

**Válasz Dr. Bíró Tamás egyetemi tanárnak, az MTA doktorának doktori értekezésemről
adott opponensi véleményére**

Nagyon köszönöm Professzor Úrnak, hogy elvállalta a „Nociceptív ioncsatornák és a kalcitonin gén-rokon peptid szerepe a trigeminovaszkuláris rendszerben – a migrén patofiziológiai folyamatainak állatkísérletes vizsgálata” című doktori értekezésem bírálatát. Köszönöm az értekezés stílusára és szerkesztésére vonatkozó elismerő szavait és észrevételeit. Az alábbiakban szeretnék válaszolni a felvetett kérdéseire és megjegyzéseire.

5. fejezet – Meningeális kemoszenzitív afferensek és extrakraniális kollaterálisaiak morfológiai azonosítása és funkcionális jellemzése

1. Talán a legjelentősebb kritika a dolgozatban bemutatott eredményekkel kapcsolatban, hogy az immunfluoreszcens ábrák gyenge minőségűek. Ez ezért is problematikus, mivel többszörös jelölés alkalmazása után adott molekulák ko-lokalizációjára vonatkozó következtetéseket von le a szerző. Kérdésem, hogy pl. a 9. ábrán a TRPV1 és a CGRP ko-lokalizációjának vizsgálata során történt-e kísérlet a ko-lokalizáció mértékének kvantitatív meghatározására?

Patkány dura materének vastagsága 200-300 µm. A dura mater totálpreparátumként a koponya csonthártyájáról lefejtve valamennyi ér és idegelemet tartalmazó, immunhisztokémiai festésre is alkalmas szövet. A benne haladó ér és ideg képletek viszont a dura teljes vastagságában gyakran egymást keresztező képletek, ami különösen hagyományos fluoreszcens mikroszkóp használata esetén megnehezíti az igazán jó minőségű dokumentációt szolgáló felvételek készítését. Az arteria meningeá media ágait szenzoros és vegetatív rostokat tartalmazó vastag idegkötegek kísérik, melyek esetében lehetetlen megbízható kvantitatív adatokat nyerni totálpreparátum mikroszkópos kiértékelésével. A dura mater immunhisztokémiai festését kísérleteink során szinte minden esetben – így a 9. ábrán bemutatott TRPV1 és CGRP festés esetében is - kvalitatív meghatározás céljából alkalmaztuk, egyedül a diabéteszes állatok preparátumain próbáltuk sztereológiai módszert alkalmazva az egyébként feltűnő és jelentős kontrolltól eltérő mértékű festődésbeli különbséget kvantitatív morфомetriai meghatározással is alátámasztani. Kolokalizációra vonatkozó megállapításokat a látható erektől távolabb, a dura mater kötőszövetes állományában haladó egyes rostok esetében tettünk.

2. A TRP ioncsatornák elleni antitestek közismerten nem minden esetben rendelkeznek abszolút specificitással. Milyen módon igazolták a kapott immunfluoreszcens (és Western blot) jelölések specificitását?

Az antitestek kiválasztásánál és használatánál mindig a lehető legnagyobb körültekintéssel jártunk el. A festési eljárást a Histochemical Society immunhisztokémiai festések során alkalmazandó kontrollokra vonatkozó útmutatásának szem előtt tartásával végeztük (Hewitt et al. 2014).

A primer antitestek specificitásának meghatározásakor alkalmazandó pozitív és negatív kontrollok esetében természetesen támaszkodtunk az antitestek gyártói által rendelkezésre bocsátott adatokra. Pozitív kontroll tekintetében amennyiben lehetőségünk volt rá (pl. CGRP immunhisztokémiai kimutatásakor) mi magunk is megbizonyosodtunk az antitest specificitásáról; hátsógyöki ganglionból készült metszeten elvégezve az immunhisztokémiai festést, annak eredményét összevetettük az irodalomból ismert adatokkal. Negatív kontroll tekintetében igyekeztünk olyan antitesteket használni, melyek a gyártó által is dokumentáltan a kérdéses fehérjét nem expresszáló knockout állatok szöveteiben (pl. TRPV1, TRPA1 esetében) nem eredményeztek immunhisztokémiai festődést. Lehetőség szerint a primer antitestet reagáltattuk a megfelelő fehérjével (abszorpciós kontroll pl. CGRP, RAMP1, CRL kimutatása esetén), a primer antitest ezt követően alkalmazva nem, vagy alig eredményezett immunhisztokémiai jelölődést. Ezeken felül, az antitest aspecifikus kötődésének kizárása céljából teszteltük a primer antitest hígításával megegyező koncentrációban alkalmazott izotípus-specifikus immunglobulin használatával nyert immunhisztokémiai jelölődést is. A másodlagos antitestek specificitásáról minden esetben a primer antitest elhagyásával végzett festéssel bizonyosodtunk meg.

Hewitt SM, Baskin DG, Frevert CW, Stahl WL, Rosa-Molinar E: Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays. J Histochem Cytochem. 2014 Oct;62(10):693-7. doi: 10.1369/0022155414545224.

3. Mi magyarázza azt a jelenséget, hogy a szisztémás capsaicin deszenzibilizáció kivédte 100 nM capsaicin (TRPV1 és CGRP felszabadulás-függő) vazodilatátor hatását, de nem befolyásolta 10 μ M capsaicin vazokonstriktor hatását?

A meningeális erekben a capsaicin topikális applikációja két, a meningeális véráramlás szempontjából ellentétes hatást váltott ki. Egyrészt a trigeminális afferensek TRPV1 receptorainak stimulációja révén kiváltott Ca^{2+} beáramlás CGRP felszabadulást eredményezett, ami az artériák és arteriolák simaizmának relaxációja révén véráramlás fokozó hatású volt, másrészt a vaszkuláris simaizom TRPV1 receptorainak aktiválásával kiváltott Ca^{2+} beáramlás révén vazokonstriktort eredményezett. A perifériás szövetekben a TRPV1 receptor kimutatható a kemoszenzitív nociceptorok perifériás nyúlványain és az arteriolák simaizomsejtjein is (Fernandes et al. 2012). A vaszkuláris helyzetű TRPV1 receptor expressziója főleg a hőszabályozásban szerepet játszó szövetek (bőr, trachea, dura mater) arterioláin volt igazolható (Cavanaugh et al. 2011).

A kísérleti állatok ismételt nagy dózisú szisztémás capsaicin kezelése a TRPV1 receptort expresszáló primer szenzoros neuron populáció szelektív károsodását váltja ki, melynek következtében károsodik az innervált perifériás szövet neurogén gyulladásos reakciója is (Jancso N et al. 1967, Jancsó G et al. 1981). A vaszkuláris TRPV1 receptorok érzékenysége azonban ilyen körülmények között is megtartott, amit Tóth Attila munkacsoportja bizonyított 2013-ban kísérleti állatok újszülött kori capsaicin kezelését követően (Czikora et al. 2013). A kísérleteinkben alkalmazott felnőtt kori szisztémás capsaicin deszenzibilizáció a korábbi megfigyeléseknek megfelelően károsította a meningeális vaszkuláris reakció neurogén TRPV1-függő komponensét, de nem befolyásolta a direkt vaszkuláris TRPV1-mediálta vazokonstriktort. A jelenség lehetséges magyarázata, hogy a TRPV1 receptorok két populációja valószínűleg eltérő érzékenységgel rendelkezik a receptor agonistáival szemben. Míg a neuronális TRPV1 receptor tartós aktivációja a következményes Ca^{2+} beáramlás révén neurotoxikus hatású, a vaszkuláris simaizom kevésbé érzékeny a receptor agonista hatására, amit a simaizom sejtek proliferációja és a károsodott receptorok ilyen módon lehetséges pótlása magyarázhat. A TRPV1 aktivációhoz köthető Ca^{2+} beáramlás toxikus hatása nem jelentkezik a simaizom sejtekben, amit az egyéb vazokonstriktor hatásokra adott megtartott vaszkuláris reakciók igazolnak (Czikora et al. 2012). *In vivo* véráramlás vizsgálataink során a meningeális artériák capsaicin deszenzibilizációt követően is intaktnak tekinthető funkciója magyarázhatja a magasabb capsaicin koncentrációk megtartott vazokonstriktor hatását.

Cavanaugh DJ, Chesler AT, Jackson AC, Sigal YM, Yamanaka H, Grant R, O'Donnell D, Nicoll RA, Shah NM, Julius D, Basbaum AI. Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J Neurosci*. 2011 Mar 30;31(13):5067-77. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6451-10.2011.

Czikora Á, Lizanecz E, Bakó P, Rutkai I, Ruzsnavszky F, Magyar J, Pórszász R, Kark T, Facskó A, Papp Z, Édes I, Tóth A: Structure-activity relationships of vanilloid receptor agonists for arteriolar TRPV1. *Br J Pharmacol*. 2012 Mar;165(6):1801-1812. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01645.x.

Czikora Á, Rutkai I, Pásztor ET, Szalai A, Pórszász R, Boczán J, Édes I, Papp Z, Tóth A: Different desensitization patterns for sensory and vascular TRPV1 populations in the rat: expression, localization and functional consequences. *PLoS One*. 2013 Nov 8;8(11):e78184. doi: 10.1371/journal.pone.0078184. eCollection 2013.

Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE: The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *British Journal of Pharmacology* 2012;166: 510–521.

Jancsó G, Hökfelt T, Lundberg JM, Kiraly E, Halász N, Nilsson G, Terenius L, Rehfeld J, Steinbusch H, Verhofstad A, Elde R, Said S, Brown M: Immunohistochemical studies on the effect of capsaicin on spinal and medullary peptide and monoamine neurons using antisera to substance P, gastrin/CCK, somatostatin, VIP, enkephalin, neurotensin and 5-hydroxytryptamine. *J Neurocytol*. 1981 Dec;10(6):963-80.

Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J: Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother* 1967;31: 138–151.

4. Ezzel kapcsolatban a szerző az 58. oldalon az írja: „A capsaicin CGRP felszabadulás révén kiváltott vazodilatátor és közvetlen vazokonstriktor hatása ...”. Úgy vélem, hogy a disszertáció meggyőző és bizonyító erejű adatokat szolgáltat az idézett mondat első feléről, ugyanakkor a második feléről nem. Kérdésem, hogy milyen adatokkal tudja alátámasztani a capsaicin „közvetlen vazokonstriktor hatását”, illetve annak hatásmechanizmusát?

A capsaicin vazokonstriktor hatásának hátterében feltételezhetően több különböző mechanizmus állhat. Jelenleg a legátfogóbb ismeretekkel a vaszkuláris TRPV1 receptorokról rendelkezünk. Ezek jelenlétét funkcionális és morfológiai vizsgálatokkal igazolták különböző, elsősorban a hőszabályozásban szerepet játszó szövetek arterioláin (Keeble & Brain 2006, Cavanaugh et al. 2011), de kimutatták jelenlétüket mezenterialis (Pórszász et al. 2002) és vázizom arteriolákban is (Lizanecz et al. 2006, Kark et al. 2008).

A vaszkuláris TRPV1 receptorok aktivációja révén kiváltott Ca^{2+} beáramlás simaizom kontraháló hatása mellett egyéb capsaicin-indukálta vazokonstriktor mechanizmusokat is igazoltak kísérletes körülmények között különböző értípusokban. Ezek részvétele a capsaicin vazokonstriktor hatásában a meningeális erek esetében sem zárható ki. Patkány aorta simaizom sejt kultúráján a capsaicin feszültség függő K^{+} -csatornákra kifejtett gátló hatását igazolták, ami a sejtek depolarizációja révén Ca^{2+} beáramláshoz és simaizom kontrakcióhoz vezetett (Lo et al. 1995).

További lehetséges mechanizmus a capsaicin vazokonstriktor hatásának hátterében az endothel sejtekből történő endothelin felszabadítása, ami a vaszkuláris simaizom sejteken parakrin módon fejtheti ki hatását. Capsaicin infúziója kísérleti állatokban szisztémás vérnyomás emelkedést vált ki. A presszor válasz keretében megvalósuló vazokonstriktáció hátterében endothelin-1 felszabadulását igazolták. A capsaicin hatására bekövetkező vérnyomás-emelkedés az ET_A receptor blokkolásával kivédhető volt. Az aorta eredetű endothel sejtek sejt kultúrában a capsaicin hatására dóziszfüggő módon fokozták endothelin-1 termelésüket (Ohanyan et al. 2011).

Cavanaugh DJ, Chesler AT, Jackson AC, Sigal YM, Yamanaka H, Grant R, O'Donnell D, Nicoll RA, Shah NM, Julius D, Basbaum AI: Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. J Neurosci. 2011 Mar 30;31(13):5067-77. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6451-10.2011.

Kark T, Bagi Z, Lizanecz E, Pásztor ET, Erdei N, Czikora A, Papp Z, Edes I, Pórszász R, Tóth A: Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. Mol Pharmacol. 2008 May;73(5):1405-12. doi: 10.1124/mol.107.043323. Epub 2008 Feb 6.

Keeble JE, Brain SD: Capsaicin-induced vasoconstriction in the mouse knee joint: a study using TRPV1 knockout mice. Neurosci Lett. 2006 Jun 19;401(1-2):55-8. doi: 10.1016/j.neulet.2006.02.083.

Lizanecz E, Bagi Z, Pásztor ET, Papp Z, Edes I, Keddi N, Blumberg PM, Toth A: Phosphorylation-dependent desensitization by anandamide of vanilloid receptor-1 (TRPV1) function in rat skeletal muscle arterioles and in Chinese hamster ovary cells expressing TRPV1. Mol Pharmacol 2006.69;1015–1023.

Lo YC, Wu SN, Wu JR, Chen IJ: Effect of capsaicin on membrane currents in cultured vascular smooth muscle cells of rat aorta. Eur J Pharmacol. 1995 Mar 16;292(3-4):321-8. doi: 10.1016/0926-6917(95)90039-x.

Ohanyan VA, Guarini G, Thodeti CK, Talasila PK, Raman P, Haney RM, Meszaros JG, Damron DS, Bratz IN: Endothelin-mediated in vivo pressor responses following TRPV1 activation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011 Sep;301(3):H1135-42. doi: 10.1152/ajpheart.00082.2011.

Pórszász R, Porkoláb A, Ferencz A, Pataki T, Szilvássy Z, Szolcsányi J: Capsaicin-induced nonneural vasoconstriction in canine mesenteric arteries. Eur J Pharmacol. 2002 Apr 26;441(3):173-5. doi: 10.1016/s0014-2999(01)01596-5.

6. fejezet – Nitrogénmonoxid és nitroxil szerepe a meningeális véráramlás szabályozásában

1. A szerzők elegánsan mutatják be az NO és a HNO komplex – a szenzoros idegvégződés és a nem-neuronális struktúrák összjátékát magában foglaló – részben TRPA1 mediált és CGRP függő szerepét a meningeális véráramlás szabályozásában. Kérdésem, hogy megbecsülhető-e, hogy az idegi és nem-idegi hatások közül melyik a domináns?

A dura materben a HNO képződésében szerepet játszó NO-ot és H₂S-t szintetizálhatják mind neuronális, mind nem neuronális szöveti elemek, elsősorban vaszkuláris struktúrák. Normál körülmények között a NO termelődését patkány dura materében az artériák és arteriolák endotheljében sikerült kimutatni, sem a kapillárisok, sem a posztkapilláris érszakaszok nem termelték. Patkány dura materében csak elvétve lehetett néhány nNOS pozitív idegrostot azonosítani, ezek is valószínűleg paraszimpatikus eredetűek voltak (Messlinger et al. 2012). A nNOS-t ugyanis a dura mater paraszimpatikus innervációját szolgáltató ganglion sphenopalatinum és ganglion oticum neuronjainak 80 %-a expresszálja, míg a trigeminális eredetű neuronoknak csupán töredéke. A paraszimpatikus rostok, mivel CGRP-t nem tartalmaznak, nem tekinthetők a HNO által mediált véráramlás szabályozásban szerepet játszó elsődleges struktúráknak sem (Tajti et al. 1999, Csati et al. 2012). Mivel a NO féléletideje a szövetekben 1 sec körül van, interakciója a legnagyobb valószínűséggel a térben közeli szöveti elemekből származó H₂S-nel képzelhető el. A vaszkuláris endothel és simaizom egyaránt termelhet H₂S-t, sőt termelődését az adventiciához közeli helyzetű sejtekben is kimutatták (Yang & Wang 2015). Nagy valószínűséggel a vaszkuláris elemekben termelt H₂S a helyben termelt NO-dal reagálva állít elő HNO-t. Saját megfigyelésünk is az arteria meninge media falában lokalizáltan mutatta ki mind a NO, mind a H₂S jelentősebb mértékű termelődését. Bár a környező szöveti struktúrákban (idegi és kötőszöveti elemekben) is kimutatható volt HNO jelenléte, az elsődleges forrásnak mégis nagy valószínűséggel a vaszkuláris képleteket tekinthetjük. Mivel nem csak a NO és a H₂S, de maga a HNO is szabadon átdiffundálhat az idegrostokba, a vaszkuláris elemekben termelő HNO parakrin módon fejtheti ki aktiváló hatását a trigeminális TRPA1 receptorokra és szabadíthatja fel a vazodilatátor hatású CGRP-t (Cuevasanta et al. 2012). Vagyis saját

megfigyeléseinket az irodalmi adatokkal összevetve az általunk vizsgált kísérleti modellben valószínűbbnek tűnik a HNO vaszkuláris eredete.

Csati A, Tajti J, Tuka B, Edvinsson L, Warfvinge K: Calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human sphenopalatine ganglion -- interaction with the sensory system. *Brain Res.* 2012 Jan 30;1435:29-39. doi: 10.1016/j.brainres.2011.11.058.

Cuevasanta E, Denicola A, Alvarez B, Möller MN: Solubility and permeation of hydrogen sulfide in lipid membranes. *PLoS One.* 2012;7(4):e34562. doi: 10.1371/journal.pone.0034562.

Messlinger K, Lennerz JK, Eberhardt M, Fischer MJ: CGRP and NO in the trigeminal system: mechanisms and role in headache generation. *Headache.* 2012 Oct;52(9):1411-27. doi: 10.1111/j.1526-4610.2012.02212.x.

Tajti J, Möller S, Uddman R, Bodi I, Edvinsson L: The human superior cervical ganglion: neuropeptides and peptide receptors. *Neurosci Lett.* 1999 Mar 26;263(2-3):121-4.

Yang G1, Wang R: H2S and Blood Vessels: An Overview. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;230:85-110. doi: 10.1007/978-3-319-18144-8_4.

2. A 73. oldalon a szerző említi, hogy más munkájukban celluláris rendszerekben (patch-clamp és Ca-imaging technikákat alkalmazva) vizsgálták a HNO és a TRPA1 szerepét a fenti folyamatokban. Kérem, röviden foglalja össze ezen eredményeket!

Kutatócsoportunk különböző *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* kísérleti modellekben vizsgálta a HNO és az ennek keletkezésében szerepet játszó NO és H₂S interakciója során bekövetkező TRPA1 ioncsatorna aktivációt és ennek nociceptív reakciókra kifejtett hatását. A doktori dolgozatomban is részletesen bemutatott *in vivo* meningeális véráramlás mérések és *ex vivo* meningeális CGRP felszabadulás mérésre vonatkozó kísérleteinken túl munkacsoportunk egyéb szövetekben is igazolta a HNO donor Angeli's salt hatására bekövetkező, illetve a HNO szövetekben történő spontán termelődését eredményező NO és H₂S interakcióját követő TRPA1 receptor aktiválódást és következményes CGRP felszabadulást. Whole cell voltage clamp módszerrel TRPA1 receptort expresszáló kínai hörcsög ovárium sejteken Angeli's salt applikációjával intenzív befelé irányuló ionáramot sikerült mérni, mely ismételt blokkolható volt a TRPA1 receptor antagonista HC030031 applikációjával. A szövetekben spontán módon is gyorsan inaktíváló Angeli's salt lebomlott formájában hatástalannak bizonyult.

Vad típusú egerek hátsógyöki ganglion sejtjeiből készült neuron tenyészetben calcium imaging módszerrel Angeli's salt applikációja a neuronok 28 %-ában váltott ki intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelkedést. Ezen sejtek döntő többsége a klasszikus TRPA1 receptor agonista allyl isothiocyanate-tal is aktiválható volt, a TRPA1 receptor antagonista HC030031 pedig felfüggesztette a HNO által indukált Ca²⁺ szignált. A TRPA1-/- állatok hátsógyöki ganglionsejtjeiből készült tenyészetben sem az Angeli's salt, sem az allyl isothiocyanate nem váltott ki Ca²⁺ koncentráció emelkedést. Ugyanebben a kísérleti modellben vad típusú állatok ganglionsejtjeiben sem a NO donor DEANONOate, sem a H₂S donor Na₂S nem váltott ki Ca²⁺-

tranzienst, a két anyag együttes alkalmazása azonban igen. Ez a reakció is gátolható volt TRPA1 receptor antagonistá előkezeléssel, a TRPA1 receptorral nem rendelkező állatokból származó hátsó gyöki ganglion sejtekben pedig nem volt kiváltható.

Vad típusú egerek *ex vivo* nervus ischiadicus preparátumából az Angeli's salt jelentős mennyiségű CGRP-t szabadított fel, ami kivédhető volt TRPA1 receptor antagonistá előkezeléssel. TRPA1 +/- állatok nervus ischiadicus preparátumában az Angeli's salt nem fokozta a CGRP felszabadulást.

Egér szíven végzett *ex vivo* mérések igazolták, hogy NO vagy H₂S donor magában nem, de együttesen adva CGRP felszabadulást vált ki a szenzoros axonokból. Az ilyen módon kiváltott CGRP felszabadulást a TRPV1 receptor antagonistá BCTC előkezelés nem befolyásolta, de a TRPA1 antagonistá HC030031 kivédte. A NO és H₂S kombinációja TRPV1/- állatokban a kontrollokéhoz hasonló mértékű CGRP felszabadulást váltott ki, TRPA1/- egerek szívében azonban ez a hatás nem volt megfigyelhető.

A TRPA1 receptort expresszáló nociceptorok aktiválódása fájdalomérzést vált ki. Ezért önként vállalkozókon teszteltük az Angeli's salt alkar voláris felszínébe intrakután adott injekciójával (10 nmol/kg) kiváltott fájdalomérzést is. Angeli's salt injekciója azonnal jelentkező égő fájdalmat váltott ki, ami átlagosan 7,5 perc alatt lecsengett és 0-10 terjedő szubjektív skálán átlagosan 3,6 ± 0,4-nek értékelt maximális fájdalomérzést váltott ki. A lebomlott Angeli's salt injekciója se fájdalmat, se viszketést nem váltott ki. Lézer Doppler szkennelével az Angeli's salt beadásának helyén jelentős axon reflex erythema volt mérhető, amit nem befolyásolt a H1 receptor antagonistá előzetes adása, vagyis nem a hízósejtekből kiváltott hisztamin felszabadulás eredménye volt. A HNO képződését elősegítő DEANONOate és Na₂S együttes intradermális injekciója is kiterjedt vazodilatációt okozott, melyet fájdalom vagy viszkető érzés kísért.

A különböző kísérleti modellekben nyert valamennyi eredményünk a HNO TRPA1 ioncsatornát aktiváló hatását igazolta, mely a nociceptorok aktiválása révén fájdalomérzést vált ki és CGRP felszabaduláshoz vezet, amely lokális véráramlás fokozódást eredményez (Eberhardt et al. 2014).

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. Nat Commun. 2014 Jul 15;5:4381. doi: 10.1038/ncomms5381.

7. fejezet – Kemoszenzitív afferensek és hízósejtek közötti interakció a dura materben

1. Minor hiba, hogy a 30. ábráról lemaradt egy „μ” betű.

Köszönöm az észrevételt, a 30. ábrán a hisztamin koncentrációinak jelölésekor valóban lemaradt az ábráról egy μ jelölés.

2. Általánosan elfogadott, hogy a hisztamin döntően a hízósejtekből szabadul fel különféle hatásokra. Ugyanakkor nem mutat olyan adatot a szerző, miszerint a hízósejtek jelen vannak-e az alkalmazott kísérletes elrendezésben a dura materben, valamint, hogy valóban degranulálódnak-e az alkalmazott stimulusokra. Kérem, kommentálja fenti felvetésemet!

Bár korábbi morfológiai vizsgálatok is tanulmányozták rágcsálók dura materének innervációját, ezek a vizsgálatok döntően a szenzoros és vegetatív axonok morfológiájára fókuszáltak, hízósejtek előfordulására vonatkozó információt vagy egyáltalán nem (Andres et al. 1987), vagy csak érintőlegesen tartalmaztak (Keller & Marfurt 1991). Az első, részletes leírást patkány dura materének hízósejtjeiről Dimlich és munkatársai publikálták 1991-ben (Dimlich et al. 1991). Ők a hízósejt granulumok tartalmának metakromáziás festődésén alapuló hisztokémiai módszerrel és szerotonin tartalmuk immunhisztokémiai kimutatásával fénymikroszkópos eljárással, valamint elektronmikroszkópiával is igazolták a meningeális hízósejtek jelenlétét. Meghatározták a hízósejtek denzitását (kb. 250 sejt/mm²), kimutatták meningeális artériákhoz és idegrost kötegekhez közeli elhelyezkedésüket és bizonyítékot szolgáltatottak a hízósejtek degranulációját kiváltó compound 48/80 alkalmazását követő fény- és elektronmikroszkópos morfológiai változásokra, melyeket a degranuláció morfológiai jeleinek tekintettek. Később Dimitriadou és munkatársai a ganglion trigeminale elektromos ingerlésével, corticotropin-releasing hormon hatására és a dura mater ösztadiollal történő stimulációjával is kiváltották a meningeális hízósejtek degranulációját, melyet dura mater totálpreparátumban a hízósejtek granulumainak metakromáziás festődése alapján, a bennük tárolt triptáz immunhisztokémiai kimutatásával fény-, valamint scanning- és transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokkal támasztottak alá (Dimitriadou et al. 1991, 1997, Rozniecki et al. 1999). Patkányokban a meningeális afferensek aktivációjával felszabadított szenzoros neuropeptidok, a CGRP és P anyag szintén hízósejt degranuláló hatásúnak bizonyultak (Ottosson and Edvinsson 1997, Rozniecki et al. 1999).

Fénymikroszkópos vizsgálat során a hízósejt degranuláció egyértelmű morfológiai jelének tekinthető, ha egy metakromáziásan festődő hízósejt környezetében 5 vagy ennél több festődő vezikula látható. A sejtek halványabb festődése és határozatlan kontúrjai is a degranuláció jeleinek tekinthetők. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálattal a preparátumban az elektrondeniz megjelenésüket elvesztő granulumok intracelluláris jelenléte, scanning elektronmikroszkópos vizsgálattal pedig a hízósejtek filopódiumainak elvesztése és felszínen látható granulumainak számbeli csökkenése utal a degranulációra. A hízósejt degranuláció morfológiai jeleivel párhuzamosan funkcionális változások is igazolhatóak voltak, melyek alátámasztották, hogy a hízósejtek degranulációjával kiváltott mediátor felszabadulás a meningeális nociceptorok szenzitizációját eredményezi. A compound 48/80-nal kiváltott meningeális hízósejt degranuláció a nociceptív pálya

aktivációját az agytörzsi másodlagos neuronokban is kiváltotta, ami a c-fos expresszió fokozódásával volt igazolható (Levy et al. 2007).

Andres KH, von Düring M, Muszynski K, Schmidt RF: Nerve fibres and their terminals of the dura mater encephali of the rat. Anat Embryol (Berl). 1987;175(3):289-301.

Dimitriadou V, Buzzi MG, Moskowitz MA, Theoharides TC: Trigeminal sensory fiber stimulation induces morphological changes reflecting secretion in rat dura mater mast cells. Neuroscience. 1991;44(1):97-112.

Dimitriadou V, Rouleau A, Trung Tuong MD, Newlands GJ, Miller HR, Luffau G, Schwartz JC, Garbarg M: Functional relationships between sensory nerve fibers and mast cells of dura mater in normal and inflammatory conditions. Neuroscience. 1997 Apr;77(3):829-39.

Dimlich RV, Keller JT, Strauss TA, Fritts MJ: Linear arrays of homogeneous mast cells in the dura mater of the rat. J Neurocytol. 1991 Jun;20(6):485-503.

Keller JT, Marfurt CF: Peptidergic and serotonergic innervation of the rat dura mater. J Comp Neurol. 1991 Jul 22;309(4):515-34.

Levy D, Burstein R, Kainz V, Jakubowski M, Strassman AM: Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache. Pain. 2007 Jul;130(1-2):166-76. Epub 2007 Apr 24.

Ottosson A, Edvinsson L: Release of histamine from dural mast cells by substance P and calcitonin gene-related peptide. Cephalalgia. 1997 May;17(3):166-74.

Rozniecki JJ, Dimitriadou V, Lambracht-Hall M, Pang X, Theoharides TC: Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell-neuron interactions in vitro and in vivo. Brain Res. 1999 Dec 4;849(1-2):1-15.

3. Az ebben a fejezetben bemutatott eredményeket tartalmazó közleményeket 2007-ben és 2009-ben publikálták a szerzők. Van-e azóta újabb adata a dura mater hízósejtjeiről, különös tekintettel a migrén patofiziológiájára?

Jelenlegi ismereteink alapján fontos tényezőnek tekintjük a migrén pathogenezisében a trigeminális nociceptív pálya perifériás és centrális szenzitizációját. Mivel a dura mater neurogén gyulladásos folyamata mindkét mechanizmus kiváltásában szerepet játszhat, a trigeminális nociceptorok aktiválódása következtében felszabaduló szenzoros neuropeptidek pedig a hízósejtek degranulációját válthatják ki és így további vazoaktív és nociceptor szenzitizáló hatású mediátorokat tehetnek szabaddá, logikus feltételezés a dura mater hízósejtjeinek is szerepet tulajdonítani ezekben a folyamatokban.

Gerincesekben, így emberben is jelentős számban mutathatók ki hízósejtek a kemény agyhártyában (Ottosson & Edvinsson 1997, Varatharaj et al. 2012), melyek helyzetüknél fogva ideális kommunikációt biztosítanak az erek, neuronok, gliasejtek, az extracelluláris matrix és egyéb immunkompetens sejtek között. A hízósejtek különböző stimulusok hatására számos mediátort (többek között hisztamint, proteázokat, prosztaglandinokat, citokineket, chemokineket) szabíthatnak fel, melyek révén befolyásolják a meningeális véráramlást és szenzitizálhatják a primer szenzoros neuronokat (Silver & Curley 2013). A hízósejtek meningeális nocicepcióban betöltött szerepére vonatkozó kísérleteink óta eltelt bő 10 év

során publikált kísérletes eredmények további adatokat szolgáltatottak rágcslókban a meningeális hízósejtek és a trigeminális nociceptív funkciók közötti kapcsolatokra vonatkozóan. Itt szeretném megjegyezni, hogy a hízósejtek migrén patofiziológiában feltételezett szerepe mind a mai napig döntően állatkísérletes eredményeken alapul.

Az elmúlt időszakban állatkísérletekben igazolták a dura pH-jának savas irányba tolódása következtében fellépő nociceptor szenzitizáció és ASIC3 csatorna (melyet a meningeális afferensek 80 %-a expresszál) aktiváció hátterében a hízósejt eredetű mediátorok szenzitizáló szerepét (Yan et al. 2013). Bizonyították továbbá patkányokban a dura matert innerváló paraszimpatikus idegek potenciális hízósejt degranuláló hatását: a muszkarinos acetilkolin receptor stimulációja a hízósejtekben morfológiailag igazolható degranulációt váltott ki (Shelukhina et al. 2017). A hízósejtek meningeális nocicepcióban betöltött lehetséges szerepét igazolták patkányokban azok az elektrofiziológiai vizsgálatok is, melyek a szerotonin trigeminális afferenseket aktiváló hatását bizonyították (Kilinc et al. 2017). Egerekben a szerotonin felszabadulás lehetséges mechanizmusaként a meningeális hízósejtek P2X7 purinerg receptorainak ATP-vel történő stimulációját igazolták. A glia, neuronális vagy endothel eredetű ATP és annak metabolitjai vazodilatátor és nociceptor szenzitizáló hatásuknál fogva szerepet játszhatnak a migrén patofiziológiájában is (Burnstock 1981).

Bár az elmúlt évtized állatkísérletes vizsgálatai további részleteket tártak fel a meningeális hízósejtek és a trigeminális nocicepció közötti összefüggésekről, hasonló mechanizmusok igazolása a humán dura mater vonatkozásában még várat magára. Úgy tűnik, hogy a rágcslókban igazolt szenzoros neuropeptidok által kiváltott hízósejt degranuláció emberben nem játszik jelentős szerepet a hízósejtek mediátorainak felszabadításában.

Immunhisztokémiai vizsgálatok ugyanis csak a CLR CGRP receptor komponens jelenlétét igazolták a hízósejteken, a RAMP1 receptor komponensét azonban nem, ami pedig előfeltétele lenne a funkcióképes CGRP receptor expressziójának (Eftekhari et al. 2013). Humán dura materben sem CGRP, sem P anyag nem váltott ki hisztamin felszabadulást (Ottosson & Edvinsson 1997). Annak ellenére, hogy hisztamin infúziójával a migrénes betegekben fejfájás provokálható (Krabbe & Olesen, 1980) és a migrén profilaxisában alkalmazható triciklikus antidepresszáns kezelés hízósejt degranulációt gátló hatását igazolták (Kraeuter Kops et al. 1990), a H1 és H2 receptorokon ható antihisztaminok terápiás hatását nem sikerült klinikai vizsgálatokban bizonyítani (Worm et al. 2019). Bizakodásra adhat okot azonban az az újabb feltételezés, hogy a hízósejtek által felszabadított proinflammatorikus citokinek, az IL-1, IL-6 és a TNF töltenek be olyan központi szerepet a meningeális szöveteket érintő patofiziológiás állapotokban, melyek nociceptor szenzitizációhoz és a migrén során fellépő neurovaszkuláris reakciók felerősödéséhez vezethetnek (Conti et al. 2019). Ez, a hízósejtek migrén patofiziológiában betöltött lehetséges szerepére vonatkozó új feltételezés összhangban áll az általunk elhízott állatokban ezen proinflammatorikus citokinek TRP nociceptor ioncsatornát szenzitizáló hatására vonatkozóan tett megfigyeléseinkkel.

- Burnstock G: Pathophysiology of migraine: a new hypothesis. *Lancet*. 1981 Jun 27;1(8235):1397-9.
- Conti P, D'Ovidio C, Conti C, Gallenga CE, Lauritano D, Caraffa A, Kritas SK, Ronconi G: Progression in migraine: Role of mast cells and pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Eur J Pharmacol*. 2019 Feb 5;844:87-94. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.12.004.
- Eftekhari S, Warfvinge K, Blixt FW, Edvinsson L: Differentiation of nerve fibers storing CGRP and CGRP receptors in the peripheral trigeminovascular system. *J Pain*. 2013 Nov;14(11):1289-303. doi: 10.1016/j.jpain.2013.03.010.
- Kilinc E, Guerrero-Toro C, Zakharov A, Vitale C, Gubert-Olive M, Koroleva K, Timonina A, Luz LL, Shelukhina I, Giniatullina R, Tore F, Safronov BV, Giniatullin R: Serotonergic mechanisms of trigeminal meningeal nociception: Implications for migraine pain. *Neuropharmacology*. 2017 Apr;116:160-173. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.12.024.
- Krabbe AA, Olesen J: Headache provocation by continuous intravenous infusion of histamine. Clinical results and receptor mechanisms. *Pain*. 1980 Apr;8(2):253-9.
- Kraeuter Kops S, Theoharides TC, Cronin CT, Kashgarian MG, Askenase PW: Ultrastructural characteristics of rat peritoneal mast cells undergoing differential release of serotonin without histamine and without degranulation. *Cell Tissue Res*. 1990 Dec;262(3):415-24.
- Ottosson A, Edvinsson L: Release of histamine from dural mast cells by substance P and calcitonin gene-related peptide. *Cephalalgia*. 1997 May;17(3):166-74.
- Shelukhina I, Mikhailov N, Abushik P, Nurullin L, Nikolsky EE, Giniatullin R: Cholinergic Nociceptive Mechanisms in Rat Meninges and Trigeminal Ganglia: Potential Implications for Migraine Pain. *Front Neurol*. 2017 Apr 27;8:163. doi: 10.3389/fneur.2017.00163. eCollection 2017.
- Silver R, Curley JP: Mast cells on the mind: new insights and opportunities. *Trends Neurosci*. 2013 Sep;36(9):513-21. doi: 10.1016/j.tins.2013.06.001.
- Varatharaj A, Mack J, Davidson JR, Gutnikov A, Squier W: Mast cells in the human dura: effects of age and dural bleeding. *Childs Nerv Syst*. 2012 Apr;28(4):541-5. doi: 10.1007/s00381-012-1699-7.
- Worm J, Falkenberg K, Olesen J: Histamine and migraine revisited: mechanisms and possible drug targets. *J Headache Pain*. 2019 Mar 25;20(1):30. doi: 10.1186/s10194-019-0984-1.
- Yan J, Wei X, Bischoff C, Edelmayer RM, Dussor G: pH-evoked dural afferent signaling is mediated by ASIC3 and is sensitized by mast cell mediators. *Headache*. 2013 Sep;53(8):1250-61. doi: 10.1111/head.12152.

9. fejezet – A kemoszenzitív meningeális afferensek működésében bekövetkező változások patofiziológias körülmények között.

1. 47. ábra: A szerző bemutatja, hogy elhízott állatokból származó preparátumokon azonos akrolein koncentráció nagyobb áramlásfokozódást váltott ki. Ugyanakkor a szerző nem mutat adatot arra, hogy a mechanizmus továbbra is TRPA1 aktiváció és CGRP-függő maradt-e (azaz nem mutat inhibitorokkal végzett kísérletes eredményeket). Kérem, kommentálja fenti felvetésemet!

Jelenlegi ismereteink alapján a dura mater különböző szöveti struktúráiból felszabaduló vazodilatátor hatású anyagok közül a szenzoros idegrostokból származó CGRP a leghatásosabb. Emellett még szóba jöhetnek a szenzoros rostoknál jóval kisebb számban

jelen lévő paraszimpatikus rostokból felszabaduló acetilkolin, VIP és PACAP (Edvinsson & Uddman 1981), a döntően endothel eredetű NO és a hízósejtek hisztaminja. Az acrolein specifikus TRPA1 receptor agonista (Bautista et al. 2006, Moghe et al. 2015). A TRPA1 receptorok expressziója a meningeális paraszimpatikus rostokon nem mutatható ki. A hízósejtek rendelkezhetnek ugyan TRPA1 receptorral és az intrakraniális ereken is kimutattak TRPA1 receptorokat, melyek aktivációja Ca^{2+} függő K^{+} csatornákra kifejtett hatása révén vezet simaizom hiperpolarizációhoz és véráramlás fokozódáshoz (Earley et al. 2009), így elméletileg más, TRPA1-mediált, de nem CGRP felszabadulás által megvalósuló véráramlás fokozódás elhízott állatokban sem lenne kizárható, de ennek a valószínűségét minimálisra csökkenti az a megfigyelésünk, hogy elhízott állatokban acrolein hatására mintegy 90 %-kal emelkedett a trigeminális afferensekből felszabaduló CGRP mennyisége, ami már magában is kielégítő magyarázatot adhat a nagyobb mértékű véráramlás fokozódásra. Kísérleteink során csak a normál tápon nevelt állatok esetében kontrolláltuk az acrolein meningeális véráramlásfokozó hatásának hátterében álló mechanizmust. Az elhízott állatokban acroleinnel kiváltott CGRP felszabadulásra vonatkozó eredményeink arra utalnak, hogy az acrolein vazodilatátor hatása ezekben az állatokban is hasonló mechanizmus révén valósul meg.

Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D: TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. Cell. 2006 Mar 24;124(6):1269-82. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.023.

Earley S, Gonzales AL, Crnich R: Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca^{2+} -Activated K^{+} channels. Circ Res. 2009 Apr 24;104(8):987-94. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.189530.

Edvinsson L, Uddman R: Adrenergic, cholinergic and peptidergic nerve fibres in dura mater--involvement in headache? Cephalalgia. 1981 Dec;1(4):175-9. doi: 10.1046/j.1468-2982.1981.0104175.x.

Moghe A, Ghare S, Lamoreau B, Mohammad M, Barve S, McClain C, Joshi-Barve S: Molecular mechanisms of acrolein toxicity: relevance to human disease. Toxicol Sci. 2015 Feb;143(2):242-55. doi: 10.1093/toxsci/kfu233.

2. A 46., 47., 49. és 50. ábra adatai arra utalnak, hogy elhízott állatokban a TRPV1 és TRPA1 aktivációja megnövekedett véráramlás-fokozódást vált ki. Ugyanakkor az 51. ábrán a TRPA1 szignifikánsan csökkent kifejeződését mutatja a szerző elhízott állatokban. Kérdésem: A fenti érdekes megfigyelést azzal magyarázza a szerző, hogy elhízás során feltehetően szenzitizálódik a TRPA1 (és a TRPV1 is?). Tud-e ezen felvetést bizonyító eredményt mutatni?

Elhízott állatokban a TRPV1 és TRPA1 receptorok specifikus agonistáival kiváltott fokozott meningeális vazodilatáció hátterében különböző mechanizmusok állhatnak. Elképzelhető a receptorok fokozott expressziója és membránba történő kihelyeződése, illetve a receptorok szerkezeti módosulására visszavezethető szenzitizációja, melyet nem feltétlenül kísér a receptorok számának megváltozása. Kísérleteink során a TRPA1 fehérje mennyiségi meghatározását végeztük el, amely nemhogy nem igazolta a receptorok számának fokozódását, hanem egyenesen annak csökkenését mutatta ki. Így elhízott állatokban a

receptorok abszolút számának csökkenését is ellensúlyozó mértékű érzékenységbeli változás következett be, aminek hátterében feltételezhetőek mindazok a metabolikus változások, amik az elhízás során fellépő oxidatív és nitrozatív stressz (Freeman et al. 2013) következtében termelődnek és a TRP ioncsatornák szerkezeti módosulását válthatják ki, illetve a hasonlóan csatorna szenzitizációt eredményező emelkedett proinflammatorikus citokin koncentrációk (Camprubí-Robles et al. 2009). Az általunk elhízott állatokban is emelkedettnek mért citokinek esetében elektrofiziológiai vizsgálatok igazolták azok meningeális nociceptor szenzitizáló hatását (Yan et al. 2012, Zhang et al. 2012). Az a jelenség, hogy az egyes receptorok szenzitizáció következtében fokozott nyitási valószínűsége csökkent abszolút receptor számmal kombinálódik, szintén nem ismeretlen jelenség. Az általunk is vizsgált elhízott állatok metabolikus állapotával hasonlóságot mutató kísérletesen előidézett diabéteszben szenvedő állatokban igazolható volt a TRPV1 receptorok számbeli csökkenése, ami más Ca^{2+} csatornák működéséhez köthető változásokkal párhuzamosan volt megfigyelhető. A jelenség hátterében a tartósan megváltozott környezetben a neuronok normális funkcióját célzó kompenzatórikus változásait tételezhetjük fel.

Camprubí-Robles M, Planells-Cases R and FerrerMontiel A: Differential contribution of SNARE-dependent exocytosis to inflammatory potentiation of TRPV1 in nociceptors. FASEB J 2009; 23: 3722–3733.

Freeman LR, Zhang L, Nair A, Dasuri K, Francis J, Fernandez-Kim SO, Bruce-Keller AJ, Keller JN: Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brain function. Free Radic Biol Med. 2013 Mar;56:226-33. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.577.

Yan J, Melemedjian OK, Price TJ, Dussor G: Sensitization of dural afferents underlies migraine-related behavior following meningeal application of interleukin-6 (IL-6). Mol Pain. 2012 Jan 24;8:6. doi: 10.1186/1744-8069-8-6.

Zhang X, Burstein R, Levy D: Local action of the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 on intracranial meningeal nociceptors. Cephalalgia. 2012 Jan;32(1):66-72. doi: 10.1177/0333102411430848.

2. 52. ábra: Ismert, hogy az inzulin – saját receptorához kötődve, majd számos intracelluláris jelátviteli folyamat beindítása révén – képes a TRPV1 modulálására. Kérdésem: Nem lehetséges, hogy az a jelenség, hogy az inzulinkezelés normalizálta 6 hetes diabéteszes állatok capsaicin-érzékenységét, az inzulin direkt hatásának, és nem a metabolikus státusz rendeződésének köszönhető?

Az általunk végzett kísérletek eredményei alapján valóban nem lehet egyértelműen állást foglalni arra vonatkozóan, hogy kísérletes diabéteszben a trigeminális TRPV1 csatornák funkciójának inzulin kezelést követő restitúciója az állatok javuló metabolikus státuszának és/vagy az inzulin közvetlen TRPV1 receptor funkciót stimuláló hatásának köszönhető.

Ismert, hogy az inzulin fiziológiás koncentrációban az idegnövekedési faktorhoz (NGF) hasonló neurotrofikus hatással rendelkezik, serkenti az axonnövekedést, segíti a szenzoros és szimpatikus neuronok túlélését. Igazolták azt is, hogy az inzulin és az inzulin szerű

növekedési faktorok (IGF-ek) az NGF-hez hasonlóan, azzal azonos szignalizációs utat használva trófikus hatást fejtenek ki ezekre a neuronokra (Recio-Pinto et al. 1986, Fernyhough et al. 1993, Sugimoto et al. 2002, Lázár et al. 2020). Bár széles körben elfogadott nézet, hogy a diabétesz kapcsán fellépő idegkárosodás a hiperglikémia következménye (Sheetz & King 2002), hosszú távú humán vizsgálatok eredményei is azt mutatják, hogy magában a hiperglikémia kontrollja és megszüntetése nem védi ki a perifériás neuropátia kialakulását csak az esetek mintegy 60 %-ában (Diabetes Control and Complications Trial Research Group et al. 1993). Vagyis az inzulin hiány más módon is kedvezőtlenül befolyásolja a perifériás idegek működését.

Hátsógyöki ganglionsejtek kb. egyharmada expresszálja mind a TRPV1, mind az inzulin receptort (Sathianathan et al. 2003). A nagydoktori dolgozatom benyújtása óta eltelt időben laboratóriumunkban vizsgáltuk a két receptor előfordulását patkányok trigeminális ganglionjában is, ahol a TRPV1 receptort expresszáló neuronok több mint 50 %-a rendelkezett inzulin receptorral is.

Elektrofiziológiai vizsgálatok és calcium-imaging mérések igazolták, hogy az inzulin és az IGF-1 közvetlenül is képes befolyásolni a TRPV1 nociceptív ioncsatorna működését a receptor fehérje proteinkináz C által történő foszforilációja útján és a receptor membránba történő kihelyeződésének fokozása révén. Ezek eredményeként a TRPV1 csatorna nociceptív ingerekre, így capsaicinre is fokozott válaszkészséggel reagál (Van Buren et al. 2005).

Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, Davis M, Rand L, Siebert C: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993 Sep 30;329(14):977-86.

Fernyhough P, Willars GB, Lindsay RM, Tomlinson DR: Insulin and insulin-like growth factor I enhance regeneration in cultured adult rat sensory neurones. *Brain Res.* 1993 Apr 2;607(1-2):117-24.

Lázár BA, Jancsó G, Sántha P: Modulation of Sensory Nerve Function by Insulin: Possible Relevance to Pain, Inflammation and Axon Growth. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:2507. doi:10.3390/ijms21072507.

Recio-Pinto E, Rechler MM, Ishii DN: Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci.* 1986 May;6(5):1211-9.

Sathianathan V, Avelino A, Charrua A, Santha P, Matesz K, Cruz F, Nagy I: Insulin induces cobalt uptake in a subpopulation of rat cultured primary sensory neurons. *Eur J Neurosci.* 2003 Nov;18(9):2477-86. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.03004.x.

Sheetz MJ, King GL: Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA.* 2002 Nov 27;288(20):2579-88.

Sugimoto K, Murakawa Y, Sima AA: Expression and localization of insulin receptor in rat dorsal root ganglion and spinal cord. *J Peripher Nerv Syst.* 2002 Mar;7(1):44-53. doi: 10.1046/j.1529-8027.2002.02005.x.

Van Buren JJ, Bhat S, Rotello R, Pauza ME, Premkumar LS: Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Mol Pain.* 2005 Apr 27;1:17. doi: 10.1186/1744-8069-1-17.

3. Hogyan változott a TRPA1 szintje a trigeminális ganglionban adriamycin kezelést követően?

Vizsgálataink nem terjedtek ki adriamycin kezelést követően az állatok trigeminális ganglion neuronjaiban a TRPA1 receptor mennyiségi változásának meghatározására. A kérdés megválaszolásához irodalmi adatok sem állnak rendelkezésünkre. A doktori dolgozatomban ismertetett eredményekre alapozva mégis a TRPA1 receptorok mennyiségének csökkenése valószínűsíthető.

Patkányok trigeminális ganglion sejtjeinek kb. 43 %-a expresszálja a TRPV1 receptort. TRPA1 receptorral a ganglionsejtek 36 %-a rendelkezik (Kobayashi et al. 2005, Salas et al. 2009). Mivel a TRPA1 receptort expresszáló sejtek a TRPV1 receptorral rendelkező neuronok egy valamivel kisebb populációját alkotják, valamint a két receptor szerkezete és a funkciójukat befolyásoló hatások is párhuzamba állíthatók, valószínűleg nem tévedünk, ha a kísérleteink során a TRPV1 receptor fehérje mennyiségének csökkenésére vonatkozó megállapításainkra támaszkodunk.

Adriamycin kezelést követően a trigeminális ganglionban csökkent a TRPV1 receptor fehérje mennyisége. Irodalmi adatok és korábbi saját mérések alapján tudjuk, hogy az *ex vivo* dura mater preparátumban a CGRP felszabadulás meghatározása során alkalmazott 10 nM capsaicin és 300 μ M acrolein koncentrációk közel maximális vazodilatátor hatást fejtenek ki a trigeminális TRPV1 illetve TRPA1 receptorok aktivációja és a következményes CGRP felszabadulás révén (Dux et al. 2007, Marics et al. 2017, Denner et al. 2017). Kiindulva abból, hogy adriamycin kezelést követően a kismértékben csökkent TRPV1 receptor mennyiség is a kontrollhoz viszonyítottan kétszer annyi CGRP-t szabadított fel a capsaicin (első) applikációjának hatására, a TRPA1 receptorok számára hasonlóan maximális ingernek tekintett acrolein koncentráció viszont csak a kontrollal megegyező mértékű CGRP felszabadulást eredményezett, mértéktartó becslések alapján is legalább ugyanolyan mértékű csökkenése feltételezhető a funkcióképes TRPA1 receptoroknak, mint amit a TRPV1 receptorok esetében mértünk.

Denner AC, Vogler B, Messlinger K, De Col R: Role of transient receptor potential ankyrin 1 receptors in rodent models of meningeal nociception - Experiments in vitro. *Eur J Pain.* 2017 May;21(5):843-854. doi: 10.1002/ejp.986.

Dux M, Rosta J, Pintér S, Sántha P, Jancsó G: Loss of capsaicin-induced meningeal neurogenic sensory vasodilatation in diabetic rats. *Neuroscience.* 2007 Nov 30;150(1):194-201. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.001

Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, Noguchi K: Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol.* 2005 Dec 26;493(4):596-606. doi: 10.1002/cne.20794.

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 May;37(6):581-591. doi: 10.1177/0333102416654883.

Salas MM, Hargreaves KM, Akopian AN: TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. Eur J Neurosci. 2009 Apr;29(8):1568-78. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06702.x.

Végül szeretném még egyszer megköszönni Bíró Tamás Professzor Úrnak értékes kérdéseit és megjegyzéseit, valamint azt, hogy értekezésem nyilvános vitára bocsátását támogatta. Tisztelettel kérem a bírálói kérdésekre adott válaszaim elfogadását.

Szeged, 2020. 04. 27.

A handwritten signature in black ink, reading "Dr. Dux Mária". The script is cursive and elegant, with the first letters of "Dr.", "Dux", and "Mária" being capitalized and prominent.

Dr. Dux Mária