

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

és

Általános Orvostudományi Kar
Neurológiai Klinika

XXXII. OTDK Biológia Szekció

**Az endokannabinoid rendszer modulálása a migrén nitroglicerinnel indukálta
állatkísérletes modelljében**

Spekker Eleonóra

Biológia BSc, III. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Párdutz Árpád

egyetemi docens

SZTE-ÁOK, Neurológiai Klinika

és

Nagy-Grócz Gábor

PhD-hallgató

SZTE-ÁOK, Neurológiai Klinika

Belső konzulens:

Dr. Farkas Tamás

egyetemi docens

SZTE-TTIK, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

2014

Tartalomjegyzék

1. ÖSSZEFOGLALÓ.....	3
2. RÖVIDÍTÉSEK	4
3. BEVEZETÉS.....	6
3.1. MIGRÉN	6
3.1.1 <i>A migrén története.....</i>	<i>6</i>
3.1.2 <i>A migrén jellemzése.....</i>	<i>8</i>
3.1.3. <i>A migrén klinikai tünetei</i>	<i>9</i>
3.1.4 <i>A migrén patomechanizmusa</i>	<i>10</i>
3.1.5 <i>A migrén kezelése</i>	<i>12</i>
3.2.. A NITROGÉN MONOXID SZEREPE A MIGRÉNBEN	13
3.3. AZ ENDOKANNABINOID RENDSZER.....	15
3.3.1. <i>Az endokannabinoid rendszer jellemzése</i>	<i>15</i>
3.3.2. <i>A kannabinoid receptorok</i>	<i>17</i>
3.3.3. <i>Az anandamid</i>	<i>18</i>
4. CÉLKITŰZÉS.....	20
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	21
5.1. ÁLLATOK.....	21
5.2. KÍSÉRLET MENETE	21
5.3. IMMUNHISZTOKÉMIA	22
5.4. ADATFELDOLGOZÁS	23
5.5. STATISZTIKAI ELEMZÉS	23
6. EREDMÉNYEK.....	24
7. MEGBESZÉLÉS.....	27
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	29
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	38
10. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	39
11. NYILATKOZAT.....	40

1. Összefoglaló

A migrén súlyos tüneteket okozó primer fejfájásbetegség, melynek pontos pathomechanizmusa az intenzív kutatások ellenére nem ismert, de a trigeminális rendszer aktivációja és szenzitizációja alapvető szerepet játszik a betegség kialakulásában.

A kannabinoid rendszernek fontos szerepe van a fájdalomérzésben és a szenzitizációs folyamatokban, ezáltal részt vehet a migrén pathomechanizmusában. Endogén kannabinoid receptor agonista az anandamid vagy arachidonoil-etanolamid (AEA), amely állatkísérletekben hatásos fájdalomcsillapítónak bizonyult.

A nitrogén-monoxid donor nitroglicerín (NTG) szisztémás adása az egyik humán migrén modellnek tekinthető, mert migrénesekben aura nélküli rohamot provokál. Állatkísérletekben igazolódott, hogy a NTG a kaudális trigeminális mag másodlagos érző neuronjainak aktivációja mellett képes ugyanitt a centrális szenzitizáció markerének tartott neuronális nitrogén-oxid szintáz (nNOS) expressziót emelni patkányban.

Jelen kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy az AEA-kezelés képes-e modulálni a NTG-indukálta nNOS-expresszió emelkedést.

Kísérletünkben hím patkányokat használtunk fel (n=24). Az állatokat négy csoportra osztottuk. Az első csoport állatai placebo (fiziológiás sóoldat), a második csoport állatai NTG (10 mg/kg) kezelést kaptak intraperitoneálisan (i.p.). A harmadik és negyedik csoport állatai i.p. AEA-kezelést (2x5 mg/kg) kaptak 30 perccel a placebo vagy NTG kezelés előtt, majd 60 perccel utána. A placebo vagy NTG kezelés után 4 órával az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk, majd a cervikális gerincvelőt eltávolítottuk a nNOS immunhisztokémiai festés céljából.

A korábbi eredményekhez hasonlóan a NTG képes volt szignifikánsan megemelni a nNOS-expressziót a másodlagos trigeminális neuronokban, és ezt a változást az AEA-kezelés modulálta a kannabinoid receptorokon keresztül.

Eredményeinket összegezve elmondhatjuk, hogy az AEA képes csökkenteni az NTG okozta trigeminális rendszer aktivációt és szenzitizációt a másodlagos érző neuronok szintjén. Ezek alapján az endogén kannabinoidok a későbbiekben terápiás lehetőséget nyújthatnak a migrénes fejfájás kezelésében.

2. Rövidítések

2-AG – 2- arachidonoil-glicerín

5-HT – szerotonin

AEA – arachidonoil-etanolamid (anandamid)

Ca²⁺ – kalcium

CB – kannabinoid receptor

cGMP – ciklikus guanozin-monofoszfát

CGRP - kalcitonin gén-relációs peptid

CSD – „cortical spreading depression” („kérgi kúszó gátlás”)

FAAH – fatty acid amide hydrolase (zsírsavamid-hidroláz)

FHM – familiáris hemiplégiás migrén

H₂O₂ – hidrogén-peroxid

IHS – International Headache Society (Nemzetközi Fejfájás Társaság)

IR – immunreaktív

i.p. - intraperitoneális

LC- locus coeruleus

NAE – N-acil-etanolamin

NAPE – N-acil-foszfatidil-etanolamin

NO – nitrogén-monoxid

NOS – nitrogén-oxid szintáz

eNOS – endotheliális nitrogén-oxid szintáz

iNOS - indukálható nitrogén-oxid szintáz

nNOS – neuronális nitrogén-oxid szintáz

NR - Raphe mag

NRD – nucleus raphe dorsalis

NTG – nitroglicerín

PAG – periaqueductal gray (periaqueductalis szürkeállomány)

PBS – foszfátpuffer

PFA - paraformaldehid

SP - substance P

SPRD – Sprague-Dawley

SRF - szerotonin releasing factor

TNC- caudalis trigeminális mag

TRPV1- tranziens receptor potenciál vanilloid 1

3. Bevezetés

3.1. Migrén

3.1.1 A migrén története

Az őskorban a fejfájás kezdeti kezelésére a koponya meglékelését alkalmazták. Akkoriban úgy vélték, hogy ezzel a módszerrel az embert megszálló szellem eltávozik, ezáltal a fájdalom is megszűnik.

Az időszámításunk előtti 1550-re datált egyiptomi Ebers Papyrus különféle gyógymódokat írt le, melyek között szerepelt az is, hogy a harcsa csontvázának hamvával kellett bedörzsölni a fájós területet (*Waeber és mtsai, 2003*).

Hippokratész (i.e. 400) úgy vélte, hogy a gyomorból felszálló gőzök felelősek a migrénes fájdalomért. A második században Aretaios írta le a hányingert, hányást és izzadást mint a migrén során a fejfájás mellett megjelenő kísérő tüneteket.

A hemicrania fogalmát az ókori római Galénosz vezette be és a sárga epe túltengését tette felelőssé a betegség kialakulásában. A migrén kezelésére a test epefolyadékoktól való megtisztítását tartotta a legjobb módszernek.

A középkorban a gyógyfüveken alapuló gyógyítás volt az uralkodó módszer a fájdalmak enyhítésére. A 13. században pedig a fájdalom mérséklésére ecettel és ópiummal átitatott szivacsot alkalmaztak.

Thomas Willis 1664-ben vetette fel, hogy a migrénes fejfájás kapcsán az agyi erek kitágulnak, emellett utalt arra is, hogy a betegség központi idegrendszeri eredetű. A migrénes roham kiváltásáért pedig az éhséget okolta. Akkoriban higanyvegyületekkel, nadragulyával és gyűszűvirággal kezelték a migrént.

A 19. században Edward Lieving dolgozta ki a „neurogén” migrén elméletet. Ebben az idegrendszer megbetegedésével indokolta a rohamokat, és feltételezte, hogy külső okok is közrejátszanak a kialakításában. (*Keidel, 2007*).

1884-ben William H. Thompson az anyarozs kivonatát hatásosnak gondolta a migrén kezelésében. Hatóanyagát, az ergotamint Arthur Stoll izolálta először 1920-ban. Az ergotamin hatásmechanizmusának felfedezése újabb gyógyszerek, a triptánok kifejlesztéséhez vezetett.

Az első igazi tudományos megfigyelés Harold Wolff nevéhez fűződik, aki az 1960-as években megfigyelte, hogy a migrénes rohamok során az arteria temporalis superficialis

pulzációjának amplitudója megemelkedett. Ezt a pulzálást az ergotamin képes volt befolyásolni (Blau, 2004).

Az utóbbi évtized kutatásai, valamint a humán klinikai tapasztalatok alapján a neurovaszkuláris folyamatok és a kérgi kúszó gátlás kapcsolata játszik meghatározó szerepet a migrén pathomechanizmusában. Ma a legelfogadottabb elmélet a neurovaszkuláris migrénelmélet, melyet Moskowitz és munkatársai dolgoztak ki (Moskowitz, 2000). A migrénes roham alatt az agytörzsi magvak, mint a PAG, a LC és a Raphe aktiválódik (Weiller és mtsai., 1995). Ezen elmélet próbál kapcsolatot létesíteni a migrén generátorok, valamint a migrénes roham alatt kialakuló CSD és trigeminális szenzitizáció között. A migrén központi idegrendszeri esemény, amely kialakulásában szerepet játszhat az itt elhelyezkedő kalcium (Ca^{2+}) csatornák diszfunkciója, amely CSD kialakulásához megfelelő intersticiális ionösszetételt hoz létre.

3.1.2.A migrén jellemzése

A Nemzetközi Fejfájás Társaság (International Headache Society, IHS) osztályozása szerint a migrén az önálló betegségek közé, azon belül a primer fejfájásokhoz tartozik a tenziós és cluster fejfájás mellett, tehát nem áll szervi megbetegedés a tünetek hátterében. Nem tekinthető homogén betegségnek, tovább osztható. A migrén két fő előfordulási formája az aura nélküli, más néven közönséges, valamint az aurával járó vagy klasszikus migrén. Ezek a leggyakrabban előforduló formák, de beszélhetünk még ophthalmoplégiás, retinális, gyermekkori és szövődményes migrénről is (*IHS Cephalalgia, 2004*).

A betegség megléte, illetve lefolyása eltérő az egyes életszakaszokban. A migrén első megjelenése a serdülő- és ifjúkor időszakára tehető, és a megfigyelések azt mutatják, hogy a fiúknál jelentkezik hamarabb, viszont a későbbi korosztályokban a nők sokkal nagyobb arányban mutatják a migrénes megbetegedéseket, főleg 30-50 éves kor között (*Stovner és mtsai, 2006*). A migrénes nők jelentős része erősebb, illetve gyakoribb rohamokat tapasztal menstruációkor, 14%-uk csak ekkor tapasztalja. A migrénnek ezt a formáját menstruációhoz kapcsolódó migrénnek is nevezik.

Mai ismereteink szerint a migrén elsősorban genetikailag determinált betegség, ezt alátámaszthatja az a megfigyelés is, hogy a migrén családon belül halmozottan fordul elő, azonban öröklődése nem követi a mendeli szabályokat. Ez alól kivétel az egyetlen bizonyítottan autoszomális dominánsan öröklődő familiáris hemiplégiás migrén (FHM). Az FHM I típusának hátterében a 19-es kromoszóma P/Q kalcium (Ca^{2+}) csatorna alfa-1 alegységének mutációja áll (CACNA1A) (*Ophoff és mtsai, 1996*). Az FHM II típust a Na/K pumpa alfa-2 alegységét kódoló ATP1A2 génhez kapcsolják (*De Fusco és mtsai, 2003, Vanmolkot és mtsai, 2003*).

3.1.3. A migrén klinikai tünetei

A Nemzetközi Fejfájás Társaság (IHS) szerint az aura nélküli migrén visszatérő fejfájásbetegség, ami 4-72 órán át tart, mialatt lüktető jellegű, jellemzően unilaterális (féloldali) fájdalom jelentkezik, melyhez hányinger, hányás, fény- (fotofóbia) és hangkerülés (fonofóbia) társulhat. A fejfájás súlyosságát a fizikai aktivitás (lépcsőzés, köhögés) növeli.

A migrén klinikai megjelenését szakaszokra oszthatjuk: bevezető szakasz (prodroma), egy lehetséges auraszakasz, fejfájásos szakasz, lábadozási szakasz (posztodroma). A prodroma szakasz jellemzően pár órával, de esetenként akár pár nappal a fejfájásroham előtt jelentkezik. Ennek során közérzet- és viselkedésbeli változások tapasztalhatóak, emellett még gyakori panaszként fáradtság, koncentrációzavar jelentkezik. Ez a migrénes betegek kb. 25%-ánál lehetséges auraszakasszal folytatódik. A tipikus aura egy órán belül lezajlik, mellyel egy időben, vagy ezt követően migrénes fejfájás jelentkezhet. Az aurát a központi idegrendszer átmeneti jellegű funkciózavarának lehet tekinteni: leggyakrabban látászavarral (csillámlás, látótérkiesés) jelentkezik, ritkábban előfordulhat átmeneti érzészavar, bénulás vagy beszédzavar is. A tipikus fejfájás szakasz során a fejfájás mellett a fent említett vegetatív panaszok is felléphetnek. Emellett nem ritka az allodynia jelensége, mely során a nem fájdalmas ingereket a páciens fájdalomként éli meg. Az allodynia a centrális szenzitizációs folyamatok következménye, és megléte rontja a migrénes roham kezelhetőségét, így a migrénes fejfájás kapcsán kiemelt jelentőségű (*Burstein és mtsai, 2004*). A posztodroma fázisban a fejfájás elmúlik, de a betegek általában még gyengeségre, koncentrációzavarra panaszkodhatnak.

A rohamokat hosszabb-rövidebb fájdalommentes intervallumok választják el egymástól.

Megállapították azt is, hogy a stressz és az alvásmegvonás, illetve egyes ételek, mint pl.: bizonyos sajtok (camembert, brie), a csokoládé, illetve a magas nitráttartalmú ételek, szintén elősegítik a migrénes rohamok kialakulását. A betegek gyakran az időjárás változására, a stresszre, a kialvatlanságra, az éhezésre és a szomjazásra fogják a roham kialakulását.

3.1.4.A migrén pathomechanizmusa

A migrén kialakulásának okáról számos elmélet látott napvilágot. Az intenzív kutatások ellenére a betegség pontos pathomechanizmusa nem ismert.

Kezdetben a migrénes rohamok hátterében csak perifériás folyamatokat feltételeztek és tudtak bizonyítani. A klasszikus elmélet (Wolff) szerint az aurát az intrakraniális erek konstriktója, a fájdalmat a vazodilatáció okozza (Wolff, 1948). A lüktető fejfájást, amely a migrénes roham alatt kialakul, először az abnormálisan kitágult erek pulzálásának tulajdonították (Blau és mtsai, 1981, Friberg és mtsai, 1991). A vaszkuláris teória szerint a roham a trombociták aktiválódásával kezdődik, amelyekből vazokonstriktor hatású szerotonin (5-HT) szabadul fel. Így nő a plazma 5-HT szintje és az ekkor bekövetkező cerebrális érszűkület okozta funkciózavar lehet felelős az aurajelenségekért. Ezt az elméletet alátámasztja, hogy a vazodilatátor amyl nitrit megszüntetheti az aurajelenséget (Wolff, 1948). Az 5-HT okozta vazokonstriktio képes aktiválni a vasculatura érző beidegzését, melynek következtében mediátorok, majd neurokininek, illetve a mastocitákból hisztamin szabadul fel, és steril gyulladás jön létre. Ez a folyamat szenzibilizálja az érfalban lévő receptorokat, és az egyidejű érfali hipotóniával együtt kiváltja a fájdalmat (Buzzi és Moskowitz 1992).

A neurogén elmélet az agykéreg, az agytörzs, a gerincvelő, a mellékvese és a vegetatív innerváció egymásra gyakorolt hatását foglalja össze. Eszerint a cortexből, a thalamusból és a hypothalamusból triggerelő impulzusok érkeznek az agytörzsbe, melyek hatására az agytörzsből a kéregbe projektáló szerotoninergerg és noradrenerg rostok aktiválódnak. A locus coeruleusból (LC) származó noradrenerg stimulusok érszűkületet, míg a Raphe magból (NR) származó stimulusok értágulatot okoznak a carotis interna rendszerében. Az extrakraniális erek kitágulnak az NR dorsalis (NRD), az LC és a nervus trigeminus aktiválódásának hatására a ganglion oticum perifériás ágrendszerében bekövetkező neuropeptid felszabadulás által („trigeminovaszkuális reflex”). Az LC-ből származó, leszálló pályák közvetítette stimulusok hatására noradrenalin szabadul fel a mellékveséből, amely indukálja a szerotonin releasing factor-t (SRF), ezáltal a trombocitákból 5-HT szabadul fel. Ez kapcsolatot létesíthet a neurogén, és a fent említett vaszkuláris történések között. A szabad 5-HT fokozza az érfalakban lévő receptorok érzékenységet, valamint a nervus trigeminus útján befutó afferens impulzusok mértékét. A kaudális trigeminális mag (TNC) területén önerősítő folyamat

indulhat meg a perifériás és centrális aktiváció során, melynek egyik kulcsmolekulája feltételezhetően a nitrogén-monoxid (*Olesen és mtsai, 1995*).

Migrénes páciensekről roham alatt készített funkcionális neuroradiológiai vizsgálatok egyes agytörzsi magok fokozott aktivitását mutatták. Ezek a területek a periaqueductalis szürkeállomány (PAG), a nucleus raphe dorsalis, illetve a LC (*Weiller és mtsai, 1995*). Más betegségek kezelésére a PAG-ba ültetett elektróda stimulációja egyes esetekben migrénes rohamot okozott (*Raskin és mtsai, 1987*), ezért ezeket a magokat migrén generátoroknak nevezték el. Felvetődött, hogy a migrén generátorok aktiválódása indítja be a periférián a trigeminovaskuláris rendszerben lezajló jól ismert változásokat.

A legújabb kísérleti adatok alapján az már bizonyítottnak látszik, hogy az aurával járó migrénes rohamok során magáért az aura kialakításáért a kérgi kúszó gátlás (cortical spreading depression, CSD) a felelős (*Hadjikhani, 2001*). Igazolták azt is, hogy a CSD kísérletes körülmények között képes a trigeminovaskuláris rendszer aktiválására (*Moskowitz, 2008*). Az aura nélküli migrén esetében nem bizonyított a CSD megjelenése és ez által a rohamok kialakításában játszott szerepe sem. Azt feltételezik, hogy a CSD a hippocampus területén alakul ki és innen indítja be a trigeminális rendszer fokozott működését (*Moskowitz, 2008*).

3.1.5.A migrén kezelése

Annak ellenére, hogy az utóbbi időben több, igen hatásos gyógyszer jelent meg a migrénes roham enyhítésére, a biztos kezelés még nem minden esetben megoldott. A migrén kezelésének formái között a nem gyógyszeres és a gyógyszeres terápia jön szóba.

A nem gyógyszeres kezelés célja elsősorban a megelőzés, amelynek alapelve a lehetséges kiváltó tényezők kiiktatása (stressz, vörösbor, csokoládé, sajtok, nitrit/nitrát tartalmú ételek, fogamzásgátlók, citrusfélék). A nem gyógyszeres terápiák közé tartozik a ma már egyre elterjedtebbé vált relaxáció, illetve az autogén tréning, amelyek hatásossága ma még eléggé megkérdőjelezhető.

A gyógyszeres kezelést két csoportra lehet osztani. Az egyik a prevenció, vagyis a megelőzés, melynek célja a rohamok számának, illetve időtartamának mérséklése. Ilyen gyógyszerek a béta-blokkolók, flunarazine, valproát, topiramát, stb.

A megelőzés mellett a megfelelő rohamterápia is fontos, amely akut kezelésnek tekinthető.

Az akut kezelés történhet nem specifikus (analgetikumok, antiemetikumok), illetve migrénre specifikus gyógyszerekkel. A specifikus gyógyszerek közé az ergot alkaloidokat és a triptánokat sorolhatjuk. A triptánok a trigeminovaskuláris aktiváció kialakulásában, etiológiájában fontos 5-HT hatásmechanizmusának modulálásán alapulnak. Az 5-HT-hoz hasonló vázzal rendelkeznek, és az 5HT_{B/D} receptorok agonistái.

3.2. A nitrogén monoxid szerepe a migrénben

A nitrogén-monoxid (NO) az első gáz halmazállapotú molekula, amelyről az utóbbi években igazolták, hogy fontos mediátor és neurotranszmitter funkciót tölt be. Rövid féléletidejű, kis molekulasúlyú. Sajátosságai közé tartozik a diffúzibilitás, könnyen átjut a biológiai membránokon. Értágító hatású, így a dura érhalózatának tónusszabályozásában van szerepe (Murad, 1994, Akerman és mtsai, 2002). Nem tekinthető "hagyományos" neurotranszmitternek, mivel nem vezikulákban tárolódik, nem exocitózissal és nem kvantumokban szabadul fel. A NO a célsejtben aktiválja a guanilát-cikláz enzimet, ezáltal ciklikus guanozin-monofoszfát keletkezik a sejten belül.

A NO-t a nitrogén-oxid szintáz (NOS) enzim képezi L-argininből. Megkülönböztetünk neuronális (nNOS), endotheliális (eNOS) és indukálható (iNOS) izoformákat. Az eNOS az endothelium mellett a vesecsatornák falának sejtjeiben, valamint az agyi piramissejtben, míg az iNOS azon immunsejtben található meg, amelyek gyulladásos reakcióra képesek. A nNOS főként az idegrendszerben fordul elő, jelenléte megfigyelhető a trigeminális rendszerben, a TNC-ben és a gerincvelő dorzális szarvának I., II., III. és X. laminájában (Olesen és mtsai, 1993). Az idegrendszeri struktúrák mellett előfordul még a vázizmokban, a hasnyálmirigy szigetsejtjeiben, a légutak hámsejtjeiben és a vese alsó kanyarult csatornájában.

A migrén egyik humán modellje a nitroglicerín (NTG) szisztémás adása. Egészséges emberekben azonnali fejfájást, míg migrénesekben az azonnali erősebb fejfájás mellett egy késleltetve megjelenő, aura nélküli migrénes rohamot is képes kiváltani (Iversen és mtsai, 1989, Thomsen és mtsai, 1994, Olesen és mtsai, 1995). Az azonnali fejfájás magyarázható a NO erős vazodilatációs hatásával, mely következtében aktiválódnak a durális nociceptorok. A migrénes roham késleltetett megjelenésére ez azonban már nem nyújt magyarázatot, mivel sem a NTG (Murad és mtsai., 1990), sem a NO (Kelm, 1999) *in vivo* féléletideje nem ilyen hosszú. Feltételezik, hogy a NO hosszan tartó endogén szintézise idézi elő a késleltetett migrénes rohamot (Lassen és mtsai, 1997).

A migrénes fejfájás alatt lejátszódó folyamatok vizsgálatára jó módszer az állatkísérletes modellek alkalmazása. A migrénnek számos állatkísérletes modellje ismert, többek között a trigeminális ganglion (Gasser-dúc) elektromos ingerlése vagy a NTG szisztémás adása. Ezek a modellek a trigeminovaskuláris rendszer elektromos, illetve kémiai stimulációjával alakítanak ki a migrénes rohamra jellemző változásokat, amelyeket különböző módszerekkel

(pl.: immunhisztokémia, Western-blot) tanulmányozni lehet. Ezek alapján az állatkísérletes modellek használata nagymértékben elősegítheti a migrén pathomechanizmusának és a migrén ellenes gyógyszerek hatásmechanizmusának minél pontosabb megértését.

A NTG szisztémás adása patkányban képes aktiválni a neuronális aktiváció markerének tartott c-Fos gént a TNC másodlagos érző neuronjaiban (*Tassorelli és mtsai, 1995, 1999*). A c-Fos immunhisztokémiai detektálásával azonosítani lehet a TNC ingerületi állapotba kerülő másodlagos idegsejteket. A kísérleti állatokban az NTG adását követően négy óra után érte el a csúcserőérték a c-Fos expresszió a TNC-ben, amely hozzávetőleg megfelel a humán vizsgálatokban tapasztalt, NTG által kiváltott migrénes fejfájás látenciájának (*Thomsen és mtsai, 1994, Olesen és mtsai, 1995*). Az aktiválódott neuronok jelentős része nNOS immunreaktivitást is mutatott (*Tassorelli és mtsai, 1995*), melynek szintje szintén megemelkedett NTG adása után. A kapszaicin képes kivédeni az NTG okozta aktivációt a TNC területén, mely arra utalhat, hogy a NO a trigeminális A δ - és C-rostokon keresztül fejti ki ezt a hatását (*Tassorelli és mtsai, 1997, Párdutz és mtsai, 2000*).

A NTG beadása után a TNC gerincvelői szegmensének felszíni rétegeiben a CGRP expresszió lecsökkent (*Párdutz és mtsai, 2002*), mely szintén a trigeminális A δ - és C-rostok aktiválódására és következményes transzmitter felszabadulására utal.

Ezek a változások egyik esetben sem jelentek meg a *thoracális* gerincvelői szakaszon, így feltételezhető, hogy a NTG szelektíven képes hatni a migrénben kiemelkedő jelentőségű TNC-re.

NOS inhibitorok hatására a NTG indukált c-Fos aktiváció kevésbé volt kifejezett patkány gerincvelő hátsó szarvában (*Wang és mtsai, 1999*), valamint hatásukra a trigeminovaskuláris rendszer neuronális aktivációja is csökkent (*Akerman és mtsai, 2002*).

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a szisztémás NTG adása a migrén egyik megbízható állatkísérletes modellje lehet.

Mivel a nNOS-nak lényeges szerepe van a fájdalom feldolgozásában, valamint hozzájárul a migrén során a centrális szenzitizáció kialakulásához (*Burstein és mtsai, 2000*), az általunk használt NTG modellben megjelenő nNOS emelkedés a nocicepció mellett a centrális szenzitizáció markerének tekinthető. A centrális szenzitizáció kivédése lényeges, hiszen kialakulása után a betegek kezelési lehetőségei romlanak (*Burstein és mtsai, 2004*).

3.3. Az endokannabinoid rendszer

3.3.1. Az endokannabinoid rendszer jellemzése

A vadkendert (*Cannabis sativa*) mint ismert kultúrnövényt évszázadokon keresztül használták kötelek, erős vásznak készítéséhez, emellett élvezeti szerként, kábítószerként volt ismert. Kivonatának alkalmazása a gyógyításban igen hosszú időre nyúlik vissza. Kínában fájdalomcsillapításra, Indiában pedig szorongásoldásra és étvágyfokozásra használták. Manapság számos orvos szerint alkalmas sclerosis multiplexes betegek esetén a rohamok enyhítésére (Syed és mtsai, 2014), a rákos betegek kemoterápiás kezelés során jelentkező táplálkozási nehézségek kezelésére, illetve a glaukómás betegek szemében az intraokuláris nyomás csökkentésére (Alsasua del Valle, 2006). Az orvosbiológiai kutatások napjainkban kezdtek érdemben foglalkozni a terápiás lehetőségeivel, illetve az endokannabinoidok élettani hatásait vizsgálni. Fájdalomcsillapító hatásuk olyannyira erős, hogy vetekszik a morfinéval. Ugyanakkor pszichotikus mellékhatása megnehezíti a széleskörű orvosi felhasználását (Earleywine, 2004).

Az endokannabinoidok a lipid mediátorok egy osztálya, amelyek számos szövetben megtalálhatóak, szerkezetileg többszörösen telítetlen zsírsavamidokból vagy észterekből épülnek fel.

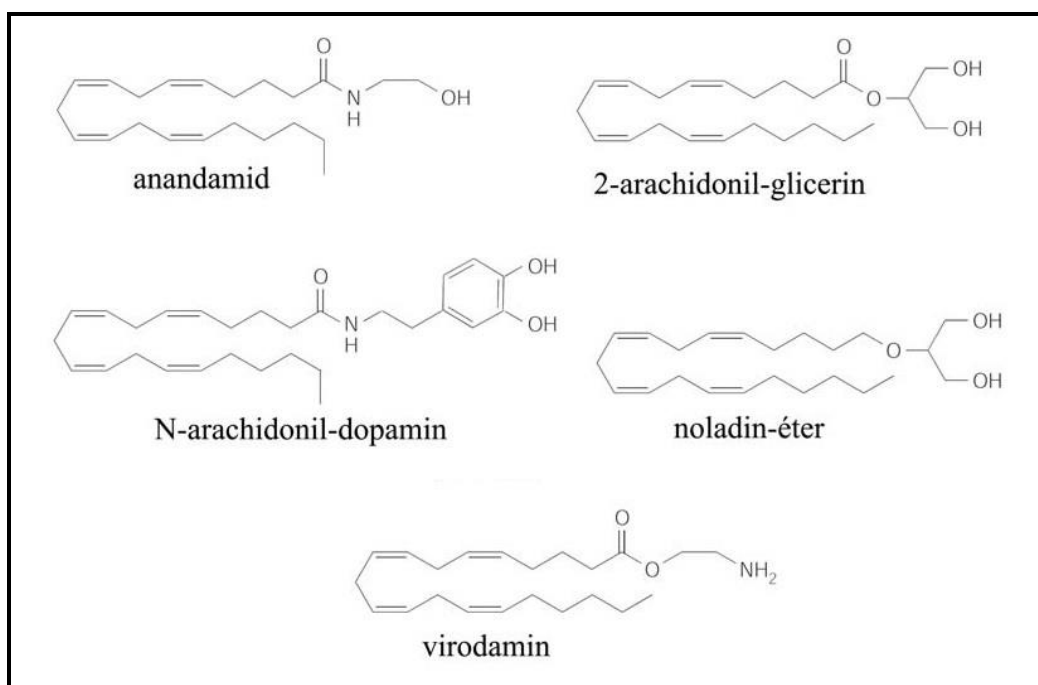
Számos tulajdonságukban eltérnek a hagyományos neurotranszmitterektől. A sejt aktiválódását követően indul meg szintézisük, és lipid természetük révén a sejtek membránján keresztül szabadulnak fel (Piomelli, 2003). Szintjük az idegsejtekben nem állandó.

Különböző fizioiógias és patológias funkcióban érintettek (pl.: a táplálékfelvétel szabályozásában, immunmodulációban, gyulladás kialakulásában, fájdalomcsillapításban) (Pacher, 2006). Jelen kutatások szerint az endokannabinoid rendszer részt vesz akut (pl.: ischaemiás stroke) és krónikus (pl.: Alzheimer-kór) agykárosodás, illetve a bazális ganglionok betegségei által okozott mozgászavarok (pl.: Gilles de la Tourette-szindróma) elleni védelemben (Romero és mtsai, 2002). Az epilepszia endokannabinoid rendszerrel való kapcsolatáról az eredmények ellentmondásosak, azonban a betegség bizonyos formájában az anandamid hatékonynak bizonyult a görcsrohamok oldásában és prevenciójában (Wallace és mtsai, 2002). Egyes feltételezések szerint a skizofrénia esetén az endokannabinoid rendszer

fokozott aktivációja hiperdopaminerg és hipoglutaminerg állapotot okoz, melyek együttesen a tünetek egy részéért felelőssé tehetők (*Laviolette és Grace, 2006*).

Az anandamid (N-arachidonoil-etanolamin) után, amely az elsőként felfedezett és legismertebb endogén kannabinoid molekula, másodikként a 2-arachidonoil-glicerint (2-AG) (*Mechoulam és mtsai, 1995, Sugiura és mtsai, 1995*) írták le, mely jóval nagyobb mennyiségben található meg az agyban (*Stella és mtsai, 1997*).

Ezekon kívül számos kémiai rokon bioaktív lipidet azonosítottak az agyban, amelyek kannabinoid receptorokon hathatnak, azaz endokannabinoidok lehetnek. Közéjük tartozik az N-arachidonoil-dopamin (*Bisogno és mtsai, 2000*), a 2-arachidonil-glicerin-éter, más néven noladin-éter (*Hanus és mtsai, 2001*), a virodamin (*Porter és mtsai, 2002*) és az N-arachidonoil-serin (*Milman és mtsai, 2006*), melyek a 1. ábrán láthatóak.



1. ábra: A kannabinoid receptorokon ható ligandok: az endokannabinoid molekulák kémiai szerkezete.

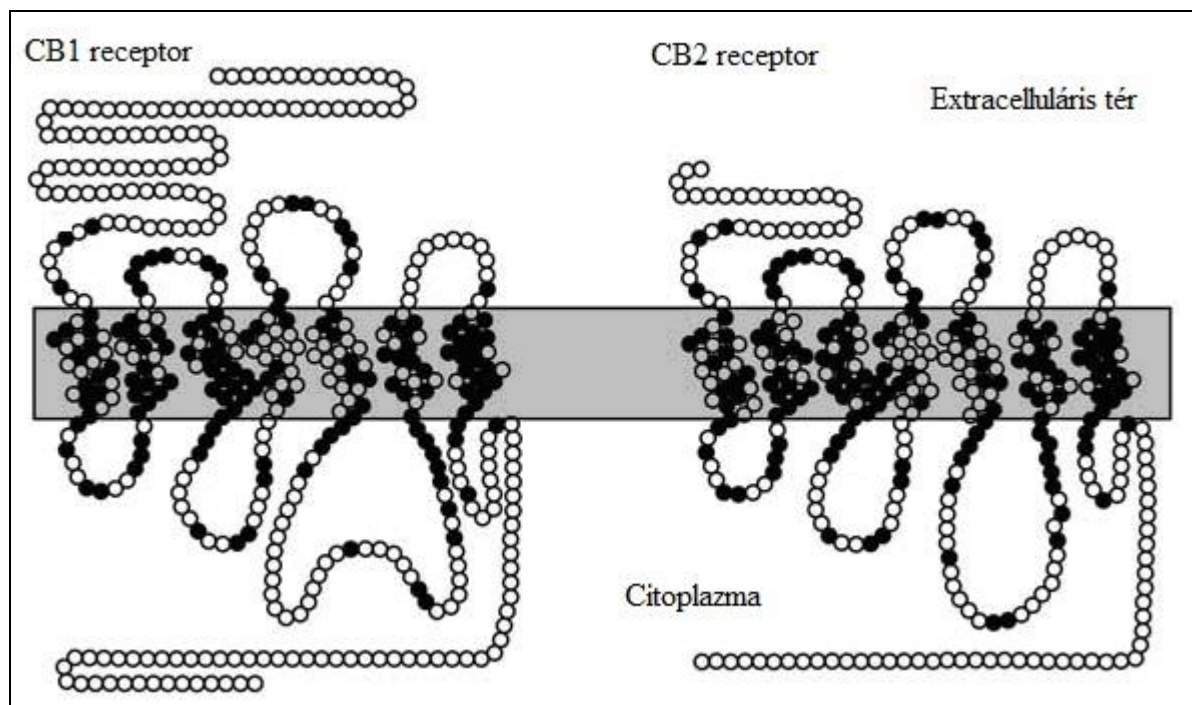
(*Battista N és mtsai, 2012*)

3.3.2. Kannabinoid receptorok

A kannabinoid receptoroknak (CB) 2 típusa van, CB1 és CB2, mindkettő G proteinhez kötődik, melyeknek 7 transzmembrán doménjük van (2. ábra). A receptorok ligandkötő helye egy hidrofób zsebben található, melyet a harmadik és hatodik transzmembrán domén alkot. Ezt a kannabinoid ligandok a membránban laterális diffúzióval érik el (Song és Bonner, 1996, Tian és mtsai, 2005).

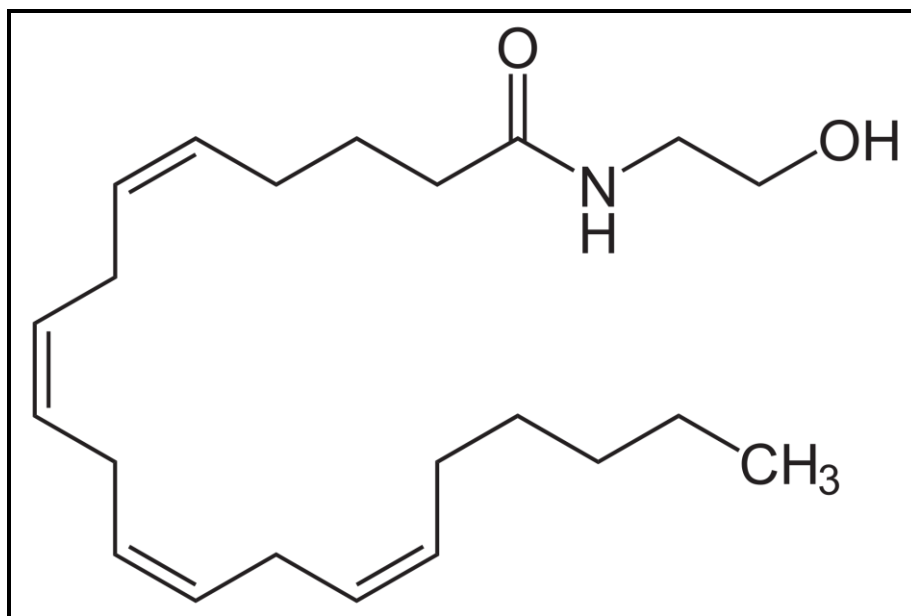
A CB1 receptorok a központi idegrendszerben, valamint a perifériás szövetekben is megtalálhatóak, mint például az agyalapi mirigyben, immunsejteken, a reproduktív és gasztrointesztinális szövetekben, szimpatikus ganglionokban, szívben, tüdőben, húgyhólyagban és a mellékvese mirigyben. Egyik funkciójuk, hogy modulálják a neurotranszmitter felszabadulást. Az agyban a CB1 receptorok eloszlása heterogén (Pertwee, 2002).

A CB2 receptorok főként az immunsejteken fordulnak elő, különösen a B sejteken és a természetes öltő sejteken, valamint az agyban előforduló mikrogliaák felszínén (Cabral és Griffin-Thomas, 2009). Funkciójukat nehéz megállapítani, de szerepük van a citokin felszabadulás modulálásában.



2. ábra: CB1 és CB2 receptor szerkezete (<http://www.upf.edu/en/noticies/en/1011/0920.html> alapján)

3.3.3. Az anandamid



3. ábra: Az anandamid szerkezete (Battista N és mtsai., 2012)

Az egyik fő endokannabinoid az anandamid vagy arachidonoil-etanolamid (AEA), amely nevét a szanszkrit „ananda” szóról kapta, melynek jelentése „belső öröm, áldás” (3. ábra). Az etanolamin arachidonsavval képzett amidja, az N-acil-etanolaminok (NAE) családjába tartozik. Az anandamid bioszintézisében több, egymástól részben független biokémiai útvonal érintett. A membránokban jelen lévő N-acil-foszfatidil-etanolaminok (NAPE) hidrolízisével keletkezik egy specifikus foszfolipáz D (NAPE-PLD) segítségével (Okamoto és mtsai, 2004). Az AEA hosszú szénhidrogén láncsal rendelkezik, melynek köszönhetően zsíroldékony, így könnyedén átmegy a membránokon. A sejteken belül anandamid transzporterek segítségével szállítódik (Fowler, 2012), nem tárolódik a sejtekben. A sejt stimulációját követő képződése után kiszabadul, intracellulárisan pedig a zsírsavamid-hidrolázok (FAAH) és oxigenázok átalakítják.

Az anandamid a CB1 receptor (Devane és mtsai, 1992) és a tranziens receptor potenciál vanilloid 1-es (TRPV1) receptor endogén agonistája. Idegrendszeri, gyulladáscsökkentő, immunmoduláló és proapoptotikus hatásokat is képes kiváltani. A CB1 és CB2 receptor altípust hozták összefüggésbe a többféle biológiai aktivitással, beleértve a nociceptív válaszok gátlását (Hohmann és mtsai, 1995, Tsou és mtsai, 1996). Az AEA antihiperalgéziás és gyulladásgátló folyamatai részben a gátló CB1 receptorok aktivációjának tulajdoníthatók a kapszaicin szenzitív primer szenzoros neuronok központi és perifériás végződésein

(Richardson és mtsai, 1998a, b). A gátló hatással szemben a megemelkedett AEA koncentráció serkenti a kapszaicin szenzitív elsődleges neuronok perifériás termináljait CB receptor-független mechanizmusokon keresztül.

Az anandamid a fájdalomcsökkentő hatása mellett vazodilatációt okoz (Ellis és mtsai, 1995, Randall és mtsai, 1997, Pratt és mtsai, 1998, O'Sullivan és mtsai, 2004). Ennek során a TRPV1 aktiválódik a perivaszkuláris szenzoros neuronokban, ami által CGRP szabadul fel (Zygmunt és mtsai, 2004).

Pszichoaktív szerepe mellett több fiziológias és viselkedésbeli, mint például szorongásoldó (Gaetani és mtsai, 2009) vagy antidepresszáns (Mangieri és Piomelli, 2007) hatás is hozzá kapcsolható. Ezek mellett még a neurodegenerációban (Hansen és mtsai, 2001) és a szinaptikus ingerületátvitel szabályozásában (Lovinger és mtsai, 2007) is részt vesz.

4. Célkitűzés

Kutatócsoportunk korábban már kimutatta, hogy a NTG képes megemelni a centrális szenzitizációra utaló nNOS-immunreaktív (IR) sejtek számát a gerincvelő cervikális szakaszán patkányban.

Jelen kísérletünkben arra voltunk kíváncsiak, hogy az endogén kannabinoidok közé tartozó AEA képes-e a NTG-indukálta változásokat modulálni.

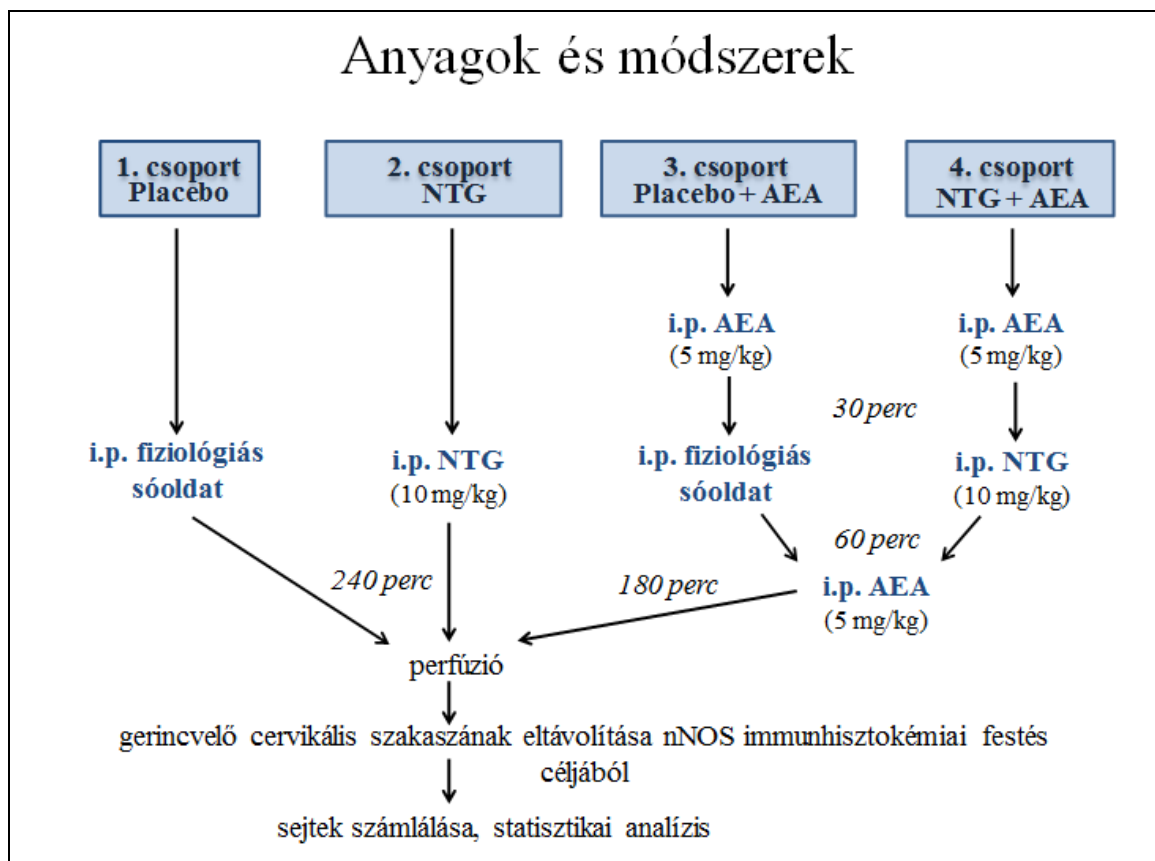
5. Anyagok és módszerek

5.1. Állatok

A kísérleti eljárások megfeleltek az Európai Közösség Tanácsának (86/609/ECC) és a Nemzetközi Fájdalomkutatási Egyesület ajánlásának. A kísérleteket a Csongrád Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága (XI./352/2012) és a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága engedélyezte. A kísérlet során 24 db hím Sprague-Dawley (SPRD) patkányt (250-300g) használtunk fel. Az állatokat 12 óra sötét és 12 óra megvilágítási ciklusokban, standard körülmények között tartottuk, elegendő étellel, ivóvízzel ellátva.

5.2. Kísérlet menete

A kísérletekben felhasznált 24 patkányt négy csoportra osztottuk, az alábbi ábrán látható módon (4.ábra). Az első csoport állatai intraperitoneális (i.p.) fiziológiás sóoldat injekciót (placebo) kaptak kezelésként. A második csoportban a patkányok i.p. NTG (10 mg/kg, Nitrolingual, Pohl Boskamp) kezelést kaptak. A harmadik és negyedik csoport állatainak i.p. AEA (5 mg/kg, Sigma, A0580, DMSO: fiziológiás sóoldat=1:19 arányú keverékében oldva) injekciót adtunk, majd 30 perc múlva i.p. placebo, vagy NTG kezelést kaptak, majd ezt követően egy órával újabb i.p. AEA (5 mg/kg) kezelést alkalmaztunk. A placebo, NTG kezelések után négy órával, mély klorál-hidrát (0,4 g/kg, Sigma, 23100) altatásban az állatokat 100 ml foszfátpufferrel (PBS) transzkardiálisan perfundáltuk, majd 500 ml PBS-ben oldott 4%-os paraformaldehid (PFA, Merck, 1.04005.1000) oldattal fixáltuk. Az így fixált állatokból a gerincvelő cervikális szakaszát az obextől számítva (-5)-(-11) mm-es szakaszon eltávolítottuk az immunhisztokémiai festések céljából, és egy éjszakán át posztfixáltuk szintén 4%-os PFA oldatban.



4. ábra: Anyagok és módszerek

5.3. Immunhisztokémia

Krioprotekció céljából az eltávolított gerincvelői szegmentumokat két órán át 10%-os, majd süllyedésig 20%-os és egy éjszakán át 30%-os szacharózoldatban tartottuk. Ezután a szegmentumokból kriosztát segítségével 30 μ m vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteket hideg PBS-t tartalmazó tégelyekbe gyűjtöttük. Az endogén peroxidáz blokkolására a szabadon úszó metszeteket 30 percig 0,3%-os hidrogén-peroxidot (H_2O_2 , Scharlau, HI0136) tartalmazó metanolban (Spektrum, 3. 13051) előkezeltük, majd 1%-os Triton X 100-at (Spektrum, 3.20150) tartalmazó PBS oldattal többször átmostuk. Ezután a n-NOS immunhisztokémiai festés céljából a metszeteket szobahőmérsékleten anti-nNOS primer antitestben (EuroProxima, B220-1) 1:5000-es hígításban inkubáltuk két éjszakán keresztül. Az immunhisztokémiai reakció vizualizálásához Vectastin® (Vector, PK 6101) avidin-biotin kittet használtunk, a színreakciót pedig nikkel-szulfát (Scharlau, NI0180) tartalmú 3', 3'-diaminobenzidin-hidrokloriddal (Sigma, D5637) hoztuk létre. A festődés specifitását a primer antitest elhagyásával ellenőriztük.

5.4. Adatfeldolgozás

A nNOS-IR neuronokat Zeiss Axio Imager M2 fénymikroszkóp (Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY, USA) 20x-os nagyítású objektíve alatt számoltuk. Azokat a neuronokat számoltuk, amelyeknél egyértelmű volt a festődés, és legalább egy axont láttunk. A gerincvelői metszeteken a nNOS pozitív neuronok számában az oldalak között nem volt különbség. Minden állatból egy sorozat metszetet használtunk fel, és a kétoldali sejtszámot minden állat esetén átlagoltuk.

A reprezentatív képeket Zeiss AxioImager M2 mikroszkópra (Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY, USA) szerelt AxioCam MRc kamerával (Carl Zeiss MicroImaging) (PixeLink, Ottawa, ON, Canada) készítettük.

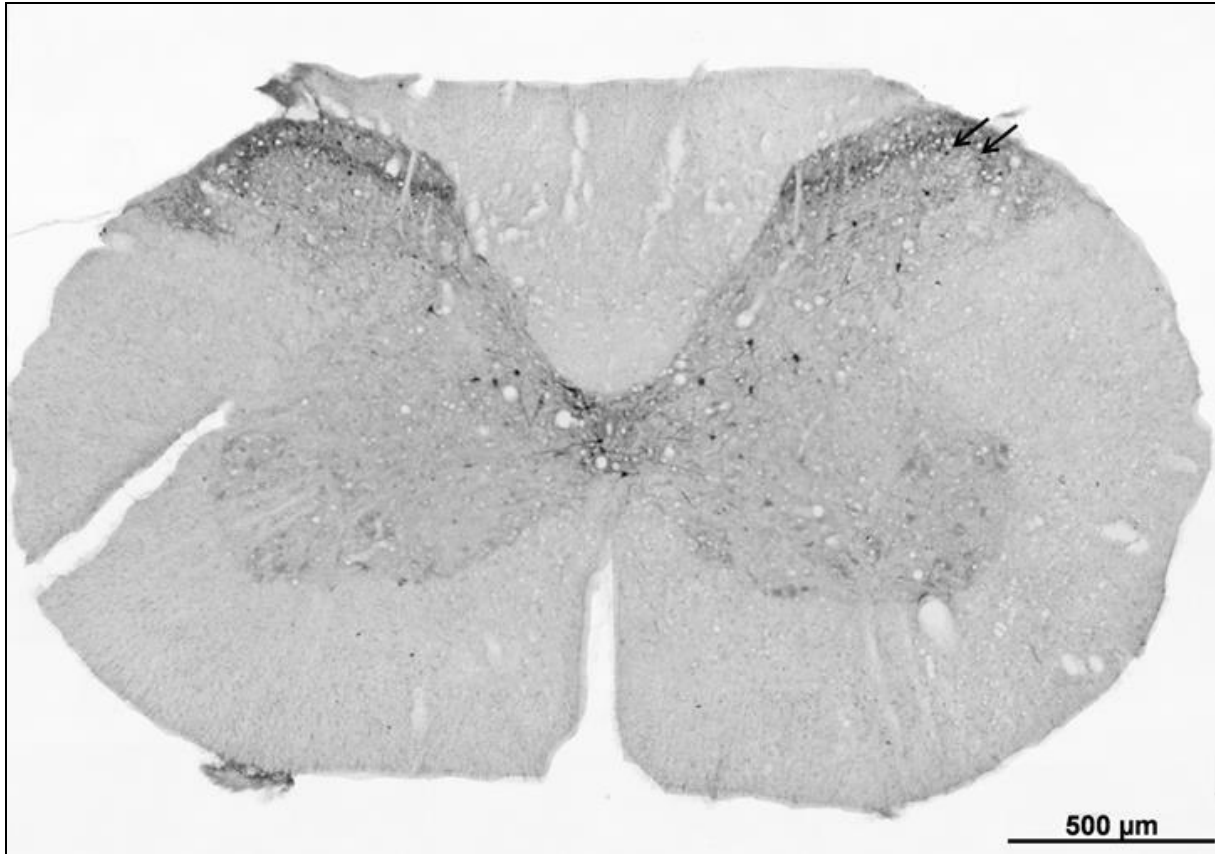
5.5 Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzést egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) használva végeztük. A páronkénti összehasonlításokhoz a Tukey Post Hoc tesztet használtuk.

A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értéken határoztuk meg.

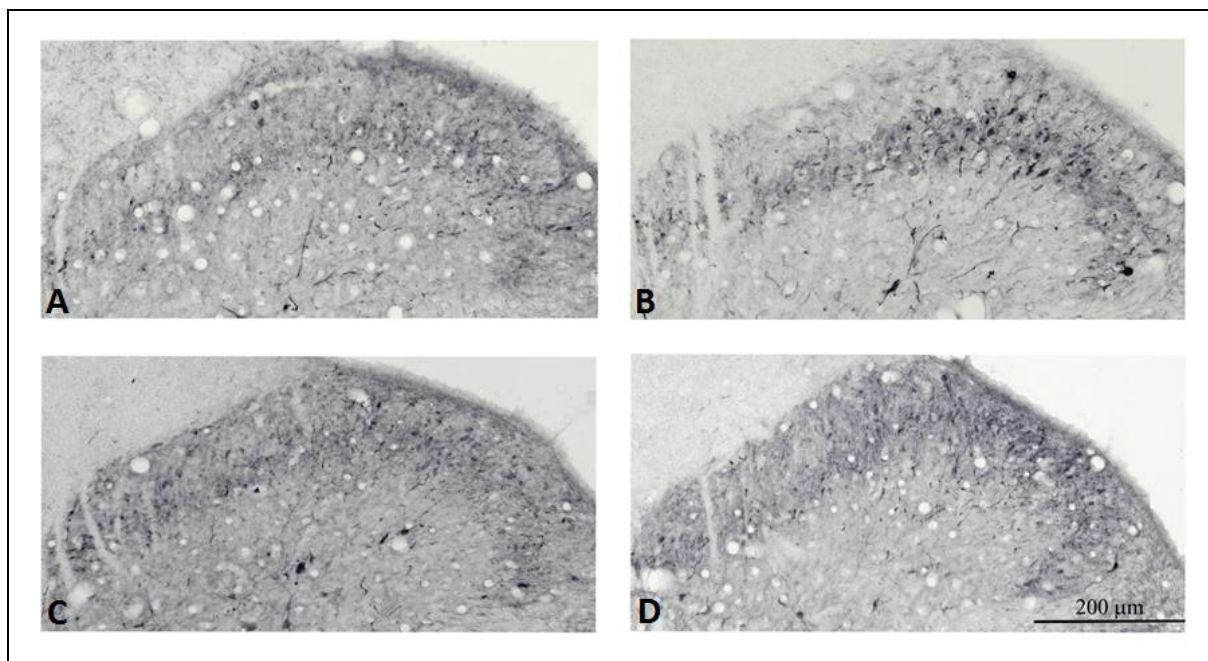
6. Eredmények

Az 5. ábrán az immunhisztokémiai festést követően, a NTG-nel kezelt csoport állatából készült reprezentatív kép látható a gerincvelő cervikális szakaszáról (5. ábra).



5. ábra: Patkány gerincvelő cervikális szakaszáról készült reprezentatív kép a nNOS immunhisztokémiai festés után. A nyilakkal a nNOS immunoreaktív sejteket jelöltük. Lépték: 500 μm

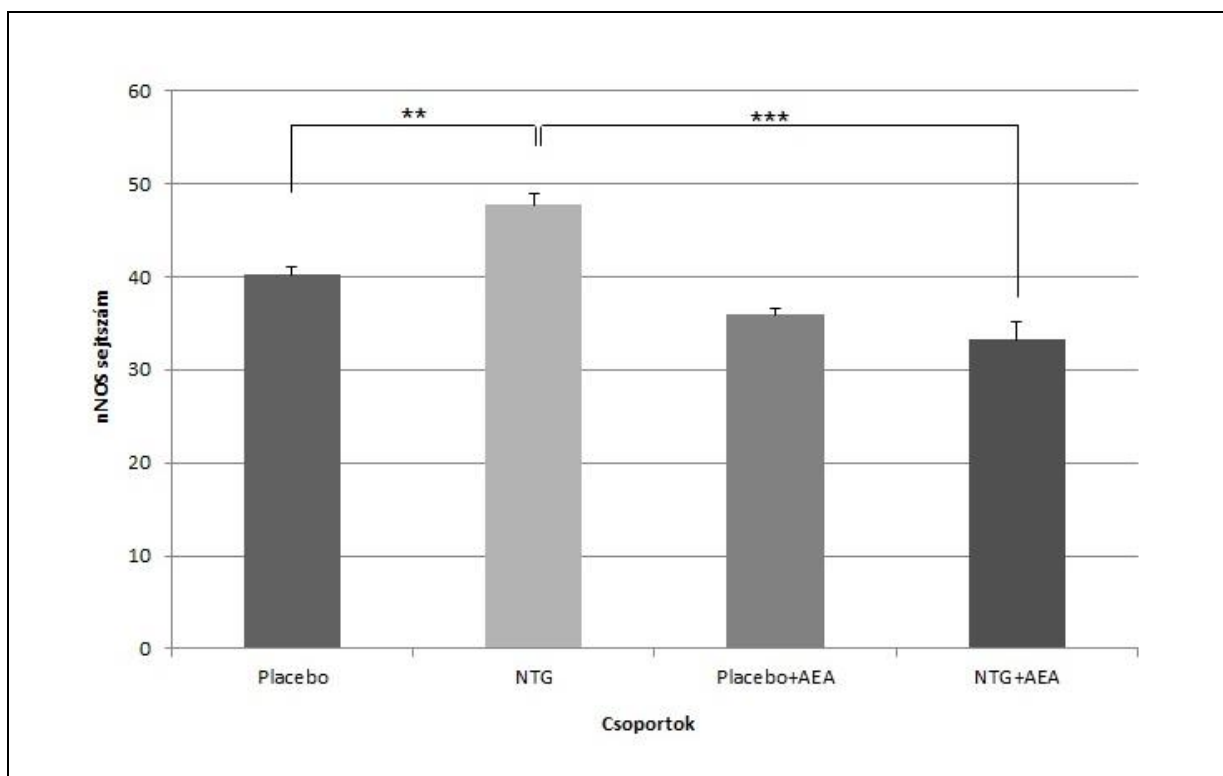
A metszeteken a NTG kezelt csoportban több nNOS-IR sejt látható, mint a placebo előkezelt csoportban. Az AEA kezelés részben kivédi a NTG okozta nNOS-IR emelkedést (6. ábra).



6. ábra: Patkány gerincevelő cervikális szakaszának hátsó szarvairól készült reprezentatív képek a nNOS immunhisztokémiai festés után. Az „A” képen a fiziológias sóoldatot, míg a „B” képen a nitroglicerint kapott csoport metszetei láthatók. A „C” képen a fiziológias sóoldatot és anandamidot kapott, míg a „D” képen a nitroglicerint és anandamidot kapott állatok mintái láthatók. Lépték: 200 µm.

Az adatok statisztikai elemzése alapján a placebo előkezelt csoporthoz képest a NTG előkezelt csoportban szignifikáns nNOS-IR sejtszám növekedés figyelhető meg (6. ábra; $**p < 0,01$). Az AEA-kezelést követően a NTG okozta nNOS-immunreaktivitás szignifikánsan kisebb a NTG előkezelt csoporthoz képest (6. ábra; $***p < 0,001$).

A gerincvelő cervikális szakaszának egyes oldalait külön-külön vizsgálva nem találtunk szignifikáns különbséget a rostromaudális tengely egyes magasságai között.



7. ábra: Az nNos sejtszám változása (átlag+S.E.M.). Az oszlopok a fiziológiás sóoldattal és a NTG-nel kezelt, valamint az anandamid kezelést kapott csoportban szintén a fiziológiás sóoldattal és a NTG-nel kezelt csoport átlagos sejtszámát mutatják. A fiziológiás sóoldattal kezelt csoporthoz képest a NTG szignifikánsan megemeli az IR sejtek számát a gerincvelő cervikális szakaszán ($**p < 0,01$). Az AEA-kezelés után a NTG-kezelt csoportban szignifikánsan kisebb az IR sejtek átlagos száma a fiziológiás sóoldattal kezelt csoporthoz képest ($***p < 0,001$).

7. Megbeszélés

A trigeminális rendszer fontos a fej területére lokalizálódó fájdalmas ingerek feldolgozásában, így az elsődleges fejfájások kialakulásában is kulcsszerepe van.

Kísérleteinkben az i.p. adott NTG hatására patkány cervikális gerincvelői szakaszán a nNOS-IR sejtek jelentős emelkedését figyelhettük meg. Eredményeink alapján az AEA-kezelés képes kivédeni a NTG indukált nNOS változásokat, azaz képes modulálni a nociceptív szenzitizációs folyamat kialakulását.

Mivel több kutatás kimutatta, hogy a nNOS-nak lényeges szerepe van a fájdalom feldolgozásában és hozzájárul a migrénben is oly fontos centrális szenzitizáció létrejöttéhez (*Burstein és mtsai, 2000*), így az általunk használt NTG modellben megjelenő nNOS emelkedés a nocicepció mellett a centrális szenzitizáció meglétére és mértékére utalhat. A NO általi nNOS indukciónak elméletben számos módja lehet a másodlagos trigeminális érzősejtekben, de az a legvalószínűbb, hogy a vékony perifériás nociceptív afferensek aktivációja által hozza létre ezt a hatást (*Tassorelli és mtsai, 1997, Párdutz és mtsai, 2000*). A NTG képes csökkenteni az elsődleges trigeminális nociceptorok CGRP szintjét a trigemino-cervikális komplex cervikális részén, ami szintén az elsődleges neuronok aktivációjára és transzmitter felszabadulására utal (*Párdutz mtsai, 2002*). A NO donor NTG adása kapcsán megnövekedő nNOS-IR expresszió önerősítő folyamatra utalhat, mely részt vehet a centrális szenzitizáció kialakulásában a TNC szintjében (*Chacur és mtsai, 2010, Fang és mtsai, 2002*). A NTG-ből keletkező NO aktiválja az elsődleges trigeminális neuronok A δ - és C-rostjait (*Párdutz és mtsai, 2000*), ami a másodlagos trigeminális nociceptorok aktiválódásához vezet, amely c-Fos vagy nNOS sejtszám emelkedésben lesz látható. Az elméletet igazolja, hogy a NTG beadást követően a másodlagos trigeminális neuronok szintjén a megnövekedett c-Fos expresszió kivédhető a kapszaicinérzékeny rostok károsításával (*Tassorelli és mtsai, 1997*).

Jelen kísérletünkben az endokannabinoid AEA képes volt a centrális szenzitizációra utaló nNOS-IR sejtek csökkentésére a trigeminális rendszer másodlagos érző neuronjaiban.

Tassorelli és munkatársai kísérletében az AEA analgézias hatását vizsgálták az orofaciális formalin tesztben (*Tassorelli és Joseph, 1995*). A vizsgálatban 30 perccel a formalin injekció beadása előtt és után i.p. 20 mg/kg mennyiségben AEA-t adtak az állatoknak. Az AEA-kezelés szignifikánsan csökkentette a NTG indukált nociceptív viselkedésmintákat a formalin teszt mindkét fázisa során. Megszüntette a NTG indukált hiperalgéziát a formalin teszt 2. fázisában. Az AEA előkezelés szignifikánsan csökkentette a NTG indukált neuronális

aktivációt a TNC-ben (*Smith és mtsai, 1994, Welch és mtsai, 1995*) az area postrema területén, míg ugyanez a kezelés a hipotalamus paraventriculáris és supraopticus magjaiban, a parabanchiális magban és a periaqueductális szürkeállományban megnövekedett c-Fos expressziót váltott ki.

A trigeminális rendszer számos területén sikerült endokannabinoid receptorokat azonosítani. A CB1 receptor a trigeminális ganglion maxilláris és mandibuláris ágának közepes és nagy átmérőjű neuronjain lokalizálódott. Ezen kívül CB1 immunoreaktív rostokat találtak a periaqueductális szürkeállományban, a gerincvelő trigeminális traktusában és magjaiban, a dorzális szarvban és a gerincvelő X. laminájában (*Tsou és mtsai, 1997*), amely a CB1 receptor centrális fájdalom feldolgozásban betöltött szerepét hangsúlyozza (*Ohno-Shosaku és mtsai, 2001, Freund és mtsai, 2003*). Herkenham patkány gerincvelőjében kannabinoid receptorokat azonosított (*Herkenham és mtsai, 1991*). Az állatok spinalizációját követően a kannabinoid indukált antinocicepció megmarad (*Lichtman és Martin, 1991*). Továbbá, a kannabinoid agonisták gátolják a gerincvelői neuronok tüzelését a noxikus stimulusra adott válaszban (*Hohmann és mtsai, 1995*), és megakadályozzák a c-Fos expressziót a dorzális szarvban (*Tsou és mtsai, 1996*).

Az endokannabinoidok trigeminális rendszerre való hatása még nem tisztázott. Mivel a kannabinoid receptorok jelen vannak a trigeminális rendszerben, így az AEA a hatását kifejezheti közvetlenül a trigeminális rendszer neuronjain.

Megállapítható tehát, hogy a CB receptorok farmakológiai szabályozása hasznos lehet a migrénes fájdalom kezelésében. Ezek az eredmények összhangban vannak a korábbi megfigyelésekkel, melyek azt mutatták, hogy az i.p. adott AEA 10-100 mg/kg közötti tartományban egerek esetén fájdalomcsillapító hatású például a *tail-flick*- és *hot plate*-vizsgálatoknál.

Jelen kísérletünkben kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a trigeminális rendszer aktivációjában és szenzitizációjában az AEA-nak moduláló hatása van. A hatásmechanizmus nem tisztázott, de feltehető, hogy a trigeminális rendszerben megtalálható kannabinoid receptorokon keresztül járul hozzá az aktiváció és a szenzitizáció mérsékléséhez. Ezek alapján az endogén kannabinoidok esetleges terápiás lehetőséget nyújthatnak a migrénes fejfájás kezelésében.

8. Irodalomjegyzék: lásd kiegészítő dokumentum

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Dr. Vécsei Lászlónak, hogy kísérleti munkámhoz lehetőséget és a szükséges feltételeket biztosította.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Párdutz Árpádnak és Nagy-Grócz Gábornak a szakmai irányításért és hasznos tanácsokért.

Köszönöm belső konzulensemnek Dr. Farkas Tamásnak a segítségét.

Köszönet és hála illeti Dr. Tar Lillát, Bohár Zsuzsannát, Fejes – Szabó Annamáriát és Vékonyé Széll Valériát, akik segítettek a laborban használt technikák elsajátításában, valamint támogattak a munkám során.

10. Tételes szakmai hozzájárulás

Alulírott Spekker Eleonóra a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül az:

- az állatok oltását és transzkardiális perfúzióját,
- a minták metszését és immunhisztokémiai festését,
- és a sejtek számolását

végeztem el.

.....
aláírás

Szeged, 2014. április 22.

11. Nyilatkozat

Alulírott Spekker Eleonóra, Biológia BSc szakos hallgató, kijelentem, hogy a szakdolgozatban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

.....
aláírás

Szeged, 2014. április 22.