

HPLC metodika fejlesztés a triptofán metabolizmus vizsgálatára és annak alkalmazása az orofaciális fájdalom komplett Freund-adjuváns indukálta modelljében

című doktori disszertáció összefoglalója

Cseh Edina Katalin

Kísérletes és Klinikai Idegtudományok képzési program

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető:

Dr. habil. Zádori Dénes

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ

Neurológiai Klinika

Szeged

2020

A doktori disszertáció témájához közvetlenül kapcsolódó eredeti közlemények:

- I.** Cseh E.K., Veres G., Szentirmai M., Nánási N., Szatmári I., Fülöp F., Vécsei L., Zádori D. HPLC method for the assessment of tryptophan metabolism utilizing separate internal standard for each detector. *Anal. Biochem.* **2019**, 574:7 (eredeti közlemény, IF: 2,877)

- II.** Cseh E.K., Veres G., Körtési T., Polyák H., Nánási N., Tajti J., Klivényi P., Vécsei L., Zádori D. Neurotransmitter and tryptophan metabolite concentration changes in the Complete Freund's adjuvant model of orofacial pain. *J. Head. Pain.* **2020**, 21:35 (eredeti közlemény, IF(2019): 4,797)

A kapcsolódó közlemények impakt faktora összesen: 7,674.

A doktori disszertációhoz közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

- I. **Cseh E.K.**, Nánási N., Veres G., Klivényi P., Danics K., Vécsei L., Kovács G.G., Zádori D. The assessment of concentrations of certain tryptophan metabolites in Creutzfeldt-Jakob disease. *Proceeding of the 23rd International Symposium on Analytical and Environmental Problems*. **2017**. ISBN 978-963-306-563-1 (konferenciakiadvány).
- II. Nánási N., **Cseh E.K.**, Szentirmai M., Veres G., Klivényi P., Vécsei L., Zádori D. Development and validation of high performance liquid chromatography methods for vitamin e measurements. *Proceeding of the 23rd International Symposium on Analytical and Environmental Problems*. **2017**. ISBN 978-963-306-563-1 (konferenciakiadvány).
- III. Nánási N., Veres G., **Cseh E.K.**, Szentirmai M., Martos D., Sümegi E., Hadady L., Klivényi P., Vécsei L., Zádori D. The detection of age-, gender-, and region-specific changes in mouse brain tocopherol levels via the application of different validated HPLC methods. *Neurochem. Res.* **2018**, 43:2081 (eredeti közlemény, IF: 2,782)
- IV. Szalárdy L., Molnar F.M., Zádori D., **Cseh E.K.**, Veres G., Kovacs G.G., Vecsei L., Klivenyi P. Non-motor behavioral alterations of PGC1 α -deficient mice – a peculiar phenotype with slight male preponderance and no apparent progression. *Front. Behav. Neurosci.* **2018**, 12:180 (eredeti közlemény, IF: 3,104)
- V. **Cseh E.K.**, Veres G., Danics K., Szalárdy L., Nánási N., Klivényi P., Vécsei L., Zádori D. Additional value of tau protein measurement in the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ideggy. Sz.* **2019**, 72: 39 (eredeti közlemény, IF: 0,337)
- VI. Nánási N., Hadady L., **Cseh E.**, Veres G., Klivényi P., Vécsei L., Zádori D. Development and validation of high performance liquid chromatography method for the measurements of biogenic amines. *Proceeding of the 24th International Symposium on Analytical and Environmental Problems*. **2018**. ISBN 978-963-306-623-2 (konferencia kiadvány).
- VII. Herédi J., **Cseh E.K.**, Magyariné B.A, Veres G., Zádori D., Toldi J., Kis Zs., Vécsei L., Ono E., Gellért L. Investigating KYNA production and kynurenergic manipulation on acute mouse brain slice preparations. *Brain Res. Bull.* **2019**, 146:185 (eredeti közlemény, IF: 3,370)

- VIII.** Tömösi F., Kecskeméti G., **Cseh E.K.**, Szabó E., Rajda C., Kormány R., Szabó Z., Vécsei L., Janáky T. A validated LC-MS method for tryptophan metabolites: Application in the diagnosis of multiple sclerosis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**.185:113246 (eredeti közlemény, IF(2019): 3,209)
- IX.** Zádor F., Nagy-Grócz G., Dvorácskó S., Bohár Z., **Cseh E.K.**, Zádori D., Párdutz Á., Szűcs E., Tömböly C., Borsodi A., Benyhe S., Vécsei L. Long-term systemic administration of kynurenic acid brain region specifically elevates the abundance of functional CB1 receptors in rats. *Neurochem. Int.* **2020** (IF(2019): 3,881)

A nem kapcsolódó közlemények impakt faktora összesen: 16,683

Összesített impakt faktor: 24,357

1. Bevezetés

A neurológiai megbetegedéseket a rokkantság vezető, illetve a halált okozó megbetegedések második leggyakoribb okozóiként tartják számon. Így egyre nagyobb szerepet töltenek be a betegségek által okozott életminőség romlásban. Ezek a betegségek – beleértve a fejfájással járó megbetegedéseket is (például migrén, tenziós típusú fejfájás, gyógyszerterületadagolás okozta fejfájás), a szklerózis multiplexet, az epilepsziát és a neurodegeneratív kórképeket is – felelősek világszerte a betegségek által okozott terhelések 3 százalékáért. Bár ez a százalékos arány alacsonynak tűnik, a migrén, a stroke, az epilepszia és a demencia megtalálható az 50 leggyakoribb betegség között, melyek a legtöbb rokkantsággal eltöltött életévvel járnak. Továbbá, a neurológiai kórképek között kiemelkedő fontossággal bírnak a fejfájással társuló megbetegedések, hiszen ezek egy évre vonatkoztatva az emberiség 46%-ban fordulnak elő, míg a teljes élethosszra vonatkozóan ez az arány 64%-ra emelkedik. Ezek nagy részét az elsődleges fejfájások teszik ki. Ebből 14,4% migrénnel, 26,1% tenziós fejfájással és 3-5% krónikus napi fejfájással diagnosztizált beteg. A másodlagos fejfájások esetén a fejfájás csupán tünete egy alapbetegségnek, vagyis a probléma háttérében számos más tényező állhat.

A fejfájás kialakulásának megértéséhez elengedhetetlen a trigeminális rendszer működésének ismerete. Az elsődleges neuronok – melyek tartalmaznak speciális receptorokat, ún. nociceptorokat – sejttestjei a trigeminális ganglionban (TG) találhatóak, melyek különféle kémiai, termikus és mechanikus ingerek hatására aktiválódnak. Innen az agytörzsi trigeminális caudális mag (TNC) másodlagos neuronjaihoz futnak, melyek különféle neurotranszmitterek (pl. glutamát (Glu), calcitonin gén-rokon peptid (*calcitonin gene related peptide* - CGRP), P-anyag, neurokinin A és a hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid (*pituitary adenylate cyclase activating peptide* - PACAP)) felszabadulásában vesznek részt. A Glu és CGRP együttes felszabadulását a kalcium influx szabályozza, a P/Q-típusú csatornákon keresztül, ez utóbbi pedig a CGRP receptorok aktiválásához is vezethet, így tovább fokozva a Glu és P anyag felszabadulását. Továbbá a CGRP receptorok jelenlétét preszinaptikusan is igazolták glutamáterg neuronokon, így az aktivációjuk tovább fokozza az 3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol propionsav (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid* - AMPA) és N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorok szenzitizációját, mely ugyancsak képes serkenteni a Glu felszabadulását. A magas Glu szint tovább serkenti az NMDA receptor expresszióját, mely hozzájárul a szenzitizációs állapot fenntartásához. A másodlagos neuronok továbbítják a jelet a thalamus felé, innen pedig a harmadrendű neuronok az elsődleges szomatoszenzoros agykéregbe juttatják az információt. Ezen a szinten különböző neurotranszmitterek és neuromodulátorok (pl. a γ -aminovajsav (GABA)-/glicinerg inhibitoros neuronok) aktivációja

révén képesek szabályozni a fájdalomszintet. Nem csak a GABAerg, de szerotonerg és noradrenerg axonok is részt vesznek a leszálló pálya szabályozásában.

A fenti információk alapján, a Glu, illetve Glu ionotróp és metabotróp receptorainak is fontos szerepe van a fejfájás és a fájdalom pathomechanizmusában. Az NMDA receptorok aktivációja kulcsfontosságú szerepet tölt be a centrális szenzitizációs állapot fenntartásában. A Glu koncentráció megemelkedését leírták különböző fejfájásos állatkísérletes modellekben. Ugyancsak fájdalommodellekben bizonyították be a GABA receptor agonisták és inhibitorok antinociceptív hatásait is. Továbbá a szerotonerg rendszer is komoly szerepet játszik a fejfájás, így a migrén pathomechanizmusában is.

A kinurénsav (*kynurenic acid* - KYNA) a triptofán (TRP) metabolizmus kinurenin (*kynurenine* - KYN) útvonalán (*kynurenine pathway* - KP) keletkező végtermék, mely több módon képes befolyásolni a glutamáterg neurotranszmissziót. A KP felelős a TRP 95%-ának átalakulásáért, míg a maradék 5% a szerotonin (5-HT) útvonalon bomlik le. A neuroprotektív termékeinek köszönhetően a KP egyre gyakrabban vizsgált különböző kutatási területeken. A KYNA antinociceptív hatását bizonyították már különböző fájdalommodellekben, beleértve a krónikus oszteoarthritisz jellegű ízületi fájdalommodellt, a karragén-indukálta termális hiperalgeziát és egyéb ízületi gyulladási modelleket. Továbbá a TRP, a KYN és a KYNA koncentrációváltozását leírták fejfájásos betegségekben is: a szérumban szignifikáns csökkenést észleltek a KYN és a KYNA szintjeiben, míg a TRP emelkedést mutatott migrénes és cluster fejfájásos betegekben is.

A neurotranszmittereket leggyakrabban nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (*high performance liquid chromatography* - HPLC) detektálják, ám minden módszernek megvan a maga negatívuma is.

A fő serkentő neurotranszmitter, a Glu detektálása leggyakrabban a GABA gátló neurotranszmitterrel együtt történik, hiszen így komplex képet kapunk a központi idegrendszer serkentő-gátló rendszeréről. Detektálásukhoz nagy segítséget nyújtanak az úgynevezett derivatizációs ágensek, melyek segítségével jó érzékenységet lehet elérni fluoreszcens detektor (FLD) alkalmazása mellett. Ez a leggyakrabban alkalmazott detektor, hiszen egyszerűen csatolható egy fordított fázisú HPLC-hez. A metodikák nagy része az o-ftálaldehid (OPA) és a 3-merkaptopropionsav (3MP) együttes használatát írja le, hiszen gyors reakcióba lépnek az aminosavakkal (vizes oldatban, szobahőmérsékleten), illetve a kapott fluoreszcens komplex magas szenzitivitással és szelektivitással rendelkezik. Továbbá túladagolása esetén nem lép további reakciókba, így a melléktermék képződés nem áll fent. A negatív tulajdonságai között érdemes megemlíteni az instabil karakterét és a pH változásra való érzékenységet. Mindemellett

már a mintaelőkészítési lépésekben alkalmazható, és viszonylag gyors futási időt tud biztosítani a Glu és a GABA mérésére egyaránt.

A TRP és néhány metabolitjának a mérése (beleértve a KYNA-t is) különböző biológiai mátrixokból kihívást jelent az eltérő kémiai karakterű komponensek miatt. Az FLD alkalmazása egy alacsony detektálási határt (*limit of detection* - LOD) tud biztosítani, amely igen fontos szempont a kis mintamennyiségeknél (pl. egér agy). Így tehát a KP parciális detektálása történhet FLD és UV-detektor (UVD) együttes használatával, hiszen a TRP, az 5-HT és a KYNA könnyen detektálható FLD-vel, míg a KYN UVD-vel. Két detektor alkalmazása mellett legalább két belső standardot (*internal standard* - IS) kell beiktatni. A szakirodalomban is gyakran említett 3-nitro-L-tirozin (3NLT) megfelel az UVD komponensek korrigálására, míg az újonnan szintetizált anyag, a 4-hidroxiquinazolin-2-karboxisav (HCA) könnyen alkalmazható az FLD-n.

A fent említett analitikai technikák követelménye egy validációs folyamat, mely során meghatározzuk a szelektivitást, a linearitást, a LOD-ot, a meghatározási határt (*limit of quantification* - LOQ), a precizitást és a visszanyerhetőséget, hiszen e paraméterekkel igazoljuk az optimalizált metodikák robusztusságát.

2. Célkitűzések

- (i) A CFA-indukált orofaciális fájdalommodell neurokémiai profiljának kutatása patkányokban, beleértve a Glu, a GABA, a TRP, az 5-HT, a KYN és a KYNA koncentráció mérését, és megtalálni az átmeneti pontot a mért neurotranszmitterek és a szakirodalomban leírt, a fájdalommal kapcsolatba hozható neuropeptidek koncentráció változása között.
- (ii) Optimalizálni és validálni egy HPLC-UVD/FLD metodikát, mely alkalmas a TRP, az 5-HT, és a KYN útvonal neuroprotektív ágán képződő anyagok mérésére különböző biológiai mátrixokból, beleértve az egér és patkány agyszöveteket és plazmákat, illetve a humán liquor és plazma mintákat, két belső standardot alkalmazva.

3. Anyagok és módszerek

3.1 CFA-indukálta orofaciális modell

A 10-12 hetes Sprague-Dawley patkányokat standard laboratóriumi körülmények között tartottuk és a rajtuk végzett kísérletek etikai engedéllyel történtek (XI./1102/2018), követve a

hivatalos irányelveket (International Association for the Study of Pain; Európai Gazdasági Közösség, 86/609/ECC). Az állatokat elaltattuk 4%-os klorálhidráttal, majd a jobb oldali bajuszpárnába adtuk az 50 µl komplett Freund adjuváns (CFA) injekciót. A kontroll csoportban lévő patkányokat megegyező térfogatú sóoldattal oltottuk be. A liquor levétele után a vérvétel a baloldali pitvarból történt, nátrium-EDTA-t tartalmazó csövekbe, majd a transzkardiális perfúzió következett, melyhez 200 ml foszfát-puffert használtunk. A plazma mintákat centrifugálás után (3500 RPM, 10 perc, 4°C) -80°C-on tároltuk felhasználásig. Az agyi mintákat illetően a TNC-ből és a szomatoszenzoros kéregből (ssCx) is külön tároltuk a jobb és a bal oldali régiókat. Mérés előtt a mintákat újra számoztuk, így azokat randomizáltan és az analitikai méréseket végző számára vakon hajtottuk végre, validált HPLC metodikák alkalmazásával. Az összes mérés egy UVD-vel és egy FLD-vel felszerelt Agilent 1100 HPLC műszeren (Santa Clara, CA, USA) történt. Az elválasztást minden esetben egy Kinetex C18 150×4,6 mm belső átmérőjű, 5 µm szemcseméretű oszlopon (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) végeztük, melynek védelmezésére egy C18, 4×3 mm belső átmérőjű, 5 µm szemcseméretű SecurityGuard előoszlopot (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) alkalmaztunk. Először az agyakat homogenizáltuk 0,5 M-os perklórsavban (PCA) 1:5 m/V arányt alkalmazva, mely tartalmazta a TRP metodikához tartozó két IS-t (3NLT-t és HCA-t). Majd a mintákat elosztottuk három részre, és -80°C-on tároltuk a felhasználásig. A Glu és GABA mérésekhez 100 µl felülűsöt hígítottunk százszorosára desztillált vízzel, majd ebből az oldatból 100 µl-t derivatizáltunk 100 µl e célból készített oldattal (2 ml OPA, 7,94 ml 0,2 M borát puffer (pH = 9,9) és 60 µl 3MP) majd ehhez adtunk még 50 µl desztillált vizet, mely tartalmazta a belső standardot, a homoszerint. Az elválasztáshoz gradiens elúciót alkalmaztunk. Az 'A' mobilfázis 95:5 V/V 0,05 M nátrium acetát (pH = 5,5): metanol; míg a 'B' oldat 45:45:10 V/V metanol:acetonitril:víz volt. 95% 'A' mobilfázissal kezdtük az elúciót, majd ez lineárisan csökkent 50%-ra, ahol 2 percig tartottuk, majd 1 percen át visszaállt a kiinduló állapotra, így elérve a 16 perces futási időt. Az áramlási sebesség 1 ml/perc volt, 10 µl injektálási térfogat mellett. Az FLD 230/440 nm excitációs/emissziós hullámhosszon mért. A Glu és GABA mérése liquorból hasonló metodikával történt, mint az agyak esetén, bár a kiindulási mobilfázis 93% 'A' oldatot tartalmazott. A mintaelőkészítés esetén itt is az 1:1:0,5 = minta: derivatizációs oldat: IS oldat arányokat követtük.

Az agyszövetek esetén a TRP, az 5-HT, a KYN és a KYNA méréséhez 5,8-as pH-jú, 200 mM cink-acetátot (ZnAc) és végső összetételében 5% acetonitrilt tartalmazó mobil fázist alkalmaztunk. Az áramlási sebesség 1,2 ml/perc volt, illetve 50 µl mintát injektáltunk az

oszlopra. Plazma és liquor esetén hasonló metodika mellett történt az elválasztás, de a pH értékét 6,2-re állítottuk be, illetve 20 és 50 μ l térfogatokat injektáltunk.

3.2 TRP, 5-HT, KYN és KYNA kvantifikálása különböző biológiai mátrixokból

A neurológiai kórképekben és ezek állatkísérletes modelljeiben a TRP-nak és metabolitjainak kulcsfontosságú szerepük van, így mérésük nem csak patkány mintákból, de humán és egér mintákból is releváns lehet. A metodikák optimalizálása során az UVD-vel detektálható anyagok fényelnyelését egy Agilent 8453 UV-Vis spektrofotométerrel (Santa Clara, CA, USA) vizsgáltuk. A mobil fázis 200 mM ZnAc-ot tartalmazott, 5 %-os végső acetonitril tartalommal. Humán és rágcsáló plazma, illetve liquor esetén a pH-t 6,2-re, míg rágcsáló agyszövetek esetén 5,8-ra állítottuk be. Minden esetben 1,2 ml/perc volt a mobilfázis áramlási sebessége. Plazma minták esetén 20 μ l, míg agyszövetek és liquor esetén 50 μ l felülúszó került injektálásra. Detektoronként külön alkalmaztunk egy-egy IS-t: 3NLT-t az UVD-n, és HCA-t az FLD-n mért anyagok korrigálására, melyeket a detektoron mért egyes anyagok hasonló kémiai szerkezete miatt választottunk. Validálás során egy kalibrációs egyenes segítségével számítottuk ki a LOD és LOQ értékeket: hat különböző koncentrációjú oldattal *spike*-oltuk meg a kezeletlen biológiai mátrixot (humán és patkány liquort és plazmát, valamint egér plazmát), követve a minta előkészítésénél is alkalmazott kicsapási arányokat. A nehézkes mintavétel, illetve a sokszor vérrel szennyezett patkány liquor nem tette lehetővé a teljes validálási folyamat véghezvitelét, így a megfelelően tiszta liquor minták csak a kalibrációs görbe meghatározására, valamint a LOD és a LOQ értékek kiszámolására voltak elegendőek. A rágcsáló plazmákat 1:1 V/V arányban csaptuk ki a két IS-t tartalmazó 0,5 M PCA oldattal, majd 12000 RPM-en, 4°C-on centrifugáltuk 10 percent át. A frissen feldolgozott agyszöveteket tömegük lemérése után jéghideg oldatban homogenizáltuk, 1:5 m/V arányban 0,5 M PCA oldatban, mely tartalmazta a két belső standardot is. Az Eppendorf csöveket a fentiekhez hasonlóan centrifugáltuk. A humán plazma előkészítése hasonló volt a rágcsáló plazmaminták előkészítéséhez, bár itt a kicsapási arány 1:3 V/V; míg liquor esetén 5:6 V/V volt.

A validálási folyamat során az elegendő mintamennyiség érdekében több mintát összeöntöttünk, míg a metodikák alkalmazhatóságának bizonyítása során 8 külön egyedtől származó mintát mértünk le.

3.3 Statisztika

A statisztikai tesztek az ingyen elérhető R software 3.5.3. (R Development Core Team) segítségével végeztük el. A metodikák validálása és a minták mérése során a legkisebb

négyzetek módszerével illesztettük az egyenes egyenletét, melyben az y a gép által kiírt csúcs alatti területeket, míg az x a koncentrációértékeket jelentette.

A CFA indukálta orofaciális modellben mintaeloszlást nem vizsgáltunk, hiszen ez nem volt feltétele az álltatunk kiválasztott statisztikai tesztnek. Első körben a Levene teszt segítségével igazoltuk a varianciák homogenitását, majd független mintás t-próbát futtatunk, ahol a referencia eloszlást biztosító véletlen számokat a Monte-Carlo módszerrel generáltuk. Ezután *post-hoc* vizsgálatként a páros összehasonlításhoz a permutációs t-tesztet használtuk. A permutációt a Monte-Carlo módszerrel végeztük el (10 000 véletlen permutáció), és az elsőfajú hibákat a tévkövetkeztetési aránnyal kontrolláltuk. A kiugró értékeket nem vizsgáltuk külön. Elemszámbecslést nem végeztünk, a 3R elméletet követve hagyatkoztunk az eddigi kísérleti eredményekre. Statisztikailag szignifikáns eltérést mutató érték esetén, a Cohen féle d értékkel (továbbiakban *Cohen's d*) adtuk meg a hatásnagyságot, mely segített a továbbiakban eldönteni, hogy a kiválasztott elemszám megfelelő-e vagy sem.

4. Eredmények

4.1 CFA-indukálta orofaciális modell

Méréseink során külön feldolgozásra kerültek a jobb és a bal oldali agyi régiók, de mivel nem találtunk szignifikáns eltérést a kettő között, így a továbbiakban az átlagukkal dolgoztunk. A permutációs t-teszt során a kontrollokhoz képest szignifikáns emelkedést találtunk a TNC-ben, a Glu ($p = 0,0319$, Cohen's $d = 1,49$), a KYN ($p = 0,0123$, Cohen's $d = 1,58$) és a KYNA ($p = 0,0098$, Cohen's $d = 1,92$) szintjeiben 24 órával a CFA kezelés után, illetve szignifikáns csökkenést a Glu ($p = 0,0357$, Cohen's $d = 1,29$), a KYN ($p = 0,0123$, Cohen's $d = 1,85$) és a KYNA ($p = 0,0263$, Cohen's $d = 1,39$) szintjeiben a 48 órás és 24 órás CFA kezelt csoportok között, míg a kontroll és a 48 órás kezelt csoportok között nem volt különbség. Ami az ssCX mintákat illeti, a KYNA ($p = 0,0237$, Cohen's $d = 1,36$) szignifikánsan megemelkedett 24 órával a CFA után, majd szignifikánsan csökkent a 48 órás csoportban ($p = 0,0173$, Cohen's $d = 1,80$). A kontroll és a 48 órás csoport között nem volt szignifikáns különbség. Az 5-HT szignifikánsan csökkent a 48 órás csoportban a kontroll ($p = 0,0479$, Cohen's $d = 1,21$) és a 24 órás csoportokhoz ($p = 0,0479$, Cohen's $d = 1,20$) képest is. Kiszámoltuk a KYN/TRP és KYNA/KYN arányokat is. A KYN/TRP arány szignifikáns emelkedést mutatott a 24 órás kezelt csoportban a kontroll ($p = 0,0419$, Cohen's $d = 1,19$) és a 48 órás kezelt csoportokhoz képest ($p = 0,0419$, Cohen's $d = 1,35$). A liquor mintákban nem találtunk szignifikáns eltérést, a TRP, a KYN és a KYNA illetve a Glu és GABA mérése során, bár az alacsony elemszám

miatt ($n = 5, 5, 4$ a kontroll, a 24 és a 48 órás kezelt csoportok esetén) a statisztikai teszt erőssége alacsony volt. Érdemes megemlíteni, hogy a KYN értéke LOD alatt volt a kontroll és a 48 órás kezelt csoportban ($LOD = 0,0274 \mu\text{M}$), egy érték kivételével. A plazma minták esetében a TRP metabolitokat kvantifikáltuk, de ezek nem mutattak szignifikáns eltérést.

4.2 TRP, 5-HT, KYN és KYNA kvantifikálása különböző biológiai mátrixokból

A validálási folyamat során a kalibrációs egyenes egyenletét meghatároztuk mindegyik biológiai mátrix esetén, majd kiszámoltuk a LOD, a LOQ, a precizitás és a visszanyerési értékeket is. A külső standardsor meghatározásakor figyelembe vettük, hogy különböző neurológiai kórképekben, vagy állatmodellekben, a metabolitok értékei eltérnek a fiziológiai értékektől, így egy nagyobb koncentrációs tartományt adtunk meg minden egyes metabolit esetén, törekedve a jó linearitás megőrzésére: a korrelációs koefficiens 0,999 fölött volt minden esetben. A LOD és LOQ értékeket a $LOD = 3.3 \cdot \sigma / S'$ és $LOQ = 10 \cdot \sigma / S$ egyenletekkel számoltuk ki, ahol a σ az alapvonal standard deviációja, míg az S' az analitikai érzékenység. Ezt alkalmazva, a kapott eredményeinek összhangban voltak a szakirodalmi adatokkal: a humán és a rágcsáló plazma esetén (amikor $20 \mu\text{l}$ mintát injektáltunk az oszlopra) a LOD értékek $0,557 \mu\text{M}$, $0,025 \mu\text{M}$ és $1,23 \text{ nM}$ felett voltak, a TRP, a KYN és a KYNA esetében. Továbbá rágcsáló agyszövet, valamint human és rágcsáló liquor esetén (amikor $50 \mu\text{l}$ mintát injektáltunk az oszlopra) a LOD értékek $0,08 \mu\text{M}$, $0,009 \mu\text{M}$, $0,0274 \mu\text{M}$ és $0,456 \text{ nM}$ felett voltak, a TRP, az 5-HT, a KYN és a KYNA esetében. A precizitás vonatkozásában az egy napon mért minták közötti eltérés $1,03\text{--}4,25 \text{ CV}\%$ volt, míg a napok közötti precizitások $1,11\text{--}10,6\%$ közötti értékeket mutattak, de kivétel volt a fényre érzékeny és könnyen oxidálható 5-HT, melynek a precizitása 52% , illetve 19% volt egér és patkány agyszövetek esetében. A visszanyerési tényező $79,6\%$ és 116% között volt, mely nem tér el az irányelvek által megadott tartománytól. Utolsó lépésben a metodika alkalmasságát bizonyítottuk be hat különböző biológiai mátrixon.

5. Diszkusszió

5.1 CFA-indukálta orofaciális modell

A fejfájás az egyik leggyakoribb neurológiai kórkép. 2010-ben a tenziós típusú fejfájás és a migrén a világ második és harmadik leggyakoribb betegségének számított. A nociceptorok perifériás afferenseinek aktiválása felelős a Glu felszabadulásáért, az ionotróp és metabotróp receptorok aktiválásával együtt. Ezt a jelenséget nem csak a preklinikai vizsgálatok támasztják alá, migrén betegekben is leírták. Így a fájdalom és a glutamáterg útvonal könnyen kapcsolatba hozható, és mindemellett különböző ionotróp glutamát receptor antagonisták pozitív hatását írták le a nociceptív folyamatokban. A pozitív hatásuk ellenére a mellékhatások miatt az ez

irányba haladó kutatásokat megszüntették. Ugyanakkor a ketamin, ami egy NMDA receptor antagonist, az egyetlen hosszú távon jó opciónak tűnő kezelés a komoly vagy hosszú ideig tartó aurás migrénes betegeknek, míg a tezampanel, mely az AMPA és kainát receptoron hat, ígéretes eredményeket mutat a migrénben szenvedők kezelésében. Továbbá bebizonyították, hogy nemcsak a KYNA, de a KP útvonalon keletkező számos vegyület koncentrációváltozása is kapcsolatba hozható a migrén vagy cluster fejfájásos betegekkel. A KYNA, mint NMDA receptor antagonist, fontos kiinduló molekula különféle, a központi idegrendszerre ható gyógyszerek szintetizálásában. Bár a vér-agy gáton nem tud átjutni és a szervezetből gyorsan kiürül, a KYNA analógok pozitív változást mutatnak ez irányban. Ugyanakkor figyelembe véve, hogy az elsőrendű neuronok a vér-agy gáton kívül találhatóak, a KYNA önmagában is ígéretes eredményeket hozhat. A fájdalomra kifejtett pozitív hatásait több állatmodellben is leírták. A kutatócsoportunk által végzett kísérletekben két KYNA analógot vizsgáltunk a trigeminális fájdalom formalin modelljében. Érdekes módon az egyik hatásosabb volt és ez esetben sokkal magasabb perifériás koncentrációértéket mutatott a KYNA, míg az agyban egyforma emelkedést okozott mindkettő. Ezen eredmények is alátámasztják hipotézisünket, miszerint a KYNA perifériás emelkedése hatásos lehet a fájdalom ellen és a hasonló szerkezetű komponenseket érdemes tovább vizsgálni farmakológiai célból, hiszen a vér-agy gáton való nagyobb koncentrációban való átjutás a fájdalom kezelésében talán nem feltétlenül szükséges. A CFA-kezelt patkányok a jelen tanulmányban is szignifikánsan megemelkedett Glu szintet mutattak, a KYN és a KYNA vegyületekkel együtt. Utóbbiak válaszként szolgálhatnak a Glu okozta szenzitizációs folyamatra. E hipotézisünket más tanulmányok is alátámasztják, hiszen a KP metabolitjainak változását fejfájásban is leírták, melyben az NMDA receptor aktiválása kulcsfontosságú lépés lehet. Ezen eredmények azért is fontosak, mert a GABA nem mutatott szignifikáns emelkedést, így önmagában a GABA nem elegendő ahhoz, hogy a Glu szintemelkedés hatását ellensúlyozza. A szerotonin 48 órával a kezelés után mutatott szignifikáns emelkedést a kéregben, mely a trigeminovaskuláris útvonal aktivációjának gátlására utalhat. Ezen eredmények utalnak a glutamáterg útvonalakat célzó terápiák limitált időintervallumára, hiszen egy előzetes tanulmányunk azt is bebizonyította, hogy a fájdalomban fontos szerepet játszó neuropeptidok koncentrációjának megemelkedése már 24 óra után megjelent. Ez az az időpont, mely a kísérletünk perifériás és centrális szenzitizációjának megfelel. Jelen pillanatban a CGRP útvonalat célzó antitestek (eptinezumab, galcanezumab, fremanezumab, erenumab) jelenthetnek újszerű kezeléseket, melyek anyagi vonzata azonban jóval magasabb, mint azon kezeléseké, melyek a fejfájás akut fázisában hatnak.

5.2 TRP, 5-HT, KYN és KYNA kvantifikálása különböző biológiai mátrixokból

A metodika validálása során a meghatározott paraméterek (LOD, LOQ, precizitás és visszanyerés) mind megfeleltek a hivatalos irányelveknek. Az ugyanazon napon belüli precizitás (melyet CV%-ban fejezünk ki; *coefficient of variation* - CV) mind 5 CV% alatt volt, míg a napok közötti precizitás 15% alatt, kivételt az 5-HT egér és patkány agyszövetekre vonatkozó 52 és 19%-os értékei képeznek. Bár célszerű a hivatalos irányelvek által kitűzött maximális értékeket alatt maradni, sok esetben a metodikák heterogenitása miatt ez nem lehetséges. Igaz ez az előbb említett agyszövetekből mért napok közötti precizitási értékekre is, hiszen nem az agyszövetet tároljuk, hanem a feldolgozott, lehomogenizált agyszövet felülúszóját, mert egy agy felezése nem eredményezne két homogén részt. E magas értékek alapján az agyakat a mérés napján célszerű homogenizálni. Ilyenkor az eltérés az irányelveknek által megadott maximális értékek alatt marad: egér esetén 4,25 CV%, míg patkány esetén 1,91 CV%. A visszanyerés során az összes érték 85-115% között volt, míg a LOQ-al *spike*-olt minták esetén 80-120% között, megfelelve az irányelveknek. A metodikánk alkalmazhatóságának vizsgálata során igazoltuk minden biológiai mátrix és minden metabolit vonatkozásában, hogy a koncentrációértékeink megegyeztek a szakirodalomban leírt értékekkel.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, Dr. Zádori Dénesnek, hiszen az elmúlt években mindenben támogatott, és türelmesen fogadta az ötleteimet, segítette őket megvalósítani és megtanította, hogy hogyan kell megválaszolni a kutatás során felmerülő kérdéseket. Dénes a példaképem volt az elmúlt években, a precíz, kitartó és keményen dolgozó attitűdjének köszönhetően. Neki köszönhetem, hogy most itt tartok a Ph.D.-m végén. Köszönettel tartozom Dr. Veres Gábornak is, hiszen ő mutatta meg a laboratóriumban használt technikákat és fortélyokat, és folyamatosan támogatott, elolvasta és kijavította minden egyes mondatomat, minden egyes előadásomat és poszteremet, és barátként mindig ott volt, ha szükség volt rá.

Köszönettel tartozom még Prof. Vécsei Lászlónak és Prof. Klivényi Péternek az évek során nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak, Polyák Helgának, Nánási Nikolettnek, Dr. Körtési Tamásnak, Dr. Bohár Zsuzsannának, Dr. Maszlag-Török Ritának, Spekker Eleonórának és Martos Diánának, amiért rengeteget segítettek a munkámban.

Köszönöm Dr. Rajda Ceciliának, Dr. Szalárdy Leventének, Prof. Janáky Tamásnak, Tömösi Ferencnek és Dr. Zádor Ferencnek, hogy részt vehettem a projektjeikben. Köszönöm Dr. Szatmári Istvánnak az SZTE-GYTK Gyógyszerkémiai Intézetéből a KYNA analógok szintetizálását.

Külön szeretném megköszönni Prof. Tajti János és Dr. Párdutz Árpádnak, hogy segítettek a disszertációm megírása során a fájdalomhoz és fejfájáshoz kapcsolódó részeknél.

Köszönettel tartozom a szüleimnek, hogy a tanulmányaim során mindvégig támogattak, a testvéremnek és a sógoromnak, hogy mindenben mellettem voltak.

Nem utolsó sorban pedig köszönöm a legjobb barátomnak, férjemnek, Dr. Veréb Gábornak, hogy mindvégig támogatott és hitt bennem.

Az anyagi támogatásokat köszönöm a GINOP-2.3.2-15-2016-00034, az EFOP-3.6.1-16-2016-00008, az UNKP-19-3 és az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 pályázatoknak.