

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**NOCICEPTÍV IONCSATORNÁK ÉS A KALCITONIN GÉN-ROKON PEPTID
SZEREPE A TRIGEMINOVASZKULÁRIS RENDSZERBEN – A MIGRÉN
PATOFIGIOLÓGIAI FOLYAMATAINAK ÁLLATKÍSÉRLETES VIZSGÁLATA**

Dr. Dux Mária



Élettani Intézet

Általános Orvostudományi Kar

Szegedi Tudományegyetem

2019

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**NOCICEPTÍV IONCSATORNÁK ÉS A KALCITONIN GÉN-ROKON PEPTID
SZEREPE A TRIGEMINOVASZKULÁRIS RENDSZERBEN – A MIGRÉN
PATOFIGIOLÓGIAI FOLYAMATAINAK ÁLLATKÍSÉRLETES VIZSGÁLATA**

Dr. Dux Mária

**Élettani Intézet
Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem**

2019

1. BEVEZETÉS

A fájdalomérzés és fájdalomcsillapítás kutatása mind medicinális, mind társadalmi jelentőségének köszönhetően a neurobiológiai kutatások intenzíven művelt területe. Bár a fájdalom a leggyakoribb tünet, amivel a betegek orvoshoz fordulnak, a különböző megbetegedésekhez társuló, vagy önálló kórképként jelentkező "primer" fájdalom csillapítása napjainkban sem tekinthető megoldottnak. A speciális fájdalomformák közül a fejfájások a leggyakrabban előforduló fájdalmak közé tartoznak. A migrén, mint primer fejfájás betegség a különböző felmérések szerint a nők 11,2-25 %-át, a férfiak 4-9,5 %-át érinti (Rasmussen, 2001). 1998-ban a Bánk és Márton által készített epidemiológiai felmérés Magyarországon a migrén egyéves prevalenciáját 9,6 %-nak találta (Bánk és Márton, 2000).

A migrénes rohamok megnehezítik, sok esetben lehetetlenné teszik a beteg számára a normális életvitelt, a munkából való kiesés pedig jelentős szociális és gazdasági terhet ró a társadalomra. A migrén tünetei összetettek. Jellemzően egyoldali, lüktető, görcsös jellegű fejfájással jár, a rohamok 4-72 órán át tarthatnak, mely során a fájdalmat a fizikai aktivitás súlyosbítja. A fájdalomhoz sok esetben társul fokozott fény- és hangérzékenység, hányinger, hányás. Az esetek 30 %-ában a migrénes rohamot aura vezeti be. Az aura reverzibilis jellegű vizuális és/vagy szomatoszenzoros tünetekkel, motoros- illetve beszédzavarral járhat, melyek kiváltásáért újabban az agykérgi kúszó depolarizációt teszik felelőssé (Headache Classification Committee, 2018).

A migrénes roham során jelentkező fájdalom kiváltásában a dura mater encephali nociceptorainak tulajdonítanak szerepet. Az 1900-as évek közepén, éber embereken nyitott koponya mellett végzett vizsgálatok igazolták, hogy míg az agyburkok különböző szenzoros stimulusokkal történő ingerlése által kiváltható egyetlen érzésképeség a fájdalom, mely lokalizációjában is megfelel a spontán jelentkező migrénes fejfájásnak, addig maga az agy állományának és az agyi erek többségének ingerlése semmilyen érzetet nem vált ki (Feindel és mtsai., 1960; Ray és Wolff, 1940).

A migrén patofiziológiáját érintő bizonytalanságok ellenére viszonylag korán felismerték ezekben a folyamatokban a trigeminovaskuláris rendszer nociceptorainak jelentős hányadában expresszáldó neuropeptid, a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) központi szerepét. Klinikai vizsgálatok során migrénes betegek vena jugularis-ának vérében migrénes roham alatt az érintett oldalon emelkedett CGRP koncentrációkat mértek (Goadsby és mtsai., 1990). A CGRP migrén patofiziológiában betöltött központi szerepét kísérletes és klinikai megfigyelések mellett

egyértelműen igazolja az a tény is, hogy az elmúlt három évtized során a migrén terápiájába bevezetett vagy fejlesztés alatt álló készítmények valamennyien a CGRP hatásának gátlása útján fejtik ki jótékony hatásukat (Messlinger, 2018). Bár ezek a készítmények jelentős előrelépést hoztak a migrén terápiájában, továbbra is igen keveset tudunk ezek hatásmechanizmusáról, illetve a migrén tüneteinek hátterében álló patofiziológiai folyamatokról. Pedig, mint minden kórállapot, így a fejfájások esetében is a betegség patomechanizmusának megismerése előfeltétele a racionális terápiás lehetőségek feltárásának.

1.1. A dura mater anatómiája, vérellátása, innervációja

A dura mater encephali az agyat borító agyburkok legkülső rétege. A dura mater vérellátását biztosító legfőbb artéria az arteria meningea media, mely az arteria maxillaris ága. A döntően a nervus trigeminus ágai által biztosított szenzoros innerváció mellett jelentős a dura mater ganglion cervicale superius-ból származó szimpatikus és kisebb mértékben a ganglion sphenopalatinum-ból és a ganglion oticum-ból származó paraszimpatikus innervációja. A szenzoros és vegetatív axonok kötegeket alkotva kísérik az artéria ágakat, de egyes rostok a dura kötőszövetes állományában, az erektől távolabbi területeken is megfigyelhetők.

A dura mater encephali szenzoros innervációjában részt vesz a nervus trigeminus mindhárom ága; a nervus ophthalmicus, a nervus maxillaris és a nervus mandibularis. A primer szenzoros neuronok sejtteste a ganglion trigeminale-ban (Gasser dúc) helyezkednek el, centrális nyúlványaik az agytörzsben a nucleus tractus spinalis nervi trigemini-ben szinaptizálnak a másodlagos neuronokkal. A dura mater okcipitális területének érző beidegzését az első két gerincvelői szegmentum biztosítja.

1.2. A meningeális szöveteket innerváló kemoszenzitív neuron populáció

A kemoszenzitív neuronok a hátsó gyöki ganglionokban és az agyidegek érző dúcaiban elhelyezkedő kis- és közepes méretű pseudounipoláris neuronok, melyek vékony velős A δ - vagy velőtlen C-típusú rostokkal rendelkeznek (Jancsó és mtsai., 1985). A tranziens receptor potenciál (TRP) receptor családkhoz tartozó receptorokat expresszálnak, jelentős hányaduk a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) vagy capsaicin receptort, illetve a tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) receptort. A TRPV1 receptort magas hőmérséklet (>43°C), savas pH és különféle exogén és endogén eredetű anyagok aktiválhatják. A receptor elsőként azonosított és egyben legtöbbet tanulmányozott archetipikus exogén agonistája a capsaicin (8-methyl-*N*-vanillyl-

6-nonenamide), a paprika (*Capsicum annuum*) csípős anyaga (Jancsó és mtsai., 1968). Egy további természetben előforduló agonistája a reziniferatoxin, a marokkói *Euphorbia resinifera* nedvéből nyert diterpén. A bors csípős anyaga, a piperin és a gyömbérből kinyerhető zingeron, valamint az etanol szintén ismert aktivátorai a receptornak (Liu és Simon, 1996; Szallasi és mtsai., 1999). Reaktív oxigén gyökök diszulfid hidak képzése révén módosíthatják a TRPV1 receptor szerkezetét és működését. A TRPV1 receptor endogén agonistái között találunk különböző membrán lipid metabolitokat, mint az eicosanoidok és az endovanilloidok. A TRPA1 csatorna aktivációja közvetíti a mustárolaj (allil-izotiocianát), a fokhagymában lévő allicin és a fahéjaldehid irritáló hatását. Az akrolein, ami a dohányfüst és a járművek kipufogó gázának egyik komponense és más irritáló gázok (pl. a fejfájás fának nevezett *Umbellularia californica* által a levegőbe juttatott umbellulon) belégzése a nociceptorok TRPA1 receptorainak aktiválása révén triggerét képezik a migrénes fejfájásnak arra hajlamos embereknél (Nassini és mtsai., 2012). A TRP receptorok nem szelektív kation csatornák, melyek aktiválódása a Na^+ mellett jelentős mennyiségű Ca^{2+} sejtbe jutását is elősegítheti. A kemoszenzitív neuronok jelentős hányada neuropeptideket, CGRP-t, P-anyagot (SP), szomatosztatint, neurokinin A-t és hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet tartalmaz (Höckfelt és mtsai., 1980). A peptiderg nociceptorok összetett funkcióval rendelkeznek; egyrészt afferens működésüknek megfelelően továbbítják a nociceptív információt a központi idegrendszer felé, másrészt a perifériás végződéseikből neuropeptideket felszabadítva efferens funkciót is betöltenek. A perifériás végződésekből szabaddá váló peptidek az innervált szövetben lokális szabályozó szerepet látnak el; részben közvetlenül, részben szöveti sejtekből további mediátorokat felszabadítva befolyásolják a helyi szöveti; vaszkuláris és simaizom működéseket (Szolcsányi, 1988).

A meningeális nociceptorok válaszkészsége számos patofiziológiai tényező hatására fokozódhat. Különböző vér- és szöveti eredetű faktorok hatására foszforilálódhatnak a specifikus nociceptor ioncsatornák (TRPV1, TRPA1), ami megnöveli a csatorna nyitásának valószínűségét. A migrén patogenezisében azonban szerepet játszhatnak olyan mechanizmusok is, melyek a nociceptorok membránpotenciáljának megváltoztatása révén érzékenyítik a szenzoros neuront.

1.3. A kalcitonin gén-rokon peptid szerepe a meningeális véráramlás szabályozásban

Emberben a ganglion trigeminale neuronjainak jelentős hányada (49 %-a) tartalmaz CGRP-t (Eftekharí és mtsai., 2010). A dura materben a CGRP túlnyomóan a kemoszenzitív afferensekben

fordul elő, a TRPV1 receptort expresszáló afferenseknek pedig 70 %-a tartalmaz CGRP-t (Shimizu és mtsai., 2007).

A funkcionális CGRP receptor 3 fehérjéből áll. A calcitonin receptor-like receptor (CLR) 7 transzmembrán doménnel rendelkező fehérje, melyet kiegészít egy transzmembrán receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1). A RAMP1 felelős a CGRP specifikus kötéséért. A funkcionális CGRP receptor harmadik komponense egy intracelluláris fehérje, a receptor component protein (RCP), ami a receptort az intracelluláris szignalizációs úthoz kapcsolja G-fehérjén és adenilát-ciklázon keresztül. Humán és rágcsáló kemény agyhártyában a CLR és a RAMP1 kimutathatók az artériák simaizomsejtjein, patkány dura mater mintákban azonosították még mononukleáris sejteken és Schwann sejteken is. A ganglion trigeminale-ban a CGRP receptor neuronokban, valamint Schwann- és szatellita sejtekben is kimutatható. Jelenlegi ismereteink szerint a CGRP a legerősebb hatású vazodilatátor anyag az intracerebrális keringésszabályozásban (Brain és mtsai., 1985). Kísérletes körülmények között a CGRP meningeális véráramlásfokozó/vazodilatátor hatása jól mérhető lézer Doppler áramlásmérővel, vagy videomikroszkópos eljárással (Gupta és mtsai., 2006; Kurosawa és mtsai., 1995). A CGRP által kiváltott vazodilatációban valószínűleg több különböző intracelluláris mechanizmus aktiválódása is szerepet játszhat, de az intrakraniális erek esetében a CGRP döntően ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP) által mediált folyamat révén fejti ki vazodilatátor hatását (Edvinsson és mtsai., 1985).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink alapvető célkitűzését a fejfájások, elsősorban a migrén kialakulásában szerepet játszó meningeális és agytörzsi neuronális illetve vaszkuláris folyamatok patomechanizmusának vizsgálata képezte. Munkánk alapvetően arra a feltételezésre épült, hogy a szervezet egyéb szerveinek nociceptív folyamataihoz hasonlóan a kemoszenzitív, TRPV1 (capsaicin) receptort kifejező afferensek fontos szerepet játszhatnak a fejfájások, illetve a meningeális nociceptív működések mechanizmusában. Ezért kezdeti vizsgálatainkban célul tűztük ki a kemoszenzitív primer szenzoros idegek meningeális előfordulásának funkcionális és farmako-morfológiai módszerekkel történő bizonyítását. Ezt később a meningeális kemoszenzitív afferens idegek extrakraniális axon kollaterálisainak feltérképezésével és funkcionális jelentőségének vizsgálatával egészítettük ki.

Tekintettel arra, hogy a migrénes fejfájások kialakulása szorosan összefügg a dura mater érrendszerében létrejövő vaszkuláris folyamatokkal, megvizsgáltuk a kemoszenzitív afferenseken

kifejeződő nociceptív ioncsatornák, a TRPV1 és a TRPA1 receptorok aktiválásával kiváltható meningeális érreakciókat a kísérletes fejfájáskutatásban alkalmazott patkány nyitott koponyaablak modellben. Farmakológiai és immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk a TRPV1 és TRPA1 nociceptív ioncsatornák, a CGRP és a CGRP receptor-komplex, valamint a PAR2 receptorok szerepét a meningeális szenzoros neurogén vazodilatáció mechanizmusában. Megvizsgáltuk a gáz transzmitterek, a nitrogén-monoxid (NO) és a kénhidrogén (H₂S) interakciójának szerepét a meningeális vaszkuláris reakciókban. Méréseket végeztünk a meningeális nociceptorok aktiválódása következtében felszabaduló CGRP szisztémás keringés, illetve likvor tér irányába történő transzportjára és lehetséges hatásaira vonatkozóan.

További vizsgálataink a meningeális kemoszenzitív primer afferens idegek különböző patológiás folyamatokban kialakuló megváltozott funkciójának feltárására irányultak. Megvizsgáltuk a népbetegségnek számító – és fokozott migrén prevalenciával társuló – elhízás kísérletes állatmodelljében a nociceptív ioncsatornák aktiválásával kiváltható meningeális érreakciókban, CGRP felszabadulásban és a dura mater beidegzésében bekövetkező változásokat. Ugyancsak vizsgálat tárgyává tettük a kísérletes diabetes mellitus meningeális szenzoros neurogén vazodilatációra, CGRP felszabadulásra és a dura mater innervációjára kifejtett hatását. Állatkísérletes modellben tanulmányoztuk az onkotéripiában széleskörűen alkalmazott – és szenzoros neuropátia kialakulásához vezető – adriamycin kezelés következményeit a meningeális vaszkuláris reakciókra, CGRP felszabadulásra és a CGRP receptor komplexre.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Meningeális kemoszenzitív afferensek és extrakraniális kollaterálisok morfológiai azonosítása és funkcionális jellemzése

Bár a migrén patomechanizmusának vizsgálata kapcsán korábban felmerült a dura matert innerváló capsaicin szenzitív, TRPV1 receptort expresszáló afferensek lehetséges szerepe, ezek létezésének igazolására tett erőfeszítések a 2000-es évek elejéig nem jártak sikerrel annak ellenére, hogy korábban kísérleti állatokban a dura mater elektromos ingerlésével kiváltott vazodilatáció hátterében CGRP felszabadulást igazoltak (Kurosawa és mtsai., 1995). Kísérleteink során célul tűztük ki a dura matert innerváló kemoszenzitív neuronpopuláció létezésének, meningeális nociceptív folyamatokban és véráramlás szabályozásban betöltött szerepének igazolását, valamint annak bizonyítását, hogy ezek az afferensek extrakraniális kollaterálisokkal is rendelkeznek és morfológiai alapját képezhetik az extrakraniális szövetek felől érkező stimulusok

és a koponyán belül érvényesülő hatások integrációjának és a következményes nociceptív reakcióknak. Kísérleteink során olyan endogén anyagok hatásait is vizsgáltuk, melyek a nociceptorok aktivációjához vezethetnek és így migrénes betegek esetében a perifériás és centrális szenzitizáció folyamataiban is szerepet játszhatnak.

A capsaicin szelektív neurotoxikus hatásán alapuló farmako-morfológiai módszerrel elektronmikroszkópos vizsgálataink során igazoltuk a capsaicin-/kemoszenzitív velőtlen afferens idegrostok előfordulását patkány dura materében. *In vivo* véráramlás modellünkben illetve *ex vivo* dura mater preparátumunkban a kemoszenzitív afferensek stimulációjával CGRP felszabadulást és következményes meningeális véráramlás fokozódást tudtunk igazolni. A TRPV1 receptor és a CGRP kolokalizációját a dura mater afferenseiben immunhisztokémiai vizsgálataink eredménye is megerősítette. Véráramlás vizsgálataink ugyanakkor rávilágítottak a TRPV1 receptor agonista capsaicin meningeális artériákon kifejtett kettős hatására is; kísérletes körülmények között közvetlen vazokonstriktor hatással is rendelkezik, ami a vaszkuláris simaizmon expresszáldó TRPV1 receptorokon, illetve egyéb Ca^{2+} -csatornákon kifejtett hatás eredménye lehet (Kark és mtsai., 2008).

A trigeminovaszkuláris rendszer endogén vanilloidok iránti érzékenységének vizsgálatát az indokolta, hogy migrénes rohamban a membrán lipid metabolitként a szövetekben fiziológiás körülmények között is termelődő endogén vanilloidok/kannabinoidok feltételezhetően nagyobb valószínűséggel szerepelhetnek a kemoszenzitív neuronok TRPV1 receptorainak aktivátoraként, mint a hőmérséklet emelkedése, vagy a pH savas irányba történő eltolódása. Eredményeink azt mutatják, hogy az arachidonoil-etanolamid (anandamid) és az N-arachidonoil-dopamin (NADA) eltérő vazoregulátor sajátságokkal rendelkezik a trigeminovaszkuláris rendszerben, aminek a hátterében az eltérő peptid felszabadító képességük áll. Míg a NADA jelentős, addig az anandamid elhanyagolható mértékű véráramlás fokozódást váltott ki a meningeális erekben *in vivo* modellünkben. A különbség hátterében valószínűleg a két anyag meningeális nociceptorokon expresszáldó TRPV1 és kannabinoid (CB1) receptorokon megnyilvánuló eltérő hatásere ssége áll (Starowicz és mtsai., 2007). Az anandamid gyengébb vazodilatátor hatását a preszinaptikus CB1 receptorokon kifejtett erősebb endokannabinoid hatása magyarázza, ami viszont intracelluláris mechanizmusok révén csökkenti a TRPV1 receptorok aktiválása révén megvalósuló endovanilloid hatást és a következményes CGRP felszabadulás mértékét (Ahluwalia és mtsai., 2003). Ezt a feltételezésünket igazolták azok az eredményeink, melyek során kimutattuk, hogy az anandamid CGRP felszabadító és vazodilatátor hatását jelentősen fokozza a CB1 receptorok előzetes

blokkolása. Az ilyen módon kiváltott szignifikáns mértékű véráramlás fokozódás teljes egészében a megnövekedett CGRP felszabadulás eredménye volt, mivel a CGRP receptorok járulékos gátlása megszüntette a CB1 receptorok gátlása mellett megfigyelhető anandamid által kiváltott véráramlás fokozódást.

Funkcionális és morfológiai vizsgálataink eredményei egyértelműen igazolták, hogy a trigeminális nociceptorok aktiválódása/szenzitizálódása nem kizárólag az intrakraniális afferensek stimulációja útján, hanem ezek extrakraniális kollaterálisainak aktiválódása következtében is létrejöhet. Ezek az extrakraniális axon kollaterálisok szenzoros információt továbbíthatnak a perikraniális szövetek (pl. orr nyálkahártya, extrakraniális helyzetű izmok) felől a dura mater felé, ami szerepet játszhat a meningeális nocicepció folyamataiban és a perifériás neuropeptid felszabadulásban. Az extrakraniális afferensek révén aktiválódhatnak az intrakraniális meningeális idegek, ami kiterjedt neuropeptid felszabadulást és következményes véráramlás fokozódást eredményezhet.

3.2. Nitrogén-monoxid és nitroxil szerepe a meningeális véráramlás szabályozásában

A meningeális véráramlás szabályozásában a neuronokból felszabaduló vazoaktív peptidek mellett döntően metabolikus faktorok játszanak szerepet. A metabolikus faktorok közül valószínűleg a NO a legjelentősebb vazodilatátor (Buchanan és Phillis, 1993). A meningeális szövetekben normál körülmények között a NO fő forrása az artériák endotheliuma. Neuronális nitrogén-monoxid szintáz aktivitás néhány trigeminális és paraszimpatikus eredetű axonban mutatható ki.

A szervezetben NO-ot felszabadító nitroglicerinnel fejfájást indukáló hatása régóta ismert. Biológiai hatásainak köszönhetően az utóbbi időben kiemelt figyelem fordult a NO redox párja, az egy elektron felvételével képződő nitroxil (HNO) felé (Fukuto és mtsai., 2005). A HNO a kardiovaszkuláris rendszerben hatásos vazodilatátornak, pozitív inotróp és luzitrop hatással rendelkező anyagnak bizonyult, hatásmechanizmusában a CGRP felszabadulásnak tulajdonítottak szerepet (Paolucci és mtsai., 2001). A HNO szövetekben történő keletkezésével kapcsolatban pedig felmerült a NO és egy másik endogén gáz halmazállapotú mediátor, a H₂S között megvalósuló interakció lehetősége (Filipovic és mtsai., 2013).

Eredményeink egyértelműen igazolták, hogy a NO-nak mint metabolikus eredetű vazodilatátor anyagnak a meningeális szövetekben megvalósuló hatása nem kizárólag az érfal simaizom sejtjein megnyilvánuló ciklikus guanozin-monofoszfát által közvetített hatás, hanem

abban a peptiderg trigeminális afferensekből felszabadított CGRP is szerepet játszik. Eredményeink, melyek kontroll állatokban igazolták a HNO trigeminális TRPA1 receptorokon kifejtett aktiváló hatását, ami az afferensekből CGRP-t felszabadítva fokozza a meningeális véráramlást, kiegészítették munkacsoportunk más kísérleti modelleken (hátsó gyöki ganglion neuronokon, kínai hörcsög ovárium sejteken) whole-cell voltage clamp és calcium imaging módszerekkel nyert eredményeit. MALDI-TOF tömegspektrometriás mérések HNO hatására a TRPA1 receptor cisztein aminosavai között diszulfid kötések kialakulását igazolták. Eredményeink funkcionális, morfológiai és hisztokémiai módszerek segítségével igazolták azt is, hogy a trigeminovaskuláris rendszer ideális körülményeket biztosít mindkét gáz halmazállapotú mediátor, a NO és a H₂S termeléséhez, ezen idegi és endotheliális eredetű mediátorok reakciója révén keletkező HNO a kemoszenzitív nociceptorok TRPA1 receptorait aktiválva CGRP felszabaduláshoz vezet, ami a vaszkuláris simaizom sejteken relaxáló hatású.

3.3. Kemoszenzitív afferensek és hízósejtek közötti interakciók a dura materben

A kemoszenzitív nociceptorok aktiválódása és a perifériás neuropeptid felszabadulás következtében kialakuló szöveti neurogén gyulladásos reakció fontos komponense a szöveti hízósejtek aktiválódása és degranulációja, ami további vazodilatátor anyagokat tesz szabaddá, felerősítve ezzel a neurogén gyulladásos választ. A dura mater hízósejtjei a szenzoros végződésekből szabaddá váló CGRP és SP hatására egyaránt degranulálódnak (Dimitriadou és mtsai., 1991). Kísérleteink során két hízósejt aktivációval kapcsolatban kialakuló mechanizmus meningeális véráramlásra gyakorolt hatását és nociceptor aktivációban betöltött szerepét vizsgáltuk, mivel ezek a reakciók nagy valószínűséggel szerepet játszhatnak a migrénes fejfájás hátterében kialakuló perifériás és centrális szenzitizáció folyamataiban is.

In vivo és *ex vivo* kísérleteink egyértelműen igazolták a nociceptorok aktiválódása következtében felszabaduló CGRP hízósejteket degranuláló és hisztamint felszabadító hatását. A hisztamin azonban nem aktiválta a szenzoros végződéseket és azokból nem váltott ki további peptid felszabadulást még a prejunctionális H3 receptorok blokkolását követően sem. Bár kísérleti modellünkben a hisztamin meningeális perfúziót befolyásoló hatását nagy valószínűséggel csak vaszkuláris lokalizációjú receptorokon fejtette ki, ezek a receptorok érfalon belüli elhelyezkedésük és funkciójuk szempontjából is több félének bizonyultak, aminek köszönhetően finoman szabályozható véráramlás változások valósulnak meg. Eredményeink alapján a hisztamin által kiváltott vazodilatáció részben az endothel sejteken lokalizált H1 receptorok hatásának, részben

pedig a valószínűleg simaizomsejteken lokalizált H2 receptorok aktivációjának következtében alakult ki. Emellett vazokonstriktor hatású H1 receptorok működését is igazoltuk, melyek valószínűleg szintén a simaizom sejteken helyezkednek el.

Bár a hisztamin esetében nem tudtuk bizonyítani annak nociceptorokat stimuláló hatását, feltételezhetően egy, a hízósejtek degranulációja során szintén szabaddá váló enzim, a hízósejt eredetű triptáz aktiválhatja a meningeális nociceptorokat. Eredményeink igazolták, hogy a proteáz aktivált receptor 2 (PAR2) aktivációja meningeális véráramlás fokozódást vált ki CGRP és NO felszabadítása révén. A kemoszenzitív neuronok PAR2 receptorainak stimulációja olyan intracelluláris folyamatokat aktivál, melyek szenzitizálhatják a TRPV1 receptort más agonistáival szemben is. Kísérleti eredményeink a PAR2 aktiváció következményeként nem neuronális vazodilatátor mechanizmus aktiválódását, endotheliális eredetű NO termelődését is igazolták. A PAR2 által kiváltott NO termelődés helye egyértelműen a vaszkuláris endothel volt, mert a vazodilatátor választ a neuronális nitrogén-monoxid szintáz gátló nem befolyásolta. A PAR2 receptorokat hízósejtek is expresszálhatják, melyek triptáz általi aktiválódása tovább fokozhatja a sejtek degranulációját és a mediátorok felszabadulását (Dux és mtsai., 2012). A dura mater gyulladásos folyamatai a megemelkedett szöveti proteáz koncentráció és a PAR2 expresszió fokozódása révén ideális körülményeket teremthetnek a nociceptorok szenzitizációjához.

3.4. A trigeminális nociceptorok aktiválódását követő perifériás és centrális kalcitonin gén-rokon peptid felszabadulás vizsgálata

A CGRP migrénes fejfájásban betöltött patofiziológiai szerepe és az utóbbi évtizedekben a migrén terápiában alkalmazott CGRP hatást csökkentő szerek jelentősége egyértelmű. Ennek ellenére keveset tudunk ezen gyógyszerek hatásmechanizmusáról, ami valószínűleg annak is következménye, hogy bár ismerjük a kraniális szövetekben a CGRP lehetséges perifériás és centrális forrásait, nem tudjuk, hogy az ezekből történő CGRP felszabadulás milyen mértékben vesz részt a migrénes fájdalom kialakításában, milyen úton éri el a tünetek létrehozásában szerepet játszó CGRP receptorokat, illetve hogy hol vannak azok a kritikus struktúrák, melyek a felszabaduló CGRP és a CGRP hatást gátló gyógyszerek számára egyaránt elérhetőek? A trigeminovaszkuláris rendszer aktiválódásának következtében felszabaduló CGRP sorsával kapcsolatos bizonytalanságok miatt kísérleteink ezen szakaszában célul tűztük ki patkány dura mater afferenseinek kémiai úton történő aktivációja/depolarizációja következtében kialakuló perifériás és centrális CGRP felszabadulás vizsgálatát. Mértük a stimulációt megelőzően és azt

követően a vena jugularis-ból vett vérminták és a cisterna cerebellomedullarisból nyert likvor CGRP tartalmát, amit egyidejűleg határoztunk meg a dura mater és az agytörzset fedő pia mater területén a CGRP felszabadulás által indukált véráramlás fokozódással.

A trigeminovaskuláris rendszer aktiválódása következtében felszabaduló neuropeptidek vaszkuláris hatásainak vizsgálata jó indikátora a nociceptorok funkcionális állapotának. A meningeális nocicepció perifériás mechanizmusainak vizsgálatával foglalkozó kutatómunkánk során sikerrel alkalmaztuk a dura mater artériáiban bekövetkező véráramlás válaszok analízisét és a meningeális perfúzió következményes változásainak vizsgálatát a primer szenzoros neuronok funkcionális állapotának megítélésére. Ezen eredmények birtokában gondoltunk arra, hogy a perifériás végződéshez hasonlóan a nociceptor aktiválódása során a centrális nyúlványból történő peptid felszabadulás mértékére vonatkozóan is információt nyerhetünk az agytörzset borító agyburkok ereihez diffundáló neuropeptid vazodilatátor hatásának mérésével.

Kísérleteink során a dura mater axonjainak depolarizációját kémiai stimulussal (60 mM KCl) váltottuk ki, ami mind a perifériás, mind a centrális nyúlvány közelében megemelte a CGRP koncentrációját. Ennek ellenére *in vivo* véráramlás méréseink során a depolarizáló hatású KCl meningeális applikációja mindaddig véráramlás csökkenést eredményezett a meningeális szövetekben, amíg nem gátoltuk az adrenerg α -receptorokat fentolaminnal. Ez a megfigyelésünk arra enged következtetni, hogy a KCl hatására a dura materben az erek közelében dús hálózatot alkotó szimpatikus posztganglionáris efferensek is depolarizálódnak. A szimpatikus vazokonstriktor hatás pedig ellensúlyozza az afferensekből történő CGRP felszabadulás véráramlás fokozó hatását. Bár az α -receptorok blokkolását követően véráramlás csökkenés már nem volt megfigyelhető KCl hatására, az *ex vivo* preparátumokban is kimutatható jelentős CGRP felszabadulás ellenére sem emelkedett jelentősen a szövet perfúziója. Ugyanakkor az agytörzs területén kismértékű, de következetes véráramlás fokozódást mértünk. Az a tény, hogy a szimpatikus vazokonstrikció kikapcsolását követően sem emelkedett jelentősen a meningeális szövet perfúziója, felveti annak lehetőségét, hogy a neuronális hatások mellett más mechanizmus is szerepet játszhat a KCl véráramlásra kifejtett hatásában. A CGRP meningeális és intracerebrális ereken kifejtett vazodilatátor hatásának hátterében döntően ATP-érzékeny K^+ -csatornák aktiválása és a K^+ kiáramlás miatti következményes simaizom hiperpolarizáció áll (Gozalov és mtsai., 2005). Esetünkben ezt a hatást kompenzálhatta a K^+ közvetlen, simaizmon kifejtett depolarizáló hatása. 60 mM KCl hatására a simaizom membránpotenciáljának depolarizáció irányába történő eltolódása feszültség függő Ca^{2+} -csatornákat nyit, a beáramló Ca^{2+} pedig aktiválja és kontrahálja a

simaizomsejteket. A kísérleteinkben használt fentolamin előkezelés kivédte a KCl által kiváltott vazokonstriktor válasz szimpatikus eredetű komponensét, de a közvetlen simaizom aktivációnak tulajdonítható komponenst nem befolyásolta.

Kísérleteink során a ganglion trigeminale lidokain kezelésével sikeresen blokkoltuk a szenzoros információ centrális irányú továbbítását és ennek hatását a centrális CGRP felszabadulásra és az agytörzs területén kialakuló véráramlás változásokra.

Méréseink során a vér és likvor minták bazális CGRP koncentrációi között jelentős eltérést tapasztaltunk. A likvor minták CGRP tartalma jelentősen meghaladta a vérmintákban mért koncentrációt, ami megerősíteni látszik azt a feltételezésünket, miszerint a dura mater afferenseinek perifériás végződéseiből felszabaduló peptid a vénás szinuszok, végső soron a vena jugularis vérébe kerülhet, a neuronok centrális végződéseiből, valamint a pia matert innerváló érző neuronok perifériás és centrális nyúlványaiból azonban a vér-agy gát miatt a likvor térbe továbbítódik. Nem tartjuk valószínűnek, hogy a dura materben felszabaduló CGRP a szubarachnoidális likvor tér felé diffundáljon, mivel az itt elhelyezkedő sejtkapcsoló struktúrák ezt megakadályozzák (Rascol és Izard, 1976). Ezeket a körülményeket figyelembe véve a kísérleteink során a likvorban mért CGRP feltételezhetően döntő mértékben a neuronok centrális végződéséből, az agytörzsi nucleus tractus spinalis nervi trigemini területéről származik.

3.5. A kemoszenzitív meningeális afferensek működésében bekövetkező változások patofiziológiás körülmények között

A trigeminovaskuláris rendszer nociceptorainak megváltozott működése kiemelt jelentőséggel bír a primer fejfájások patomechanizmusában szerepet játszó perifériás és centrális szenzitizáció folyamataiban (Burstein és mtsai., 2011). Epidemiológiai vizsgálatok számos szisztémás betegség esetében igazolták a primer fejfájások emelkedett prevalenciáját. Ezek a betegségek általában a szervezet egészét érintő metabolikus változások révén, az immunrendszer működésének megváltozása következtében vagy oxidatív/nitrozatív stressz révén módosítják a primer szenzoros neuronok működését.

Bár maga az elhízás nem tekinthető betegségnek, számos súlyos betegség rizikófaktoraként tartjuk számon. Klinikai megfigyelések egyértelmű kapcsolatot igazoltak az elhízás és a primer fejfájások okozta panaszok között is. Az elhízás fokozza a korábban is meglévő migrén rohamainak gyakoriságát és súlyosságát, illetve a migrén kialakulásának kockázatát (Chai és mtsai., 2014).

Hasonlóan mélyreható, hosszabb távon a perifériás idegek és a mikroerek funkcióját is veszélyeztető metabolikus változásokkal jár a pankreász inzulintermelő β -sejtjeinek pusztulása, ami 1-es típusú diabetes mellitus kialakulásához vezet (Kazamel és Dyck, 2015). Epidemiológiai vizsgálatok 1-es típusú diabetes mellitus esetében is igazolták a különböző primer fejfájások, a migrén és a cluster fejfájás tüneteinek súlyosbodását, illetve primer fejfájások diabéteszes anyagcserezavar kialakulását követő megjelenését is (Martins és Blau, 1989).

A szervezet egészét érintő patofiziológiai változások meningeális nociceptív mechanizmusokra kifejtett hatásának tanulmányozása során vizsgáltuk a tumor terápiában széleskörűen használt citosztatikum, az adriamycin meningeális véráramlás szabályozásra kifejtett hatását is. Az alkalmazott kezelési séma megfelelt az adriamycin terápia egyik legsúlyosabb mellékhatásaként jelentkező kardiomiopátia kísérletes modelljében alkalmazott kezelési paradigmának. Természetesen adriamycin terápia esetén nem központi kérdés a kezelés esetleges fejfájást befolyásoló hatása, tudomásunk szerint korábban nem is foglalkoztak klinikai tanulmányok a közöttük fennálló esetleges összefüggések kiderítésével. Számos adat utal azonban arra, hogy a kezelés súlyos funkcionális/morfológiai károsodást válthat ki a szöveteket innerváló kemoszenzitív neuronokban, ami az adriamycin kezelés következtében kialakuló legjelentősebb szövődmény, a kardiomiopátia súlyosságát is befolyásolja (Katona és mtsai., 2004).

Kísérleteink során magas zsír és szénhidrát tartalmú táp etetésével kísérleti állatokban az emberi elhízáshoz sok tekintetben hasonló állapotot hoztunk létre, amit nem csak a 20 hetes diétás periódus végén mért magasabb testtömeg, nagyobb zsírszövet mennyiség, hanem az állatok metabolikus paramétereiben bekövetkezett változások is egyértelműen igazoltak (Singla és mtsai., 2010). Az elhízott állatokban a zsírszövet fokozott aktivitása a glükóz és inzulin homeosztázis károsodásával kombinálódott, a plazma emelkedett interleukin- 1β és interleukin-6 koncentrációi pedig szisztémás gyulladásos folyamatra utaltak.

A magas zsír és szénhidrát tartalmú diéta okozta elhízás patkányokban a TRPV1 és a TRPA1 receptorok aktivációjára bekövetkező szenzoros vazodilatátor válasz fokozódását eredményezte a meningeális erekben, melynek hátterében fokozott CGRP felszabadulást igazoltunk. Elhízott állatok láb hát bőrében hasonlóan intenzívebbé vált a neurogén gyulladásos válasz másik komponense, a döntően a SP hatásának tulajdonítható neurogén plazma extravazáció is. Mivel a meningeális erekben sem a hisztaminnal, sem a CGRP-vel kiváltott direkt vazodilatátor válasz nem különbözött kontroll és elhízott állatokban, a capsaicinnel és az acroleinnel kiváltott vaszkuláris reakciók intenzitásában tapasztalt változásokért egyértelműen az elhízott állatok nociceptor

funkcióiban, a TRPV1 és a TRPA1 receptorok aktiválhatóságában bekövetkező változások tehetők felelőssé. Bár elhízott állatokban a TRPV1 és TRPA1 receptorok stimulációjára bekövetkező CGRP felszabadulás és következményes vazodilatáció hasonló érintettséget mutatott, a TRPA1 receptorok által mediált reakciók kisebb mértékűek voltak. Ismert, hogy TRPA1 receptorral a TRPV1-et expresszáló neuronoknak csak egy kisebb populációja rendelkezik (Kobayashi és mtsai., 2005). Az elhízott állatokban bekövetkező TRPA1 receptor szenzitizáció mégsem tekinthető elhanyagolható jelenségnek, hiszen vizsgálataink igazolták, hogy a meningeális nociceptorok egy része kollaterálisuk révén, a koponyán áthaladva extrakraniális struktúrákat is innervál. Az orr nyálkahártyát beidegző trigeminális afferensek szenzitizált TRPA1 receptorai, melyek érzékenyek a levegőből belégzett kémiai irritánsokra (Kunkler és mtsai., 2011), a trigeminovaskuláris nociceptív pálya fokozott aktiválódását eredményezhetik elhízott állatokban és feltételezhetően emberben is, ami összefüggésbe hozható a primer fejfájások gyakoribb és súlyosabb formában való jelentkezésével is.

Az elhízást kísérő, trigeminovaskuláris rendszert érintő funkcionális változások nem korlátozódnak a kemoszenzitív afferensek TRP receptoraira. Eredményeink a capsaicin vazokonstriktor hatásának kiváltásáért felelős vaskuláris TRPV1 receptorok és/vagy egyéb kation csatornák, valamint a neuronok depolarizációját követő CGRP felszabadításért felelős feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák funkcionális változásait is igazolták. A magas zsír és szénhidrát tartalmú diétával kiváltott elhízás erősítette a capsaicin-indukálta vazokonstriktor választ, aminek szerepe lehet az elhízottakban megfigyelhető gyakoribb és súlyosabb formában jelentkező fejfájások kiváltásában is. A fokozott vazokonstrikció lassíthatja a nociceptorokat aktiváló/szenzitizáló szöveti mediátorok eltávolítását és ezzel ronthatja a szöveti homeosztázis helyreállítását. Eredményeink alapján valószínűnek tűnik az elhízás okozta metabolikus és immunológiai változások, az oxidatív és nitroztatív stressz komplex hatásainak eredményeként létrejövő nociceptor szenzitizáció.

Streptozotocinnal kiváltott 1-es típusú diabetes mellitus károsította a TRPV1 receptorok aktivációjával CGRP felszabadítása révén kiváltott neurogén szenzoros vazodilatációt patkány dura materében. Kontroll állatok vaskuláris reakcióival összehasonlítva, a kísérletes diabétesz kiváltását követően 2 és 4 héttel végzett mérések még nem mutattak eltérést, 6 héttel később azonban a capsaicin applikációja meningeális véráramlás fokozódást már nem váltott ki. A capsaicin vazodilatátor hatásának károsodása a kemoszenzitív afferensekből történő CGRP felszabadulás csökkenésének következménye volt, ami kvantitatív immunhisztokémiai

vizsgálataink eredménye alapján a TRPV1 receptorokat expresszáló meningeális afferensek csökkent denzitására volt visszavezethető. Az a tény, hogy a capsaicin-indukálta vazodilatáció mértéke csak több héttel a streptozotocin injekciót követően csökken, összhangban áll a neuronális peptid szintek változásával (Rittenhouse és mtsai., 1996); patkány ganglion trigeminale neuronok CGRP tartalma csak a streptozotocin injekciót követő ötödik héten kezd csökkenni. A β -sejtek pusztulását követően megkezdett inzulin szubsztitúció helyreállította a TRPV1 receptorok stimulációjával kiváltott vazodilatációt. Ennek alapján a szenzoros efferens funkció károsodása nem a streptozotocin toxikus hatásának, hanem magának a diabéteszes állapotnak a következménye. A diabétesz késői szövődményeként kialakuló vaszkuláris endothel károsodás hosszabb távon szintén hozzájárulhat a véráramlás szabályozás zavarához (Rask-Madsen és King, 2013), ennek szerepe azonban a kísérleteinkben vizsgált időszakon belül nem mutatkozott jelentősnek.

A nociceptív ioncsatornák által mediált meningeális szenzoros neurogén vazodilatáció mechanizmusai jelentősen károsodtak a kísérleti állatok adriamycin kezelését követően is. Bár a kísérleti állatok szisztémás adriamycin kezelését követően a trigeminális ganglionban mért csökkent TRPV1 fehérje koncentráció egyértelműen mutatja a kemoszenzitív neuronok károsodását, immunhisztokémiai festéssel sem a TRPV1 receptorral rendelkező, sem a CGRP-t tartalmazó meningeális afferensek denzitásában nem láttunk szembetűnő változást. Adriamycin kezelést követően mind a TRPV1, mind a TRPA1 receptorok stimulációjával kiváltott vazodilatáció mértéke csökkent. A csökkent válaszkészség különösen szembetűnő volt az ioncsatornákat aktiváló capsaicin illetve akrolein ismételt applikációja esetén. Jelentős eltérés mutatkozott a trigeminális TRPV1 és TRPA1 receptorok ismételt stimulációjával kiváltott CGRP felszabadulás mértékében is. Kontroll állatokban az egymást követő capsaicin és akrolein applikációk hasonló mennyiségű CGRP-t szabadítanak fel a meningeális afferensekből. Bár adriamycinnel kezelt állatok dura materéből az első stimuláció a kontrollal összevethető mennyiségű CGRP-t szabadított fel, sőt capsaicin esetében azt még meg is haladta, az ezt követő stimulációk hatása elmaradt a kontrollban mért értékektől.

Adriamycinnel kezelt állatokban a fokozott kezdeti neuropeptid felszabadulás kapcsolatban állhat a neuronok megváltozott Ca^{2+} homeosztázisával. Az intracelluláris/intraterminális Ca^{2+} koncentráció emelkedése elengedhetetlen a neuropeptidek szenzoros idegrostokból történő felszabadulásához. Adriamycin kezelést követően fokozott Ca^{2+} beáramlást mind a TRPV1, mind a TRPA1 receptorok nyitása, mind egyéb Ca^{2+} csatornák aktiválódása kiválthat. Kísérleteinkben a

kemoszenzitív afferensek ismételt stimulálását követő csökkenő CGRP felszabadulást a neuronok alapvetően alacsonyabb peptid tartalma magyarázhatja.

Mivel *in vivo* véráramlás méréseink eredményei nem tükrözték a kezdeti erőteljes CGRP felszabadulást (a véráramlás fokozódás mértéke már az első applikáció esetében is csökkent mértékű volt), próbáltunk olyan mechanizmus nyomára bukkanni, ami magyarázatul szolgálhat a felszabaduló CGRP csökkent vazodilatátor hatására adriamycin kezelést követően. Ebből a célból teszteltünk különböző, a szenzoros neurogén funkciók részvétele nélkül az endothel vagy a vaszkuláris simaizom közvetlen stimulációja útján ható vazodilatátor anyagokat. A hisztamin és az acetilkolin vazodilatátor hatása nem változott adriamycin kezelést követően, a CGRP-re mutatott véráramlás változás ellenben csak körülbelül fele volt a kontrollban mért értéknek és ismételt applikációk esetében nem mutatott további csökkenő tendenciát. Bár korábbi vizsgálatok adriamycin kezelést követően az érfal apoptotikus és nekrotikus változásait írták le (Murata és mtsai., 2001), kísérleteink eredményei nem támasztották alá ezeket a megfigyeléseket. A hisztaminra és acetilkolinra mutatott válaszreakciók alapján kizárhatjuk, hogy valamiféle általános vaszkuláris károsodás ronthatná a CGRP vazodilatátor hatását. Hasonlóan épnek tűnt a CGRP vazodilatátor hatásáért felelős intracelluláris mechanizmus; az adenilát-ciklázt aktiváló és az intracelluláris cAMP szintet növelő forskolin hatásában sem figyeltünk meg eltérést a kontrollhoz képest.

Adriamycinnel kezelt állatok dura mater preparátumaiban azonban immunhisztokémiai festéssel jelentős változást figyeltünk meg a vaszkuláris CGRP receptorok szerkezetében, amely magyarázatul szolgálhat a CGRP gyengébb vazodilatátor hatására. Adriamycinnel kezelt patkányok dura materében a CGRP receptor komplex RCP komponense nem volt kimutatható immunhisztokémiai festéssel. A receptor komponens szerkezetében bekövetkező változás nem csak az RCP ellenes antitest kötődését akadályozza meg, hanem valószínűleg rontja a CGRP kapcsolódását is a receptor komplexhez és ezen keresztül a G-fehérje útján megvalósuló intracelluláris szignalizációt.

4. A TRIGEMINOVASZKULÁRIS NOCISZENZOR KOMPLEX KONCEPCIÓJA

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a meningeális szövetek működésének szabályozásában alapvető szerepet játszanak a TRP nociceptív ioncsatornákat kifejező, a dura materben elsőként általunk azonosított kemoszenzitív primer afferensek. Kísérleti eredményeink alapján felvetjük a trigeminális nociszenzor komplex, mint az agyburkok fiziológiás és patofiziológiás folyamataiban

kulcsszerepet betöltő funkcionális egység koncepcióját. A nociszenzor komplex elemei a kemoszenzitív trigeminális afferensek, a meningeális erek és a meningeális szövetek egyéb sejtselemei; a hízósejtek és a makrofágok (Dux és mtsai., 2012). Ezek a struktúrák a meningeális szöveteken belül olyan szoros anatómiai és funkcionális kapcsolatban állnak egymással, ami lehetővé teszi összehangolt működésüket.

Vizsgálataink során feltártuk, hogy a dura matert gazdagon innerválják a trigeminális kemoszenzitív primer szenzoros neuronok, amelyek kifejezik a TRPV1 és TRPA1 nociceptív ioncsatornákat és neuropeptideket, elsősorban CGRP-t tartalmaznak. Vizsgáltuk ezen primer afferens neuron populáció funkcionális sajátosságait, elsősorban ezek meningeális érreakciókban betöltött szerepét fiziológiás és patofiziológiás állapotokban. Megállapítottuk, hogy a kemoszenzitív idegekben kifejeződő TRPV1 és TRPA1 receptorok exogén (capsaicin illetve acrolein) és endogén agonistákkal (endovanilloidok illetve a NO és H₂S interakciója során keletkező HNO) történő aktiválása az arteria meningeae media ágrendszerében jelentősen fokozza a véráramlást.

A meningeális nociceptív folyamatok kísérletes modelljein végzett vizsgálataink feltárták a kemoszenzitív neuronok aktiválásának és szenzitivizációjának mechanizmusait. *Ex vivo* modell kísérletekben tisztáztuk, hogy a meningeális szenzoros neurogén vazodilatációs választ döntően az érintett idegekből felszabaduló CGRP mediálja. Eredményeink igazolták, hogy a nociceptorok működésében kulcsszerepet betöltő TRPV1 és TRPA1 receptorok aktiválódhatnak és/vagy szenzitivizálódhatnak olyan mediátorok hatására, melyek fiziológiás körülmények között is jelen vannak a nociceptorok környezetében, kóros körülmények között pedig szöveti szintjük emelkedhet. A kemoszenzitív afferensek TRP ioncsatornáinak érzékenysége, a következményes CGRP felszabadulás és vazodilatáció fokozódhat az afferenseken expresszálandó PAR2 receptorok aktivációja következtében, de hasonló hatása lehet az elhízás következtében megváltozott metabolikus és immunológiai státusznak is. A kemoszenzitív afferensekből szabadabbá váló neuropeptidek a dura mater hízósejtjeiből további mediátorokat szabadíthatnak fel, melyek pozitív feedback hatás révén felerősítik a kezdeti nociceptív és vaszkuláris reakciókat.

Neuronális pályakövetési eljárások alkalmazásával bizonyítottuk, hogy a meningeális afferensek extrakraniális axon kollaterálisokkal is rendelkeznek. Kísérleteink igazolták a meningeális afferensek extrakraniális szövetekben végződő kollaterálisainak intrakraniális nociszenzor funkciókra kifejtett hatását is. Az extrakraniális afferensek axon kollaterálisainak kiemelten fontos szerepe lehet olyan fejfájás típusok provokálásában, melyek a belélegzett kémiai

anyagok ornyálkahártyán kifejtett irritáló hatásával (Kunkler és mtsai., 2015), vagy a perikraniális izmok fokozott izomtónusával hozhatók összefüggésbe (Burstein és mtsai., 2017).

Eredményeink összhangban állnak a migrénnel kapcsolatos klinikai megfigyelésekkel is. A migrén terápiájában sok esetben hatásosan alkalmazott CGRP felszabadulást/hatást csökkentő gyógyszerek egyértelműen alátámasztják a meningeális peptiderg kemoszenzitív afferensek patofiziológiai szerepét. A CGRP, illetve hisztamin infúziójával kísérletesen kiváltott fejfájás pedig ezen mediátoroknak a trigeminális nociszenzor komplex aktiválódásában játszott szerepét támasztja alá.

5. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

5.1. Eredeti közlemények

Dux M, Schwenger N, Messlinger K: Possible role of histamine (H1- and H2-) receptors in the regulation of meningeal blood flow. *British Journal of Pharmacology* 2002,137:874-880.

Strecker T, **Dux M**, Messlinger K: Increase in meningeal blood flow by nitric oxide – interaction with calcitonin gene-related peptide receptor and prostaglandin synthesis inhibition. *Cephalalgia* 2002,22:233-241.

Strecker T, **Dux M**, Messlinger K: Nitric oxide releases calcitonin gene-related peptide from rat dura mater encephali promoting increases in meningeal blood flow. *Journal of Vascular Research* 2002,39:489-496.

Dux M, Sántha P, Jancsó G: Capsaicin-sensitive neurogenic sensory vasodilatation in the dura mater of the rat. *The Journal of Physiology* 2003,552:859-867.

Dux M, Rosta J, Pintér S, Sántha P, Jancsó G: Loss of capsaicin-induced meningeal neurogenic sensory vasodilatation in diabetic rats. *Neuroscience* 2007,150:194-201.

Schwenger N, **Dux M**, de Col R, Carr R, Messlinger K: Interaction of calcitonin gene-related peptide, nitric oxide and histamine release in neurogenic blood flow and afferent activation in the rat cranial dura mater. *Cephalalgia* 2007,27:481-491.

Dux M, Rosta J, Sántha P, Jancsó G: Involvement of capsaicin-sensitive afferent nerves in the proteinase-activated receptor-2 (PAR-2)-mediated vasodilatation in the rat dura mater. *Neuroscience* 2009,161:887-894.

Schueler M, Messlinger K, **Dux M**, Neuhuber WL, De Col R: Extracranial projections of meningeal afferents and their impact on meningeal nociception and headache. *Pain* 2013,154:1622-1631.

Eberhardt M, **Dux M**, Namer B, Miljkovic J, Cordasic N, Will C, Kichko TI, de la Roche J, Fischer M, Suárez SA, Bikiel D, Dorsch K, Leffler A, Babes A, Lampert A, Lennerz JK, Jacobi J, Martí MA, Doctorovich F, Högestätt ED, Zygmunt PM, Ivanovic-Burmazovic I, Messlinger K, Reeh P, Filipovic MR: H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO–TRPA1–CGRP signalling pathway. *Nature Communications* 2014,5:4381.

Dux M, Deák É, Tassi N, Sántha P, Jancsó G: Endovanilloids are potential activators of the trigeminovascular nociceptor complex. *The Journal of Headache and Pain* 2016,17:53.

Meßlinger K, Schüller M, **Dux M**, Neuhuber WL, De Col R: Innervation extrakranialer Gewebe durch Kollateralen von Hirnhautafferenzen. Neue Einsichten in die Entstehung und Therapie von Kopfschmerzen/Innervation of extracranial tissues through collaterals of meningeal afferents. New insights into the generation and therapy of headaches. *Manuelle Medizin* 2016,54:307-314.

Meßlinger K, De Col R, **Dux M**, Neuhuber WL, Schüller M: Extrakranielle Projektionen meningealer Afferenzen und ihre Bedeutung für meningeale Nozizeption und Kopfschmerz. *Zeitschrift für Komplementärmedizin* 2016,4:14–19.

Dux M, Will C, Vogler B, Filipovic MR, Messlinger K: Meningeal blood flow is controlled by H₂S-NO crosstalk activating HNO-TRPA1-CGRP signalling. *British Journal of Pharmacology* 2016,173:431-445.

Meßlinger K, **Dux M**: Neue Therapieoptionen bei Migräne: CGRP blockierende Substanzen im Blickpunkt/New options for migraine therapy. *Nervenheilkunde* 2016,35:492-500.

Dux M, Will C, Eberhardt M, Fischer M, Messlinger K: Stimulation of rat cranial dura mater with potassium chloride causes CGRP release into the cerebrospinal fluid and increases medullary blood flow. *Neuropeptides* 2017,64:61-68.

Marics B, Peitl B, Varga A, Pázmándi K, Bácsi A, Németh J, Szilvássy Z, Jancsó G, **Dux M**: Diet-induced obesity alters dural CGRP release and potentiates TRPA1-mediated trigeminovascular responses. *Cephalalgia* 2017,37:581-591.

Marics B, Peitl B, Pázmándi K, Bácsi A, Németh J, Oszlács O, Jancsó G, **Dux M**: Diet-induced obesity enhances TRPV1-mediated neurovascular reactions in the dura mater. *Headache* 2017,57:441-454.

Deák É, Rosta J, Boros K, Kis G, Sántha P, Messlinger K, Jancsó G, **Dux M**: Chronic adriamycin treatment impairs CGRP-mediated functions of meningeal sensory nerves. *Neuropeptides* 2018,69:46-52.

5.2. Összefoglaló közlemények, könyvfejezetek

Dux M, Messlinger K: Histological demonstration of increased vascular permeability in the dura mater of the rat. *Microsc Res Tech* 2001,53:229-231.

Meßlinger K, De Col R, Denekas T, **Dux M**, Eberhardt M, Koulchitsky SV, Röder J, Schlechtweg PM, Sixt M-L, Schwenger N, Strecker T, Tröltzsch M, Fischer MJM: Mediatorwirkungen im trigeminovaskulären System als Grundlage für die nozizeptiven Vorgänge bei der Kopfschmerzentsstehung (Actions of Nociceptive Mediators in the Trigeminovascular System as a Basis for the Generation of Headaches). *Aktuelle Neurology* 2007,34:504-507.

Dux M, Messlinger K: Neurogenic vascular responses in the dura mater and their relevance for the pathophysiology of headaches. In: Jancsó G (ed) Neurogenic inflammation in health and disease. Neuroimmune biology Vol. 8. Elsevier ISBN: 978-0-444-53229-9, 2008, pp.193-209.

Dux M, Rosta J, Jancsó G: Capsaicin-sensitive nociceptive innervation of the dura mater: implications for the pathomechanism of headache. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* 2011,10:31-42.

Dux M, Sántha P, Jancsó G: The role of chemosensitive afferent nerves and TRP ion channels in the pathomechanism of headaches. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2012,464:239-248.

Dux MJ, Messlinger KB: New options for migraine treatment: focus on CGRP blocking antibodies. *Drugs of the Future* 2015,40:589-599.

Bolay H, Messlinger K, **Dux M**, Akcali D: Anatomy of Headache. In: Ashina M, Geppetti P (eds) Pathophysiology of Headaches, From Molecule to Man. Springer ISBN: 978-3-319-15620-0, 2015, pp. 1-29.

Messlinger K, **Dux M**: Functional anatomy of trigeminovascular pain. In: Dalkara T, Moskowitz M (eds) Neurobiological Basis of Migraine. John Wiley & Sons Inc. ISBN: 978-1-118-96719-5, 2017, pp. 3-30.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik segítséget nyújtottak doktori dolgozatom elkészüléséhez. Mindenekelőtt Jancsó Gábor professzornak, hogy mentoromként megismertetett ezzel az elméleti és klinikai orvostudomány szempontjából egyaránt kiemelt jelentőségű, rendkívül érdekes témával, a nocicepció folyamatainak kutatásával és irányításával lehetőségem nyílt bekapcsolódni a munkájába. Kutatómunkához való hozzáállása és szemlélete példaértékű volt számomra. Köszönöm Karl Messlinger professzornak a két évtizedre visszanyúló közös munkát, azt hogy bevezetett a fájdalom kutatás egyik speciális és jórészt még feltérképezetlen területére, a migrén patofiziológiájának kutatásába. Köszönöm mindkét mentoromnak, hogy nem csak szakmai segítségükkel, hanem magánemberként nyújtott támogatásukkal is mellettem álltak.

Köszönettel tartozom egykori és mostani intézetvezetőimnek; Benedek György és Sáry Gyula professzoroknak, akik lehetőséget biztosítottak oktató és kutató munkám végzésére.

Nagyon hálás vagyok közvetlen munkatársamnak, Sántha Péternek, hogy széles körű tudományos tájékozottságára és önzetlen segítségére mindig számíthattam. Köszönöm PhD hallgatóimnak; Rosta Juditnak, Marics Baláznak és Deák Évának hogy együtt dolgozhattunk, hogy ötleteiknek és munkájuknak köszönhetően sok új érdekes megfigyelést tehettünk. Köszönöm korábbi és jelenlegi munkatársaim; Boros Krisztina, Dobos Ildikó, Oszlács Orsolya, Kis Gyöngyi, Holger Sann, Milos Filipovic és Christine Will, valamint Intézetünk Funkcionális Neuromorfológiai Laboratóriumának valamennyi korábbi és jelenlegi munkatársának a segítségét, a jó hangulatú és eredményes közös munkát. Külön köszönöm Tenkné Hegyeshalmi Éva, Birgit Vogler és Jana Schramm mindig készséges és nélkülözhetetlen segítségét a kísérletek kivitelezésében. Köszönöm a Szegedi Tudományegyetem Élettani Intézete, valamint az Erlangen-nürnbergi Friedrich-Alexander-Universität Institut für Physiologie und Pathophysiologie valamennyi dolgozójának a támogatást.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Családomnak, elsősorban Szüleimnek, hogy a kitartásra nem csak buzdítottak, de személyes példát is mutattak, valamint lányaimnak, Orsinak és Gabinak, hogy annyi szeretetet, megértést és támogatást kaptam tőlük, ami minden nehézségen átsegített.

7. IRODALOMJEGYZÉK

Ahluwalia, J., Urban, L., Bevan, S., and Nagy, I. (2003). Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the vanilloid receptor 1 in vitro. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 2611–2618.

Bánk, J., and Márton, S. (2000). Hungarian migraine epidemiology. *Headache* *40*, 164–169.

Brain, S.D., Williams, T.J., Tippins, J.R., Morris, H.R., and MacIntyre, I. (1985). Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* *313*, 54–56.

Buchanan, J.E., and Phillis, J.W. (1993). The role of nitric oxide in the regulation of cerebral blood flow. *Brain Res.* *610*, 248–255.

Burstein, R., Jakubowski, M., and Rauch, S.D. (2011). The science of migraine. *J. Vestib. Res. Equilib. Orientat.* *21*, 305–314.

Burstein, R., Blake, P., Schain, A., and Perry, C. (2017). Extracranial origin of headache. *Curr. Opin. Neurol.* *30*, 263–271.

Chai, N.C., Scher, A.I., Moghekar, A., Bond, D.S., and Peterlin, B.L. (2014). Obesity and headache: part I--a systematic review of the epidemiology of obesity and headache. *Headache* *54*, 219–234.

- Dimitriadou, V., Buzzi, M.G., Moskowitz, M.A., and Theoharides, T.C. (1991). Trigeminal sensory fiber stimulation induces morphological changes reflecting secretion in rat dura mater mast cells. *Neuroscience* 44, 97–112.
- Dux, M., Sántha, P., and Jancsó, G. (2012). The role of chemosensitive afferent nerves and TRP ion channels in the pathomechanism of headaches. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 464, 239–248.
- Edvinsson, L., Fredholm, B.B., Hamel, E., Jansen, I., and Verrecchia, C. (1985). Perivascular peptides relax cerebral arteries concomitant with stimulation of cyclic adenosine monophosphate accumulation or release of an endothelium-derived relaxing factor in the cat. *Neurosci. Lett.* 58, 213–217.
- Eftekhari, S., Salvatore, C.A., Calamari, A., Kane, S.A., Tajti, J., and Edvinsson, L. (2010). Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human trigeminal ganglion. *Neuroscience* 169, 683–696.
- Feindel, W., Penfield, W., and McNaughton, F. (1960). The tentorial nerves and localization of intracranial pain in man. *Neurology* 10, 555–563.
- Filipovic, M.R., Eberhardt, M., Prokopovic, V., Mijuskovic, A., Orescanin-Dusic, Z., Reeh, P., and Ivanovic-Burmazovic, I. (2013). Beyond H₂S and NO interplay: hydrogen sulfide and nitroprusside react directly to give nitroxyl (HNO). A new pharmacological source of HNO. *J. Med. Chem.* 56, 1499–1508.
- Fukuto, J.M., Switzer, C.H., Miranda, K.M., and Wink, D.A. (2005). Nitroxyl (HNO): chemistry, biochemistry, and pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 335–355.
- Goadsby, P.J., Edvinsson, L., and Ekman, R. (1990). Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann. Neurol.* 28, 183–187.
- Gozalov, A., Petersen, K.A., Mortensen, C., Jansen-Olesen, I., Klaerke, D., and Olesen, J. (2005). Role of KATP channels in the regulation of rat dura and pia artery diameter. *Cephalalgia Int. J. Headache* 25, 249–260.
- Gupta, S., Akerman, S., van den Maagdenberg, A.M.J.M., Saxena, P.R., Goadsby, P.J., and van den Brink, A.M. (2006). Intravital microscopy on a closed cranial window in mice: a model to study trigeminovascular mechanisms involved in migraine. *Cephalalgia Int. J. Headache* 26, 1294–1303.
- Headache Classification Committee (2018). Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia* 38, 1–211.
- Hergenhahn, M., Kusumoto, S., and Hecker, E. (1984). On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). V. Extremely skin-irritant and moderately tumor-promoting diterpene esters from *Euphorbia resinifera*. *Berg. J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 108, 98–109.
- Hökfelt, T., Lundberg, J.M., Schultzberg, M., Johansson, O., Skirboll, L., Anggård, A., Fredholm, B., Hamberger, B., Pernow, B., Rehfeld, J., et al. (1980). Cellular localization of peptides in neural structures. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 210, 63–77.

- Jancsó, G., Király, E., Joó, F., Such, G., and Nagy, A. (1985). Selective degeneration by capsaicin of a subpopulation of primary sensory neurons in the adult rat. *Neurosci. Lett.* *59*, 209–214.
- Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A., and Szolcsányi, J. (1968). The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* *33*, 32–41.
- Kark, T., Bagi, Z., Lizanecz, E., Pásztor, E.T., Erdei, N., Czikora, A., Papp, Z., Edes, I., Pórszász, R., and Tóth, A. (2008). Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol. Pharmacol.* *73*, 1405–1412.
- Katona, M., Boros, K., Sántha, P., Ferdinandy, P., Dux, M., and Jancsó, G. (2004). Selective sensory denervation by capsaicin aggravates adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* *370*, 436–443.
- Kazamel, M., and Dyck, P.J. (2015). Sensory manifestations of diabetic neuropathies: anatomical and clinical correlations. *Prosthet. Orthot. Int.* *39*, 7–16.
- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A., and Noguchi, K. (2005). Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J. Comp. Neurol.* *493*, 596–606.
- Kunkler, P.E., Ballard, C.J., Oxford, G.S., and Hurley, J.H. (2011). TRPA1 receptors mediate environmental irritant-induced meningeal vasodilatation. *Pain* *152*, 38–44.
- Kunkler, P.E., Zhang, L., Pellman, J.J., Oxford, G.S., and Hurley, J.H. (2015). Sensitization of the trigeminovascular system following environmental irritant exposure. *Cephalalgia Int. J. Headache* *35*, 1192–1201.
- Kurosawa, M., Messlinger, K., Pawlak, M., and Schmidt, R.F. (1995). Increase of meningeal blood flow after electrical stimulation of rat dura mater encephali: mediation by calcitonin gene-related peptide. *Br. J. Pharmacol.* *114*, 1397–1402.
- Liu, L., and Simon, S.A. (1996). Similarities and differences in the currents activated by capsaicin, piperine, and zingerone in rat trigeminal ganglion cells. *J. Neurophysiol.* *76*, 1858–1869.
- Martins, I., and Blau, J.N. (1989). Headaches in insulin-dependent diabetic patients. *Headache* *29*, 660–663.
- Messlinger, K. (2018). The big CGRP flood - sources, sinks and signalling sites in the trigeminovascular system. *J. Headache Pain* *19*, 22.
- Murata, T., Yamawaki, H., Hori, M., Sato, K., Ozaki, H., and Karaki, H. (2001). Chronic vascular toxicity of doxorubicin in an organ-cultured artery. *Br. J. Pharmacol.* *132*, 1365–1373.
- Nassini, R., Materazzi, S., Vriens, J., Prenen, J., Benemei, S., De Siena, G., la Marca, G., Andrè, E., Preti, D., Avonto, C., et al. (2012). The “headache tree” via umbellulone and TRPA1 activates the trigeminovascular system. *Brain J. Neurol.* *135*, 376–390.

Paolucci, N., Saavedra, W.F., Miranda, K.M., Martignani, C., Isoda, T., Hare, J.M., Espey, M.G., Fukuto, J.M., Feelisch, M., Wink, D.A., et al. (2001). Nitroxyl anion exerts redox-sensitive positive cardiac inotropy in vivo by calcitonin gene-related peptide signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10463–10468.

Rascol, M.M., and Izard, J.Y. (1976). The subdural neurothelium of the cranial meninges in man. *Anat. Rec.* *186*, 429–436.

Rask-Madsen, C., and King, G.L. (2013). Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab.* *17*, 20–33.

Rasmussen, B.K. (2001). Epidemiology of headache. *Cephalalgia Int. J. Headache* *21*, 774–777.

Ray, B.S., and Wolff, H.G (1940). Experimental studies on headache: pain sensitive structures of the head and their significance in headache. *Arch Surg* *1*, 813–856.

Rittenhouse, P.A., Marchand, J.E., Chen, J., Kream, R.M., and Leeman, S.E. (1996). Streptozotocin-induced diabetes is associated with altered expression of peptide-encoding mRNAs in rat sensory neurons. *Peptides* *17*, 1017–1022.

Shimizu, T., Toriumi, H., Sato, H., Shibata, M., Nagata, E., Gotoh, K., and Suzuki, N. (2007). Distribution and origin of TRPV1 receptor-containing nerve fibers in the dura mater of rat. *Brain Res.* *1173*, 84-91.

Singla, P., Bardoloi, A., and Parkash, A.A. (2010). Metabolic effects of obesity: A review. *World J. Diabetes* *1*, 76–88.

Starowicz, K., Nigam, S., and Di Marzo, V. (2007). Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol. Ther.* *114*, 13–33.

Szallasi, A., Szabó, T., Bíró, T., Modarres, S., Blumberg, P.M., Krause, J.E., Cortright, D.N., and Appendino, G. (1999). Resiniferatoxin-type phorboid vanilloids display capsaicin-like selectivity at native vanilloid receptors on rat DRG neurons and at the cloned vanilloid receptor VR1. *Br. J. Pharmacol.* *128*, 428–434.

Szolcsányi, J. (1988). Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. *Agents Actions* *23*, 4–11.