

**Válasz Dr. Tóth Attila egyetemi tanárnak, az MTA doktorának doktori értekezésem
opponensi bírálatára**

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

Általános kérdésekre adott válaszaim a következők:

1. A szakirodalom a szerzővel egyetértésben a kortikálisan terjedő idegi aktivitáscsökkenéssel (cortical spreading depression) hozza összefüggésbe a migrént. Ezt a szerző is nagyszerűen leírja, bemutatja. Azt is megalapozza, hogy ez a hipotézise (és a bemutatott irodalmi adatok) alapján a durális keringés megváltozásával (konkrétan vazodilatációval) függ össze. Erre valóban vannak irodalmi adatok is szép számmal. Ugyanakkor nekem hiányoztak a további, alternatív pathomechanizmusok bemutatása. Kérem, hogy röviden ismertesse, hogy ezeken kívül milyen mechanizmusokat feltételeztek az irodalomban!

Az 1990-es éveket megelőzően két elképzelés létezett a primer fejfájások patofiziológiai folyamatainak magyarázatára. Az ún. vaszkuláris teória, mely a migrént az agyburkok fokozott vérátáramlásának és a perivaszkuláris szenzoros idegek következményes stimulációjának tulajdonította, az 1940-es években éber pácienseken végzett nyitott koponya műtétek során tett megfigyelésekre vezethető vissza (Ray & Wolff 1940). A neurogén teória ezzel szemben a dura mater steril gyulladásos reakciója következtében aktiválódó trigeminális afferenseket tette elsődlegesen felelőssé a kialakuló tünetekért (Markowitz et al. 1987, Moskowitz 1993). Eredeti formájában egyik elképzelés sem bizonyult helytállónak, így napjainkban a két teória ötvöztetésével létrejött neurovaszkuláris teóriát tartjuk elfogadhatónak, bár a véráramlás változásokat egyértelműen a neuronális változások következményének tekintjük.

Jelenlegi felfogásunk szerint a migrén az agytörzs és a diencephalon diszfunkciójára vezethető vissza, ami zavart eredményez a szenzoros információ feldolgozásában (Charles 2013). Epidemiológiai vizsgálatok támasztják alá a genetikai predispozíciót (Tolner et al. 2015), bizonyos migrén típus esetében (familiális hemiplégiás migrén) pedig olyan géndefektusokat azonosítottak, melyek a trigeminális nociceptív folyamatokat módosítják.

A migrén típusától függően az aura, illetve a prodromális tünetek során aktiválódhatnak olyan agyterületek, melyek a migrénes roham következő, fejfájással járó szakaszában a trigeminovaskuláris rendszert stimulálják. Bár a migrénes rohamot bevezető tünetek között találunk olyanokat, melyek agytörzsi (nyakizmok fokozott tónusa) vagy kérgi struktúrák (kóros érzékenység fény, hang és szagingerekre), illetve a limbikus rendszer működéséhez

(levertség) köthetőek, patofiziológiai szempontból ezeknél valószínűleg jóval fontosabb tényező egyes hypothalamikus működések aktiválódása (fokozott étvágy). A migrénesek ugyanis extrém módon érzékenyek a hypothalamus homeosztatisz funkcióit érintő változásokra. A hypothalamus működése a meningeális erekben a paraszimpatikus aktiválódás (vazodilatáció) javára változtatja meg a szimpatikus/paraszimpatikus hatások egyensúlyát (Burstein and Jakubowski, 2005), ami a meningeális véráramlás fokozódását és különböző proinflammatorikus anyagok lokális felszabadulását eredményezi, melyek a trigeminális afferensek aktiválódását válthatják ki. Az aurával társuló migrén esetében a CSD feltehetően közvetlenül vezet a meningeális szövetekben a proinflammatorikus anyagok, illetve a hidrogén ionok koncentrációjának megemelkedéséhez, ami a trigeminális nociceptorok aktiválódását eredményezi (Goadsby 2001).

A migrén patofiziológiájában fontos szerepet tulajdonítunk a trigeminális nociceptorok megváltozott környezetére visszavezethető, a nociceptorok fokozott érzékenységet eredményező ún. perifériás szenzitizációnak. A nociceptorok fokozott működése érzékenyítheti a centrális helyzetű (agytörzsi, illetve thalamikus) neuronokat is (centrális szenzitizáció), amit jól mutat a neuronok spontán aktivitásának fokozódása, receptív mezejük kiterjedése és az a tény, hogy egyébként nem fájdalmas mechanikai és hőingerekre is reagálnak (Burstein et al. 2010).

Burstein R, Jakubowski M: Unitary hypothesis for multiple triggers of the pain and strain of migraine. J Comp Neurol. 2005 Dec 5; 493(1):9-14.

Burstein R, Jakubowski M, Garcia-Nicas E, Kainz V, Bajwa Z, Hargreaves R, Becerra L, Borsook D: Thalamic sensitization transforms localized pain into widespread allodynia. Ann Neurol. 2010 Jul; 68(1):81-91.

Charles A: Migraine: a brain state. Curr Opin Neurol. 2013 Jun; 26(3):235-9.

Goadsby PJ: Migraine, aura, and cortical spreading depression: why are we still talking about it? Ann Neurol. 2001 Jan; 49(1):4-6.

Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA: Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. J Neurosci. 1987 Dec; 7(12):4129-36.

Moskowitz MA: Neurogenic inflammation in the pathophysiology and treatment of migraine. Neurology. 1993 Jun;43(6 Suppl 3):S16-20.

Ray BS, Wolff HG: Experimental studies on headache. Pain sensitive structures of the head and their significance in headache. Arch Surg 1940;41: 813–856.

Tolner EA, Houben T, Terwindt GM, de Vries B, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM: From migraine genes to mechanisms. Pain. 2015 Apr; 156 Suppl 1():S64-74.

2. A fenti kérdés kapcsán érdemes kiemelni, hogy habár a műben elejétől a végéig következetesen a migrén potenciális pathomechanizmusáról értekezik, ezt az élettani jelenséget egyetlen kísérletben sem vizsgálták közvetlenül. A kérdés ennek kapcsán, hogy a migrén vizsgálatára milyen modellek lehetnek alkalmasak? A disszertációban bemutatott

kísérleti rendszerben lehet-e EEG-t regisztrálni? Ilyen szempontból milyen határozottsággal lehet a műben szereplő véreloszlás/vérellátás különbségeit összefüggésbe hozni a migrénnel?

A migrén patofiziológiai folyamatait különböző állatkísérletes modelleken vizsgálhatjuk. Mivel a migrén mai felfogásunk szerint komplex neurovaszkuláris megbetegedés, egyetlen kísérletes megközelítés sem tekinthető a migrén teljesértékű modelljének. Az ember és a rágcsálók trigeminovaszkuláris rendszere között fennálló anatómiai és funkcionális hasonlóságoknak köszönhetően azonban a trigeminovaszkuláris rendszer működésére vonatkozó, állatkísérletekből nyert információk megbízhatóan adaptálhatók emberre.

In vitro körülmények között tanulmányozhatók a trigeminális neuronokból készült sejtkultúrák. A módszer a dura mater felől retrográd pályakövetési eljárással kombinálva alkalmas a meningeális szövetet innerváló neuronok szelektív vizsgálatára is. Elektrofiziológiai és calcium imaging módszerekkel vizsgálható a neuronok különböző kémiai stimulusokra bekövetkező aktivációja, illetve a migrén terápiás szerek ezen reakciókra kifejtett moduláló hatása.

Rágcsálók *ex vivo* dura mater preparátuma – melyet mi is számos alkalommal vizsgáltunk – a trigeminális afferensek reakcióinak tanulmányozását eredeti szövetkörnyezetükben teszi lehetővé. Ez a modell alkalmas az elektromos vagy kémiai stimulusok hatására az afferensekből, vagy a dura hízósejtjeiből felszabaduló mediátorok mennyiségi meghatározására is (Harriott et al. 2019).

Az *in vivo* altatott állatokon végzett kísérletek egy része az agytörzsi nucleus tractus spinalis nervi trigemini neuronjainak elektrofiziológiai vizsgálatára fókuszál, amit a trigeminális afferensek elektromos (Olesen et al. 2009., Munro et al. 2017) vagy kémiai ingerlése (Oshinsky & Gomomchareonsiri 2007) befolyásol. Lézer Doppler áramlásméréssel, vagy az érátmérő videomikroszkóppal történő meghatározásával vizsgálható a stimulusok hatására felszabaduló vazoaktív anyagok meningeális véráramlásra gyakorolt hatása is. Az ún. nyitott koponyaablak módszere a stimulusok közvetlen topikális applikációját teszi lehetővé a dura materen, zárt koponyaablak mellett a szisztémásan adott, fejfájást provokáló anyagok (pl. nitroglicerín, Bates 2010) hatása tanulmányozható. A modell alkalmas a stimulusokat követő neuronális aktivációra utaló c-Fos vagy foszforilált ERK immunhisztokémiai kimutatására is az agytörzsi neuronokban (Hoskin et al. 1999, Martins-Oliveira et al. 2017).

In vivo éber állatokban a periorbitális bőrterületek nociceptív ingerküszöbe meghatározható von Frey vagy Ugo Basile berendezéssel pronociceptív vagy antinociceptív hatású anyagok adását követően is (De Logu et al. 2019).

Bizonyos, igazoltan génmutáció következtében fellépő migrén típusok vizsgálatára genetikailag módosított állatok is rendelkezésre állnak. A familiáris hemiplegiás migrén hátterében korábban különböző génmutációkat igazoltak (CACNA1A (FHM1), ATP1A2 (FHM2) és SCNA1A (FHM3)) melyek olyan ioncsatornákat és transzportereket érintenek, melyeknek szerepe van a szenzoros információ továbbításában (feszültség függő Na^+ és Ca^{++}

csatornákat, illetve a Na-K-ATPáz alegységeit érintették). Ennek vizsgálatára genetikai modelleket hoztak létre egérben, a humán mutáns gén beillesztésével (knock-in modell). Ezeknél az állatoknál a migrénes betegekhez hasonlóan megváltozott CGRP expressziót, fokozott fájdalomérékenységet és fotofóbiát is igazoltak (van den Maagdenberg et al. 2004, Mathew et al. 2011, Chen et al. 2016).

Patkányban *in vivo* kísérletekben lehetséges az EEG regisztrálása. Az eredmények interpretációja azonban nehéz volna, mivel emberben sem támaszkodhatunk a migrén diagnózisának felállításában az EEG-ben megfigyelhető változásokra (Marucco et al. 2019). Bár rohammentes időszakban az alfa ritmus fokozott variabilitását és asszimetriáját írták le (Hughes & Robbins 1990), gyerekeknél az aura fázis alatt az alfa-teljesítmény csökkenését és a parietooccipitális területen a delta-teljesítmény fokozódását találták (Cerquiglioni et al. 1994), az irodalom bizonytalan és sokszor egymásnak ellentmondó adatokat közöl erre vonatkozóan.

A kísérleteinkben mért véráramlás változások a trigeminális nociceptorok adott ingerre történő aktiválódásának indikátorai. A nociceptív afferensek ingerlését követő peptid felszabadulást - elsősorban a CGRP és SP felszabadulását - a nociceptív afferens-funkció megbízható indikátorának tekintik. A stimulált afferensek perifériás végződéseiből felszabaduló CGRP fokozza a meningeális véráramlást, a neuronok centrális nyúlványából felszabaduló transzmitterek pedig a nociceptív információ központi idegrendszer felé történő továbbításában játszanak szerepet. Jelenlegi ismereteink alapján a meningeális véráramlás fokozódást nem tekintjük a migrénes roham kiváltásáért felelős patofiziológiai tényezőnek. Feltételezéseink szerint a trigeminális afferensek aktiválódását kísérő vazodilatáció sokkal inkább szolgálhatja a gyors szöveti restitúciót, mivel adott esetben a gyulladásos mediátorok nociceptív végzések környezetéből történő gyorsabb eltávolítását teszi lehetővé.

Bates EA, Nikai T, Brennan KC, Fu YH, Charles AC, Basbaum AI, Ptáček LJ, Ahn AH: Sumatriptan alleviates nitroglycerin-induced mechanical and thermal allodynia in mice. *Cephalalgia*. 2010 Feb; 30(2):170-8.

Cerquiglioni A, Seri S, Sturniolo MG, Galletti F: Computerized electroencephalographic assessment of congenital brain infarction. *Childs Nerv Syst*. 1994 May;10(4):252-8. doi: 10.1007/BF00301164

Chen SP, Tolner EA, Eikermann-Haerter K: Animal models of monogenic migraine. *Cephalalgia*. 2016 Jun; 36(7):704-21.

De Logu F, Landini L, Janal MN, Li Puma S, De Cesaris F, Geppetti P, Nassini R: Migraine-provoking substances evoke periorbital allodynia in mice. *J Headache Pain*. 2019 Feb 14; 20(1):18.

Harriott AM, Strother LC, Vila-Pueyo M, Holland PR: Animal models of migraine and experimental techniques used to examine trigeminal sensory processing. *J Headache Pain*. 2019 Aug 29;20(1):91. doi: 10.1186/s10194-019-1043-7.

Hoskin KL, Bulmer DC, Goadsby PJ: Fos expression in the trigeminocervical complex of the cat after stimulation of the superior sagittal sinus is reduced by L-NAME. *Neurosci Lett*. 1999 May 14; 266(3):173-6.

Hughes JR, Robbins LD: Brain mapping in migraine. Clin Electroencephalogr. 1990 Jan;21(1):14-24. doi: 10.1177/155005949002100110.

Martins-Oliveira M, Akerman S, Holland PR, Hoffmann JR, Tavares I, Goadsby PJ: Neuroendocrine signaling modulates specific neural networks relevant to migraine. Neurobiol Dis. 2017 May; 101():16-26.

Marucco E, Lisicki M, Magis D: Electrophysiological Characteristics of the Migraine Brain: Current Knowledge and Perspectives. Curr Med Chem. 2019;26(34):6222-6235. doi: 10.2174/0929867325666180627130811.

Mathew R, Andreou AP, Chami L, Bergerot A, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Goadsby PJ: Immunohistochemical characterization of calcitonin gene-related peptide in the trigeminal system of the familial hemiplegic migraine 1 knock-in mouse. Cephalalgia. 2011 Oct; 31(13):1368-80.

Munro G, Jansen-Olesen I, Olesen J: Animal models of pain and migraine in drug discovery. Drug Discov Today. 2017 Jul; 22(7):1103-1111.

Olesen J, Burstein R, Ashina M, Tfelt-Hansen P: Origin of pain in migraine: evidence for peripheral sensitisation. Lancet Neurol. 2009 Jul; 8(7):679-90.

Oshinsky M.L., Gomomchareonsiri S: Episodic dural stimulation in awake rats: A model for recurrent headache. Headache. 2007;47:1026–1036. doi: 10.1111/j.1526-4610.2007.00871.x.

van den Maagdenberg AM, Pietrobon D, Pizzorusso T, Kaja S, Broos LA, Cesetti T, van de Ven RC, Tottene A, van der Kaa J, Plomp JJ, Frants RR, Ferrari MD: A Cacna1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. Neuron. 2004 Mar 4; 41(5):701-10.

3. A szerző a CGRP szinteket a migrén biomarkereként implikálja. Tudom, hogy erre érdemi bemutatást nyújt a műben, mégis fontosnak érzem, hogy itt, a válaszok kapcsán is foglalja össze, hogy ezt milyen emberi adatok támasztják alá!

A CGRP az elmúlt három évtizedben tett humán megfigyelések alapján vált a migrén patofiziológiai folyamatainak központi tényezőjévé. A CGRP szerepére vonatkozó első, úttörő jellegű megfigyelést 1990-ben tették; migrénes betegek vena jugularisának vérében migrénes roham ideje alatt emelkedett CGRP koncentrációkat mértek (Goadsby et al. 1990). Később emelkedett CGRP koncentrációt igazoltak szérum és nyál mintákban is mind spontán, mind NO-dal provokált migrénes roham idején (Ho et al. 2010, Tfelt-Hansen & Le 2009). Ezekben az esetekben a terápiásan alkalmazott triptánok nem csak a CGRP szintet csökkentették, hanem mérsékeltek a fájdalmat és egyéb klinikai tüneteket is. Emelkedett CGRP koncentrációt migrénes betegek szérumában a rohammentes időszakban is igazoltak mind epizodikus (Ashina et al. 2000), mind krónikus migrén esetében (Cernuda-Morollón et al. 2013).

A CGRP patofiziológiai szerepét támasztotta alá az a megfigyelés is, hogy CGRP intravénás injekciójával fejfájás volt provokálható (Lassen et al. 2002, Hansen et al. 2010, Asghar et al. 2011). Bár migrénes betegekben CGRP infúziója jellegzetes migrénes rohamot provokált, nem-migrénesekben csak átmeneti fájdalom vagy diszkomfort jelentkezett (Petersen et al. 2005, Hansen et al. 2010), ami a migrénesek fokozott CGRP iránti érzékenységre utalt.

A peptid hatásának klinikai jelentőségét igazolja az a tény is, hogy az elmúlt néhány évtizedben a migrén terápiájába bevezetett, rohamokat enyhítő vagy preventív céllal adható készítmények valamennyien a CGRP felszabadulását, illetve a CGRP hatását mérséklék. A trigeminális afferensekből történő CGRP felszabadulást mérséklék a triptánok, a CGRP hatását gátolják a jelenleg klinikai kipróbálás alatt álló nem peptid természetű CGRP receptor antagonisták „gepant”-ok és a mindössze két éve forgalomban lévő CGRP ellenes és CGRP receptor ellenes monoklonális antitestek is (de Vries et al. 2020).

Asghar MS, Hansen AE, Amin FM, van der Geest RJ, Koning P, Larsson HB, Olesen J, Ashina M: Evidence for a vascular factor in migraine. *Ann. Neurol.* 2011; 69:635–45.

Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Schifter S, Olesen J: Evidence for increased plasma levels of calcitonin gene-related peptide in migraine outside of attacks. *Pain.* 2000; 86:133–38.

Cernuda-Morollón E, Larrosa D, Ramón C, Vega J, Martínez-Camblor P, Pascual J: Interictal increase of CGRP levels in peripheral blood as a biomarker for chronic migraine. *Neurology.* 2013; 81:1191–96.

de Vries T, Villalón CM, MaassenVanDenBrink A: Pharmacological treatment of migraine: CGRP and 5-HT beyond the triptans. *Pharmacol Ther.* 2020 Mar 12:107528. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107528.

Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R: Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann. Neurol.* 1990; 28:183–87.

Hansen JM, Hauge AW, Olesen J, Ashina M: Calcitonin gene-related peptide triggers migrainelike attacks in patients with migraine with aura. *Cephalalgia.* 2010; 30:1179–86.

Ho TW, Edvinsson L, Goadsby PJ: CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. *Nat. Rev. Neurol.* 2010; 6:573–82.

Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J: CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia.* 2002; 22:54–61.

Petersen KA, Lassen LH, Birk S, Lesko L, Olesen J: BIBN4096BS antagonizes human α calcitonin gene related peptide--induced headache and extracerebral artery dilatation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2005; 77:202–13.

Tfelt-Hansen P, Le H: Calcitonin gene-related peptide in blood: Is it increased in the external jugular vein during migraine and cluster headache? A review. *J. Headache Pain.* 2009; 10:137–43.

Konkrét tárgyi kérdésekre adott válaszaim:

4. A durális kemoszenzorok tekintetében a mű a neurális kapszaicin (TRPV1) és a TRPA1 receptorokat nevezi meg. A kísérletekben is ezeket célozták a szerző és munkatársai. Ennek kapcsán a nagyobb koncentrációban alkalmazott kapszaicin (10 mikromól) vazokonstriktív hatásait a simaizomban lokalizálódó TRPV1 rovására írja (szerintem helyesen). Ugyanakkor az immunhisztokémiai elemzést bemutató 9. ábra bal oldali paneljén egy a nyomtatott képen nehezen megítélhető TRPV1 festődést látunk, melyen nem nyilvánvaló, hogy a durális erek simaizmában expresszálódik a TRPV1. Ennek mi lehet az oka? A TRPV1 festésére használt antitest specificitását hogyan ellenőrizték?

Ezekben a kísérletekben a dura mater kemoszenzitív tulajdonságú peptiderg afferenseinek jelenlétére és meningeális véráramlás szabályozásban betöltött szerepére vonatkozóan kívántunk adatokat nyújtani. Ennek megfelelően, a capsaicin nagyobb dózisainak applikációját követően mért véráramlás csökkenés - ha lehet így nevezni - számunkra inkább zavaró tényező volt, melyet közelebbről nem vizsgáltunk, de amelyet a neurogén vazodilatáció mértékének megítélésakor mindenképpen figyelembe kellett vennünk.

Az immunhisztokémiai festés során használt TRPV1 ellenes antitest az Alomone Laboratories, Israel terméke, a fehérje C-terminálisa ellen nyúlban termeltetett poliklonális antitest volt, melyet a gyártó dokumentációja alapján knockout állatok szövetmintáin validáltak. Korábban laboratóriumunkban az antitest megbízhatóan működött hátsó gyöki ganglion sejteken és a gerincvelőből készült kriosztát metszeteken. Az indirekt immunhisztokémiai festések specificitását azzal bizonyítottuk, hogy sem az antigénként alkalmazott peptiddel végzett preabszorpció, sem a primer antitest elhagyása után nem figyeltünk meg specifikus festődést.

5. A kapott véráramlási értékek (a műben általánosan) vajon a fiziológiás lehetőségek tükrében mekkora mértékűek? Más szavakkal megfogalmazva, az adott kísérleti elrendezés mellett mekkora mértékű lehet a maximális dilatáció és konstriktio mellett megfigyelhető hatás?

Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy patkányban a dura mater közvetlen elektromos ingerlése véráramlás fokozódást vált ki. Maximális véráramlásváltozás a 17,5 V, 10 Hz, 0,5 ms ingerlési paraméterekkel volt elérhető. Ezekkel az ingerlési paraméterekkel az egyes állatokban igen különböző, a bazális véráramláshoz viszonyítva 11-72 % közötti, átlagosan 44 ± 18 %-os véráramlásfokozódást lehetett regisztrálni, ami maximális mértékűnek tekinthető (Messlinger et al. 1995). Az elektromos ingerléssel elérhető maximális véráramlásfokozódással összemérhető véráramlásfokozódást kísérleteink során csak a NO donor DEANONOate magas, 1 mM koncentrációja mellett mértünk ($71,8 \pm 18$ %). Minden egyéb esetben (capsaicin 100 nM, NADA 100 nM, Angeli's salt 300 μ M, Na_2S 300 μ M, hisztamin 100 μ M, PAR2-agonista SLIGRL-NH₂ 100 μ M és CGRP 10 μ M topikális applikációját követően) 15-37 % közötti perfúzió növekedést mértünk, amit mindenképpen erőteljes, de többnyire a maximális dilatációs kapacitás alatti értéknek tekinthetünk.

A meningeális erek maximális vazokonstriktójának megítélése tekintetében nehezebb a helyzet. Az általunk 10 μ M capsaicin applikációját követően mért $18 \pm 2,3$ %-os véráramlás csökkenés megítélése kapcsán egy, a doktori dolgozatom benyújtását követően publikált eredményünkre hivatkoznék. Ezekben a kísérletekben az $\alpha 1$ -adrenerg receptor agonista fenilefrin különböző koncentrációinak topikális applikációjával váltottunk ki meningeális véráramlás változásokat. Az általunk legerőteljesebb véráramlás csökkenést kiváltó dózis 1 mM volt, amivel a korábban vizsgált, vazokonstriktor capsaicin koncentrációval azonos $18,1 \pm 3,8$ %-os véráramlás csökkenést mértünk (Dux et al. 2020). Ezekre az adatokra

támaszkodva tekinthetjük a 10 μ M-os capsaicin hatását maximális vazokonstrikciónak, annál is inkább, mert a kísérleti állatok capsaicin deszenzibilizációja (a CGRP felszabadulás-mediálta vazodilatáció kikapcsolása) nem fokozta a capsaicin véráramlás csökkentő hatását, szemben az alacsonyabb, 1 μ M-os capsaicin esetében mért deszenzibilizációt követő fokozódással.

Dux M, Babes A, Manchen J, Sertel-Nakajima J, Vogler B, Schramm J, Messlinger K: High-dose phenylephrine increases meningeal blood flow through TRPV1 receptor activation and release of calcitonin gene-related peptide. Eur J Pain. 2020 Feb;24(2):383-397. doi: 10.1002/ejp.1495.

Messlinger K, Hanesch U, Kurosawa M, Pawlak M, Schmidt RF: Calcitonin gene related peptide released from dural nerve fibers mediates increase of meningeal blood flow in the rat. Can J Physiol Pharmacol. 1995 Jul;73(7):1020-4. doi: 10.1139/y95-143.

6. A műben változatos kísérleti elrendezésekben vizsgálták például a CGRP koncentrációját. Ezen kísérletekben a kontroll állatokban némileg eltérő abszolút koncentrációkat láthatunk (akár kezeletlen, akár azonos kezelések mellett megemelkedő szintek). Ezen eltéréseknek van valami magyarázata (például az állatok kora, neme, altatás/anesztézia módja)?

CGRP felszabadulást Wistar és Sprague-Dawley patkányok ex vivo dura mater preparátumaiban mértünk. A kontroll állatokban mért bazális CGRP felszabadulás a különböző kísérletsorozatokban 13-35 pg/ml értékek között variált. Ennek a különbségnek a legvalószínűbb oka a patkány törzsek és a különböző forrásból származó állatok közötti eltérés, hiszen a különböző mérési sorozatokat 20 év leforgása alatt végeztük. A meghatározásra használt CGRP EIA-kitek közötti individuális érzékenységbeli különbségek is befolyásolhatták a mért értékeket. Valamennyi mérést hím állaton végeztük és bár az állatok dekapitálását követően beiktatott 30 perces előinkubáció minimálisra csökkentette az esélyét, mégsem zárható ki a két féle túlaltatásból (CO_2 belélegeztetés vagy tiopentálnátrium i.p.) adódó esetleges különbség sem. Az állatok, illetve a CGRP kitek érzékenysége közötti különbségek módosító hatásának minimalizálása céljából számítottunk különböző stimulusok alkalmazását követően a legtöbb esetben az abszolút CGRP koncentrációk helyett a bazális CGRP felszabaduláshoz képest mért %-os eltérést.

7. Ugyanehhez kapcsolódik, hogy a mért CGRP koncentrációk széles tartományban változtak, ennek ellenére a vérellátottságban hasonló mértékű változások következtek be. Ennek mi lehet az oka?

A különböző kísérletsorozatokban mért CGRP koncentrációk valóban jóval szélesebb tartományban változtak, mint az azonos stimulus hatására létrejövő véráramlás változások. Bizonyos stimulusok esetében (pl. 100 nM capsaicin, 300 μ M Angeli's salt) a mért CGRP koncentrációk a bazális értékhez képest akár háromszoros értékre növekedtek, míg ugyanezekkel a stimulusokkal mindössze 15-25 % közötti véráramlás fokozódást mértünk. A jelenségnek különböző okai lehetnek. Általánosságban elmondható, hogy a CGRP

koncentrációk *ex vivo* dura mater preparátumban történő mérésekor a teljes koponyagödröt fedő meningeális szövet adott anyagra érzékeny összes afferensét stimuláljuk és a dura szövetéből az inkubációs folyadékba jutó teljes CGRP mennyiséget meg tudjuk határozni. Ezzel szemben az *in vivo* véráramlás mérések során a felszabaduló CGRP-nek csak a pontszerű lézer Doppler probe közelében felszabaduló és az általunk mért érszakasz CGRP receptorait elérő CGRP frakciójának hatását tudjuk mérni. Capsaicin applikáció hatására mért véráramlás változás megítélésakor a capsaicin direkt vaszkuláris vazokonstriktor hatása is befolyásolja a CGRP hatására bekövetkező perfúzió növekedést. Ezen túl bizonyos kísérletsorozatokban az érfal megváltozott reaktivitása is befolyásoló tényező lehet. Például adriamycin kezelést követően a fokozott CGRP felszabadulás ellenére sem mértünk elvárható mértékű véráramlás fokozódást, amit a vaszkuláris CGRP receptorok megváltozott funkciója magyarázhat.

8. Nekem sok kísérletsorozatban hiányzott az, hogy a CGRP specifikus hatások mértékét meghatározzák, és ezzel elkülönítsék a CGRP specifikus komponenseket az összes többi komponenstől a keringés tekintetében. Erre miért nem került sor? Léteznek kellő specificitású CGRP receptor/funkció gátló molekulák? Ezek alkalmazása milyen arányban képes a migrént csökkenteni?

Kísérleteink során, amikor egy-egy anyag (capsaicin, NADA, anandamid, acrolein, Angeli's salt, Na₂S, PAR2 agonista, illetve a NO donorok) meningeális afferensekből történő CGRP felszabadító képességét és az ennek következtében kialakuló véráramlás fokozódást vizsgáltuk, minden esetben megbizonyosodtunk azok CGRP receptor antagonistá CGRP₈₋₃₇ peptid jelenlétében mérhető hatásáról is. Azokban a kísérletekben tekintettünk el a CGRP receptor antagonistá befolyásoló hatásának tesztelésétől, amikor nem kontroll állatokban, hanem magas zsír és szénhidrát tartalmú tápon nevelt patkányokban, diabetes mellitusban szenvedő, vagy adriamycinnel kezelt állatokban határoztuk meg a korábban már tisztázott hatásmechanizmusú anyagok véráramlásra kifejtett hatásait. Bár valóban nem nyilatkozhatunk ilyen körülmények között arról, hogy egyéb, CGRP felszabadulástól független mechanizmus nem játszik-e szerepet a véráramlási reakciók módosításában, az *ex vivo* CGRP felszabadulás mérésre vonatkozó eredményeink minden esetben alátámasztják a peptiderg trigeminális afferensek érintettségét.

Kísérletes körülmények között a CGRP receptor antagonistá hatású CGRP₈₋₃₇ peptid fragmentum mellett nem peptid természetű antagonisták (BIBN4096BS, MK-0974, MK-8825) is alkalmazhatók. Ezek közül a BIBN4096BS Olcegepant, az MK-0974 Telcagepant néven jelenleg klinikai tesztelés alatt áll. Ezeknek a CGRP receptor antagonistáknak a humán terápiába történő bevezetését hepatotoxikus hatásuk hátráltatja (Holland & Goadsby 2018). A migrénes betegek terápiájában jelenleg alkalmazható CGRP felszabadulást gátló készítmények a triptánok (Sumatriptan, Zolmitriptan, Naratriptan, Rizatriptan stb.), melyek 5-HT_{1B/1D} receptor agonista hatásuknál fogva csökkentik az egyéb hatásokra a trigeminális

afferensekből felszabaduló CGRP mennyiségét. A triptánok a migrénes betegek kb. 60 %-ában hatásosan enyhítik a rohamokat (Cameron et al. 2015).

A krónikus migrén esetén (migrénes napok száma > 15 nap/hónap) preventív céllal adhatók a CGRP ellenes monoklonális antitestek (Eptinezuma, Fremanezumab, Galcanezumab) valamint a CGRP receptor ellenes monoklonális antitest (Erenumab). Klinikai vizsgálatok alapján a monoklonális antitest terápia átlagosan 4-5 nappal csökkentheti egy hónapban a migrénes napok számát (Scuteri et al. 2019).

Cameron C, Kelly S, Hsieh SC, Murphy M, Chen L, Kotb A, Peterson J, Coyle D, Skidmore B, Gomes T, Clifford T, Wells G: Triptans in the Acute Treatment of Migraine: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. Headache. 2015 Jul-Aug;55 Suppl 4:221-35. doi: 10.1111/head.12601.

Holland PR, Goadsby PJ: Targeted CGRP Small Molecule Antagonists for Acute Migraine Therapy. Neurotherapeutics. 2018 Apr;15(2):304-312. doi: 10.1007/s13311-018-0617-4.

Scuteri D, Adornetto A, Rombolà L, Naturale MD, Morrone LA, Bagetta G, Tonin P, Corasaniti MT: New Trends in Migraine Pharmacology: Targeting Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) With Monoclonal Antibodies. Front Pharmacol. 2019 Apr 9;10:363. doi: 10.3389/fphar.2019.00363. eCollection 2019.

9. A műben bemutatott interpretáció egyik legnagyobb kérdése (amit az egyik fejezetben a szerző ki is bont részben) az, hogy a mért CGRP értékek közvetlenül okai-e a vérellátásban látott különbségeknek? Ebből a szempontból fontos kérdés, hogy a mért koncentrációk nagyságrendekkel elmaradnak az in vitro kísérletekben meghatározható CGRP érzékenységektől. Miért lehet az in vivo érzékenység nagyobb, illetve miért lehet a receptorok környezetében a CGRP koncentráció magasabb?

Izolált humán és patkány arteria meningeae media és arteria cerebri media érszakaszok *in vitro* körülmények között mért CGRP-indukálta vazodilatációjának EC₅₀ értékét 1 nM CGRP koncentrációban határozták meg (Edvinsson et al. 2007, Ohlsson et al. 2018). Kísérleteink során azok a stimulusok, melyek *in vivo* méréseink során meningeális véráramlást fokozó hatású CGRP felszabadulást indukáltak, *ex vivo* kísérleteinkben 60 pg/ml körüli CGRP felszabadulást váltottak ki (10 µM capsaicin 61 ± 11 pg/ml; 1 mM DEANONOate 59,2 ± 7 pg/ml; 300 µM Angeli's salt 77,3 ± 1,6 pg/ml). A kísérleteinkben mért CGRP koncentrációk valóban két nagyságrenddel elmaradnak az *in vitro* kísérletek során hatásosnak talált CGRP koncentrációktól. Figyelembe kell azonban venni, hogy az általunk mért CGRP koncentrációk csak a dura szövetén keresztül az inkubációs folyadékba kimosódó CGRP mennyiségét tudja mérni, ami a CGRP meglehetősen nagy (3789,4) molekula tömegét figyelembevéve erősen lecsökkenti a mérhető koncentrációkat. A meningeális szövetben, közvetlenül az erek közelében haladó trigeminális afferensekből felszabaduló CGRP lokális koncentrációja a vaszkuláris CGRP receptorok környezetében jóval magasabb érték, mint az azonos stimulációval *ex vivo* mérhető CGRP felszabadulás. Bár a CGRP tartalmú mintákat levételüket követően azonnal proteáz gátlót tartalmazó EIA pufferrel kevertük, az 5-10 perces inkubációs

idő alatt a CGRP esetlegesen bekövetkező enzimatis bontását sem zárhatjuk ki, mint a mért értékeket befolyásoló tényezőt.

Edvinsson L, Nilsson E, Jansen-Olesen I: Inhibitory effect of BIBN4096BS, CGRP(8-37), a CGRP antibody and an RNA-Spiegelmer on CGRP induced vasodilatation in the perfused and non-perfused rat middle cerebral artery. Br J Pharmacol. 2007 Mar;150(5):633-40. doi: 10.1038/sj.bjp.0707134.

Ohlsson L, Kronvall E, Stratton J, Edvinsson L: Fremanezumab blocks CGRP induced dilatation in human cerebral, middle meningeal and abdominal arteries. J Headache Pain. 2018 Aug 14;19(1):66. doi: 10.1186/s10194-018-0905-8.

10. A műben végig követhető az az alapvetés, hogy a migrén feltehetőleg a durális, CGRP magasabb fokú felszabadulásával összefüggésbe hozható vazodilatáció vezethet migrénhez. Ugyanakkor ez az adriamicin kezelés kapcsán nehezen értelmezhető. A kapott adatok alapján várható migrén adriamicin-kezelt betegekben?

Számos kísérletes megfigyelés igazolta az adriamicin primer szenzoros neuronokra kifejtett neurotoxikus hatását (Bigotte & Olsson, 1982; 1987). Arra vonatkozóan azonban nincsenek adatok, hogy az adriamicin kezelés a korábban is meglévő migrénes panaszokat rontaná, esetleg hozzájárulna a migrén kialakulásához. Kísérleti eredményeink sem támasztják alá ezt a feltételezést. Bár a nociceptorok stimulációja átmenetileg erőteljesebb CGRP felszabadulást váltott ki adriamicinnel kezelt állatokban, ez a hatás csak átmeneti volt, amit a neuronok válaszkészségének tartós csökkenése követett. Funkcionális szempontból (a CGRP felszabadulás által kiváltott vazodilatáció mérésével) pedig az átmeneti fokozott CGRP felszabadító képesség sem nyilvánult meg a CGRP által mediált hatások erőteljesebbé válásában; fokozott véráramlás változásokban. Kísérleteink során csak a vaszkuláris CGRP receptorokat érintő változásokat vizsgáltuk immunhisztokémiai festéssel. Amennyiben a vaszkuláris CGRP receptorok funkciójának csökkenésével azonos jellegű változás következik be a neuronális CGRP receptorokban is, a trigeminális nociceptorok centrális nyúlványából felszabaduló CGRP nociceptív információ továbbításban játszott szerep is károsodik. Ez pedig, a CGRP migrén patomechanizmusában játszott központi szerepét ismerve összességében inkább a migrénes roham keletkezésének gátlása irányába hat.

Bigotte, L., Olsson, Y: Retrograde transport of doxorubicin (adriamicin) in peripheral nerves of mice. Neurosci. Lett. 1982;32, 217–221.

Bigotte L, Olsson Y: Degeneration of trigeminal ganglion neurons caused by retrograde axonal transport of doxorubicin. Neurology. 1987 Jun;37(6):985-92. doi: 10.1212/wnl.37.6.985.

11. Kicsit visszalépve a dolgozatban, a KCl potenciális hatásait tekintve a simaizom depolarizációt követő feszültségfüggő Ca²⁺ csatorna nyitásából adódó vazokonstrikcióra nem emlékszem. Ennek alapja az, hogy az általam vizsgált csaknem minden ér esetében 50-100 mM KCl alkalmazása a simaizom depolarizáció miatt vazokonstrikciót okozott,

mindenféle egyéb sejt (neuronok, endothel sejtek) hozzájárulása nélkül. Ez miért nem szerepelt a lehetőségek között, annak magyarázatára, hogy a megemelekedő CGRP szintek ellenére kevésbé látható a vazodilatációs hatás?

Munkánkban a KCl vaszkuláris simaizomra kifejtett hatására létrejövő vazokonstrikció molekuláris mechanizmusát nem vizsgáltuk. A jelenséget mindössze a KCl által kiváltott jelentős CGRP felszabadulás ellenére elmaradó véráramlás fokozódás ellentmondásának feloldására, annak lehetséges magyarázataként említettük. Munkánkban ennek magyarázatára megemlítettük a depolarizáció következtében közvetlenül létrejövő vazokonstrikció lehetőségét. A jelenség hátterében természetesen minden, a KCl vaszkuláris simaizmot depolarizáló hatásának következtében létrejövő mechanizmus feltételezhető.

12. A proteáz aktivált receptor 2 stimulációja során bemutatásra került, hogy az a kapszaicin hatásait fokozza és önmagában nem kimutatható kapszaicin deszenzibilizált állatokban. Mitől specifikus ez a válasz a TRPV1-et expresszáló neuronokra? A deszenzibilizálást túlélő TRPA1 neuronok miért nem voltak képesek ezt a funkciót átvenni?

Kísérleteink során csak a PAR2 aktiváció trigeminális TRPV1 receptor funkcióra és következményes CGRP felszabadulásra kifejtett hatását vizsgáltuk. Így csak a TRPV1 receptort expresszáló neuronok peptiderg populációjáról tudunk véleményt mondani. A kísérleti állatok nagy dózisú szisztémás capsaicin kezelésével előidézett capsaicin deszenzibilizációja nem csak a TRPV1 receptorok működését függeszti fel, hanem kiváltja a receptort expresszáló neuronok szelektív degenerációját is. Elektronmikroszkópos vizsgálataink során már egy órával a capsaicin expozíció után degenerálódó velőtlen axonokat mutattunk ki a dura materben. Mivel rágcslók TRPA1 receptort expresszáló primer szenzoros neuronjainak 97 %-a expresszálja a TRPV1 receptort is (Story et al. 2003), valószínűleg a capsaicin deszenzibilizációt túlélő TRPA1 receptorral rendelkező neuronok hatása elenyésző, ami nem eredményez PAR2 aktivációt követően számottevő CGRP felszabadulást és mérhető nagyságú vazodilatációt.

Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A: ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. Cell. 2003 Mar 21;112(6):819-29. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00158-2.

13. A migrén potenciális mechanizmusai közül az elhízott egyéneknél mekkora jelentősége lehet a CGRP-től feltehetően független alvási apnoeak? A repetitív hipoxiás epizódok esetében mit lehet tudni a migrén gyakoriságáról és annak mechanizmusáról?

A reggelente ébredéskor jelentkező fejfájás gyakori kísérő tünete az alvási apnoeak (Loh et al. 1999). Epidemiológiai vizsgálatok igazolták az alvási apnoe és a primer fejfájások, ezen belül is elsősorban a migrén között fennálló kapcsolatot (Yin et al. 2019). Klinikai vizsgálatok igazolták azt is, hogy az alvási apnoeal diagnosztizáltak között jóval nagyobb valószínűséggel

alakul ki az évek folyamán migrén, mint az átlag populációban (Harnod et al. 2015). A hipoxiás epizódoknak kitett emberek körében majdnem négyszerese volt a migrén előfordulási gyakorisága, mint azoknál, akik ettől nem szenvedtek. Szembetűnő az is, hogy az elhízás, hiperlipidémia vagy a diabétesz mellitus az alvási apnoe és a migrén közös rizikófaktorai.

A hipoxia fejfájást indukáló hatása egyébként magaslati körülmények között (Burtscher et al., 2011) vagy repülőút során is megfigyelhető (Bui & Gazerani, 2017). Klinikai vizsgálatok igazolták, hogy a hipoxia jellegében a migrénes rohamra emlékeztető fejfájást provokál migréneseiben és olyan emberekben is, akiknek korábban nem volt migrénes roham (Schoonman et al., 2006, Broessner et al., 2016). Állatkísérletekben hipoxiás körülmények között a nucleus tractus spinalis nervi trigemini meningeális afferenciával rendelkező neuronjainak spontán aktivitásfokozódását figyelték meg. A hipoxiás periódusok alatt emelkedett a likvor CGRP koncentrációja, amit a dura materben és az agytörzs területén véráramlásfokozódás kísért (Waldmann & Messlinger, közlés alatt).

Broessner G, Rohregger J, Wille M, Lackner P, Ndayisaba J-P, Burtscher M: Hypoxia triggers high-altitude headache with migraine features: A prospective trial. Cephalalgia : an international journal of headache 2016;36:765–771.

Bui SBD, Gazerani P: Headache attributed to airplane travel: diagnosis, pathophysiology, and treatment - a systematic review. The journal of headache and pain 2017;18:84.

Burtscher M, Mairer K, Wille M, Broessner G: Risk factors for high-altitude headache in mountaineers. Cephalalgia: an international journal of headache 2011;31:706–711.

Harnod T, Wang YC, Kao CH: Association of Migraine and Sleep-Related Breathing Disorder: A Population-Based Cohort Study. Medicine (Baltimore). 2015 Sep;94(36):e1506. doi: 10.1097/MD.0000000000001506.

Loh NK, Dinner DS, Foldvary N, Skobieranda F, Yew WW: Do patients with obstructive sleep apnea wake up with headaches? Arch Intern Med. 1999 Aug 9-23; 159(15):1765-8.

Schoonman GG, Sándor PS, Agosti RM, Siccoli M, Bärtsch P, Ferrari MD, Baumgartner RW: Normobaric hypoxia and nitroglycerin as trigger factors for migraine. Cephalalgia : an international journal of headache 2006;26:816–819.

Yin JH, Chen SY, Lin CC, Sung YF, Chou CH, Chung CH, Chien WC, Yang FC, Tsai CK, Tsai CL, Lin GY, Lee JT: Increased risk of sleep apnoea among primary headache disorders: a nationwide population-based longitudinal study. Postgrad Med J. 2019 Feb;95(1120):72-77. doi: 10.1136/postgradmedj-2018-136220.

Waldmann D, Messlinger K: Transient Activation of spinal trigeminal neurons in a rat model of hypoxia-induced headache. (közlés alatt)

14. A TRPV1 mennyiségének meghatározására ELISA kísérleteket végeztek. Milyen volt ezen kísérletek megbízhatósága? Milyen kontrollokat alkalmaztak és a trigeminális rendszerben, illetve a durában a TRPV1 expresszió hogyan arányult a hátsógyöki ganglionokban mérhetőhöz képest?

A kísérlet során a TRPV1 receptor mennyiségi meghatározásakor az ELISA méréseknél a standardokat a szövet homogenizátumokéval azonos összetételű folyadékban hígítottuk, a kontroll és adriamycinnel kezelt állatok esetében pedig mindössze az azonos körülmények között nyert szövetminták TRPV1 fehérje tartalma között mérhető különbség megállapítására szorítkoztunk.

A hátsógyöki ganglionok TRPV1 expressziójával kapcsolatban irodalmi adatokra támaszkodhatunk. Bár ezek az eredmények nem feltétlenül reflektálják a funkcionális receptor fehérje abszolút mennyiségét, rágsálók trigeminális és hátsó gyöki ganglionjaiban a TRPV1 mRNS meghatározásával jelentős eltérések voltak kimutathatók az egyes ganglionok tekintetében. A trigeminális ganglion TRPV1 mRNS tartalma közel tízszerese volt a hátsó gyöki ganglionok mRNS tartalmának, csupán az L6 és S1 szegmentumok esetében mértek a trigeminális ganglionokéhoz hasonló mértékű expressziót (Vandewauw et al. 2013).

Vandewauw I, Owsianik G, Voets T: Systematic and quantitative mRNA expression analysis of TRP channel genes at the single trigeminal and dorsal root ganglion level in mouse. BMC Neurosci. 2013 Feb 14;14:21. doi: 10.1186/1471-2202-14-21.

15. Hogyan magyarázható, hogy a TRPV1 és TRPA1 receptorok hasonló stimulációja mellett a különböző modellekben megjelenő jelentősen eltérő CGRP szint változások ellenére a vérátáramlás hasonlóan emelkedett értékeit figyelték meg? A rendszer szaturálódik (mindegy mennyi CGRP van jelen, úgyis csak ugyanakkora vazodilatáció jelenik meg), vagy egyéb mechanizmusokat (is) feltételezhetünk?

A jelenséggel kapcsolatban két mechanizmus valószínűsíthető. Ismert, hogy a dura mater elektromos ingerléssel kiváltható maximális vazodilatációja nem haladja meg a 70 %-os véráramlás fokozódást. Kémiai stimulusok hatására ennél nagyobb mértékű véráramlás fokozódást mi sem mérünk egyetlen kísérletsorozatunkban sem. Ilyen mértékű véráramlás fokozódás mellett a rendszer valószínűleg eléri vazodilatációs kapacitásának felső határát. A másik lehetséges mechanizmus abban keresendő, hogy míg *ex vivo* dura mater preparátumokban a kémiai stimulusokkal a teljes dura felszín stimuláljuk és valamennyi peptiderg rostból fel tudjuk szabadítani és a mintákban meg tudjuk mérni a CGRP mennyiségét, addig *in vivo* véráramlás mérések során csupán a pontszerű lézer Doppler érzékelő közvetlen közelében felszabaduló és az általunk regisztrált ér CGRP receptoraihoz diffundáló CGRP hatására bekövetkező véráramlás fokozódást tudjuk mérni.

16. Egy általános kérdés: a durális keringés Doppler-vizsgálata kapcsán történt időkontroll felvétele? A durális keringést érintette-e a kísérlet időtartama? Más szavakkal, a keringés változásához mennyiben járulhatott hozzá az altatás/anesztézia időtartama?

Lézer Doppler véráramlás mérés során az izofluránnal altatott és lélegeztetett állatokon a kilégzett CO₂ kontrollja mellett 4-5 órán keresztül stabil értéken lehetett tartani a bazális

véráramlást. Azokban a kísérletekben, ahol az állatok spontán lélegeztek, ennyi idő alatt kismértékű, de folyamatos véráramlás fokozódást mértünk, ami az 5. óra végére elérte a kiindulási érték 15-20 %-át. Az ebből származó esetleges tévedések minimalizálása érdekében ezek a kísérletek 2-3 óra időtartamúak voltak. Ez alatt az idő alatt a bazális véráramlás változása még nem volt szignifikáns mértékű, a stimulált véráramlás értékek meghatározásakor pedig a bazális véráramlás értékeket alapul véve mindig relatív változásokat határoztunk meg.

17. Végül, ismét egy általános kérdés. A disszertációban a durális keringés széleskörű élettani jellemzése látható. Nekem ezen erek viselkedése unikálisnak tűnik. Semmiképpen sem emlékeztet az általam leginkább vizsgált vázizomerekre, de az artéria basilarisra sem. Mit lehet tudni ezen erek unikalitásának molekuláris okairól?

A dura mater érellátása több szempontból is különbözik az intrakraniális erek, illetve egyéb szervek érellátásától. Hisztológiai és funkcionális eltérések is megfigyelhetők. Patkányokban a dura mater külső, perioszteális rétegében haladó artériák arteriolákra, majd rövid, maximum 50 µm hosszú kapillárisokra ágaznak, melyek hosszú (akár 200 µm) venulákba szedődnek össze (Andres et al. 1987). A posztkapilláris venulák vére a nagyobb artéria ágakat kísérő vénákba, illetve a dura mater két lemeze között elhelyezkedő vénás szinuszokba kerül. A dura szinuszok és a koponyacsontok között is vannak vénás kapcsolatok, melyek immunkompetens sejtek csontvelőből a meningeális szövetekbe történő vándorását is lehetővé teszik (Herisson et al. 2018). A koponyacsontokat teljes egészében átszelő emissarium vénák az extrakraniális szövetek felől drenálják a vért a dura szinuszokba. A dura mater nyirokerekkel is rendelkezik. Az érfal endothel sejtjei között nincsenek tight junction jellegű szoros kapcsolatok, vagyis ezeket az ereket nem védi vér-agy gát, 43 kDa-nál kisebb molekulák számára az érfal átjárható (Balin et al. 1986).

A dura mater ereinek közelében rendkívül dús a vazoaktív mediátorokat is tartalmazó szenzoros és vegetatív innerváció. Az ereket a szimpatikus vazokonstriktor hatású efferensek mellett a ganglion sphenopalatinum-ból és a ganglion oticum-ból származó paraszimpatikus vazodilatátor hatású idegrostok is innerválják. A dura mater anyagcseréje alapvetően nem indokolja ezt a dús érhalózatot és finoman szabályozott perfúziót. Érdekes, jelenleg még a statisztikai kiértékelés szakaszában lévő megfigyelésünk az is, hogy a dura mater ereiben lézer Doppler áramlásmérővel mért perfúzió növekedés nem feltétlenül jár együtt az érátmérő növekedésével, amit videomikroszkóppal közvetlenül mérhetünk. Vazodilatátor hatású anyagok jelentős perfúzió fokozódást váltanak ki a dura mater ereiben a vörösvértestek áramlási sebességének fokozódása révén akkor is, ha ezzel párhuzamosan nem változik számottevően az érátmérő.

A meningeális és kortikális erek reakciói között fennálló különbségre utal az a megfigyelés is, hogy patkányokban a NO donor glicerín-trinitrát intraperitoneális injekcióját követően két-foton lézer scanning mikroszkópiával a kortikális arteriolák dilatációját figyelték meg,

ugyanakkor a meningeális arteriolák kontraháltak. Az arteriolák szintjén érvényesülő eltérő reakciók hátterében a meningeális és kortikális erek eltérő környezete is szerepet játszhat – míg a kortikális erek közelében az asztrociták, addig a meningeális erek közelében a hízósejtek, szenzoros és vegetatív idegrostok játszhatnak meghatározó szerepet (Pryazhnikov et al. 2014).

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. doi: 10.1007/BF00309843.

Balin BJ, Broadwell RD, Salzman M, el-Kalliny M: Avenues for entry of peripherally administered protein to the central nervous system in mouse, rat, and squirrel monkey. *J Comp Neurol*. 1986 Sep 8;251(2):260-80. doi: 10.1002/cne.902510209.

Herisson F, Frodermann V, Courties G, Rohde D, Sun Y, Vandoorne K, Wojtkiewicz GR, Masson GS, Vinegoni C, Kim J, Kim DE, Weissleder R, Swirski FK, Moskowitz MA, Nahrendorf M: Direct vascular channels connect skull bone marrow and the brain surface enabling myeloid cell migration. *Nat Neurosci*. 2018 Sep;21(9):1209-1217. doi: 10.1038/s41593-018-0213-2.

Pryazhnikov E, Kislin M, Tibeykina M, Toptunov D, Ptukha A, Shatillo A, Gröhn O, Giniatullin R, Khiroug L: Opposite reactivity of meningeal versus cortical microvessels to the nitric oxide donor glyceryl trinitrate evaluated in vivo with two-photon imaging. *PLoS One*. 2014 Feb 28;9(2):e89699. doi: 10.1371/journal.pone.0089699. eCollection 2014.

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

Szeged, 2020. 06. 07.



Dr. Dux Mária