettem álltak.