MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

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

Dr. Dux Mária



Élettani Intézet Általános Orvostudományi Kar Szegedi Tudományegyetem

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	7
2.1. A dura mater anatómiája, vérellátása, beidegzése	9
2.2. A meningeális szöveteket innerváló kemoszenzitív neuron populáció	10
2.3. A tranziens receptor potenciál vanilloid 1 receptor	12
2.4. A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 receptor	15
2.5. A kalcitonin gén-rokon peptid	17
2.6. A kalcitonin gén-rokon peptid a trigeminovaszkuláris rendszerben	18
2.7. A kalcitonin gén-rokon peptid receptora és a peptid celluláris	
hatásmechanizmusa	20
3. CÉLKITŰZÉSEK	23
4. MÓDSZEREK	24
4.1. Kísérleti állatok	24
4.2. Kísérleti állatok előkezelése	25
4.3. Kísérleti állatok tápláltsági állapotának vizsgálata	26
4.4. Vérplazma biomarkerek vizsgálata: vércukor, inzulin, tumor nekrózis faktor α ,	
interleukin-1β és interleukin-6 koncentrációk meghatározása	26
4.5. Meningeális véráramlás mérés <i>in vivo</i> nyitott koponyaablak preparátumban	27
4.6. Kalcitonin gén-rokon peptid felszabadulás mérése ex vivo dura mater	
preparátumban	30
4.7. Plazma és likvor minták kalcitonin gén-rokon peptid tartalmának meghatározása	31
4.8. Hisztamin felszabadulás mérése <i>ex vivo</i> dura mater preparátumban	32
4.9. A ganglion trigeminale tranziens receptor potenciál vanilloid 1 fehérje	
tartalmának meghatározása enzyme-linked immunoassay módszerrel	33
4.10. A ganglion trigeminale tranziens receptor potencial ankyrin 1 feherje	
tartalmának meghatározása Western blot módszerrel	33
4.11. Mustarolajjal kiváltott plazmaextravazáció vizsgálata patkány lábhát börében	34
4.12. Meningealis afferensek extrakranialis kollateralisainak azonositasa neuronalis	_
palyakovetesi eljarassai	34
4.13. Dura mater szövetmintak elektronmikroszkopos vizsgalata	36
4.14. Infinitul insztokennia	30
4.13. Niciogen-monoxia, kenniarogen es nicioxii nuoreszcens nisztokennai	20
A 16. Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-diaforáz aktivitás hisztokémiai	39
	20
A 17 Felhasznált anvagok	39
4.17. Telilaszhait aliyagok	40
5 MENINGEÁLIS KEMOSZENZITÍV AFEFRENSEK ÉS EXTRAKRANIÁLIS	40
KOLLATERÁLISAIK MOREOLÓGIALAZONOSÍTÁSA ÉS ELINKCIONÁLIS IELLEMZÉSE	/ 1
5.1. Revezetés	41 //1
5.2. Alkalmazott módszerek	42
5.3. Eredmények	<u>4</u> 2
5.3.1. Capsaicin hatása a meningeális véráramlásra	 ∆२
5.3.2. A dura mater tranziens receptor potenciál vanilloid 1 receptort expresszáló	-3
kemoszenzitív afferenseinek morfológiai és funkcionális azonosítása	45

5.3.3. Endovanilloidok hatása a dura mater vaszkuláris reakcióira	48
5.3.4. Meningeális afferensek extrakraniális kollaterálisainak szerepe a	
trigeminovaszkuláris érreakciókban és a kalcitonin gén-rokon peptid	
felszabadulásában	52
5.4. Megbeszélés	57
6. NITROGÉN-MONOXID ÉS NITROXIL SZEREPE A MENINGEÁLIS VÉRÁRAMLÁS	_
SZABÁLYOZÁSBAN	60
6.1. Bevezetés	60
6.2. Alkalmazott módszerek	63
6.3. Eredmények	63
6.3.1. Nitrogén-monoxid hatása a meningeális perfúzióra és a kalcitonin gén-rokon	
peptid felszabadulására	63
6.3.2. Nitroxil hatása a meningeális perfúzióra és a kalcitonin gén-rokon peptid	
felszabadulására	64
6.3.3. Nitrogén-monoxid és kénhidrogén interakciója: az endogén nitroxil	
keletkezése	66
6.3.4. Nitrogén-monoxid, kénhidrogén és nitroxil termelő szöveti struktúrák	
azonosítása a dura materben	70
6.4. Megbeszélés	72
7. KEMOSZENZITÍV AFFERENSEK ÉS HÍZÓSEJTEK KÖZÖTTI INTERAKCIÓK A DURA	
MATERBEN	75
7.1. Bevezetés	75
7.2. Alkalmazott módszerek	78
7.3. Eredmények	78
7.3.1. Hisztamin szerepe a meningeális véráramlás szabályozásban	78
7.3.2. Proteáz aktivált receptor 2 szerepe a meningeális véráramlás szabályozásban	
és a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 receptorok szenzitizálásában	83
7.4. Megbeszélés	88
8. A TRIGEMINÁLIS NOCICEPTOROK AKTIVÁLÓDÁSÁT KÖVETŐ PERIFÉRIÁS ÉS	
CENTRÁLIS KALCITONIN GÉN-ROKON PEPTID FELSZABADULÁS VIZSGÁLATA	92
8.1. Bevezetés	92
8.2. Alkalmazott módszerek	94
8.3. Eredmények	95
8.3.1. A dura mater KCl stimulációjával kiváltott meningeális véráramlás	
változásokban szerepet játszó tényezők	95
8.3.2. A dura mater KCl stimulációjával kiváltott agytörzsi véráramlás változások	96
8.3.3. A dura mater KCl stimulációjának hatása a vér és a likvor kalcitonin gén-rokon	
peptid tartalmára	97
8.4. Megbeszélés	99
9. A KEMOSZENZITÍV MENINGEÁLIS AFFERENSEK MŰKÖDÉSÉBEN BEKÖVETKEZŐ	
VÁLTOZÁSOK PATOFIZIOLÓGIÁS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT	102
9.1. Bevezetés	102
9.2. Alkalmazott módszerek	105
9.3. Eredmények	105
9.3.1. Magas zsír és szénhidrát tartalmú diéta hatása az állatok metabolikus	
paramétereire	105
9.3.2. Elhízás hatása a bőr neurogén plazma extravazációjára	107

9.3.3. Elhízás hatása a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 receptorok által	
közvetített trigeminovaszkuláris reakciókra	108
9.3.4. Elhízás hatása a tranziens receptor potenciál ankyrin 1 receptorok által	
közvetített szenzoros neurogén vazodilatációra	109
9.3.5. Elhízás hatása a trigeminális nociceptorokból történő kalcitonin gén-rokon	
peptid felszabadulásra	110
9.3.6. A tranziens receptor potenciál vanilloid 1 és tranziens receptor potenciál	
ankyrin 1 receptorok expressziója kontroll és elhízott állatok trigeminális	
neuronjaiban	112
9.3.7. Diabetes mellitus hatása a trigeminovaszkuláris reakciókra és a dura mater	
nociceptorainak tranziens receptor potenciál vanilloid 1 expressziójára	113
9.3.8. Szisztémás adriamycin kezelés hatása a tranziens receptor potenciál vanilloid	
1 és tranziens receptor potenciál ankyrin 1 receptorok aktivációjával kiváltott	
meningeális véráramlás válaszokra	115
9.3.9. Szisztémás adriamycin kezelés hatása a kalcitonin gén-rokon peptid,	
hisztamin és acetilkolin applikációjával kiváltott meningeális véráramlás válaszokra.	117
9.3.10. Szisztémás adriamycin kezelés hatása a meningeális kalcitonin gén-rokon	
peptid felszabadulásra	117
9.3.11. Szisztémás adriamycin kezelés hatása a ganglion trigeminale tranziens	
receptor potenciál vanilloid 1 fehérje tartalmára, a dura mater kemoszenzitív	
peptiderg afferenseinek denzitására és a kalcitonin gén-rokon peptid receptort	
alkotó fehérjékre	119
9.4. Megbeszélés	120
10. A TRIGEMINOVASZKULARIS NOCISZENZOR KOMPLEX KONCEPCIOJA	125
11. AZ ERTEKEZES ALAPJAT KEPEZO KOZLEMENYEK	129
11.1. Eredeti közlemények fejezetek szerint	129
11.2. Osszetoglaló közlemények, könyvtejezetek a témából	130
12. KOSZONETNYILVANITAS	131
13. IRODALOMJEGYZEK	132

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AC: adenilát-cikláz

AM 251: 1-(2,4-diklórfenil)-5-(4-jódfenil)-4-metil-N-1-piperidinil-1H-pirazol-3-karboxamid Angeli's salt: nátrium-[trioxo-dinitrát] anti-ET1: endothelin1 ellenes ASIC: savérzékeny ioncsatorna (acid sensing ion channel) ATP: adenozin-trifoszfát **β-Arr:** β-arrestin BBB: vér-agy gát (blood-brain barrier) BDA: biotinilált dextrán amin **BK:** bradykinin CAM: kalmodulin CaMKII: Ca²⁺/kalmodulin-dependens protein kináz II cAMP: ciklikus adenozin-monofoszfát **CB:** kannabinoid **CBS:** cisztationin β-szintáz **CET:** cetirizin cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid CGRP₈₋₃₇: kalcitonin gén-rokon peptid 8-37 fragmentum **CIM:** cimetidin CLR: calcitonin receptor-like receptor **CNS:** központi idegrendszer **CREB:** cAMP response element-binding protein **CSD:** agykérgi kúszó depolarizáció (cortical spreading depression) CSE: cisztationin y-liáz Cy3: indokarbocianin DA: dura mater artéria DAB: 3,3'-diaminobenzidin DAF-FM: 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluoreszcein-diacetát **DAG:** diacilglicerol DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid DEANONOate: 2-(N,N-dietilamin)-diazenolát-2-oxid dietilammónium só DNS: dezoxiribonukleinsav DV: dura mater véna EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav EIA: enzyme-linked immunoassay eNOS: endotheliális nitrogén-monoxid szintáz ER: endoplazmás retikulum ERK: extracellular signal-regulated kinase FITC: fluoreszcein-izotiocianát **Gαβγ:** G-fehérje αβγ alegységek HA: hisztamin HC030031: 1,2,3,6-tetrahidro-1,3-dimetil-N-[4-(1-metiletil)fenil]-2,6-dioxo-7H-purin-7acetamid 5-HT: szerotonin (5-hidroxitriptamin)

IB4: Griffonia simplicifolia izolektin B4 **IL-1β:** interleukin-1β IL-6: interleukin-6 iNOS: indukálható nitrogén-monoxid szintáz IP3: inozitol triszfoszfát IP3-R: inozitol triszfoszfát receptor **IRMA:** immunoradiometrikus assay L-NAME: N_w-nitro-L-arginin metilészter hidroklorid **L-NMMA:** *N*_ω-metil L-arginin acetát MMA: arteria meningea media mRNS: messenger ribonukleinsav NADA: N-arachidonoil-dopamin NADP: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát NADPH-d: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-diaforáz NGF: idegnövekedési faktor (nerve growth factor) **NKA:** neurokinin A nNOS: neuronális nitrogén-monoxid szintáz NOC-12: N-etil-2-(1-etil-2-hidroxi-2-nitrozohidrazino)-etánamin NOS: nitrogén-monoxid szintáz OA: oxálsav amid ODQ: 1H-[1,2,4]oxadiazolil[4,3-a]kinoxalin-1-on PA: pia mater artéria PAR2: proteáz aktivált receptor 2 PBS: foszfát pufferes sóoldat (phosphate-buffered saline) PGE2: prosztaglandin E2 PIP2: foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát PKA: proteinkináz A PKC: proteinkináz C PKCE: protein kináz CE **PLCβ1:** foszfolipáz Cβ1 PU: perfúziós egység (perfusion unit) **RAMP1:** receptor activity-modifying protein 1 RCP: receptor component protein **RNS:** ribonukleinsav SEM: átlag standard hibája (standard error of mean) SIF: szintetikus intersticiális folyadék SLIGRL-NH₂: Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu-amid SNAP: S-nitrozo-N-acetil-D,L-penicillamin SP: P-anyag (substance P) SpVc: nucleus tractus spinalis nervi trigemini nucleus caudalis SpVi: nucleus tractus spinalis nervi trigemini nucleus interpolaris STN: nucleus tractus spinalis nervi trigemini TH: tirozin-hidroxiláz TH-ir: tirozin-hidroxiláz-immunreaktivitás **TNF** α : tumor nekrózis faktor α TRIM: 1-(2-trifluorometilfenil)imidazol TRP: tranziens receptor potenciál

TRPA1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1
TRPV1: tranziens receptor potenciál vanilloid 1
TrV: tractus spinalis nervi trigemini
WSP-1: 3'-metoxi-3-oxo-3H-spiro[izobenzofurán-1,9'-xanten]-6'-il 2-(piridin-2-ildiszulfanil)benzoát

2. BEVEZETÉS

A fájdalomérzés és fájdalomcsillapítás kutatása mind medicinális, mind társadalmi jelentőségének köszönhetően a neurobiológiai kutatások intenzíven művelt területe. Bár a fájdalom a leggyakoribb tünet, amivel a betegek orvoshoz fordulnak, a különböző megbetegedésekhez társuló, vagy önálló kórképként jelentkező "primer" fájdalom csillapítása napjainkban sem tekinthető megoldottnak. A speciális fájdalomformák közül a fejfájások a leggyakrabban előforduló fájdalmak közé tartoznak (Burch és mtsai., 2018). A migrén, mint primer fejfájás betegség a különböző felmérések szerint a nők 11,2-25 %-át, a férfiak 4-9,5 %-át érinti (Lipton és mtsai., 2001, 2003; Manzoni és mtsai., 2003; Rasmussen, 1999, 2001; Stewart és mtsai., 1992; Stovner és mtsai., 2007). Európában körülbelül 41 millió felnőtt ember él migrénnel (Andlin-Sobocki és mtsai., 2005). 1998-ban a Bánk és Márton által készített epidemiológiai felmérés Magyarországon a migrén egyéves prevalenciáját 9,6 %-nak találta (Bánk és Márton, 2000).

A migrénes rohamok megnehezítik, sok esetben lehetetlenné teszik a beteg számára a normális életvitelt, a munkából való kiesés pedig jelentős szociális és gazdasági terhet ró nemcsak az egyénre, hanem a társadalomra is. A migrén tünetei összetettek. Jellemzően egyoldali, lüktető, görcsös jellegű fejfájással jár, a rohamok 4-72 órán át tarthatnak, mely során a fájdalmat a fizikai aktivitás súlyosbítja. A fájdalomhoz sok esetben társul fokozott fény- és hangérzékenység, hányinger, hányás. Az esetek 30 %-ában a migrénes rohamot aura vezeti be. Az aura reverzibilis jellegű vizuális és/vagy szomatoszenzoros tünetekkel, motorosilletve beszédzavarral járhat, melyek kiváltásáért újabban az agykérgi kúszó depolarizációt (cortical spreading depression: CSD) teszik felelőssé (Charles és Baca, 2013; Headache Classification Committee, 2018).

Bár a migrén patogenezisét napjainkban sem ismerjük, a keletkezésére vonatkozó korábbi vaszkuláris és neurogén elképzelések közötti határokat feloldotta az utóbbi évtizedek modern funkcionális és morfológiai vizsgálatainak eredménye, ami a két elképzelés ötvözésével a neurovaszkuláris szemléletet alakította ki (Edvinsson és Uddman, 2005; Edvinsson és mtsai., 2012; Goadsby, 2005; Ho és mtsai., 2010a). A migrén patofiziológiáját érintő bizonytalanságok ellenére viszonylag korán felismerték a trigeminovaszkuláris rendszer nociceptorainak jelentős hányadában expresszálódó neuropeptid, a kalcitonin génrokon peptid (CGRP) központi szerepét ezekben a folyamatokban. Klinikai vizsgálatok során migrénes betegek vena jugularis-ának vérében migrénes roham alatt az érintett oldalon

emelkedett CGRP koncentrációkat mértek (Gallai és mtsai., 1995; Goadsby és Edvinsson, 1993; Goadsby és mtsai., 1990; Sarchielli és mtsai., 2000). Ez az emelkedés bizonyos esetekben a migrénes rohamok közötti időszakokban is megfigyelhető volt. CGRP intravénás infúziójával pedig arra hajlamos emberekben migrénes rohamot tudtak provokálni (Lassen és mtsai., 2002, 2008).

A CGRP migrén patofiziológiában betöltött központi szerepét kísérletes és klinikai megfigyelések mellett egyértelműen igazolja az a tény is, hogy az elmúlt három évtized során a migrén terápiájába bevezetett vagy fejlesztés alatt álló készítmények valamennyien a CGRP vagy a CGRP receptor blokkolása útján fejtik ki jótékony hatásukat. Ilyen módon hatnak az 1991 óta forgalomban lévő "triptán"-ok, a jelenleg klinikai kipróbálás alatt álló nem peptid természetű CGRP receptor blokkoló "gepant"-ok, illetve a krónikus migrén terápiájában ígéretes CGRP- illetve CGRP receptor ellenes monoklonális antitestek (Benemei és mtsai., 2017; Macone és Perloff, 2017; Yuan és mtsai., 2017). Bár ezek a készítmények jelentős előrelépést hoztak a migrén terápiájában, továbbra is igen keveset tudunk ezek hatásmechanizmusáról, illetve a migrén tüneteinek hátterében álló patofiziológiai folyamatokról. Pedig, mint minden kórállapot, így a fejfájások esetében is a betegség patomechanizmusának megismerése előfeltétele a racionális terápiás lehetőségek feltárásának.

Doktori értekezésemben ismertetendő kutatómunkám során a trigeminális nociceptorok fiziológiás és patofiziológiás körülmények között bekövetkező aktiválódását, a következményes CGRP felszabadulást és a CGRP által kiváltott funkcionális változásokat vizsgáltam állatkísérletekben. Vizsgálataimat a jelentős szenzoros innervációval rendelkező kemény agyhártya (dura mater encephali) nociceptív folyamataira összpontosítottam, mivel az itt kialakuló nociceptív reakciók a fejfájások keletkezése szempontjából napjainkban kulcsfontosságúnak tekintett ún. perifériás és centrális szenzitizáció folyamataiban egyaránt szerepet játszanak (Burstein, 2001). A migrén patofiziológiai folyamatainak megértése szempontjából fontos intrakraniális képletek szenzoros innervációja és az afferensek neuropeptid tartalma szempontjából igen hasonlóak az ember és a rágcsálók szövetei, így a kísérleti állatainkon (patkány, egér) tett megfigyeléseink a migrén patofiziológiája szempontjából is relevánsnak tekinthetők.

2.1. A dura mater anatómiája, vérellátása, beidegzése

A dura mater encephali az agyat borító agyburkok legkülső rétege, mely maga is két lemezből áll: a külső perioszteális rétegből, mely közvetlenül kapcsolódik a koponyacsontok csonthártyájához és erekben, idegekben gazdag struktúra, valamint a belső meningeális rétegből. A dura mater két lemeze között helyezkednek el a vénás szinuszok. A dura mater meningeális rétege szeptumot képez a nagyagy- (falx cerebri) és a kisagy féltekéi között (falx cerebelli), elválasztja a kisagyat és az agytörzset az agy okcipitális lebenyétől (tentorium cerebelli), valamint a hipofízist a koponyagödörtől (diaphragma sellae).

A dura mater vérellátását biztosító legfőbb artéria az arteria meningea media, mely az arteria maxillaris ága. Az artéria a foramen spinosum-on keresztül lép be a középső koponyagödörbe. Az elülső koponyagödör vérellátásában részt vesznek még az arteria meningea anterior, amely az arteria ethmoidalis anterior ága és az arteria ophthalmica meningeális ágai is. A hátsó koponyagödör területére az arteria meningea posterior (az arteria pharyngea ascendens ága), az arteria occipitalis és az arteria vertebralis meningeális ágai szállítanak vért (Szentágothai és Réthelyi, 2002).

Általánosan elfogadott tény, hogy az ember és a rágcsálók kemény agyhártyájának beidegzésében azonos elvek érvényesülnek. Elektronmikroszkópos vizsgálatok igen dús, döntően vékony velős Aδ- és velőtlen C-rostokból álló hálózatot igazoltak a dura mater encephali-ban (Andres és mtsai., 1987; Messlinger és mtsai., 1993). A döntően a nervus trigeminus ágai által biztosított szenzoros innerváció (O'Connor és van der Kooy, 1986) mellett jelentős a dura mater ganglion cervicale superius-ból származó szimpatikus beidegzése (Keller és mtsai., 1989). Emellett a dura mater a ganglion sphenopalatinum-ból és a ganglion oticum-ból paraszimpatikus posztganglionáris idegrostokat is kap (Bleys és mtsai., 1996). A szenzoros és vegetatív axonok vastag kötegeket alkotva kísérik az artériákat, de egyes idegrostok önállóan, a dura kötőszövetes állományában, az erektől távolabbi területeken is megfigyelhetőek.

A dura mater encephali szenzoros innervációjában a nervus trigeminus mindhárom ága, a nervus ophthalmicus (V1), a nervus maxillaris (V2) és a nervus mandibularis (V3) is részt vesz (McNaughton, 1938). A primer szenzoros neuronok sejttestei a koponyaalapon a ganglion trigeminale-ban (Gasser dúc) helyezkednek el, centrális nyúlványaik az agytörzsben szinaptizálnak a másodlagos neuronokkal; az extra- és intrakraniális szövetek nociceptorai és termoreceptorai a nucleus tractus spinalis nervi trigemini-ben, a nucleus caudalis területén.

A dura mater okcipitális területének érző beidegzését az első két gerincvelői szegmentum biztosítja (Keller és mtsai., 1985), melyek neuronjai a cervikális gerincvelőbe projiciálnak. Ultrastrukturális vizsgálatok igazolták, hogy a meningeális Aδ- és C-típusú afferensek döntő hányada szabadon végződik az innervált szövetben. Ruffini-szerű végződéseket magasabb rendű gerincesekben, emberi dura materben is azonosítottak, elsősorban azokon a területeken, ahol az agyi vénák a sinus sagittalis-ba ömlenek (Andres és mtsai., 1987). A dura mater szenzoros innervációjára és a fejfájások patofiziológiájában betöltött szerepére vonatkozó első, éber embereken végzett nyitott koponyaműtétek során tett megfigyelések Harold Wolff és Wilder Penfield nevéhez fűződnek (Feindel és mtsai., 1960; Ray és Wolff, 1940). Ezek az 1900-as évek közepéről származó, napjainkban már klasszikusnak számító megfigyelések igazolták, hogy míg az agyburkok különböző szenzoros stimulusokkal történő ingerlése által kiváltható egyetlen érzésféleség a fájdalom, mely lokalizációjában is megfelel a spontán jelentkező fejfájásoknak, addig maga az agy állományának és az agyi erek többségének ingerlése semmilyen érzetet nem vált ki.

2.2. A meningeális szöveteket innerváló kemoszenzitív neuron populáció

A kemoszenzitív vagy capsaicin szenzitív neuron populáció jelenlétét korábban számos szervben igazolták. A kemoszenzitív neuronok a hátsó gyöki ganglionokban és az agyidegek érző dúcaiban elhelyezkedő kis- és közepes méretű pszeudounipoláris neuronok, melyek vékony velős Aδ- vagy velőtlen C-típusú rostokkal rendelkeznek (Henrich és mtsai., 2015; Jancsó és mtsai., 1977, 1980, 1985a; Lynn, 1990; Nagy és mtsai., 1983; Scadding, 1980). A kemoszenzitív neuronok mind morfológiai-, mind neurokémiai- és funkcionális tulajdonságaik tekintetében sajátos populációját alkotják a primer szenzoros neuronoknak (Buck és Burks, 1986; Holzer, 1991; Jancsó, 1992; Jancsó és mtsai., 1977, 1987; Szolcsányi, 2004). A tranziens receptor potenciál (TRP) receptor családhoz tartozó receptorokat expresszálnak, jelentős hányaduk a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) vagy capsaicin receptort, illetve a tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) receptort (Benemei és mtsai., 2015; Bessac és Jordt, 2008; Caterina és mtsai., 1997; Guo és mtsai., 1999; Jancsó és mtsai., 2016; Szigeti és mtsai., 2012).

A TRP receptorok nem szelektív kation csatornák, melyek aktiválódása a Na⁺ mellett jelentős mennyiségű Ca²⁺ sejtbe jutását eredményezheti (Julius, 2013). A sejtbe áramló kationok felelősek a neuron depolarizációjáért, az idegingerület tovaterjedéséért és végső

dc 1628 19

soron a nociceptív információ továbbításáért. A Ca²⁺ beáramlás neuropeptidek felszabadulását váltja ki a peptiderg érző neuronokból. A TRP csatornák különféle nociceptív ingerek: endogén és exogén eredetű kémiai anyagok, a pH, a hőmérséklet és az ozmotikus viszonyok változásait szignalizáló receptorok. A TRP receptorok központi jelentőségre tettek szert a különböző szervek fiziológiás és patofiziológiás folyamatainak megértésében (Gees és mtsai., 2012; Nilius és Owsianik, 2011).

A kemoszenzitív neuronok jelentős hányada neuropeptideket, többek között CGRP-t, P-anyagot (substance P, SP), neurokinin A-t (NKA), szomatosztatint és hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet tartalmaz (Hökfelt és mtsai., 1980; Hou és mtsai., 2002; Jancsó és mtsai., 1981; Kestell és mtsai., 2015; Lundberg és mtsai., 1992; Zhang és mtsai., 1997). A peptiderg nociceptorok összetett funkcióval rendelkeznek; egyrészt afferens működésüknek megfelelően továbbítják a nociceptív információt a központi idegrendszer irányába, másrészt a perifériás végződéseikből neuropeptideket felszabadítva efferens funkciót is betöltenek. A perifériás végződésekből szabaddá váló peptidek az innervált szövetben lokális szabályozó szerepet látnak el; részben közvetlenül, részben szöveti hízósejtekből további vazoaktív mediátorokat felszabadítva simaizom relaxációt, vazodilatációt és érfal permeabilitás fokozódást eredményeznek (Buck és Burks, 1986; Holzer, 1991; Jancsó és mtsai., 1968, 1977, 1980; Maggi és Meli, 1988; Szallasi és Blumberg, 1996; Szolcsányi, 1988). Bár az így kialakuló steril szöveti neurogén gyulladásos reakció biológiai szerepének megítélése a különböző szervekben és szövetekben némileg eltérő, a fokozott szöveti véráramlás kétségkívül elősegíti a szöveti integritás megőrzését. A gyulladásos mediátorokat tartalmazó szövetben kialakuló neurogén gyulladásos reakció a fokozott véráramlás révén felgyorsítja a káros anyagok eltávolítását és segíti a szöveti restitúciót (Pintér és mtsai. 2002).

Kísérleti adatok arra utalnak, hogy az aktivált kemoszenzitív afferensek nem csak gyulladáskeltő hatású neuropeptideket, hanem a gyulladásos reakciót gátló hatású szomatosztatint is felszabadíthatnak, mely a keringésbe jutva szisztémás fájdalomcsillapító hatást fejthet ki (Helyes és mtsai., 2000; Lembeck és mtsai., 1982; Pintér és mtsai., 2006; Szolcsányi és mtsai., 1998).

A neurogén gyulladásos reakció két fő komponensének, a CGRP által kiváltott vazodilatációnak és a döntően a SP hatásának tulajdonított érfal permeabilitás fokozódás szerepének megítélése a migrén patogenezise szempontjából eltérő. Bár kísérletes körülmények között a trigeminális afferensek elektromos ingerlésével permeabilitás

fokozódás volt kiváltható a dura mater ereiben (Buzzi és mtsai., 1989), klinikai vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a neurogén plazma extravazáció gátlása neurokinin 1 receptor antagonistákkal sem a migrénes roham kialakulását, sem a roham során jelentkező fájdalom mértékét nem befolyásolta (Williamson és Hargreaves, 2001). Mindent összevetve a neurogén plazma extravazáció szerepe a migrén patomechanizmusában minden valószínűség szerint elhanyagolható, még akkor is, ha újabb megfigyelések migrénes aura kialakulását összefüggésbe hozták a meningeális erek fokozottan áteresztővé válásával (Rotstein és mtsai., 2012). A fejfájások patomechanizmusát vizsgáló kutatások során egyértelműen nagyobb figyelem fordult a kemoszenzitív nociceptorok aktiválódását kísérő CGRP felszabadulás és a következményes szenzoros neurogén vazodilatáció felé (Benemei és mtsai., 2009; Dux és mtsai., 2003; Edvinsson és Warfvinge, 2017).

2.3. A tranziens receptor potenciál vanilloid 1 receptor

Bár a capsaicin okozta csípős érzés kiváltásáért felelős receptor létezésének gondolata már jóval korábban felmerült (Szallasi és Blumberg, 1990; Szolcsányi és Jancsó-Gábor, 1975), a capsaicin receptort, - melyet először vanilloid receptor 1-nek neveztek el, majd később, szerkezetének pontos megismerését követően a TRP receptor családba soroltak be és TRPV1 receptornak neveztek el - 1997-ben Caterina és munkatársai klónozták (Caterina és mtsai., 1997).

A funkcionális TRPV1 receptor négy alegységből épül fel. Egy alegység hat transzmembrán doménnel rendelkezik, az 5. és 6. transzmembrán régió között egy rövid hidrofób pórust formáló szegmenttel, mely csatorna régióként működik **(1. ábra)**. A perifériás idegrendszerben a TRPV1 receptor döntően a kis- és közepes méretű hátsó gyökiés trigeminális nociceptív primer szenzoros neuronokban fejeződik ki (Caterina és mtsai., 1997; Huang és mtsai., 2012; Hwang és mtsai., 2005). Kimutatták többek között a bőrt (Tsukagoshi és mtsai., 2006), húgyhólyagot (Liu és mtsai., 2014), légutakat (De Logu és mtsai., 2016; Zhao és mtsai., 2016), a cochleát (Vass és mtsai., 2004), a tápcsatorna struktúráit (Holzer, 2011) és a szívet (Freichel és mtsai., 2017) innerváló primer nociceptor végződéseken. A TRPV1 receptort központi idegrendszeri struktúrákon is azonosították (pl. frontális kéreg, kisagy, limbikus rendszer, bazális ganglionok, agytörzs) (Cavanaugh és mtsai., 2011; Cristino és mtsai., 2006; Mezey és mtsai., 2000). A receptort nem csak neuronok expresszálják; vaszkuláris simaizomsejteken (Cavanaugh és mtsai., 2011; Kark és mtsai.,

2008; Sand és mtsai., 2015), az epidermisz keratinocitáin (Caterina és Pang, 2016), a húgyhólyag simaizom sejtjein és az urotheliumon (Lazzeri és mtsai., 2004), neutrofil granulocitákon (Köse és Nazıroğlu, 2015) és makrofágokon (Ninomiya és mtsai., 2017) is előfordul.

A TRPV1 receptort magas hőmérséklet (>43 °C), savas pH és különféle exogén és endogén eredetű anyagok aktiválhatják (Tominaga és Caterina, 2004; Tominaga és Tominaga, 2005). A receptor elsőként azonosított és egyben legtöbbet tanulmányozott archetipikus exogén agonistája a capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide), a paprika (Capsicum annuum) csípős anyaga (Jancsó és mtsai., 1968, 1987). Egy további természetben előforduló agonistája a receptornak a reziniferatoxin, a marokkói Euphorbia resinifera nedvéből nyert diterpén (Hergenhahn és mtsai., 1984; Szallasi és mtsai., 1999). A bors csípős anyaga a piperin és a gyömbérből kinyerhető zingeron, valamint az etanol szintén ismert aktivátorai a receptornak (Liu és Simon, 1996). Reaktív oxigén gyökök diszulfid hidak képzése révén módosíthatják a TRPV1 receptor szerkezetét és működését (Taylor-Clark, 2016). A TRPV1 receptor endogén agonistái között találunk különböző membrán lipid metabolitokat, mint az eikosanoidok és az endovanilloidok. Utóbbiakról ismert, hogy kannabinoid receptor agonista endokannabinoidokként is hatnak (Ahluwalia és mtsai., 2003; Di Marzo és mtsai., 2002; Zygmunt és mtsai., 1999). Az arachidonoil-etanolamid (anandamid) a TRPV1 receptor legrészletesebben tanulmányozott endogén ligandja, amely hatásos aktivátora a kannabinoid (CB) receptoroknak is. Az endovanilloid anandamidot és N-arachidonoildopamin-t (NADA) korábban hátsó gyöki ganglionokban mint természetes körülmények között is előforduló TRPV1 agonistákat mutatták ki (Dinis és mtsai., 2004; Khasabova és mtsai., 2013; van der Stelt és mtsai., 2005).

Hasonlóan más receptor fehérjékhez, a TRPV1 receptor is számos foszforilációs hellyel rendelkezik, ahol a proteinkináz C (PKC) (Bhave és mtsai., 2003; Premkumar és mtsai., 2004), a proteinkináz A (PKA) (De Petrocellis és mtsai., 2001; Rosenbaum és Simon, 2007) vagy a Ca²⁺/kalmodulin-dependens protein kináz II (CaMKII) (Zhang és mtsai., 2011b) szerkezeti módosítást hozhat létre, ami a receptor funkcióját is befolyásolja. Szöveti gyulladásos mediátorok mint a bradykinin, szerotonin és a prosztaglandinok, vagy az idegnövekedési faktor (nerve growth factor, NGF) a TRPV1 receptor szerkezetét foszforiláció révén módosítva fokozza a csatorna hő, protonok vagy kémiai anyagok iránti érzékenységét és a csatorna nyitásának valószínűségét (Jankowski és Koerber, 2010; Mizumura és Murase,

2015). A receptor fehérje defoszforilációja (pl. kalcineurin révén) ugyanakkor csökkenti a receptor válaszkészségét (Bevan és mtsai., 2014). A membrán foszfatidilinozitol-4,5biszfoszfát (PIP2) komponensei, illetve ezek foszfolipáz C általi hasítása szintén befolyásolja a TRPV1 ioncsatorna aktiválhatóságát (Rohacs, 2015).

A nociceptorok perifériás ingerek hatására létrejövő szenzitizációját a migrénes roham kialakulásában is jelentős patofiziológiai tényezőnek tekintjük (Burstein és mtsai., 2011; Dodick és Silberstein, 2006; Levy, 2012; Martins és mtsai., 2017; Tajti és Vécsei, 2009). A szenzitizálódott primer szenzoros neuron gyakrabban küld impulzusokat az agytörzs másodlagos neuronjai irányába (perifériás szenzitizáció). Ennek az állapotnak a tartós fennállása végső soron megváltoztathatja a másodlagos neuron érzékenységét is, ami így már a periféria felől érkező fokozott impulzusok hiányában is gyakrabban aktiválódik (centrális szenzitizáció).

Bár a capsaicin akutan a TRPV1 receptorok aktiválása révén égő fájdalomérzést vált ki a bőrön és a nyálkahártyákon, tartós- vagy ismételt alkalmazása a fájdalommal járó kórképek esetében fájdalom csillapító hatásúnak bizonyult. Jancsó Miklós szegedi farmakológus professzor kutatásai mutattak rá először, hogy a capsaicin ismételt alkalmazásával kísérleti állatokban az analgéziának egy sajátos formája váltható ki: az érző idegvégződések érzéketlenné válnak fájdalomkeltő kémiai ingerekkel szemben, ugyanakkor a mechanikai ingerekkel szembeni válaszkészségük megmarad (Jancsó és Jancsó, 1949; Jancsó és mtsai., 1967, 1968). Később állatkísérletes megfigyelések is igazolták, hogy a capsaicin ismételt vagy tartós applikációját követően a kemoszenzitív neuronok deszenzibilizálódnak, ami kezdetben csak a TRPV1 receptor funkcióvesztésében nyilvánul meg, nagyobb capsaicin dózisok azonban már a neuron teljes funkcióképtelenségét okozzák (Jancsó és mtsai., 1987; Nagy, 1982; Nagy és mtsai., 2004; Szallasi és mtsai., 1999; Szolcsányi, 1984). Alacsony capsaicin koncentrációk alkalmazásával, illetve rövidebb expozíciós időt követően a TRPV1 receptor funkcióvesztésének hátterében valószínűleg a receptor defoszforilációját eredményező intracelluláris folyamatok állnak (Novakova-Tousova és mtsai., 2007). Magasabb capsaicin koncentráció, vagy hosszabb expozíciós idő a neuronok génexpresszióját is megváltoztathatja, ami a nociceptív információ feldolgozásában szerepet játszó receptorok és transzmitterek szintézisét, illetve a receptorok membránba való kihelyeződését változtatja meg (Sanz-Salvador és mtsai., 2012). A nagy dózisú capsaicin hatására a sejtbe áramló Ca²⁺ a kemoszenzitív neuronok degeneratív folyamatait is kiválthatja, ami extrém

esetben a TRPV1 receptort expresszáló szenzoros neuronokban lizoszómák széteséséhez és proteázok aktiválódásához vezethet (Chard és mtsai., 1995, Jancsó és mtsai., 1977, 1978, 1985a, 1987; Király és mtsai., 1991; Marsh és mtsai., 1987; Olah és mtsai., 2001).



1. ábra. A TRPA1 és TRPV1 receptor monomerek szerkezete. TRPA1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1, **TRPV1**: tranziens receptor potenciál vanilloid 1, **PIP**₂: foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát, **TRP**: TRP box, **CAM**: kalmodulin, **ATP**: adenozin trifoszfát (Bessac és Jordt, 2008).

2.4. A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 receptor

A TRPA1 kation csatorna a tranziens receptor potenciál ankyrin receptor család emberben ismert egyetlen képviselője (Nilius és mtsai., 2005). A TRPA1 receptor jellegzetes szerkezeti eleme az N-terminális helyzetű nagyszámú ismétlődő ankyrin szekvencia **(1. ábra)**. Rágcsálókban a ganglion trigeminale neuronjainak kb. 8 %-a expresszálja a TRPA1 receptort, ugyanilyen arányban mutatható ki a TRPA1 receptor a dura matert innerváló trigeminális afferenseken is (Huang és mtsai., 2012). Humán trigeminális ganglionban a rágcsálókhoz hasonlóan a neuronoknak csupán egy kis populációja expresszálja a TRPA1 receptort (Flegel és mtsai., 2015). A TRPA1 pozitív sejtek szinte kizárólag kis- és közepes méretű neuronok, döntő többségük (97 %) peptiderg, CGRP-t, SP-t tartalmaz (Hajna és mtsai., 2016; Story és mtsai., 2003; Wang és mtsai., 2019). A TRPA1 csatorna aktivációja közvetíti a mustárolaj (allil-izotiocianát), a fokhagymában lévő allicin és a fahéjaldehid irritáló hatását (Nieto-Posadas és mtsai., 2011). Az akrolein, ami a dohányfüst és a járművek kipufogó gázának egyik komponense és más irritáló gázok (pl. a fejfájás fának nevezett Umbellularia californica

által a levegőbe juttatott umbellulon) belégzése a nociceptorok TRPA1 receptorainak aktiválása révén provokálhatnak migrénes fejfájást arra hajlamos emberekben (Benemei és mtsai., 2014; Nassini és mtsai., 2012; Silva-Néto és mtsai., 2014). Ezen irritánsok apnoét és könnyezést is okozhatnak a légutak és a nyálkahártyák kemoszenzitív nociceptorainak izgatása révén. A receptor endogén agonistája a szövetekben képződő hidrogén peroxid, illetve a lipid peroxidáció során termelődő 4-hidroxi-nonenal és az endogén eredetű akrolein is (Andersson és mtsai., 2008; Macpherson és mtsai., 2007a; Trevisani és mtsai., 2007). A kémiai irritánsok mellett a TRPA1 receptor a fájdalmas hideg (<17 °C) szenzoraként (Pan és mtsai., 2018), illetve a hallásban szerepet játszó szőrsejtek transzdukciós csatornájaként is működik (Corey és mtsai., 2004).

A TRPA1 receptor agonistái alapvetően két egymástól eltérő módon aktiválhatják a receptort. Az agonisták egy csoportja hasonlóan a capsaicin TRPV1 receptoron kifejtett aktiváló hatásához a receptor meghatározott szekvenciájával való átmeneti kapcsolódás útján fejti ki hatását, míg mások elektrofil ágensként a receptor fehérje cisztein komponenseinek tiol láncaival reagálva hoznak létre a receptor aktiválódását eredményező szerkezeti változást (Hinman és mtsai., 2006; Macpherson és mtsai., 2007b; Meents és mtsai., 2017). A TRPV1 receptorhoz hasonlóan, a receptor fehérje foszforilációja érzékenyíti a TRPA1 csatornát agonistáival szemben. Gyulladásos mediátorok (pl. bradykinin) foszfolipáz C vagy PKA aktiválása útján szenzitizálhatják a receptort (Gouin és mtsai., 2017; Wang és mtsai., 2008).

Hisztológiai és funkcionális vizsgálatok igazolták a TRPA1 és a TRPV1 receptor kolokalizációját rágcsálók spinális és trigeminális ganglion sejtjeiben. A TRPA1-immunreaktív neuronok 97 %-a expresszálja a TRPV1 receptort is (Jordt és mtsai., 2004; Salas és mtsai., 2009; Story és mtsai., 2003). Bár a két receptort aktiváló stimulusok eltérőek, együttes előfordulásuk a nociceptorokban lehetőséget biztosít a receptorok közötti interakcióra, ami megváltoztathatja a nociceptív neuron válaszkészségét is. A mustárolajjal kiváltott TRPA1 csatorna aktivációt pozitív módon befolyásolja a TRPV1 receptorok jelenléte (Salas és mtsai., 2009), ugyanakkor a TRPA1 receptor aktivációja segít helyreállítani a neuron TRPV1 receptorainak capsaicin iránti érzékenységét deszenzibilizált állapotban (Zhang és mtsai., 2011a). Funkcionális szempontból a két receptor között kialakuló interakciók a szövetek gyulladásos állapotában lehetnek különösen fontosak.

A perivaszkuláris helyzetű afferensek TRPA1 receptorainak aktivációja révén kiváltott CGRP felszabadulás és következményes vazodilatáció a kardiovaszkuláris rendszerben általánosan megfigyelt reakció (Aubdool és mtsai., 2016; Earley, 2012; Sullivan és mtsai., 2015). Patkányok cerebrális és cerebelláris rezisztencia artériáiban ezen felül endothel függő vazodilatációt is kimutattak (Earley és mtsai., 2009), ami az endothel-simaizom határon (ún. mioendotheliális junkció) expresszálódó TRPA1 receptorok aktiválódásának következménye. A két sejttípus ezen különleges kapcsolódási pontjain Ca²⁺-függő K⁺-csatornák (K_{Ca}3.1) és konnexin expresszióját mutatták ki (Haddock és mtsai., 2006; Sandow és mtsai., 2006). Az endotheliális TRPA1 receptorokon keresztül beáramló Ca²⁺ az endoplazmás retikulumból további Ca²⁺-felszabadulást indukál, ami a Ca²⁺-függő K⁺-csatornák nyitása révén hiperpolarizálja az endothelt. Az endothel hiperpolarizációja mioendotheliális gap junction útján terjed tovább a szomszédos simaizom sejtekre, ahol relaxációt vált ki.

2.5. A kalcitonin gén-rokon peptid

A CGRP-t először, mint a kalcitonin gén alternatív hasítási termékét azonosították (Amara és mtsai., 1982; Rosenfeld és mtsai., 1983). Míg a kalcitonin messenger ribonukleinsav (mRNS) a pajzsmirigyben, addig ez a később azonosított peptid - melyet CGRP-nek neveztek el - jellemzően neuronokban fordul elő (Rosenfeld és mtsai., 1984). A CGRP egyaránt kimutatható szenzoros-, motoros- és integratív funkcióval rendelkező idegrendszeri struktúrákban, valamint egyéb, nem neuronális eredetű sejtekben; endothelsejtekben, zsírsejtekben, keratinocitákban és fehérvérsejtekben (Cai és mtsai., 1993; Gupta és mtsai., 2007; Hou és mtsai., 2011; McGillis és mtsai., 1991).

A CGRP 37 aminosavból álló peptid. Emberben a CGRP két izoformája, az egymástól mindössze 3 aminosavban különböző αCGRP és βCGRP a 11. kromoszóma két külön génjének terméke (Steenbergh és mtsai., 1986; Wimalawansa és mtsai., 1990). Igen nagyfokú a hasonlóság az állatkísérletekben használt rágcsálók (patkány, egér) és a humán CGRP izoformák között is (Russell és mtsai., 2014). Az αCGRP és a βCGRP biológiai hatásuk tekintetében is nagyfokú hasonlóságot mutatnak (Morris és mtsai., 1984; Steenbergh és mtsai., 1986). Hagyományosan az αCGRP-t a perifériás és centrális idegrendszerben, a βCGRP-t az enterális idegrendszerben előforduló formának tekintik, bár újabb adatok az érrendszer egyes szakaszain a két forma együttes előfordulására utalnak (Brain és Grant, 2004; Mulderry és mtsai., 1985). A neuronokban a CGRP szintézisét követően nagy dense

core vezikulákban tárolódik, melyekből a neuron depolarizációját követően Ca²⁺-függő exocitózissal ürül.

2.6. A kalcitonin gén-rokon peptid a trigeminovaszkuláris rendszerben

Emberben a trigeminális ganglion neuronjainak jelentős populációja (49 %-a) tartalmaz CGRP-t, a neuronok egy kisebb hányadában SP-vel kolokalizáltan (Eftekhari és mtsai., 2010). Immunhisztokémiai festéssel humán és rágcsáló dura materben is jelentős számban mutathatók ki CGRP tartalmú axonok a vérellátást biztosító arteria meningea mediát kísérő idegrost kötegek formájában, a sinus sagittalis superior és a sinus transversus mentén, illetve az erektől távolabbi kötőszövetes területeken is (Keller és Marfurt, 1991; Strassman és mtsai., 2004). A dura materben a CGRP túlnyomóan a kemoszenzitív afferensekben fordul elő, a TRPV1 receptort expresszáló afferenseknek pedig 70 %-a tartalmaz CGRP-t is (Shimizu és mtsai., 2007). A dura materben előforduló valamennyi CGRPimmunreaktív axont szenzoros eredetűnek tekintjük; a nervus trigeminus, vagy a felső gerincvelői szegmentumok primer szenzoros neuronjainak nyúlványa. Humán szövetmintákban CGRP-immunreaktivitás nem mutatható ki a dura matert innerváló szimpatikus és paraszimpatikus ganglionokban (Csati és mtsai., 2012; Tajti és mtsai., 1999). CGRP tartalmú perivaszkuláris idegrostok szinte valamennyi szervben megfigyelhetőek, valamivel nagyobb gyakoriságban az artériák/arteriolák, mint a vénák falában (Edvinsson és mtsai., 2001; Yokomizo és mtsai., 2015).

A CGRP biológiai hatásainak vizsgálata során Brain és munkatársai tették azt az alapvető megfigyelést, miszerint a CGRP rendkívül potens vazodilatátor hatással rendelkezik, mind állatkísérletes modellekben, mind pedig humán vizsgálatokban (Brain és mtsai., 1985; Russell és mtsai., 2014). Viszonylag korán egyértelművé vált a perivaszkuláris axonokból felszabaduló CGRP keringésszabályozásban betöltött szerepe is. Edvinsson és munkatársai 1985-ben macskák intracerebrális artériáin végzett kísérletei igazolták a perivaszkuláris CGRP tartalmú afferensek jelenlétét az agyi erek közelében, valamint az ezekből felszabaduló CGRP vazodilatátor hatását (Edvinsson és mtsai., 1985). A CGRP nem csak cerebrális artériákban, hanem a migrén patomechanizmusa szempontjából kiemelt jelentőségű meningeális ereken (dura mater és pia mater artériái) is erős vazodilatátor hatású anyagnak bizonyult (Jansen-Olesen és mtsai., 1996).

A meningeális nociceptorok válaszkészségének fokozódása (szenzitizálódása) nem csak a specifikus nociceptor ioncsatornák (TRPV1, TRPA1) különböző vér- és szöveti eredetű faktorok (pl. prosztaglandinok, bradykinin) hatására bekövetkező receptor fehérje foszforiláció eredménye lehet. A migrén patogenezisében szerepet játszhatnak olyan mechanizmusok is, melyek a nociceptorok membránpotenciáljának megváltoztatása révén érzékenyítik a primer szenzoros neuront (Levy és mtsai., 2008; Zhang és mtsai., 2007).

A purinerg P2Y receptor és a nem szelektív ioncsatornaként működő P2X receptor jelentős számban expresszálódik a trigeminális afferenseken, részben a TRPV1 receptorokkal kolokalizáltan (Ichikawa és Sugimoto, 2004; Ruan és Burnstock, 2003). A dura mater felől retrográd módon jelölt trigeminális ganglion sejtek többsége (52 %) expresszálja vagy a P2X2 vagy a P2X3 receptort, esetleg mindkettőt (Staikopoulos és mtsai., 2007). Az adenozin-trifoszfát (ATP) és hasítási termékei a receptor típusától függően vagy Ca²⁺ beáramlása, vagy G-fehérje által közvetített módon módosíthatják a nociceptorok membránpotenciálját (Puchałowicz és mtsai., 2014). Bár a G-fehérjék által közvetített hatások a receptor típusától függően lehetnek pro- vagy antinociceptív hatások, patkány izolált dura materében az ATP P2Y receptorok aktiválása révén fokozta a protonok által kiváltott CGRP felszabadulást (Zimmermann és mtsai., 2002).

A dura mater afferenseinek egy része savérzékeny ioncsatornát (acid sensing ion channel, ASIC), döntően az ASIC3 típusú ioncsatornát expresszál, melyet az alacsony meningeális pH aktivál (Yan és mtsai., 2011). Az ASIC csatornák az epitheliális amiloridszenzitív Na⁺-csatornák családjába tartoznak (Wemmie és mtsai., 2006). A dura materben bekövetkező viszonylag kismértékű proton koncentrációváltozás is hatásos aktivátora az ASIC3 csatornának, amely afferens szignált generálva aktiválja a trigeminális nociceptív pályát. A dura mater pH-ját savas irányba tolhatja el a szöveti iszkémia, ami lehet a CSD következménye is. A CSD megváltoztatja a neuronok válaszkészségét és véráramlás változásokat is kivált, melyek jelenlegi ismereteink alapján a migrénes aura tüneteinek kiváltásáért felelős változások lehetnek (Bolay és mtsai., 2002; Lambert és Michalicek, 1994). A dura mater hízósejtjeinek degranulációja, ami a durában kialakuló neurogén gyulladás részjelensége, szintén savas metabolitokat szabadít fel, amelyek a szenzoros idegvégződéseket aktiválhatják (Pejler és mtsai., 2017).

Más mediátorok, mint például a szerotonin (5-hidroxitriptamin, 5-HT) prejunkcionális 5-HT_{1D} és 5-HT_{1F} receptorain hatva gátolja a primer szenzoros neuronokból történő

transzmitter felszabadulást (Amrutkar és mtsai., 2012; Buzzi és Moskowitz, 1991). A Gfehérje által közvetített reakció eredményeképpen gátlódik a nociceptorokból egyéb ingerek hatására bekövetkező neuropeptid felszabadulás (Burstein és Jakubowski, 2004; Levy és mtsai., 2004; Macone és Perloff, 2017). A szerotonin receptor agonista triptánok részben ezt a hatást kihasználva fejtik ki terápiás hatásukat migrénes betegekben. A trigeminális rendszerben elsősorban a maxilláris és mandibuláris ághoz tartozó neuronokban jelen lévő CB1 receptorok (Price és mtsai., 2003) endovanilloidokkal/endokannabinoidokkal való stimulációja különböző mechanizmusok révén szintén csökkenti a nociceptorok aktiválhatóságát. A CB1 receptorok stimulációja gátolja a sejt adenilát-cikláz aktivitását, gátolja a feszültség függő Ca²⁺-csatornákat és K⁺-áramot generál (Howlett és mtsai., 2010). Korábban kimutatták, hogy a trigeminális CB1 receptorok aktivációja gátolja a durában az elektromos ingerléssel kiváltott vazodilatációt (Akerman és mtsai., 2004) és a dura mater hőingerlésével kiváltott CGRP felszabadulást is (Fischer és Messlinger, 2007). A CB1 receptoroknak különleges szerepe lehet a nociceptorok TRPV1 receptorainak aktivációjával kiváltott CGRP felszabadulásban, mivel mindkét receptort ugyanazok az endogén ligandok aktiválják, mint pl. az anandamid és a NADA (Price és mtsai., 2004).

2.7. A kalcitonin gén-rokon peptid receptora és a peptid celluláris hatásmechanizmusa

A funkcionális CGRP receptor 3 fehérjéből áll. A calcitonin receptor-like receptor (CLR) 7 transzmembrán doménnel rendelkező fehérje, melyet kiegészít egy transzmembrán receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1). A RAMP1 felelős a CGRP specifikus kötéséért. A funkcionális CGRP receptor harmadik komponense egy intracelluláris fehérje, a receptor component protein (RCP), ami a receptort az intracelluláris szignalizációs úthoz kapcsolja Gfehérjén és adenilátciklázon keresztül (Evans és mtsai., 2000; Flühmann és mtsai., 1995; Messlinger, 2018; Muff és mtsai., 1998).

Humán és rágcsáló kemény agyhártyában a CLR és a RAMP1 kimutatható az artériák simaizomsejtjein, patkány dura mater mintákban azonosították még mononukleáris sejteken és Schwann sejteken is (Eftekhari és mtsai., 2013; Lennerz és mtsai., 2008). A trigeminális ganglionban a CGRP receptor neuronokban, valamint Schwann- és szatellita sejtekben volt kimutatható (Eftekhari és Edvinsson, 2010; Lennerz és mtsai., 2008). Bár a neuronoknak kb. harmada expresszálja mind a CRL, mind a RAMP1 receptor komponenseket, ezek kolokalizációja a CGRP peptiddel nagyon ritkán volt megfigyelhető (Eftekhari és mtsai., 2010;

Lennerz és mtsai., 2008). A primer szenzoros neuronok centrális végződéseinél, az agytörzsi nucleus tractus spinalis nervi trigemini felszínes lamináiban szintén kimutatható a CGRP receptorok jelenléte. Arra vonatkozóan, hogy az agytörzsi másodlagos neuronok tartalmaznak-e CGRP receptorokat, jelenleg egymásnak ellentmondó irodalmi adatok állnak rendelkezésre. A primer szenzoros neuronok által felszabadított CGRP ennek megfelelően vagy direkt módon aktiválhat agytörzsi másodlagos neuronokat, vagy a CGRP receptort expresszáló trigeminális afferensek receptorain hatva preszinaptikus hatásként modulálja az ezekből felszabadított glutamát mennyiségét és ezen keresztül a nociceptív transzmissziót (Bower és mtsai., 2016; Eftekhari és mtsai., 2016; Lennerz és mtsai., 2008).

Jelenlegi ismereteink szerint a CGRP a legerősebb hatású vazodilatátor anyag az intracerebrális keringésszabályozásban, aminek a hatása is viszonylag tartós. Hatáserőssége tízszerese a legerősebb hatású prosztaglandinoknak és sokszorosan meghaladja az acetilkolin vagy a SP vazodilatátor hatását (Brain és mtsai., 1985). Kísérletes körülmények között a CGRP véráramlásfokozó/vazodilatátor meningeális hatása jól mérhető lézer Doppler áramlásmérővel, vagy videomikroszkópos eljárással (Dux és mtsai., 2003; Fischer és mtsai., 2010; Gupta és mtsai., 2006; Kurosawa és mtsai., 1995). A meningeális nociceptorokból a perifériás szövetben szabaddá váló CGRP további hatása lehet a környező hízósejteken hatva azok degranulációja és belőlük további, a nociceptív transzmissziót vagy a lokális szöveti reakciókat befolyásoló mediátorok (pl. hisztamin, triptáz) felszabadítása (Ottosson és Edvinsson, 1997; Schwenger és mtsai., 2007). A perifériás nociceptor végződésekből felszabaduló CGRP közvetlen meningeális afferenseket stimuláló vagy szenzitizáló hatását eddig még nem sikerült bizonyítani, aminek oka lehet a CGRP receptorok hiánya a dura mater afferensein (Lennerz és mtsai., 2008).

A CGRP által kiváltott vazodilatációban valószínűleg több különböző intracelluláris mechanizmus aktiválódása is szerepet játszik. Korábbi vizsgálatok kimutattak mind endothelium függő, mind endothel funkciótól független mechanizmusokat (Brain és Grant, 2004). A szövetekben legjellemzőbb és ennek megfelelően a legtöbbet tanulmányozott az endothel-független vazodilatáció. A CGRP által kiváltott véráramlás fokozódás az intrakraniális erek esetében is döntően ciklikus adenozin-monofoszfát (cAMP) által mediált folyamat (Brain és Grant, 2004; Edvinsson és mtsai., 1985; Yoshimoto és mtsai., 1998). Ennek során a CGRP a vaszkuláris simaizom CGRP receptorain hatva fokozza a simaizomsejtek adenilát-cikláz aktivitását, ami fokozza a sejt cAMP termelését. Az ennek következtében

aktiválódó PKA foszforiláció révén ATP-függő K⁺-csatornákat nyit, a K⁺-kiáramlás pedig a sejt hiperpolarizációját és a simaizomsejtek következményes relaxációját okozza. Kísérleti állatok meningeális artériáiban a CGRP által kiváltott vazodilatáció jelentősen gátolható volt az ATPszenzitív K⁺-csatorna blokkoló glibenclamid szisztémás infúziójával (Gozalov és mtsai., 2005; Nelson és mtsai., 1990). A CGRP véráramlás fokozó hatásában valószínűleg más típusú K⁺csatornák aktivációja is szerepet játszik, pl. a Ca²⁺-függő K⁺-csatornák a pia mater arterioláinak dilatációjában (Hong és mtsai., 1996) **(2. ábra)**.



2. ábra. A CGRP receptor szerkezete és az általa közvetített hatás celluláris mechanizmusai. PKCε: proteinkináz Cε, DAG: diacilglicerol, PIP₂: foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát, PLCβ1 foszfolipáz Cβ1:, Gαβγ: G-fehérje αβγ alegységek, CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid, CLR: calcitonin receptor-like receptor, RAMP1: receptor activity-modifying protein 1, RCP: receptor component protein, β-Arr: β-arrestin, AC: adenilát-cikláz, PKA: proteinkináz A, NOS: nitrogén-monoxid szintáz, CREB: cAMP response element-binding protein, ERK: extracellular signal-regulated kinase, ER: endoplazmás retikulum, IP₃: inozitol triszfoszfát, IP₃-R: inozitol triszfoszfát receptor, anti-ET1: endothelin1 ellenes (Russell és mtsai., 2014).

A CGRP endothel függő vazodilatátor hatása az intrakraniális erek esetében nem egyértelmű. Bár humán cerebrális artériák endothel sejtjeiben valamennyi CGRP receptor komponens mRNS-e kimutatható, az endothel eltávolítása mégsem okoz változást a CGRP-indukálta vazodilatáció mértékében (Jansen-Olesen és mtsai., 2003). Kísérleti állatok egyes értípusaiban ezzel szemben az endotheliális CGRP receptor aktivációja fokozza a sejt nitrogén-monoxid (NO) termelését, ami a simaizomsejtekhez diffundálva aktiválja a

guanilátciklázt, ami ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) keletkezése révén vazodilatációt vált ki (Gray és Marshall, 1992). Kísérleti állatokban a CGRP által kiváltott meningeális véráramlás fokozódás valóban gátolható volt az endotheliális NO-szintáz gátlásával (Akerman és mtsai., 2002a). A dura mater elektromos stimulálásával kiváltott vazodilatáció, amely igazoltan a dura afferenseiből felszabaduló CGRP által kiváltott folyamat, szintén csökkenthető volt NO-szintáz gátló szisztémás vagy topikális alkalmazásával (Messlinger és mtsai., 2000).

A CGRP által a célsejtekben kiváltott hosszabb távú hatások hátterében elképzelhető egyes gének upregulációja is. Ezen mechanizmusoknak köszönhetően fokozta a CGRP a P2X3 receptor expresszióját trigeminális neuron tenyészetben (Fabbretti és mtsai., 2006; Simonetti és mtsai., 2008). *In vivo* körülmények között a génexpresszió változásokban valószínűleg közreműködnek a ganglion sejtek szatellita sejtjei is, melyekben CGRP hatására fokozódik az indukálható NO-szintáz aktivitása és ezen keresztül a NO termelődése (Li és mtsai., 2008), ami viszont a szomszédos neuronokban mitogén-aktivált protein kináz aktiválás révén fokozott CGRP termelődéshez vezet (Bellamy és mtsai., 2006; Russell és mtsai., 2014).

3. CÉLKITŰZÉSEK

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

Tekintettel arra, hogy a migrénes fejfájások kialakulása szorosan összefügg a dura mater érrendszerében létrejövő vaszkuláris folyamatokkal, megvizsgáltuk a kemoszenzitív afferenseken kifejeződő nociceptív ioncsatornák, a TRPV1 és a TRPA1 receptorok

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

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

4. MÓDSZEREK

Ebben a fejezetben a kísérletekben alkalmazott módszerek általános leírását ismertetem, az egyes kísérletsorozatokra vonatkozó részletes információk az adott fejezeteknél találhatók.

4.1. Kísérleti állatok

Valamennyi állatkísérletünket az International Association for the Study of Pain és az Európai Parlament 2010/63/EU irányelveivel összhangban terveztük meg. Kísérleteinket a Szegedi Tudományegyetem és a Debreceni Egyetem Állatetikai Bizottságainak, valamint a Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg Etikai Bizottságának és az illetékes

szakhatóságok engedélyeinek birtokában végeztük. A kísérletek során a felhasznált állatok számát a szükséges minimumon tartottuk. *In vivo* és *ex vivo* méréseink során egy-egy állatcsoportban 5-22 állatot, hisztokémiai és elektronmikroszkópos vizsgálataink során 3-4 állatot használtunk fel.

Kísérleteink során felnőtt (250-350 g) mindkét nembeli Wistar és Sprague-Dawley patkányokat, valamint C57BI/6 vad típusú és TRPA1-/- knockout egereket használtunk. Az állatokat standard laboratóriumi körülmények között tartottuk (12 órás világos/sötét periódus, 22 ± 2 °C hőmérséklet, 50-70 % relatív páratartalom). Az állatok a legtöbb kísérletünket megelőzően standard összetételű rágcsáló tápot és csapvizet kaptak ad libitum.

Magas zsír- és magas szénhidrát tartalmú diéta hatásának vizsgálata:

Ebben a kísérlet sorozatban 150-170 g tömegű, 6 hetes hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. Az állatokat random módon két csoportra osztottuk. Az egyik csoport standard laboratóriumi patkánytápot kapott (3,20 kcal/g, 59 % szénhidrát, 32 % fehérje, 9 % zsír, diet code: S8106-S011 SM R/M-Z+H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Germany) és csapvizet ivott. A másik csoport magas zsír és magas szénhidrát tartalmú tápot evett (4,56 kcal/g, 35 % szénhidrát, 20 % fehérje, 45 % zsír, diet code: 824018, Special Diets Services, UK) és 5 % szacharóz tartalmú csapvizet ivott. Az állatok folyadék és táp fogyasztását nem korlátoztuk. Ebben a kísérlet sorozatban valamennyi kísérletünket az állatok 20 hetes diétáját követően végeztük.

4.2. Kísérleti állatok előkezelése

Capsaicin deszenzibilizáció:

Az állatok ezen csoportja 3 egymást követő napon emelkedő dózisban (10, 20 és 100 mg/kg) capsaicin oldatot (Sigma-Aldrich, Germany) kapott szubkután injekciók formájában (Ferdinandy és mtsai., 1997). A kontroll csoportba tartozó állatokat a capsaicin oldószerével (6 % etanol és 8 % Tween 80 fiziológiás sóoldatban) kezeltük. A kísérleteket legkorábban 4 nappal a kezelés befejezése után végeztük.

Streptozotocin kezelés:

A kísérleti állatokban diabetes mellitust streptozotocin 65 mg/kg (Sigma-Aldrich, Germany) egyszeri intravénás injekciójával váltottunk ki (Wimhurst és Manchester, 1970). A diabéteszes állatok egy csoportja inzulin szubsztitúcióban részesült a streptozotocin kezelést követő 3. naptól kezdve. Az inzulint az állatok naponta egyszer, szubkután injekció formájában kapták (Lantus 1 IU/100 g, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Germany). A kontroll csoport állatait a streptozotocin oldószerével (0,1 M citrát puffer, pH 4) kezeltük. Az állatokat 2, 4 és 6 héttel a streptozotocin kezelést követő en használtuk kísérleteinkhez. Az állatok vércukor szintjét a kísérletek előtt ellenőriztük.

Adriamycin kezelés:

Az állatok ezen csoportja intravénás injekciók formájában 15 mg/kg kumulatív dózisban adriamycin (Doxorubicin, Pharmacia Italia, Italy) kezelésben részesült (Tong és mtsai., 1991). Az adriamycint az állatok 2 héten keresztül, heti 3 egyenlő részre elosztva (2,5 mg/kg) kapták. A kontroll állatok fiziológiás sóoldatot kaptak. A kísérleteket 2-7 nappal a kezelés befejezését követően végeztük.

4.3. Kísérleti állatok tápláltsági állapotának vizsgálata

A magas zsír és magas szénhidrát tartalmú tápon tartott állatok és kontroll társaik tápláltsági állapotát a korábban a vérplazma biomarkereinek meghatározására (**Módszerek 4.4**) használt állatokon vizsgáltuk. A vérminták gyűjtését követően az állatokat tiopentálnátriummal (Thiopental, Biochemie GmbH, Austria vagy Insera Arzneimittel GmbH, Germany) túlaltattuk (150 mg/kg i.p.), az intraabdominális és az epididimális fehér zsírszövetet eltávolítottuk és tömegüket lemértük. Az elhízás mértékét a teljes zsírszövet tömeg teljes testtömegre vonatkoztatott százalékában határoztuk meg.

4.4. Vérplazma biomarkerek vizsgálata: vércukor, inzulin, tumor nekrózis faktor α , interleukin-1 β és interleukin-6 koncentrációk meghatározása

A 20 héten keresztül kontroll vagy magas zsír és magas szénhidrát tartalmú tápon tartott állatokat egy éjszakán keresztül éheztettük. Másnap az állatokat tiopentálnátriummal (100 mg/kg, i.p.) altattuk, majd a jobb oldali arteria carotis communis-ba kanült vezettünk vérminta gyűjtésének céljából. Rövid stabilizációs periódust követően a kanülön

keresztül nyert vérmintákat Eppendorf csőbe gyűjtöttük. A mintákban meghatároztuk a vércukor koncentrációját (Accu-Chek, Roche Diagnostics, Magyarország, mérési tartomány: 0,6 - 33,3 mmol/l), ezt követően a vérmintákat 2 percig 4 °C-on 10.000 *g*-n centrifugáltuk, aliquotoztuk, lefagyasztottuk és a mérések elvégzéséig -70 °C-on tároltuk. Az éhgyomri inzulin szintet a plazma mintákban immunoradiometrikus assay (IRMA) kit (Institute of Isotopes, Hungary, mérési tartomány: 8,6 - 861 μ U/ml, érzékenység: 2,8 μ U/ml) segítségével μ U/ml egységekben mértük. A plazma tumor nekrózis faktor α (TNF α , Thermo Scientific, USA, mérési tartomány: 25,6 - 2500 pg/ml, érzékenység: 12 pg/ml) és interleukin-6 (IL-6, Life Technologies, USA, mérési tartomány: 23,5 - 1500 pg/ml, érzékenység: 5 pg/ml) koncentrációit a kereskedelemben megvásárolható enzyme-linked immunoassay (EIA) kitek segítségével határoztuk meg, a gyártók útmutatásai alapján. A plazma citokin koncentrációit pg/ml egységekben mértük.

4.5. Meningeális véráramlás mérés in vivo nyitott koponyaablak preparátumban

A kísérletek kezdetén a patkányokat tiopentál-nátrium intraperitoneális injekciójával, vagy zárt dobozban 5 % izoflurán (Forene, Abbott, Germany) belélegeztetésével altattuk.

A tiopentál-nátriumot 120 mg/kg kezdő dózisban, majd a kísérlet folyamán szükség szerint 25 mg/kg kiegészítő dózisban alkalmaztuk. A kísérlet folyamán fájdalmas ingerrel (a fül megcsípésével) ellenőriztük időről időre az anesztézia mélységét és arra törekedtünk, hogy az állat ennek hatására se mutasson nociceptív motoros reakciókat vagy artériás vérnyomás változást. A tiopentál-nátriummal altatott állatok a kísérlet folyamán trachea kanülön keresztül spontán lélegeztek. Az izoflurán anesztéziát a kísérlet folyamán 2 % izoflurán belélegeztetésével tartottuk fenn kezdetben a fejre helyezett maszkon, később trachea kanülön keresztül.

Az állatok átlagos artériás vérnyomását a jobb oldali arteria femoralisba vezetett kanülön keresztül folyamatosan mértük. Az állatok testhőmérsékletét melegítő lap segítségével 37-37,5 °C-on tartottuk. Anyagok szisztémás (intravénás) adása céljából az állatok jobb oldali vena femoralisába is kanült vezettünk.

A meningeális véráramlást a Kurosawa és munkatársai által ismertetett nyitott koponyaablak módszerrel mértük (Kurosawa és mtsai., 1995). Az állatok fejét sztereotaxiás készülékben rögzítettük, a fejtető bőrét a középvonalban megnyitottuk és a koponyát a

parietális területen szabaddá tettük. A koponyacsontot az egyik oldalon a szabaddá tett parietális területen kb. 4x6 mm-es területen fogászati fúróval eltávolítottuk. Eközben a csontot fiziológiás sóoldattal folyamatosan hűtöttük, hogy elkerüljük a szövetek túlmelegedését.

A véráramlást az arteria meningea media ágai fölött, a látható pia mater artériákat elkerülve lézer Doppler áramlásmérővel (Periflux 4001 Master, Perimed, Sweden vagy DRT4, Moor Instruments, UK) mértük. A mérések során vékony mérő szondát (külső átmérő: 1 mm, optikai szálak távolsága: 0,25 mm) használtunk, amelyet közvetlenül az arteria meningea media ága fölé pozicionáltunk. Az ilyen feltételek mellett mért véráramlás értékek döntően a dura mater artériás véráramlás változásairól szolgáltatnak információt. A szabaddá tett dura mater felszínét szintetikus intersticiális folyadékkal (SIF) fedtük, melynek összetétele: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 10 mM glükóz és 10 mM Hepes (pH 7,4). A meningeális véráramlás változásokat a dura mater felszínére topikálisan adott anyagokkal váltottuk ki. A különböző hatóanyagokat 40 µl térfogatban 3, 5 vagy 10 perc időtartamra pipettáztuk a dura mater felszínére. Ezt követően eltávolítottuk és a dura felszínét ismételten átmostuk SIF-kal, amíg az applikáció előtti bazális véráramlás értékek vissza nem tértek. Ez a legtöbb esetben 5-10 perc alatt bekövetkezett. Újabb applikációra csak ezt követően került sor. A véráramlást perfúziós egységekben (perfusion unit, PU) mértük. A véráramlás értékeket és az átlagos artériás nyomás értékeit a használt lézer Doppler áramlás mérő típusának megfelelően vagy a Perisoft számítógépes programmal (Perimed, Sweden) vagy a MoorSoft for Windows (Moor Instruments, UK) programmal rögzítettük és értékeltük ki. A bazális véráramlás értékeket az anyagok applikációját megelőző 3 percben mért véráramlás értékek átlagaként határoztuk meg. A különböző anyagok applikációjával kiváltott véráramlás változásokat a teljes applikációs időtartam (3, 5 vagy 10 perc) egészére vonatkoztatott átlag véráramlásként határoztuk meg, egyes esetekben a percenként vagy két percenként mért értékek átlagát számoltuk ki és a bazális véráramlás szinthez viszonyítva százalékos változásként fejeztük ki.

A különböző neuronális és vaszkuláris lokalizációjú receptorok stimulációjával kiváltott véráramlás változások vizsgálata során a stimulus alkalmazását megelőzően a dura matert előkezeltük a megfelelő receptor antagonistával, bizonyos esetekben a receptor aktiválásában szerepet játszó anyag szintéziséért felelős enzim(ek) inhibitorával. Az előkezelés a különböző gátlószerek 5, 10, 15 vagy 20 perc időtartamú topikális

applikációjával történt. A receptor antagonisták, illetve az enzim gátlók eltávolítását követően a dura SIF-kal történő átöblítése nélkül került sor a megfelelő stimulus alkalmazására. Néhány kísérlet során a stimuláló és/vagy a gátlószereket intravénás injekció formájában juttattuk az állatok keringésébe. Ezekben a méréssorozatokban a receptor agonistának az antagonista/inhibitor applikációját/injekcióját megelőzően és azt követően mért meningeális véráramlásra gyakorolt hatását hasonlítottuk össze.

Az intrakraniális trigeminális afferensek extrakraniális kollaterálisainak kimutatása céljából végzett kísérleteinkben az arteria meningea media ágai fölött mért perfúziót meghatároztuk, majd 20 μl fiziológiás sóoldatot vagy 1 μM capsaicin oldatot injektáltunk lassan (10 sec alatt) a véráramlás méréssel azonos oldalon a musculus temporalisba, a csonthártyához közeli területre. Néhány esetben a ganglion blokkoló hexamethonium kloridot (20 mg/kg fiziológiás sóoldatban, Sigma-Aldrich, Germany) injektáltuk intravénásan, más esetekben a CGRP receptor antagonista kalcitonin gén-rokon peptid 8-37 fragmentumot (CGRP₈₋₃₇ 100 μM, Sigma-Aldrich, Germany) pipettáztuk topikális előkezelés formájában a dura materre a capsaicin injekcióját megelőzően 4 perccel. Ezekben a kísérletekben a capsaicin injekcióját követő 4 percben mért véráramlás átlagértékeket a bazális véráramlással hasonlítottuk össze.

A dura mater kémiai stimulációjával kiváltott centrális és perifériás CGRP felszabadulást vizsgáló kísérleteink során a preparálást megelőzően kanült vezettünk az állatok koponyaablakkal azonos oldali vena jugularisába, melyet 10 U/ml heparin (Ratiopharm, Germany) tartalmú fiziológiás sóoldattal töltöttünk fel. A kanül hegyét kraniális irányban, a vena jugularis bifurkációjának közelében rögzítettük. Ezen kísérletek során a parietális koponyacsont eltávolítását megelőzően a nyakizmokat a középvonalban kettéválasztottuk, majd a ligamentum atlantooccipitale és a dura mater átvágásával megnyitottuk a cisterna cerebellomedullarist (cisterna magna); az agytörzs dorzális felszínét szabaddá tettük véráramlás mérés és likvor minták gyűjtésének céljából. A canalis infraorbitalis-on keresztül vékony szilikon csőhöz csatlakoztatott 27G tűt vezettünk a ganglion trigeminale-ba. A csövet 40 µl 2 %-os lidokain hidroklorid (Xylocain, AstraZeneca, Germany) és 40 µl 0,1 % metilénkék oldatával (Sigma-Aldrich, Germany) töltöttük fel, a két oldatot egymástól 10 µl térfogatú levegő buborékkal elválasztva. A metilénkék oldatot a kísérletek végén, a véráramlás mérések befejezése után juttattuk a ganglionba. Ezt követően a túlaltatott állatokat fiziológiás sóoldattal transzkardiálisan perfundáltuk, a koponyát

felnyitottuk és meggyőződtünk a trigeminális ganglion kék elszíneződéséről, ami a ganglionba vezetett tű megfelelő helyét igazolta. A kísérlet során nyert, lidokain intraganglionáris injekciójának hatására vonatkozó mérési eredményeinket csak a ganglion kék elszíneződése esetén értékeltük ki statisztikailag.

Az *in vivo* véráramlás mérést követően a kísérletek végén az állatokat tiopentálnátrium (250 mg/kg i.v.) injekciójával túlaltattuk.

4.6. Kalcitonin gén-rokon peptid felszabadulás mérése *ex vivo* dura mater preparátumban

A meningeális afferensekből nyugalmi körülmények között, illetve különböző stimulusok hatására bekövetkező CGRP felszabadulást patkány és egér dura mater preparátumban mértük ex vivo (Ebersberger és mtsai., 1999). Az állatokat tiopentálnátriummal (150 mg/kg i.p.) vagy CO₂ belélegeztetésével túlaltattuk majd dekapitáltuk, a koponyáról a bőrt és az izmokat eltávolítottuk, az állkapcsot a temporomandibuláris izületnél leválasztottuk, majd a koponyát a középvonalban megfeleztük. Az agyféltekék óvatos eltávolítását követően az intakt dura materrel fedett koponyafeleket 30 percen keresztül karbogén (95 % O₂ + 5 % CO₂) gázzal átáramoltatott SIF-ban előinkubáltuk, majd 37 °C-os nedveskamrában a koponyagödörrel felfelé rögzítettük. Patkányokon végzett mérések során a koponyagödörbe minden esetben 300 µl, egereken végzett mérések során 50 µl térfogatú oldatot pipettáztunk 5 vagy 10 perc időtartamra. A bazális CGRP felszabadulást SIF applikációját követően határoztuk meg. A mintákat Eppendorf csőbe gyűjtöttük, 25 µl EIA pufferrel (SPI-Bio, Bertin Pharma, France) hígítottuk és -70 °C-on tároltuk. A minták CGRP tartalmát EIA módszerrel, a SPI-Bio (Bertin Pharma, France) EIA kit felhasználásával mértük. A kit érzékenységének alsó határa 0,7 pg/ml volt. A minták CGRP koncentrációját DYNEX MRX vagy Opsys MR (Dynex Technologies, Germany) fotométerrel mértük. A különböző stimulusokkal kiváltott CGRP felszabadulást pg/ml értékekben határoztuk meg és a bazális CGRP felszabadulással hasonlítottuk össze.

A meningeális afferensek extrakraniális kollaterálisait vizsgáló kísérleteink során *ex vivo* dura mater preparátumunkat annyiban módosítottuk, hogy a dekapitálást követően a bőrt eltávolítottuk, de az alatta fekvő izmokat és a csonthártyát érintetlenül hagytuk. 30 perces SIF-ban történő előinkubációt követően vékony szilikon csővel és fecskendővel csatlakoztatott 26G tűt vezettünk mélyen a musculus temporalisba, vagy a musculus splenius és a musculus longissimus capitis tapadási pontjainak közelébe a tarkótájon. Az injekciós

rendszert 1 μM-os capsaicin oldattal töltöttük fel, amit etanolban oldottunk és SIF-kal hígítottunk a végső koncentrációra. A kísérlet során a dura materrel fedett koponyagödröket SIF-kal töltöttük fel 10 perc időtartamra. Két egymást követő minta szolgált a bazális CGRP felszabadulás meghatározására, a harmadikat 20 μl capsaicin oldat intramuszkuláris injekcióját követően gyűjtöttük, majd 2 további mintát gyűjtöttünk a stimulust követően. Abból a célból, hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy a koponyán keresztül diffundáló capsaicin direkt módon aktiválja a dura matert innerváló intrakraniális afferenseket, a koponyagödörbe a TRPV1 antagonista capsazepin 1 μM-os oldatát (Sigma-Aldrich, Germany, 100 mM törzsoldat dimetil szulfoxidban oldva és SIF-kal tovább hígítva) töltöttük. A kísérletek végén úgy bizonyosodtunk meg az afferensek funkcióképességéről, hogy capsaicin 0,1 μM-os oldatát pipettáztuk a koponyagödörbe és 10 perc elteltével egy további mintát gyűjtöttünk belőle, amelyben meghatároztuk az intrakraniális afferensek direkt stimulációjával kiváltott CGRP felszabadulást. Amelyik koponyafél a direkt capsaicin stimulációra nem mutatott a korábbi kísérleteinknél tapasztalt mértékű CGRP koncentráció emelkedést, azt nem használtuk fel a statisztikai kiértékelés során.

Azokban a kísérletekben, amelyekben az extrakraniális afferenseket nem kémiai ingerrel (capsaicin applikációval), hanem elektromos ingerrel stimuláltuk, vékony elektróda párt szúrtunk a musculus temporalisba. Az elektromos ingerlést 10 percen keresztül 1 ms, 5 mA és 10 Hz paraméterekkel (WPI A360; World Precision Instruments, UK) végeztük.

4.7. Plazma és likvor minták kalcitonin gén-rokon peptid tartalmának meghatározása

A dura mater kémiai stimulációjával kiváltott centrális és perifériás CGRP felszabadulást vizsgáló kísérleteinkben az *in vivo* véráramlás mérésnél leírt preparálás során a vena jugularisba vezetett kanülön keresztül vett vérminták és a cisterna cerebellomedullárisból gyűjtött likvor minták CGRP tartalmát is meghatároztuk.

A vénás vér 300 µl-ét 10 µl 0,5 M etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA, Sigma-Aldrich, Germany) tartalmú fecskendőbe gyűjtöttük, majd Eppendorf csőben 60 µl peptidáz inhibitort tartalmazó EIA pufferrel (SPI-Bio, Bertin Pharma, France) hígítottuk. A mintákat 2 percig 700 *g*-n centrifugáltuk, ezt követően a plazmát összegyűjtöttük és a CGRP koncentráció meghatározásáig -20 °C-on tároltuk. A CGRP koncentrációkat a dura mater 60 mM KCI-dal történő stimulációját megelőzően 10 perccel és azt közvetlenül követően vett vérmintákból nyert plazmában határoztuk meg és hasonlítottuk össze.

Az állatok preparálása során szabaddá tett agytörzs dorzális felszínét borító likvort pipettával gyűjtöttük össze a környező szövetek érintése nélkül. Előkísérletekben meghatároztuk az agytörzs preparálásának a likvor CGRP koncentrációjára kifejtett hatását: 25 μl likvort gyűjtöttünk közvetlenül a preparálás után, majd egy következőt 15 perccel később. A koponyaablak kifúrását követően közvetlenül, majd 15 percenként további 3-7 likvor mintát gyűjtöttünk.

A dura mater kémiai stimulációjával kiváltott meningeális és agytörzsi véráramlás változások vizsgálata során a likvor minták gyűjtését 30 perccel a koponyaablak elkészítése után kezdtük meg, mivel előkísérleteink eredményei alapján a preparálás következtében átmenetileg megemelkedő CGRP koncentráció ekkorra stabilizálódott. Ezt az értéket tekintettük kísérleteink során bazális CGRP felszabadulásnak. A dura mater kémiai stimulációjának (60 mM KCl applikációja) hatását a stimulus alkalmazását 10 perccel megelőzően és azt közvetlenül követően vett likvor minták CGRP tartalmának összehasonlításával határoztuk meg. A likvor mintákat minden esetben Eppendorf csőbe pipettáztuk, négyszeres térfogatú EIA pufferrel hígítottuk és -20 °C-on tároltuk.

A plazma és likvor minták CGRP tartalmát az *ex vivo* koponya preparátumokban CGRP felszabadulás mérésére használt EIA kit segítségével, az ott ismertetett módon határoztuk meg (SPI-Bio, Bertin Pharma, France). A gyártó a CGRP kit érzékenységét plazma minták esetében 2 pg/ml értékben határozta meg.

4.8. Hisztamin felszabadulás mérése ex vivo dura mater preparátumban

A dura mater hízósejtjeiből nyugalmi körülmények között, illetve CGRP hatására bekövetkező hisztamin felszabadulást *ex vivo* patkány dura mater preparátumban mértük. A preparátum előkészítése és a kísérlet folyamán a minták gyűjtése a CGRP koncentrációk meghatározására használt preparátumainkkal azonos módon történt (**Módszerek 4.6**). Ezekben a kísérletekben SIF két egymást követő 5 perces applikációja során nyert minták hisztamin koncentrációjának meghatározásával nyertünk adatot a bazális hisztamin felszabadulásra vonatkozóan, ezt követően pipettáztuk a koponyagödörbe a CGRP (Sigma-Aldrich, Germany) 10 μM-os oldatának 300 μl-ét. A stimulációt követően újabb két mintát gyűjtöttünk SIF jelenlétében, amivel megbizonyosodtunk a hisztamin felszabadulás bazális értékre történő visszatéréséről. Néhány kísérletben a sorrendben második, harmadik és

negyedik mintához használt SIF, illetve CGRP tartalmú oldatokat kiegészítettük a CGRP receptor gátló CGRP₈₋₃₇ 10 µM koncentrációjú oldatával.

A mintákat a hisztamin koncentráció meghatározásáig -70 °C-on tároltuk. A minták hisztamin tartalmát EIA módszerrel, az IBL Germany által forgalmazott EIA kit felhasználásával mértük. A minták hisztamin koncentrációit standard görbe segítségével Dynatech, Canada fotométerrel 450 nm-en határoztuk meg. A gyártó által rendelkezésünkre bocsátott adatok szerint az EIA kit érzékenységének alsó határa 2,4 ng/ml hisztamin koncentráció volt.

4.9. A ganglion trigeminale tranziens receptor potenciál vanilloid 1 fehérje tartalmának meghatározása enzyme-linked immunoassay módszerrel

Kontroll és adriamycinnel szisztémásan kezelt patkányokat tiopentál-nátrium (200 mg/kg) intraperitoneális injekciójával túlaltattunk, majd dekapitáltunk. A bőr és az izmok eltávolítását követően a koponyát a középvonalban kettévágtuk, a ganglion trigeminale-t eltávolítottuk, tömegét lemértük, foszfát pufferes sóoldatban (phosphate-buffered saline, PBS) homogenizáltuk, majd egy éjszakán keresztül -20 °C-on tároltuk. Két fagyasztás-felolvasztási ciklust követően a homogenizátumokat 4 °C-on 5 percig 5 *g*-n centrifugáltuk, a felülúszót összegyűjtöttük és a minták TRPV1 tartalmának meghatározásáig -70 °C-on tároltuk. A minták TRPV1 fehérje tartalmát EIA módszerrel mértük az Aviva Systems Biology, USA-tól beszerezhető kit segítségével. A rendszer gyártó által ismertetett érzékenysége 0,1 ng/ml volt. A TRPV1 kocentrációt pg/mg szövet értékekben határoztuk meg.

4.10. A ganglion trigeminale tranziens receptor potenciál ankyrin 1 fehérje tartalmának meghatározása Western blot módszerrel

A 20 héten keresztül kontroll vagy magas zsír és magas szénhidrát tartalmú diétán tartott állatokat egy éjszakán keresztül éheztettük. Másnap az állatokat tiopentálnátriummal (150 mg/kg, i.p.) túlaltattuk majd dekapitáltuk. A koponyát a középvonalban kettévágtuk, a trigeminális ganglionokat eltávolítottuk, majd 1 mM fenil-metil-szulfonilfluorid és proteáz gátló (mindkettő Sigma-Aldrich, USA) tartalmú NP40 pufferben (Thermo Fisher Scientific, USA) jégen homogenizáltuk. A homogenizátumokat kétszer 10 sec-ig szonikáltuk, majd 2 óráig 4 °C-on rázattuk. A lizátumokat 20 percig 4 °C-on 13.680 *g*-n centrifugáltuk. A felülúszó fehérje koncentrációját BCA protein assay (Thermo Fisher

Scientific, USA) segítségével határoztuk meg. 10 % SDS poliakrilamid gél-elektroforézist követően a blottolást nitrocellulóz membránra végeztük, majd nyúlban termeltetett TRPA1ellenes ellenanyaggal (1:2500, Alomone Labs, Israel) β-aktinnal párhuzamosan (1:1000, Cell Signalling Technology, USA) egy éjszakán keresztül 4 °C hőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a membránt szamárban termeltetett nyúl ellenes IgG-HRP konjugátummal (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, USA) 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az immunreaktív sávokat SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA) használatával Gel Logic 1500 Imaging System (Kodak, Japan) segítségével vizualizáltuk.

4.11. Mustárolajjal kiváltott plazmaextravazáció vizsgálata patkány lábhát bőrében

A kontroll és magas zsír, magas szénhidrát tartalmú diétán tartott állatokat tiopentálnátriummal (100 mg/kg, i.p.) altattuk, majd intravénásan 50 mg/kg Evans kék (Sigma-Aldrich, Germany) festék oldatot (1 % fiziológiás sóoldatban) injektáltunk. Ezt követően a jobb hátsó végtag lábhát bőrét 5 %-os mustárolaj (Sigma-Aldrich, Germany) oldattal ecseteltük. 5 perc várakozási idő után digitális fényképeket készítettünk a lábakról. A lábhát bőr Evans kék extravazáció okozta kék elszíneződését Image-Pro Plus 7.0 (QImaging, USA) számítógépes program segítségével értékeltük ki. Az átlagos pixel intenzitás (világosság) értékeket a lábfej teljes felszínét lefedő 3x3 mm nagyságú négyzetekben határoztuk meg.

4.12. Meningeális afferensek extrakraniális kollaterálisainak azonosítása neuronális pályakövetési eljárással

A patkányokat zárt dobozban 5 % izoflurán belélegeztetésével altattuk. Minden sebészeti beavatkozást általános érzéstelenítésben végeztünk 3 mg/kg ketamin (Pfizer, Germany) és 3 mg/kg xylazin (KVP Pharma, Germany) intramuszkuláris injekcióját követően. Az állatok a műtét ideje alatt maszkon keresztül 2 % izofluránt lélegeztek be. A műtétet követően az állatok ivóvizébe metamizolt (Ratiopharm, Germany) adagoltunk (10 mg/kg dózisban).

A musculus temporalist hosszában megnyitottuk és 1 mm hosszúságú metszést ejtettünk az alatta fekvő periosteumon a crista supramastoidea-tól kraniális irányban, közel az os occipitale crista nuchalis-ához. A pályakövetésre az állatok egy csoportjánál biotinilált dextrán amint (BDA, 3000 MW, Molecular Probes, USA), egy másik csoportjánál Texas Red
dc_1628_19

fluoreszcens festékkel konjugált dextrán amint (Texas Red, 3000 MW, Molecular Probes, USA) használtunk. A jelölő anyagot kristályok formájában juttattuk a musculus temporálison ejtett bemetszésbe. 5 perccel később a sebet zselatin szivacs darabbal zártuk (Abgel, Sri Gopal Labs, India) és egy réteg parafilmmel fedtük abból a célból, hogy a tracer környező szövetek általi felvételét megakadályozzuk. Az izmot és a bőrt steril varróanyaggal összezártuk. 48-52 órás túlélést követően az állatokat tiopentál-nátriummal (150 mg/kg i.p.) túlaltattuk, előbb 250 ml fiziológiás sóoldattal (NaCl 0,9 %), majd BDA jelölés esetén 200 ml 2,5 %-os glutáraldehidet, Texas Red konjugátum használatakor pedig pufferezett (0,1 M foszfát puffer, pH 7,4) 4 % paraformaldehidet tartalmazó fixáló oldattal transzkardiálisan perfundáltuk. Mintát vettünk a parietális dura materből, továbbá eltávolítottuk a kezelt oldali trigeminális gangliont és az agytörzset. A gangliont totál preparátumként fluoreszcens sztereomikroszkóppal (Leica MZ FLIII, Leica Microsystems, Germany) értékeltük. Ezt követően a ganglionokat és az agytörzset egy éjszakán keresztül 4 °C-on 30 %-os szacharóz oldatban tartottuk, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és kriosztáttal (CM 3050 S Leica, Switzerland) 20 µm vastag hosszanti metszeteket készítettünk belőlük. A BDA-t avidinbiotin-peroxidáz módszerrel vizualizáltuk (Vector Laboratories, USA) a 3,3'-diaminobenzidin (DAB) reakció terméken nikkel intenzifikációt alkalmaztunk. A dura matert, a ganglion trigeminale és az agytörzs metszeteit tárgylemezre fektettük és Fluoromount G-vel (Science Services, Germany) fedtük. A metszeteket konfokális mikroszkóppal (LSM 710, Carl Zeiss Microlmaging, Germany) értékeltük ki.

Néhány kísérletben a musculus temporalis Texas Red fluoreszcens festékkel konjugált dextrán amin (Dextran, Texas Red, 3000 MW Lysine Fixable, Invitrogen, USA) jelölését az intrakraniális meningeális afferensek Rhodamine green fluoreszcens festékkel konjugált dextrán amin (Dextran, Rhodamine Green, 3000 MW Lysine Fixable, Invitrogen, USA) jelölésével kombináltuk. Ezekben a kísérletekben a musculus temporalis műtéti területének zárását követően nyitottuk meg a bőrt a koponya középvonalában, majd a jelölt musculus temporalis-szal azonos oldalon a parietális területen fogászati fúróval eltávolítottuk a csontot és szabaddá tettük a dura matert. A Rhodamine green fluoreszcens festékkel konjugált dextrán amin kristályokat az arteria meningea media ágainak közelében helyeztük a dura mater felszínére, a sebet néhány perces várakozást követően parafilmmel fedtük, a bőrt steril varróanyaggal összezártuk. 48-52 órás túlélést követően az állatokat tiopentál-nátriummal (150 mg/kg i.p.) túlaltattuk, előbb 250 ml fiziológiás sóoldattal (NaCl 0,9 %),

majd pufferezett (0,1 M foszfát puffer, pH 7,4) 4 % paraformaldehidet tartalmazó fixáló oldattal transzkardiálisan perfundáltuk. A trigeminális ganglionokat eltávolítottuk, egy éjszakán keresztül 4 °C-on 30 % szacharóz oldatban tartottuk, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és kriosztáttal 20 μm vastag hosszanti metszeteket készítettünk belőlük. A metszetek kiértékelése konfokális mikroszkóppal (LSM 710, Carl Zeiss Microlmaging, Germany) történt.

4.13. Dura mater szövetminták elektronmikroszkópos vizsgálata

Hím Wistar patkányokat tiopentál-nátriummal túlaltattunk (150 mg/kg i.p.) majd dekapitáltunk. A bőr, az izmok és az állkapocs eltávolítását követően a koponyát a középvonalban megfeleztük és az agyféltekéket kiemeltük. A koponyafeleket karbogénnel átáramoltatott Krebs oldatba (119 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,5 mM MgSO₄, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 11mM glükóz, pH 7,4) helyeztük. A capsaicin-szenzitív afferensek azonosítására Király és munkatársainak módszerét használtuk (Király és mtsai., 1991). Tíz perc 37 °C-os Krebs oldatban történő előinkubációt követően 10 µM-os capsaicin oldatot, vagy a capsaicin oldószerét ugyanilyen koncentrációban adtuk az inkubáló oldathoz. 10 perccel később az oldatokat lecseréltük friss Krebs oldatra, amelyben még további 60 percig inkubáltuk a preparátumokat. A szövetmintákat 3 óráig in situ fixáltuk 2 % paraformaldehidet és 1 % glutáraldehidet tartalmazó fixálóban (0,1 M foszfát puffer, pH 7,4), majd kisméretű, artéria ágakat is tartalmazó darabokat metszettünk ki belőle, ezeket 2 % ozmium tetroxidot tartalmazó oldatban utófixáltuk 2 óráig, alkoholsorban dehidráltuk és Durcupan-ba (Durcupan ACM, Sigma-Aldrich, Germany) ágyaztuk. A szövetmintákból Reichert-Jung Ultracut E ultrotommal ultravékony metszeteket készítettünk, melyeket uranilacetáttal és Reynolds szerint ólomcitráttal kontrasztoztunk (Reynolds, 1963). A preparátumokat Jeol Jem 1010 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

4.14. Immunhisztokémia

Patkányok dura mater totálpreparátumait, az agytörzset borító pia mater totálpreparátumát és a ganglion trigemináléból készült metszeteket indirekt immunfluoreszcens technikával vizsgáltuk. Az állatokat tiopentál-nátriummal (150 mg/kg, i.p.) túlaltattuk, majd előbb fiziológiás sóoldattal, majd pufferezett (0,1 M foszfát puffer, pH 7,4) 4 % paraformaldehidet tartalmazó fixáló oldattal perfundáltuk. Az állatokat

dekapitáltuk, majd a koponyáról eltávolítottuk a bőrt és az izmokat. A koponyát a középvonalban megfeleztük. Az agyféltekéket kiemeltük, a dura mater parietális területéről vett szövetmintákat 1 órán keresztül 4 % paraformaldehidet tartalmazó fixáló oldatban utófixáltuk, majd indirekt immunfluoreszcens technikával egyes vagy kettős immunhisztokémiai festést végeztünk rajtuk.

Néhány kísérlet során a trigeminális ganglionokat is kimetszettük, 1 óra utófixálást követően egy éjszakán keresztül 4 °C-on 30 %-os szacharóz oldatban tartottuk, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és kriosztáttal (CM 3050 S Leica, Switzerland) 14 μm vastag hosszanti metszeteket készítettünk belőlük.

Az agytörzsi véráramlás változásokat vizsgáló kísérleteink végén néhány esetben a túlaltatott kísérleti állatokat fiziológiás sóoldattal transzkardiálisan perfundáltuk, majd az agytörzset 1 órán keresztül 4 % paraformaldehidet tartalmazó fixáló oldatban in situ fixáltuk. Az agytörzs dorzális felszínét borító pia matert eltávolítottuk és immunhisztokémiai festést végeztünk rajta.

Ellenanyag	Ellenanyagot	Hígítás	Forrás
	termelő állatfaj		
anti-TRPV1	nyúl	1:500	Alomone Laboratories, Israel
anti-CGRP	egér	1:500	Sigma-Aldrich, Germany
anti-CGRP	nyúl	1:1000	Peninsula, Germany
anti-CGRP	nyúl	1:100	Dianova, Germany
anti-nNOS	nyúl	1:1000	Calbiochem, Germany
anti-TRPA1	nyúl	1:500, 1:100	Abcam, UK
anti-CBS	egér	1:100	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-RCP	egér	1:50	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-RAMP1	kecske	1:50	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-PAR2	kecske	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-TH	birka	1:2000	Novus Biologicals, USA

1. táblázat. A kísérleteink során használt primer ellenanyagok. TRPV1: tranziens receptor potenciál vanilloid 1, CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid, nNOS: neuronális nitrogén-monoxid szintáz, TRPA1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1 , CBS: cisztationin β-szintáz, RCP: receptor component protein, RAMP1: receptor activity-modifying protein 1, PAR2: proteáz aktivált receptor 2, TH: tirozin-hidroxiláz.

A preparátumokat a primer antitestekkel 4 °C-on egy éjszakán keresztül, az ezt követő mosás után a másodlagos antitestekkel szobahőn 2 órán keresztül inkubáltuk. A totál preparátumokat tárgylemezre helyeztük, Fluoromount G-vel (Science Services, Germany) fedtük és konfokális mikroszkóppal (LSM 700 vagy LSM 780 Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany) értékeltük ki. A kísérletek során használt primer antitestek típusait, hígítását és forrását az **1. táblázat**ban, a másodlagos antitestek adatait a **2. táblázat**ban foglaltam össze.

Fluoreszcens	Ellenanyagot termelő	Hígítás	Forrás
jelölés	állatfaj		
Alexa 488	szamár (nyúl ellenes)	1:500, 1:1000	Molecular Probes, USA
Alexa 555	szamár (kecske ellenes)	1:500, 1:1000	Molecular Probes, USA
FITC	szamár (nyúl ellenes)	1:500	Jackson Immunoresearch Laboratories, USA
СуЗ	szamár (kecske ellenes)	1:500	Jackson Immunoresearch Laboratories, USA
СуЗ	kecske (nyúl ellenes)	1:200	Dianova, Germany
FITC	kecske (egér ellenes)	1:500	Sigma-Aldrich, USA
DyLight 488	kecske (egér ellenes)	1:500	Jackson Immunoresearch Laboratories, USA
Alexa 488	szamár (birka ellenes)	1:1000	Molecular Probes, USA

2. táblázat. A kísérleteink során használt másodlagos ellenanyagok. FITC: fluoreszcein-izotiocianát,
Cy3: indokarbocianin.

Streptozotocinnal kezelt diabéteszes állatok dura materének innervációjában bekövetkező változások morfometriai kiértékelését x20 nagyítás mellett Image-Pro program (QImaging, USA) segítségével végeztük. Egy-egy dura mintában 10 mm² területen számoltuk meg a TRPV1 immunreaktív képletek cikloid görbéket tartalmazó mérő sablonnal képezett metszéspontjait az egyes axonok és a rostkötegek vonatkozásában. A metszéspontok számát átlag/mm² ± SEM értékekben határoztuk meg (Howard és Reed, 1998).

Néhány preparátum esetében a sejtmagokat a másodlagos antitestekhez adott 4',6diamidino-2-fenilindol dihidroklorid (DAPI, Sigma-Aldrich, USA) 2 μg/ml oldatával tettük láthatóvá.

4.15. Nitrogén-monoxid, kénhidrogén és nitroxil fluoreszcens hisztokémiai kimutatása

A NO, H₂S és nitroxil (HNO) termelődését patkányok fixálatlan dura mater preparátumaiban fluoreszcens szenzorokkal mutattuk ki. A tiopentál-nátriummal (150 mg/kg, i.p.) túlaltatott és dekapitált állatok koponyáját megfeleztük, az agyféltekéket kiemeltük. A parietális területről kimetszett dura mater mintákat 37 °C-on 15 percig inkubáltuk oldatokkal. NO kimutatására 5 а reagens А μΜ 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluoreszcein-diacetát (DAF-FM) oldatot (Sigma-Aldrich, Germany), a H₂S kimutatára 5 μM 3'-metoxi-3-oxo-3*H*-spiro[izobenzofurán-1,9'-xanten]-6'-il 2-(piridin-2-ildiszulfanil)benzoát-ot (WSP-1, Cayman, Germany), a HNO kimutatására pedig HNO-szelektív fluoreszcens festéket 10 µM koncentrációban (CuBOT1, a Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg Lehrstuhl für Bioanorganische Chemie munkatársai által a Rosenthal és Lippard által kidolgozott módszerrel előállítva) (Rosenthal és Lippard, 2010) használtunk. Ezt követően a dura mintákat SIF-kal mostuk, majd további 30 percig 37 °C-on inkubáltuk SIF-ban. Néhány kísérletben a dura mintákat 45 percig előinkubáltuk 2 mM N_{ω} metil L-arginin acetát (L-NMMA, Sigma-Aldrich, Germany) vagy 2 mM oxálsav amid (Sigma-Aldrich, Germany) oldatában, néhány esetben egyidejűleg mindkettőben, mielőtt a korábban ismertetett fluoreszcens szenzorokat alkalmaztuk volna. A reakció eredményeként létrejött zöld fluoreszcenciát minden esetben fluoreszcein-izotiocianát (FITC) detektálására alkalmas filter segítségével LSM 780 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

A dura mater NO termelésének mennyiségi kimutatására izolált dura mater mintákat 30 percig 37 °C-on előkezeltünk 2 mM oxálsav amid oldatával, majd 30 percig inkubáltunk a NO szenzor DAF-FM-tal. Hasonlóan a szöveti H₂S termelés kimutatása céljából 2 mM L-NMMA előkezelést követően reagáltattuk a mintákat WSP-1 oldatban. Ezeknél a méréseknél a folyadékban kialakuló fluoreszcenciát Jasco spectrofluoriméterrel vizsgáltuk (Jasco Analytical Instruments, Germany) a DAF-FM esetében λ ex 485 és λ em 538 nm, a WSP-1 esetében pedig λ ex 465 és λ em 515 nm hullámhosszak mellett. A szövettömegre vonatkoztatott mért fluoreszcencia intenzitást a kontralaterális, előkezelés nélküli dura mater értékeivel hasonlítottuk össze.

4.16. Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-diaforáz aktivitás hisztokémiai kimutatása

Az arteria meningea media ágait tartalmazó dura mater mintákat 0,3 % Triton X-100 tartalmú 0,1 M PBS-ben 60 percig előinkubáltuk, majd 37 °C-on 15 percig reagáltattuk a

nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH)-diaforáz kimutatására szolgáló oldatban (1 mg/ml nitroblue tetrazolium, 0,4 mg/ml β-NADPH, 0,3 % Triton X-100 0,1 M PBS-ben, valamennyi Sigma-Aldrich, Germany). A dura mintákat tárgylemezre helyeztük, lefedtük és fénymikroszkóposan vizsgáltuk.

4.17. Felhasznált anyagok

A kísérleteink során használt acetilkolin, akrolein, CGRP₈₋₃₇, cimetidin, 2-(*N*,*N*-dietilamin)-diazenolát-2-oxid dietilammónium só (DEANONOate), fentolamin-hidroklorid, forskolin, hisztamin, N_{ω} -nitro-L-arginin metilészter hidroklorid (L-NAME), nátrium-szulfid, oxálsav amid, Ser-Leu-IIe-Gly-Arg-Leu-amid (SLIGRL-NH₂), 1-(2-trifluorometilfenil)imidazol (TRIM) és tripszin a Sigma-Aldrich, Germany terméke volt. Az 1-(2,4-diklórfenil)-5-(4-jódfenil)-4-metil-*N*-1-piperidinil-1*H*-pirazol-3-karboxamid (AM 251), az arachidonoil-etanolamid (anandamid), az 1,2,3,6-tetrahidro-1,3-dimetil-*N*-[4-(1-metiletil)fenil]-2,6-dioxo-7*H*-purin-7-acetamid (HC030031), az *N*-arachidonoil-dopamin (NADA) és a tioperamid maleát a Tocris Bioscience, UK, a nátrium-[trioxo-dinitrát] (Angeli's salt), az *N*-etil-2-(1-etil-2-hidroxi-2-nitrozohidrazino)-etánamin (NOC-12), az 1*H*-[1,2,4]oxadiazolil[4,3-a]kinoxalin-1-on (ODQ) és az *S*-nitrozo-*N*-acetil-D,L-penicillamin (SNAP) pedig a Calbiochem, Germany terméke volt. A cetirizint az UBC Pharma, Germany forgalmazta.

4.18. Statisztikai módszerek

Valamennyi eredményünket átlag ± átlag standard hibája (SEM) értékek formájában határoztuk meg. Eredményeink statisztikai elemzéséhez az SPSS, illetve a Statistica 12 és 13 programokat használtuk. A csoportok eloszlásának jellegéről a Shapiro-Wilk teszt segítségével bizonyosodtunk meg. Ennek eredményétől függően a csoportokat Student-féle t-próbával vagy Mann-Whitney U teszt segítségével hasonlítottuk össze. Az állatok metabolikus paramétereinek kiértékelésére, *in vivo* véráramlás vizsgálataink során az anyagok különböző koncentrációinak hatására mért válaszreakciók, illetve ezek ismételt applikációinak és topikális vagy szisztémás előkezelést megelőzően és azt követően mért hatásainak összehasonlítására, valamint az *ex vivo* CGRP és hisztamin felszabadulás kiértékelésére egy szempontos variancia analízist (ANOVA) alkalmaztunk Fisher, Tukey vagy Bonferroni post hoc teszttel kiegészítve. Eredményeinket p < 0,05 érték mellett tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

5. MENINGEÁLIS KEMOSZENZITÍV AFFERENSEK ÉS EXTRAKRANIÁLIS KOLLATERÁLISAIK MORFOLÓGIAI AZONOSÍTÁSA ÉS FUNKCIONÁLIS JELLEMZÉSE

5.1. Bevezetés

Az elmúlt néhány évtized során számos szerv esetében igazolták a kemoszenzitív primer szenzoros idegek jelenlétét, valamint ezen idegek nocicepcióban és lokális véráramlás szabályozásban betöltött szerepét (Domoki és mtsai., 2003; Holzer és mtsai., 1991; Hottenstein és mtsai., 1991; Hughes és Brain, 1994; Liu és mtsai., 1992; Rózsa és mtsai., 1984; Vass és mtsai., 1995). Bár a migrén patomechanizmusának vizsgálata kapcsán is felmerült a dura matert innerváló capsaicin szenzitív, TRPV1 receptort expresszáló afferensek lehetséges szerepe, ezek létezésének igazolására tett erőfeszítések a 2000-es évek elejéig nem jártak sikerrel (Peitl és mtsai., 1999) annak ellenére, hogy korábban kísérleti állatokban a dura mater elektromos ingerlésével kiváltott vazodilatáció hátterében CGRP felszabadulást igazoltak (Kurosawa és mtsai., 1995). A Jancsó Gábor professzor vezetésével működő funkcionális neuromorfológiai laboratóriumunkban éppen ebben az időszakban kezdtünk foglalkozni a trigeminális kemoszenzitív primer szenzoros neuronok nociceptív folyamatokban és vaszkuláris reakciókban betöltött szerepének tanulmányozásával. Így a korábbi sikertelen próbálkozások ismeretében igazi kihívást jelentett számunkra olyan funkcionális és morfológiai megközelítést találni, ami segíthet azonosítani a dura materben is ezt a fontos, a migrén patofiziológiájának szempontjából is feltételezhetően jelentős nociceptív neuron populációt.

Míg a kísérletes orvostudomány szempontjából a TRPV1 receptorokat expresszáló kemoszenzitív neuronpopuláció meningeális nocicepcióban betöltött szerepének igazolása, addig a klinikai orvostudomány szempontjából ezen afferensek fiziológiás/patofiziológiás körülmények közötti aktiválhatósága a központi kérdés. A fejfájások patogenezisével kapcsolatban korábban felmerült a perikraniális szöveteket innerváló afferensek lehetséges szerepe is. Klinikai és kísérletes megfigyelések igazolták, hogy a perikraniális szövetek nociceptív ingerekkel történő stimulációja, különösen a temporális és okcipitális-cervikális régióban fejfájást válthat ki, illetve részt vehet a perifériás szenzitizáció folyamatában (Burstein és mtsai., 2006; Calhoun és mtsai., 2010; Jensen, 1993). Ezek a megfigyelések egybecsengenek azokkal a klasszikus intraoperatív megfigyelésekkel is, melyek során igazolták, hogy nem csak kizárólag az intrakraniális szövetek ingerlése, hanem extrakraniális struktúrák, mint a perikraniális izmok és ezek artériáinak ingerlése is fejfájást eredményez

(Ray és Wolff, 1940). Kosaras és munkatársai kísérletes körülmények között egerekben mutattak ki olyan peripherin- és CGRP-immunreaktív idegrostokat, melyek áthatolnak a koponyacsonton és összeköttetést biztosítanak a galea aponeurotica és a meningeális szövetek között (Kosaras és mtsai., 2009). Hasonló összeköttetések létezését emberben Luschka igazolta (von Luschka, 1856).

Kísérleteink során célul tűztük ki a dura matert innerváló kemoszenzitív neuronpopuláció létezésének és meningeális nociceptív folyamatokban betöltött szerepének igazolását, valamint annak bizonyítását, hogy ezek az afferensek extrakraniális kollaterálisokkal is rendelkeznek és morfológiai alapját képezhetik az extrakraniális szövetek felől érkező stimulusok és a koponyán belül érvényesülő hatások integrációjának és a következményes nociceptív reakcióknak. Kísérleteink során olyan endogén anyagok hatásait is vizsgáltuk, melyek a nociceptorok aktivációjához vezethetnek és így migrénes betegek esetében a perifériás és centrális szenzitizáció folyamataiban is szerepet játszhatnak. Kísérleteink során olyan endogén vanilloidok TRPV1 receptorokon kifejtett hatását vizsgáltuk a trigeminális rendszerben, melyek jelenlétét korábban hátsógyöki ganglionokban igazolták. Vizsgáltuk ezen anyagok kettős hatásának következményeit is; a trigeminális afferensek által expresszált TRPV1 és CB1 receptorokon kifejtett hatások összegződését és ennek nociceptor funkciót befolyásoló következményeit.

5.2. Alkalmazott módszerek

Kísérleteink során kontroll és capsaicin deszenzibilizált (**Módszerek 4.2**.) patkányokban *in vivo* lézer Doppler módszerrel tanulmányoztuk endogén és exogén vanilloidok topikális applikációját követő meningeális véráramlás változásokat, illetve a TRPV1 receptorok és a következményes CGRP felszabadulás szerepét az így kiváltott véráramlás változásokban (**Módszerek 4.5**.). *Ex vivo* kísérletekben vizsgáltuk az intra- és extrakraniális afferensek kémiai, illetve elektromos stimulációjával kiváltott intrakraniális CGRP felszabadulást (**Módszerek 4.6**.). A meningeális afferensek extrakraniális kollaterálisait, valamint ezen neuronok trigeminális ganglionban elfoglalt helyét és agytörzsi trigeminusz magba történő projekcióját az extrakraniális szövetek felől történő retrográd axonális transzport segítségével mutattuk ki (**Módszerek 4.12**.). Az extra- és intrakraniális szövetek irányából transzportálódó két különböző fluoreszcens festékkel jelölt tracer segítségével a trigeminális ganglionban olyan neuronokat kerestünk, melyek mindkét perifériás területen

afferens végződésekkel rendelkeztek. A kemoszenzitív trigeminális afferensek létezésének direkt morfológiai bizonyítására elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk (**Módszerek 4.13.**), a TRPV1 receptor és a vazodilatátor neuropeptid CGRP kolokalizációját a meningeális afferensekben immunhisztokémiai festéssel igazoltuk (**Módszerek 4.14.**).

5.3. Eredmények

5.3.1. Capsaicin hatása a meningeális véráramlásra

A capsaicin a TRPV1 (capsaicin) receptor archetipikus exogén agonistája. Ezért in vivo kísérleteinkben lézer Doppler véráramlás méréssel kontroll állatokban teszteltük különböző koncentrációjú (10 nM - 10 μM) capsaicin oldatok dura mater felszínére történő topikális applikációjának meningeális véráramlásra kifejtett hatását **(3. ábra)**.



3. ábra. In vivo véráramlás mérés kísérleti elrendezése patkányban.

10 nM capsaicin oldat 5 perces topikális applikációját követően még nem, de a koncentráció emelésével a véráramlás szignifikáns mértékű emelkedését mértük. Az emelkedés 50 nM-os capsaicin oldat esetében a bazális véráramlás 6,4 \pm 2,1 %-a, 100 nM capsaicin oldat applikációját követően pedig 12,8 \pm 3,5 %-a volt. A véráramlás minden esetben az applikáció 2.-3. percében érte el a maximumot **(4. ábra A, C)**. Tovább emelve a capsaicin koncentrációját, a meningeális véráramlás csökkenését figyeltük meg, amely az applikáció 2. percében volt a legnagyobb mértékű. 1 μ M capsaicin oldat hatására 7,2 \pm 1,4 %-os, 10 μ M-os oldat applikációját követően pedig 18 \pm 2,3 %-os véráramlás csökkenést mértünk **(4. ábra B, C)**. A capsaicin applikációjával kiváltott hatás minden koncentráció esetében ismételhető volt, de a magas, 10 μ M capsaicin egyetlen 5 perces applikációja is

gátolta a továbbiakban az alacsonyabb koncentrációk vazodilatátor hatását. Ezen információ birtokában ebben a kísérlet sorozatban és a későbbiekben is, a capsaicin oldatokat mindig emelkedő koncentrációban teszteltük. Az állatok átlagos artériás vérnyomását a topikális capsaicin applikáció nem befolyásolta.



4. ábra. Különböző koncentrációjú capsaicin oldatok applikációjának hatása a meningeális véráramlásra. Lézer Doppler áramlásmérővel mért eredeti regisztrátumok 100 nM (**A**) és 10 μM (**B**) capsaicin topikális applikációját követően. Capsaicin oldatok 5 perces applikációja alatt mért átlagos véráramlás változások (**C**, átlag ± SEM, n=6-10). Egy szempontos ANOVA-t követő Tukey teszt.*: szignifikánsan eltér a bazális véráramlás értéktől. **PU**: perfúziós egység.

Nagy dózisú capsaicin szisztémás adásával deszenzibilizált patkányokban az alacsonyabb koncentrációjú, kontroll állatokban vazodilatátor hatású capsaicin véráramlás fokozó hatása nem volt megfigyelhető, míg a nagy dózisú capsaicin vazokonstriktor hatása változatlanul fennállt, sőt 1 μ M capsaicin oldat estében még meg is haladta a kontroll állatokban mért értéket. Deszenzibilizált állatokban az 50 nM-os capsaicin oldat mindössze 3 ± 2,4 % véráramlás fokozódást váltott ki. A capsaicin oldat 100 nM koncentrációban 0,6 ± 1,4 %, 1 μ M koncentrációban 19,2 ± 3,8 %, 10 μ M koncentrációban pedig 27,7 ± 6,2 % véráramlás csökkenést eredményezett **(5. ábra)**.



5. ábra. Szisztémás capsaicin deszenzibilizáció hatása a capsaicin meningeális véráramlásra kifejtett hatására. Az oszlopok kontroll és szisztémás capsaicin deszenzibilizáción átesett állatok 5 perces capsaicin applikációs periódusának 3. percében mért véráramlás értékeit ábrázolják (átlag ± SEM, n=5-7). Egy szempontos ANOVA-t követő Tukey teszt. *: szignifikánsan eltér a kontroll állatokban mért átlagos véráramlás változástól.

5.3.2. A dura mater tranziens receptor potenciál vanilloid 1 receptort expresszáló kemoszenzitív afferenseinek morfológiai és funkcionális azonosítása

Az a tény, hogy az állatok capsaicin deszenzibilizációja gátolta a capsaicin véráramlás fokozó hatását, valószínűsítette a kemoszenzitív afferensek szerepét ebben a folyamatban. Abból a célból, hogy feltételezésünk további igazolást nyerjen, kontroll állatok dura materét előkezeltük a TRPV1 receptor antagonista capsazepinnel. Capsazepin (10 μ M) applikációja nem befolyásolta a bazális véráramlást, capsazepin előkezelést követően azonban a 100 nM koncentrációjú capsaicin oldat véráramlás fokozódás helyett kismértékű véráramlás csökkenést váltott ki (5,7 ± 0,8 %). A CGRP receptorok CGRP₈₋₃₇ peptiddel (10 μ M) történő blokkolása önmagában szintén nem változtatta meg a meningeális véráramlást, de előkezelés formájában megszüntette az azt követően applikált capsaicin (100 nM) vazodilatátor hatását. A CGRP receptorok blokkolása a TRPV1 receptorok gátlásához hasonlóan átfordította a 100 nM-os capsaicin oldat vazodilatátor hatását kismértékű



6. ábra. A TRPV1 receptor antagonista capsazepin és a CGRP receptor antagonista CGRP₈₋₃₇ **topikális applikációjának hatása a capsaicin vazodilatátor hatására kontroll állatokban.** Az oszlopok az 5 perces capsaicin applikáció alatt mért meningeális véráramlás értékeket ábrázolják (átlag ± SEM, n=5-6). Egy szempontos ANOVA-t követő Tukey teszt. *: szignifikánsan eltér a capsaicin hatására az antagonista applikációját megelőzően mért átlagos véráramlás értékektől. **CGRP**₈₋₃₇: kalcitonin génrokon peptid 8-37 fragmentum.

In vivo véráramlás méréseink eredményét alátámasztották *ex vivo* dura mater preparátumban nyert capsaicin oldattal kiváltott CGRP felszabadulásra vonatkozó méréseink eredményei is. Dura mater preparátumokban a SIF applikációja mellett mért bazális CGRP felszabadulás 18,6 ± 2 pg/ml volt. Capsaicin (10 μ M) a CGRP felszabadulást 61 ± 11,7 pg/ml-re fokozta **(7. ábra)**.



7. ábra. Capsaicin hatása a CGRP felszabadulásra *ex vivo* dura mater preparátumban. *Ex vivo* patkány koponya preparátum (**A**) és 10 μM capsaicin applikáció hatása a meningeális afferensekből felszabaduló CGRP koncentrációjára (**B**, átlag ± SEM, n=8). Student-féle egymintás t-próba. *: szignifikánsan eltér a kontroll (SIF) értéktől. **SIF**: szintetikus intersticiális folyadék, **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid.

Funkcionális vizsgálataink sikerét követően, melyek során igazoltuk a dura matert innerváló kemoszenzitív neuronokból felszabaduló CGRP vazodilatátor hatását, direkt

morfológiai módszerrel, a capsaicin szelektív neurotoxikus hatását kihasználva, az axonok finomszerkezetében capsaicin hatására bekövetkező degeneratív változások elektronmikroszkópos kimutatásával is megkíséreltük azonosítani ezeket az afferenseket. Kontroll dura mater preparátumokban, melyeket a capsaicin oldószerével inkubáltunk, semmilyen patológiás elváltozást nem találtunk sem a velős, sem a velőtlen idegrostok morfológiájában. Ezzel szemben a capsaicin 10 µM-os oldatában 10 percig inkubált szövetmintákban a velőtlen rostok egy csoportjában feltűnő szerkezeti módosulásokat figyeltünk meg. Ezek a szerkezeti változások jellemzően az axonok degenerációjára utaltak: az érintett velőtlen axonok axoplazmáját amorf elektrondenz anyag töltötte ki, az axonok jellegzetes strukturális elemei nem voltak felismerhetőek. A capsaicinnel kezelt dura minták velős rostjai egyetlen esetben sem mutattak szerkezeti eltérést. Egyéb szöveti elemek mind a kontroll, mind a capsaicinnel kezelt dura mintákban épek voltak (8. ábra).



8. ábra. Capsaicin hatására bekövetkező finomszerkezeti változások a dura mater velőtlen axonjaiban. *In vitro* oldószer (A) és 10 μM capsaicin (B, C) hatása patkány dura mater velős (nyílvég) és velőtlen (nyíl) axonjainak morfológiájára. Elektronmikroszkópos vizsgálattal capsaicin kezelést követően néhány velőtlen axon ozmiofil degeneráció jeleit mutatta. A nagy nagyítású felvételen a nyíl degenerálódó axonra mutat. Kontroll mintákban oldószer kezelést követően hasonló morfológiai elváltozást nem tapasztaltunk. A és B nagyításai megegyeznek.

Immunhisztokémiai vizsgálatainkban kontroll állatok dura mater preparátumait TRPV1 receptor ellenes és CGRP ellenes primer antitestekkel, majd a megfelelő másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Az arteria meningea media ágait kísérő idegrost kötegek jelentős hányadában figyeltük meg a TRPV1 receptor és a vazodilatátor hatású neuropeptid kolokalizációját. Az immunreaktív axonok nem csak az erek közelében, hanem azoktól távolabb is, a dura mater kötőszövetes állományában, egyes rostok formájában is megfigyelhetőek voltak **(9. ábra)**.



9. ábra. TRPV1 és CGRP immunreaktív idegek patkány dura mater preparátumban. AMM: arteria meningea media, **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid, **TRPV1**: tranziens receptor potenciál vanilloid 1.

5.3.3. Endovanilloidok hatása a dura mater vaszkuláris reakcióira

A kemoszenzitív/capsaicin szenzitív meningeális afferensek létezésének funkcionális és morfológiai igazolását követően vizsgáltuk ezek endogén eredetű anyagok iránti érzékenységét is. Kísérleteink során olyan endogén vanilloidokat teszteltünk, melyek jelenlétét hátsó gyöki ganglionokban korábban kimutatták.

Stimulus	Koncentráció	Véráramlás változás (%)
NADA	10 nM	7,4 ± 2*
(n=8-10)	100 nM	24 ± 4,7*
	1 μM	-7,7 ± 4,3
Anandamid	100 nM	3,4 ± 1,5
(n=6-11)	1 μM	2,5 ± 1*
	10 µM	-2,1 ± 0,8*

3. táblázat. NADA és anandamid topikális applikációjának hatása a meningeális véráramlásra. Egy szempontos ANOVA-t követő Bonferroni teszt. *: szignifikánsan eltér a bazális véráramlás értéktől. **NADA**: *N*-arachidonoil-dopamin.

Az endovanilloid NADA topikális applikációja (10-100 nM) a dura materben dózisfüggő, szignifikáns véráramlás fokozódást okozott. A véráramlás emelkedés mértéke a

bazális véráramláshoz viszonyítva 7,4 \pm 2 %, illetve 24 \pm 4,7 % volt a két különböző koncentráció esetében. Ezzel szemben a NADA 1 μ M koncentrációban 7,7 \pm 4,3 %-kal csökkentette a meningeális véráramlást **(3. táblázat)**.

Korábbi megfigyeléseinkkel összhangban, capsaicin deszenzibilizált állatokban, melyekben a capsaicin (100 nM) applikációjával véráramlás fokozódás nem volt kiváltható, a NADA (100 nM) applikációja is véráramlás fokozódás helyett kismértékű csökkenést (0,9 ± 1,2 %) eredményezett **(10. ábra)**.



10. ábra. Capsazepin és CGRP₈₋₃₇ előkezelés, valamint az állatok szisztémás capsaicin deszenzibilizációjának hatása a NADA véráramlás fokozó hatására. Az oszlopok a 3 perces NADA applikáció alatt mért meningeális véráramlás értékeket ábrázolják (átlag ± SEM, n=8-13). Egy szempontos ANOVA-t követő Bonferroni teszt. *: szignifikánsan eltér a NADA applikációval antagonista előkezelés nélkül kiváltott véráramlás értékektől, #: szignifikánsan eltér a kontroll állatokban mért értéktől. NADA: *N*-arachidonoil-dopamin, CGRP₈₋₃₇: kalcitonin gén-rokon peptid 8-37 fragmentum.

Annak igazolására, hogy a NADA által kiváltott véráramlás fokozódás a TRPV1 receptorok stimulációjával, CGRP felszabadulás révén kiváltott folyamat, *in vivo* véráramlás modellünkben vizsgáltuk a TRPV1 receptor antagonista capsazepin (10 μM) és a CGRP receptor antagonista CGRP₈₋₃₇ (10 μM) topikális előkezelés hatását a NADA (100 nM) által kiváltott véráramlás fokozódásra. Maguk a gátlószerek ebben a mérés sorozatban sem voltak hatással a meningeális véráramlásra, de a NADA vazodilatátor hatását jelentős mértékben csökkentették, illetve kivédték. Capsazepin applikációját követően a NADA mindössze 2,2 ± 3,3 % perfúzió fokozódást, a CGRP receptor antagonista applikációját követően pedig 4,8 ± 1,4 %-nyi perfúzió csökkenést eredményezett **(10. ábra)**.

Ex vivo dura mater preparátumban a NADA (100 nM) hasonlóan az exogén vanilloid capsaicin hatásához, szignifikáns mértékű CGRP felszabadulást váltott ki a meningeális afferensekből, mely a bazális felszabadulás 140,3 ± 16,2 %-a volt. A NADA CGRP-t felszabadító hatásának tesztelését követően minden preparátumban meggyőződtünk a kemoszenzitív nociceptorok funkcióképes állapotáról. Ebből a célból 100 nM capsaicin oldatot használtunk, ami átlagosan a bazális érték 328,8 ± 63,6 %-ára emelte a CGRP felszabadulást. Ez az érték megfelelt az általunk korábbi kísérletekben kontroll állatok dura mater preparátumaiban mért CGRP felszabadulás mértékének **(11. ábra)**.



11. ábra. Az endovanilloid NADA hatása a meningeális CGRP felszabadulásra. Az oszlopok a koponyafelekben SIF applikációja mellett mért bazális CGRP felszabadulás százalékában ábrázolják a NADA és a capsaicin applikációjával kiváltott CGRP felszabadulást (átlag ± SEM, n=11). Egy szempontos ANOVA-t követő Bonferroni teszt. *: szignifikánsan eltér a SIF CGRP felszabadító hatásától. NADA: *N*-arachidonoil-dopamin, **SIF**: szintetikus intersticiális folyadék, **CGRP**: calcitonin gén-rokon peptid.

A NADA hatásától eltérően a másik általunk tesztelt endogén vanilloid, az anandamid applikációja csupán elenyésző mértékű hatást gyakorolt a meningeális véráramlásra. A 100 nM és 1 μ M koncentrációjú anandamid oldatok 3,4 ± 1,5 % és 2,5 ± 1 % véráramlásfokozódást váltottak ki, míg a 10 μ M-os koncentrációjú oldat kismértékű (2,1 ± 0,8 %) véráramlás csökkenést eredményezett **(3. táblázat)**.

Annak érdekében, hogy tisztázzuk a primer afferenseken lokalizált CB1 receptorok neuropeptid felszabadulásra kifejtett esetleges módosító hatását, a dura matert előkezeltük a CB1 receptor antagonista 1-(2,4-diklórfenil)-5-(4-jódfenil)-4-metil-*N*-1-piperidinil-1*H*-

pirazol-3-karboxamid (AM 251) 100 μ M koncentrációjú oldatával. Az anandamid 10 μ M koncentrációban csak a CB1 receptorok blokkolását követően okozott kismértékű, de szignifikáns vazodilatációt (a bazális véráramlás 4,1 ± 0,6 %-a). Ez a vazodilatáció egyértelműen az afferensekből felszabaduló CGRP hatásának következménye volt, mivel azt a CGRP receptor antagonista teljes mértékben kivédte. A CB1- és a CGRP receptorok egyidejű blokkolása mellett az anandamid (10 μ M) 1,1 ± 1,8 % véráramlás csökkenést váltott ki **(12. ábra)**.



12. ábra. A CB1- és CGRP receptorok gátlásának hatása az anandamid vazodilatátor hatására. A lézer Doppler véráramlásmérővel rögzített eredeti regisztrátum (**A**) és a véráramlásváltozások statisztikai kiértékelése (**B**) mutatja az anandamid által CB1 receptor antagonista (AM 251) applikációját megelőzően és azt követően, illetve CB1- és CGRP receptor antagonisták együttes alkalmazását követően kiváltott véráramlás változásokat (átlag ± SEM, n=6-10). Egy szempontos ANOVA-t követő Bonferroni teszt. *: szignifikánsan eltér az anandamid CB1 receptor gátlást követően mért véráramlás fokozó hatásától. **CGRP₈₋₃₇**: kalcitonin gén-rokon peptid 8-37 fragmentum. **PU**: perfúziós egység.

Ex vivo dura mater modellünkben az anandamid (10 μ M) koncentrációban a CGRP felszabadulást 22,2 ± 9,6 %-kal fokozta, CB1 receptor antagonista előkezelést követően a CGRP felszabadulás mértéke jelentősen, a bazális érték 170,4 ± 23,7 %-ára emelkedett **(13. ábra)**.



13. ábra. Anandamid hatása a meningeális afferensekből történő CGRP felszabadulásra. Az oszlopok a koponyafelekben SIF applikációja mellett mért bazális CGRP felszabadulás százalékában ábrázolják az anandamid és a CB1 receptor antagonista AM 251 és anandamid kombinációjával kiváltott CGRP felszabadulást (átlag ± SEM, n=10). Egy szempontos ANOVA-t követő Bonferroni teszt. *: szignifikánsan eltér a SIF CGRP felszabadító hatásától. #: szignifikánsan eltér az anandamid CGRP felszabadító hatásától. SIF: szintetikus intersticiális folyadék, CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid.

5.3.4. Meningeális afferensek extrakraniális kollaterálisainak szerepe a trigeminovaszkuláris érreakciókban és a kalcitonin gén-rokon peptid felszabadulásában

Annak igazolására, hogy az intrakraniális meningeális afferensek a koponyacsontok preformált nyílásain áthaladó és az extrakraniális szöveteket innerváló kollaterálisokkal rendelkeznek, az extrakraniális szövetekbe applikált, retrográd axonális transzport útján az eredő sejttestekbe jutó jelölő anyagokat használtunk. Alacsony molekulasúlyú dextrán-konjugátumok musculus temporalis alatti csonthártyára történő applikációját követően olyan jelölődött idegkötegeket azonosítottunk, melyek az os occipitale és az os temporale szuturáin és az emissarium vénák áthaladására szolgáló nyílásain keresztül léptek be a koponyaüregbe. A penetráló idegrostok a középső koponyagödör területén a parietális durában voltak kimutathatók, követték az arteria meningea media ágait a ganglion trigeminale irányába, lefutásuk során sok esetben vékonyabb kötegekre és egyedülálló rostokra ágazódtak, amelyek főként az artériák közelében, de az erektől távolabbi területeken is kimutathatóak voltak (**14. ábra**).



14. ábra. Meningeális afferensek extrakraniális kollaterálisainak kimutatása. A dextrán amin (Tracer) jelölő anyag applikációjának helye a musculus temporalis alatt fekvő csonthártyára (**A**). A retrográd úton transzportálódó jelölő anyag kimutatása DAB reakcióval a dura materben számos idegrostot és rost köteget tett láthatóvá (**B, C**). **B**: A dura materbe az emissarium vénák mentén belépő idegrost kötegeket * jelöli, a belépési pontoktól rosztrális irányba haladó rostkötegeket nyilak mutatják. **vv**: véna. **C**: Az extrakraniális szövet irányából retrográd módon jelölt idegrost köteg (nyíllal jelölve) csatlakozik az arteria meningea media ágaihoz (**mma**, a jobb láthatóság érdekében az artéria ágakat körülrajzoltuk).

A ganglion trigeminale-ban azonosított, retrográd transzport útján jelölődött neuronok többnyire a nervus trigeminus ramus mandibularis-ának megfelelően, ritkábban a ramus maxillaris területén voltak megfigyelhetőek. A ramus ophthalmicus-nak megfelelő terület egyetlen kísérlet esetében sem tartalmazott jelölt neuronokat. Egy-egy állat trigeminális ganglionjában általában 30-45 visszajelölt sejtet találtunk **(15. ábra)**.



15. ábra. Texas Red fluoreszcens festékkel konjugált dextrán amin retrográd transzportja a ganglion trigeminale neuronjaiba. A felvétel a ganglion totálpreparátumában mutatja a tracert transzportáló nervus spinosust (**N. spinosus**), valamint a jelölődött neuronokat, melyek a nervus trigeminus ramus maxillaris-ának (**V2**) és ramus mandibularis-ának (**V3**) megfelelően voltak kimutathatók. A ganglion kontúrját és a V2, V3 régiókat pontozott vonal jelöli.

Azokban az állatokban, melyekben Texas red-del konjugált dextrán amint használtunk, transzganglionáris jelölődést tudtunk kimutatni az ipszilaterális nucleus tractus spinalis nervi trigemini területén, a trigeminusz mag caudális részén. Jelölődést az agytörzsnek mind a felszínes (I és II lamina), mind a mélyebb rétegeiben megfigyeltünk. Jelölődést sem a kontralaterális oldalon, sem a C1-C3 cervikális gerincvelő területén nem láttunk **(16. ábra)**.



16. ábra. Idegi struktúrák transzganglionáris jelölődése a nucleus spinalis nervi trigemini területén. Az agytörzs hosszanti metszetén (A) a canalis centralis-t * jelöli, a tractus spinalis nervi trigemini (TrV) és az agytörzsi laminák (I/II, III/IV) határait szaggatott vonal ábrázolja. B, C és D a transzganglionárisan jelölődött struktúrák helyzetét jelzi. A sematikus rajz az agytörzs kontúrját és ezen belül a nucleus tractus spinalis nervi trigemini nucleus interpolaris (SpVi), nucleus tractus spinalis nervi trigemini nucleus caudalis (SpVc) és а cervikális gerincvelői szegmentumok (C1-3) ábrázolja. helyzetét B, C és D: transzganglionárisan jelölődött agytörzsi neuronális struktúrák nagy nagyítású képe.

A musculus temporalis és a parietális dura mater eltérő fluoreszcenciát mutató kettős jelölésével ki tudtunk mutatni olyan neuronokat a ganglion trigeminale területén, melyek

mindkét festéket tartalmazva egyértelműen igazolták, hogy a primer szenzoros neuron mindkét perifériás struktúrában afferensekkel rendelkezik **(17. ábra)**.



17. ábra. Intrakraniális és extrakraniális végződéssel egyaránt rendelkező neuronok identifikálása a ganglion trigeminale területén. A konfokális mikroszkóppal készült felvételen a musculus temporalis (Temp. muscle) irányából Texas red-del jelölt tracer-t (piros), a parietális dura mater (Dura mater) irányából Rhodamin green-nel jelölt tracert (zöld) transzportáló és mindkét tracert tartalmazó (sárga) sejtek láthatók. A nyílhegy a musculus temporalis irányából Texas red-del jelölt tracert szállító axonra mutat.

Az intra- és extrakraniális struktúrák közötti axon kollaterálisok útján megvalósuló kommunikáció morfológiai módszerrel történő igazolását követően arra voltunk kíváncsiak, hogy az extrakraniális axonok stimulációjával ki tudunk-e váltani neuropeptid felszabadulást az intrakraniális szövetekből? Stimulusként a musculus temporalist elektromos impulzusokkal ingereltük (1 ms, 5 mA, 10 Hz), amit *ex vivo* dura mater preparátumunkban szignifikáns mértékű CGRP felszabadulás követett (bazális CGRP felszabadulás: 10,6 ± 1,8 pg/ml, stimulált 33,8 ± 5,6 pg/ml). A kemoszenzitív afferensek szelektív stimulálása céljából a musculus temporalisba injektált 20 μ l 1 μ M capsaicin oldat 20,5 ± 3 pg/ml-ről 45,6 ± 8,6 pg/ml-re emelte a CGRP felszabadulást **(18. ábra A)**, a musculus splenius és musculus longissimus capitis tapadási pontjainak közelébe injektálva a capsaicin ugyanilyen koncentrációban 16 ± 1,7 pg/ml-ről 31,5 ± 4,8 pg/ml-re emelte a CGRP felszabadulást **(18. ábra B)**.



18. ábra. Extrakraniálisan alkalmazott stimulusok hatásának vizsgálata az intrakraniális végződések CGRP felszabadító képességére. A görbék a musculus temporalis elektromos ingerlését és capsaicin stimulációját (A) valamint a tarkó izmok capsaicin stimulációját (B) megelőzően és azt követően mért CGRP koncentrációkat ábrázolják (átlag ± SEM, n=11-17). Egy szempontos ANOVA-t követő Tukey teszt. *: szignifikánsan eltér a stimulust megelőzően mért CGRP koncentrációtól. SIF: szintetikus intersticiális folyadék, CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid.

Az extrakraniális kollaterálisok stimulációjával kiváltott intrakraniális CGRP felszabadulás meningeális véráramlásra gyakorolt hatását *in vivo* modellünkben teszteltük. A parietális helyzetű koponyaablakban szabaddá tett arteria meningea media ágai fölött meghatároztuk a bazális véráramlást, majd az azonos oldali musculus temporalisba fiziológiás sóoldat 20 µl-ét injektáltuk, ami nem befolyásolta a meningeális véráramlást (1,8 ± 2 % véráramlás növekedést mértünk). Capsaicin 1 µM-os oldatának injekciója azonban szignifikánsan megemelte a szöveti perfúziót a bazális véráramlás 7,6 ± 1,5 %-ával. Annak céljából, hogy kizárjuk az esetleges paraszimpatikus aktiváció következtében fellépő vazodilatációt, néhány kísérletben a ganglion blokkoló hexamethonium kloridot adtuk intravénásan az állatoknak a capsaicin injekcióját megelőzően, ami - bár az állatok átlagos artériás vérnyomásának 16,3 ± 10,2 %-os csökkenését eredményezte - alapvetően nem módosította az intramuszkulárisan adott capsaicin vazodilatátor hatását (7,2 ± 1,1 % véráramlás fokozódás). A dura mater CGRP receptor antagonista CGRP₈₋₃₇ (100 μM) előkezelése ellenben megszüntette az extrakraniális capsaicin injekció véráramlás fokozó hatását. A CGRP receptorok gátlását követően az izomba injektált capsaicin átlagosan 1,2 ± 1,5 %-kal csökkentette a bazális véráramlást **(19. ábra)**. Eredményeink egyértelműen igazolták, hogy az extrakraniális izmok és az alattuk fekvő perioszteum kémiai stimulációja az intrakraniális kemoszenzitív afferensekből történő CGRP felszabadítása révén véráramlás fokozódást vált ki.



19. ábra. Extrakraniális szövet stimulációjával kiváltott meningeális véráramlás változások (átlag ± SEM, n=9-14). Egy szempontos ANOVA-t követő Tukey teszt. *: szignifikánsan eltér a musculus temporalisba injektált 1 μ M-os capsaicin véráramlás fokozó hatásától. **CGRP**₈₋₃₇: kalcitonin gén-rokon peptid 8-37 fragmentum.

5.4. Megbeszélés

A vazodilatátor hatású szenzoros neuropeptid CGRP migrén patogenezisében betöltött szerepét számos klinikai megfigyelés támasztja alá. Klinikai vizsgálatok és kísérletes megfigyelések számos adatot szolgáltattak arra vonatkozóan, hogy a CGRP szöveti- illetve vérben mérhető koncentrációjának emelkedése és a fejfájás jelentkezése párhuzamba állítható, míg a CGRP felszabadulás/hatás gátlása a migrén terápiájában is kiemelt jelentőséggel bír (Barbanti és mtsai., 2017; Benemei és mtsai., 2017; Messlinger, 2018; Wrobel Goldberg és Silberstein, 2015). A korábbi vizsgálatok során a trigeminális dc_1628_19

kemoszenzitív afferensek nocicepcióban és meningeális véráramlás szabályozásban betöltött szerepének bizonyítását valószínűleg nehezítette az a tény, hogy a CGRP nem csak kemoszenzitív neuronokban fordul elő, hanem ahogyan a legtöbb szövet esetében, egyéb szenzoros funkcióval rendelkező afferensek is tartalmazzák (Carr és Frings, 2018; Carr és Lipkowski, 1990; Kang és mtsai., 2010). Ennek ismeretében nem meglepő, hogy a dura mater elektromos ingerlésével kiváltott vazodilatációt, melynek hátterében valamennyi peptiderg afferens aktivációja áll, sem az állatok capsaicin deszenzibilizációja (Peitl és mtsai., 1999) sem a szisztémásan adott capsazepin (Akerman és mtsai., 2003) nem tudta jelentősen befolyásolni. A dura mater elektromos ingerlése a kemo/capsaicin inszenzitív idegrostokból capsaicin deszenzibilizációt, illetve a TRPV1 receptor antagonista capsazepin szisztémás adását követően is olyan jelentős mennyiségű CGRP felszabadulást eredményezhet, ami a meningeális erek maximális vazodilatációját kiváltva elfedheti a capsaicin szenzitív afferensek hiányát.

Elektronmikroszkópos vizsgálataink során a nagy dózisú capsaicin hatására a velőtlen afferesek egy részében megfigyelhető degenerációra utaló morfológiai jelek egyértelműen igazolták az érintett idegrostok capsaicin érzékenységét (vö. Király és mtsai., 1991). In vivo véráramlás modellünkben illetve ex vivo dura mater preparátumunkban a kemoszenzitív afferensek stimulációjával CGRP felszabadulást és következményes meningeális véráramlás fokozódást tudtunk igazolni. A TRPV1 receptor és a CGRP kolokalizációját a dura mater afferenseiben immunhisztokémiai vizsgálataink eredménye is megerősítette. Véráramlás vizsgálataink ugyanakkor igazolták a TRPV1 receptor agonista capsaicin kettős hatását a meningeális artériákon. Kísérletes körülmények között az afferensekből felszabaduló CGRP vazodilatátor hatása mellett számolnunk kell a capsaicin vazokonstriktor hatásával is, ami a vaszkuláris simaizmon expresszálódó TRPV1 receptorok, illetve egyéb Ca²⁺-csatornákon kifejtett capsaicin hatás eredménye lehet (Duckles, 1986; Kark és mtsai., 2008; Pórszász és mtsai., 2002; Toda és mtsai., 1972). A capsaicin CGRP felszabadulás révén kiváltott vazodilatátor és közvetlen vazokonstriktor hatása az alkalmazott capsaicin koncentráció függvényében együttesen határozza а szöveti perfúziót. А CGRP meg felszabadulásának/hatásának gátlása а kísérleti állatok szisztémás capsaicin deszenzibilizációjával, illetve a meningeális TRPV1- vagy CGRP receptorok topikális gátlása egyaránt felerősítette az artériák capsaicin hatására mutatott vazokonstriktor válaszát.

dc_1628_19

Hasonlóan kettős, a kemoszenzitív afferensekből történő CGRP felszabadulás révén kiváltott vazodilatációt és valószínűleg közvetlenül a vaszkuláris receptorokon kialakuló vazokonstriktor választ tapasztaltunk a trigeminális kemoszenzitív afferensek endogén vanilloidokkal történő stimulációját követően is. A trigeminovaszkuláris rendszer endogén vanilloidok iránti érzékenységének vizsgálatát az indokolta, hogy migrénes rohamban a membrán lipid metabolitként a szövetekben fiziológiás körülmények között is termelődő vanilloidok/kannabinoidok endogén feltételezhetően nagyobb valószínűséggel szerepelhetnek a kemoszenzitív neuronok TRPV1 receptorainak aktivátoraként, mint a hőmérséklet emelkedése, vagy a pH savas irányba történő eltolódása. Bár az endovanilloidok szenzoros neuronokban kimutatható koncentrációja igen alacsony (Pacher és mtsai., 2006), a szintézisért felelős enzim aktivitásának, vagy az endovanilloidok sejtmembránon keresztül történő transzportjának fokozódása a nociceptív afferensek és a meningeális hízósejtek interakciójaként kialakuló neurogén gyulladás okozta patofiziológiás körülmények között jelentősen megnövelheti a koncentrációjukat (McVey és mtsai., 2003).

Eredményeink azt mutatják, hogy az anandamid és a NADA eltérő vazoregulátor hatással rendelkezik a trigeminovaszkuláris rendszerben, aminek a hátterében az eltérő peptid felszabadító képességük áll. Míg a NADA jelentős, addig az anandamid elhanyagolható mértékű véráramlás fokozódást tudott kiváltani a meningeális ereken *in vivo* véráramlás modellünkben. Az eltérés oka valószínűleg a két anyag TRPV1 és CB1 receptorokon kifejtett eltérő hatáserőssége (Starowicz és mtsai., 2007). Az anandamid gyengébb vazodilatátor hatását a prejunkcionális CB1 receptorokon kifejtett erősebb hatása magyarázza, ami viszont intracelluláris mechanizmusok révén csökkenti a TRPV1 receptorok aktiválásával kiváltott CGRP felszabadulás mértékét (Ahluwalia és mtsai., 2003). Ezt a feltételezésünket igazolták azok az eredményeink, melyek során kimutattuk, hogy az anandamid CGRP felszabadító és vazodilatátor hatását jelentősen fokozza a CB1 receptorok előzetes blokkolása. Az ilyen módon kiváltott szignifikáns mértékű véráramlás fokozódás teljes egészében a megnövekedett CGRP felszabadulás eredménye volt, mivel a CGRP receptorok járulékos gátlása megszüntette a CB1 receptorok gátlása mellett megfigyelhető anandamid által kiváltott véráramlás fokozódást.

Funkcionális és morfológiai vizsgálataink eredményei egyértelműen igazolták, hogy a trigeminális nociceptorok aktiválódása/szenzitizálódása nem kizárólag az intrakraniális afferensek stimulációja útján, hanem ezek extrakraniális kollaterálisainak aktiválódása

következtében is létrejöhet. Ezek az extrakraniális axon kollaterálisok szenzoros információt továbbíthatnak a perikraniális szövetek felől a dura mater irányába, ami valószínűleg szerepet játszik a meningeális nocicepció folyamataiban és a perifériás neuropeptid felszabadulásban, ami az erek közelében vazodilatációt és véráramlás fokozódást vált ki. Az aktivált extrakraniális afferensek a koponyába lépve antidrómosan aktiválhatják a teljes intrakraniális axon hálózatot, ami kiterjedt neuropeptid felszabadulást eredményez. Az extrakraniális szövetekből retrográd transzportálódó jelölő anyag az arteria meningea media mentén haladó axon kötegeken keresztül egészen a trigeminális ganglionig követhető volt, ami egyértelműen igazolja ezeknek az axonoknak a trigeminális eredetét. A retrográd transzportálódó festék kimutatható volt az ipszilaterális nucleus tractus spinalis nervi trigemini nucleus caudalis-ának felszínes lamináiban, ami egyértelműen igazolta ezeknek a struktúráknak a nociceptív trigeminovaszkuláris rendszerhez való tartozását.

6. NITROGÉN-MONOXID ÉS NITROXIL SZEREPE A MENINGEÁLIS VÉRÁRAMLÁS SZABÁLYOZÁSÁBAN

6.1. Bevezetés

Az intrakraniális véráramlás szabályozásában a neuronokból felszabaduló vazoaktív peptidek mellett döntően metabolikus faktorok játszanak szerepet (Faraci és Heistad, 1991; Peterson és mtsai., 2011). A metabolikus faktorok közül valószínűleg a NO a legjelentősebb vazodilatátor, amely az artériák simaizom sejtjeiben solubilis guanilát-ciklázt aktiválva az intracelluláris cGMP mennyiségének emelése révén fejti ki simaizom relaxáló és következményes véráramlás fokozó hatását (Brian és mtsai., 1996; Buchanan és Phillis, 1993; Moncada és mtsai., 1988). A meningeális szövetekben normál körülmények között a NO fő forrása az artériák endotheliuma (Nemade és mtsai., 1995). Neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) aktivitás néhány trigeminális és paraszimpatikus eredetű axonban mutatható ki (Nozaki és mtsai., 1993). A NO folyamatos termelődésének döntő szerepe van a meningeális szövetek bazális perfúziójának biztosításában (Messlinger és mtsai., 2000). Gyulladásos folyamatok során a dura matert elárasztó makrofágokban jelentős mennyiségben expresszálódik a nitrogén-monoxid szintáz indukálható formája (iNOS), ami a szöveti NO termelést erősítve vesz részt a vaszkuláris reakciókban (Koedel és mtsai., 1995; Korytko és Boje, 1996; Reuter és mtsai., 2001).

dc_1628_19

A szervezetben NO-ot felszabadító nitroglicerin fejfájást indukáló hatása az 1800-as évek közepe óta ismert, az erről szóló első beszámoló magától a nitroglicerint feltaláló Ascanio Sobrero-tól származik (Marsh és Marsh, 2000). Bár ekkor még természetesen nem volt ismert a NO-dal való kapcsolata, a nitroglicerin erős vazodilatátor hatását már ebben az időszakban is kihasználták anginás panaszok enyhítésére. Az utóbbi évtizedek szisztémás vizsgálatai óta ismert, hogy nitroglicerin intravénás injekciója egészséges emberekben fejfájást provokál, migrénes betegekben pedig a spontán rohamokhoz nagyon hasonló migrénes fejfájást vált ki (Iversen és mtsai., 1989; Olesen és mtsai., 1994). A NO és a peptiderg meningeális afferensek együttműködésére utaló fontos megfigyelés volt a cluster fejfájásos betegekben nitroglicerinnel provokált fejfájás alatt mért emelkedett vérplazma CGRP koncentráció (Fanciullacci és mtsai., 1995). Ezen klinikai megfigyelések birtokában a vazodilatációt kiváltó meningeális NO felszabadulásra, mint a primer fejfájások patogenezisében jelentős tényezőre kezdtek tekinteni (Olesen és mtsai., 1994), a szöveti NO termelés és neuronális CGRP felszabadulás közötti lehetséges interakciót pedig mint a trigeminovaszkuláris rendszerben kialakuló perifériás szenzitizáció lehetséges mechanizmusát kezdték vizsgálni. Állatkísérletekben bizonyítható volt, hogy a meningeális afferensek elektromos ingerlésével kiváltott véráramlás fokozódás, ami igazoltan az afferensekből felszabaduló CGRP hatásának következménye, csökkenthető volt a NO szintézis gátlásával (Messlinger és mtsai., 2000).

A gáz halmazállapotú NO rövid életidejű, de igen reakcióképes molekula, amely a szövetekben további, biológiai funkcióval rendelkező metabolitok képzésében vesz részt. Oxidációja során nitrit- illetve nitrát ionok keletkeznek, szuperoxid gyökkel történő reakciója pedig lipidek peroxidációját kiváltó peroxinitrit képződéséhez vezet (Radi, 2018; Rocha és mtsai., 2011). Biológiai hatásainak köszönhetően az utóbbi időben kiemelt figyelem fordult a NO redox párja, az egy elektron felvételével képződő HNO felé (Fukuto és Carrington, 2011; Fukuto és mtsai., 2005). A HNO a kardiovaszkuláris rendszerben hatásos vazodilatátornak (Ellis és mtsai., 2000), pozitív inotróp és luzitróp hatással rendelkező anyagnak bizonyult (Gao és mtsai., 2012; Sabbah és mtsai., 2013), hatásmechanizmusával kapcsolatban pedig felmerült az afferensekből történő CGRP felszabadító képessége (Paolocci és mtsai., 2001). Mivel a HNO donorok alkalmazása nem jár a nitrátok tartós használata során elkerülhetetlen tolerancia kialakulásával, terápiás alkalmazásukhoz jelentős reményeket fűznek. A szívelégtelenség terápiájában mutatott előnyös hatásai ellenére azonban hosszú ideig

kérdéses volt az is, hogy a HNO termelődik-e egyáltalán a szervezetben, és ha igen, milyen biokémiai reakciók eredményeként? Nem volt ismert a HNO CGRP felszabadulásra kifejtett hatásának pontos mechanizmusa sem (Flores-Santana és mtsai., 2011; Fukuto és Carrington, 2011; Fukuto és mtsai., 2005). A kérdés megválaszolásában áttörést jelentettek egy másik gáz halmazállapotú mediátor, a levegőben előforduló, de a szöveteinkben normális körülmények között is termelődő H₂S vaszkuláris tónus szabályozásban betöltött szerepével kapcsolatos megfigyelések (Yang és mtsai., 2008), illetve a H₂S és a NO közötti interakció eredményeként megvalósuló vaszkuláris hatások megismerése. A szervezetben a H₂S cisztein vagy homocisztein felhasználásával enzimatikus úton keletkezik. Termelése a különböző szövetféleségekben legalább 3 különböző enzim, a cisztationin β-szintáz (CBS), a cisztationin γ-liáz (CSE) és a merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz működésének eredménye (Kabil és Banerjee, 2014; Kabil és mtsai., 2014).

A H₂S termelődését mind a vaszkuláris simaizomban, mind az endothel sejtekben kimutatták. A H₂S direkt véráramlás fokozó hatásának hátterében korábban az ATP-függő K⁺csatornákra és egyéb K⁺-csatornákra kifejtett aktiváló hatást azonosították (Tang és mtsai., 2005). A H₂S ezen felül több különböző mechanizmus útján potencírozza a NO vazodilatátor hatását is (Holwerda és mtsai., 2015). Ezek között szerepel a H₂S hatására fokozódó endotheliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) expresszió, valamint az eNOS foszforilációja, ami az enzimet stabilizálva optimális szinten tartja a NO termelést (Altaany és mtsai., 2014). A NO hatására termelődő cGMP erőteljesebb biológiai hatása részben a H₂S hatására bekövetkező szerkezeti stabilizáció, részben pedig a foszfodiészteráz 5 enzim gátlása révén lassabban megvalósuló cGMP lebomlás következménye. A H₂S révén keletkező poliszulfidok közvetlenül is aktiválhatják a cGMP-dependens proteinkináz G-t (Bełtowski és Jamroz-Wiśniewska, 2014; Kimura, 2017). Végül, de nem utolsó sorban néhány évvel ezelőtt a NO és a H₂S interakciója során lejátszódó kémiai reakciók számbavételekor felmerült annak lehetősége is, hogy ezek interakciója egy további vazodilatátor hatású anyag, nevezetesen a HNO keletkezéséhez vezet (Filipovic és mtsai., 2013).

Az irodalmi adatok ismeretében kísérleteink ezen szakaszában célul tűztük ki a NO és a kemoszenzitív nociceptorok között létrejövő interakciók vizsgálatát különös tekintettel a NO trigeminális afferensekből történő CGRP felszabadító hatására és ennek fiziológiai megnyilvánulására, a véráramlás fokozódásra. Vizsgáltuk a HNO donor nátrium-[trioxodinitrát] (Angeli's salt) meningeális véráramlás szabályozásban játszott szerepét, a hatás

hátterében álló mechanizmusokat, illetve választ kerestünk arra a kérdésre is, hogy van-e lehetőség a trigeminovaszkuláris rendszerben, és ha igen, pontosan milyen szöveti elemekben a HNO fiziológiás körülmények között történő termelődésére? Ennek eldöntése céljából vizsgáltuk a NO és H₂S interakciójának hatására a meningeális szövetekben bekövetkező CGRP felszabadulást és véráramlás változásokat.

6.2. Alkalmazott módszerek

Kísérleteink során kontroll patkányokban *in vivo* és *ex vivo* modellekben vizsgáltuk különböző NO donorok CGRP felszabadulásra és meningeális véráramlásra kifejtett hatását (**Módszerek 4.5. és 4.6.**). Vizsgáltuk patkány és egér *in vivo* és *ex vivo* preparátumban a HNO donor Angeli's salt CGRP felszabadító és vazodilatátor hatását, valamint a TRPA1 receptorok szerepét a HNO által kiváltott véráramlás fokozódásban. Vizsgáltuk a H₂S és NO által kiváltott vazodilatáció és CGRP felszabadulás mechanizmusában ezen anyagok szövetekben való termelődésének szerepét. NADPH-diaforáz reakcióval (**Módszerek 4.16.**) kimutattuk a durában a NO termelődés helyét. Immunfluoreszcens festéssel kimutattuk a dura materben a TRPA1-, valamint a nNOS immunreaktív struktúrákat, illetve a trigeminális ganglion sejtekben a TRPA1 és a CBS enzim expresszióját (**Módszerek 4.14.**). Fluoreszcens hisztokémiai eljárással azonosítottuk a dura materben a NO, H₂S és HNO termelődésének szöveti lokalizációját (**Módszerek 4.15.**).

6.3. Eredmények

6.3.1. Nitrogén-monoxid hatása a meningeális perfúzióra és a kalcitonin gén-rokon peptid felszabadulására

In vivo kísérleteinkben lézer Doppler véráramlás méréssel kontroll patkányokban teszteltük a NO donor topikális applikációjával kiváltott véráramlás változásokat, valamint a CGRP felszabadulás szerepét a NO által indukált vazodilatátor válaszban. Kísérleteink során a következő három NO donor vazodilatátor hatását teszteltük: *S*-nitrozo-*N*-acetil-D,L-penicillamin (SNAP), 2-(*N*,*N*-dietilamin)-diazenolát-2-oxid dietilammónium só (DEANONOate) és *N*-etil-2-(1-etil-2-hidroxi-2-nitrozohidrazino)-etánamin (NOC-12), mindhárom anyagot 0,1 és 1 mM kocentrációkban alkalmazva. Mindhárom NO donor koncentráció függő meningeális véráramlás fokozódást váltott ki, ami a dura mater CGRP receptor antagonista CGRP₈₋₃₇ (0,1 mM) előkezelésével jelentősen csökkenthető volt **(4. táblázat)**.

Stimulus	CGRP ₈₋₃₇ előtt	CGRP ₈₋₃₇ után	
	(bazális %-a)	(bazális %-a)	
SNAP 0,1 mM (n=6)	118,2 ± 4*	107,6 ± 2,8* [#]	
SNAP 1 mM (n=6)	130,4 ± 4*	121,1 ± 3,3* [#]	
DEANONOate 0,1 mM (n=10)	148,2 ± 9,8*	106,9 ± 3,4 [#]	
DEANONOate 1 mM (n=10)	171,8 ± 18*	146,1 ± 12,2* [#]	
NOC-12 0,1 mM (n=8)	109,9 ± 6,5	96,8 ± 1,1 [#]	
NOC-12 1 mM (n=8)	128,4 ± 11,5*	110,1 ± 1,1* [#]	

4. táblázat. NO donorok hatása a meningeális véráramlásra CGRP receptor gátlást megelőzően és azt követően (átlag ± SEM). Egy szempontos ANOVA-t követő LSD teszt. *: szignifikánsan eltér a bazális véráramlás értéktől, #: szignifikánsan eltér a CGRP₈₋₃₇ (0,1 mM) applikáció előtt mért értéktől. **SNAP**: *S*-nitrozo-*N*-acetil-D,L-penicillamin, **DEANONOate**: 2-(*N*,*N*-dietilamin)-diazenolát-2-oxid dietilammónium só, **NOC-12**: *N*-etil-2-(1-etil-2-hidroxi-2-nitrozohidrazino)-etánamin, **CGRP**₈₋₃₇: kalcitonin gén-rokon peptid 8-37 fragmentum.

Hasonló eredményre jutottunk a meningeális afferensek NO donorral történő stimulációját követő CGRP felszabadulás meghatározásával. Kontroll patkányok *ex vivo* dura mater preparátumában a DEANONOate applikációja dózisfüggő módon fokozta a CGRP felszabadulást **(5. táblázat)**.

DEANONOate	Bazális CGRP felszabadulás	Stimulált CGRP felszabadulás	
koncentráció	(pg/ml)	(pg/ml)	bazális %-a
10 μΜ (n=6)	33,3 ± 1,2	37,1 ± 1,3*	111,4*
100 μM (n=6)	34,5 ± 3,7	43,5 ± 5,8*	126,3*
1 mM (n=6)	35,5 ± 3,2	59,2 ± 7*	166,8*

5. táblázat. DEANONOate hatása az *ex vivo* **CGRP felszabadulásra** (átlag ± SEM). Egy szempontos ANOVA-t követő LSD teszt. *: szignifikánsan eltér a bazális CGRP felszabadulástól. **DEANONOate**: 2-(*N*,*N*-dietilamin)-diazenolát-2-oxid dietilammónium só, **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid.

6.3.2. Nitroxil hatása a meningeális perfúzióra és a kalcitonin gén-rokon peptid felszabadulására

Patkányokban és C57Bl/6 vad típusú egerekben a HNO donor Angeli's salt (300 μ M) jelentősen megnövelte a meningeális afferensekből felszabaduló CGRP mennyiségét, amit a TRPA1 receptor antagonista 1,2,3,6-tetrahidro-1,3-dimetil-*N*-[4-(1-metiletil)fenil]-2,6-dioxo-7*H*-purin-7-acetamid (HC030031, 50 μ M) jelenléte az inkubáló folyadékban nagymértékben

csökkentett. Patkányokban a 21,5 \pm 0,3 pg/ml bazális CGRP koncentráció 3 egymást követő Angeli's salt stimuláció során mérve maximum 77,3 \pm 1,6 pg/ml-re emelkedett **(20. ábra A)**, egerek esetében ezek az értékek 30,7 \pm 2,4 (bazális) illetve 106 \pm 16,8 pg/ml (stimulált) voltak. A TRPA1 receptor antagonista egyidejű alkalmazása patkányokban 41,7 \pm 5,6 pg/ml, egerekben 57,2 \pm 4,2 pg/ml értékre csökkentette a maximális CGRP felszabadulás mértékét. TRPA1-/- knockout egerekben sem váltott ki jelentősebb CGRP felszabadulást az Angeli's salt, a HNO által indukált CGRP felszabadulás körülbelül azonos volt a vad típusú egerekben a TRPA1 receptorok blokkolását követően mért értékekkel (50,8 \pm 8,3 pg/ml-ig emelkedett) **(20. ábra B)**.



20. ábra. A HNO TRPA1 receptort aktiváló és CGRP felszabadító hatása. Patkány *ex vivo* dura mater preparátumban Angeli's salt fokozta a CGRP felszabadulást. Ez a hatás gátolható volt a TRPA1 receptor antagonista HC030031 applikációjával (**A**, átlag ± SEM, n=9). C57BI/6 egér dura mater preparátumában hasonló hatást figyeltünk meg. TRPA1-/- knockout egerekban az Angeli's salt nem váltott ki a kontroll állatokhoz hasonló mértékű CGRP felszabadulást (**B**, átlag ± SEM, n=8). Egy szempontos ANOVA-t követő Fisher teszt. *: szignifikánsan eltér az Angeli's salt applikációját megelőzően mért bazális CGRP felszabadulástól. **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid, **HC030031**: 1,2,3,6-tetrahidro-1,3-dimetil-*N*-[4-(1-metiletil)fenil]-2,6-dioxo-7*H*-purin-7-acetamid.

In vivo kísérleteinkben az Angeli's salt (300 μ M) topikális applikációja szignifikáns véráramlás fokozódást váltott ki az arteria meningea media ágaiban, melynek mértéke a bazális véráramlás 124,1 ± 5,1 %-a volt. Ez a véráramlás fokozódás gátolható volt a TRPA1 receptor előzetes blokkolásával (HC030031, 50 μ M) és jelentősen csökkentette a CGRP receptorok gátlása is (CGRP₈₋₃₇, 100 μ M). A TRPA1 receptorok gátlása mellett az Angeli's salt applikációja mindössze 8,5 ± 1,5 %-kal fokozta a bazális perfúziót, CGRP receptor antagonista előzetes adása után ez az érték 15,4 ± 4 % volt **(21. ábra)**.





21. ábra. HNO véráramlás fokozó hatása a meningeális artériákban. Az Angeli's salt applikációjával kiváltott véráramlás fokozódást gátolta a TRPA1 receptor antagonista HC030031 és a CGRP receptor antagonista CGRP₈₋₃₇ előkezelés (átlag ± SEM, n=10-12). Egy szempontos ANOVA-t követő Fisher teszt. *: szignifikánsan eltér az Angeli's salt véráramlás fokozó hatásától. **CGRP**₈₋₃₇: kalcitonin gén-rokon peptid 8-37 fragmentum, **HC030031**: 1,2,3,6-tetrahidro-1,3-dimetil-*N*-[4-(1-metiletil)fenil]-2,6-dioxo-7*H*-purin-7-acetamid.

6.3.3. Nitrogén-monoxid és kénhidrogén interakciója: az endogén nitroxil keletkezése

Annak eldöntésére, hogy a feltételezéseknek megfelelően a NO és a H₂S interakciójának eredményeként képződhet-e HNO endogén módon is a meningeális szövetekben, vizsgáltuk ezen két gáz halmazállapotú mediátor együttes hatásának tulajdonítható meningeális CGRP felszabadulást és következményes véráramlás fokozódást. NO donorként DEANONOate 200 μM oldatát, H₂S donorként pedig nátrium-szulfid (Na₂S, 300 μM) oldatát használtuk. *In vivo* véráramlás méréseink során a NO donor a korábbi méréseink eredményével összevethető, 30 % körüli véráramlás fokozódást váltott ki (29,6 ± 4,9 %). Ez a véráramlás fokozódás jelentősen csökkenthető volt a dura mater topikális oxálsav amid (OA, 2 mM), vagy az állatok szisztémás OA (i.v. 10 mg/kg) előkezelésével. Az OA a H₂S képződéséért felelős enzimek, a CBS és a CSE nem szelektív inhibitora. A dura mater 20

perces és az állatok szisztémás OA kezelése azonos mértékben csökkentette a DEANONOate véráramlás fokozó hatását; ez az érték topikális applikációt követően 10,2 ± 2,6 %, intravénás adást követően 10,5 ± 2,3 % volt. Feltételeztük, hogy ez a mérsékelt, a NO H₂S jelenlététől függetlenül is megnyilvánuló vazodilatátor hatása a NO klasszikus, cGMP által mediált vazodilatátor hatásának következménye. Ennek igazolására néhány kísérletben a H₂S termelésének i.v. OA adásával történő kikapcsolását követően a szolubilis guanilát-cikláz gátló 1*H*-[1,2,4]oxadiazolil[4,3-a]kinoxalin-1-on (ODQ) topikális (50 μ M) vagy szisztémás (1 mg/kg i.v.) adásával gátoltuk a cGMP hatását. Ennek eredményeként a NO által kiváltott véráramlás fokozódás további néhány százaléknyi csökkenését mértük, bár topikális applikációt követően 8,3 ± 3,8 %, intravénás adást követően 5,9 ± 2,9 % véráramlás fokozódás továbbra is megfigyelhető volt **(22. ábra)**.



DEANONOate

22. ábra. DEANONOate topikális applikációjának hatása a meningeális véráramlásra. Az oszlopok a DEANONOate (200 μ M) hatását, valamint az oxálsav amid topikális (OA top. 2 mM) 10 illetve 20 percig történő előkezelésének, az oxálsav amid intravénás alkalmazásának (OA i.v. 10 mg/kg), valamint a szolubilis guanilát-cikláz gátló ODQ topikális (ODQ top. 50 μ M) és intravénás (ODQ i.v. 1 mg/kg) előkezelésének DEANONOate vazodilatátor hatására kifejtett módosító hatását ábrázolja (átlag ± SEM, n=8-14). Egy szempontos ANOVA-t követő Fisher teszt. *: szignifikánsan eltér a DEANONOate véráramlás fokozó hatásától. DEANONOate: 2-(*N*,*N*-dietilamin)-diazenolát-2-oxid dietilammónium só, ODQ: 1*H*-[1,2,4]oxadiazolil[4,3-a]kinoxalin-1-on, OA: oxálsav amid.

Annak igazolását követően, hogy a NO maximális vazodilatátor hatásának kifejtéséhez szükség van a szövetekben termelődő H₂S jelenlétére, fordítva is teszteltük a két vazodilatátor hatású mediátor együttműködését. Ezekben a kísérletekben Na₂S (300 μM)

topikális applikációjával váltottunk ki szignifikáns véráramlás fokozódást a meningeális artériákban (19 ± 3,8 %). A H₂S donor Na₂S vazodilatátor hatásáról egyértelműen igazolni tudtuk, hogy a TRPA1 receptorok aktiválása révén, CGRP felszabadulás által megvalósuló folyamat, mivel a vazodilatációs választ mind a TRPA1 receptor antagonista (HC030031, 50 μ M), mind a CGRP receptor antagonista (CGRP₈₋₃₇, 100 μ M) előkezelés kivédte. A TRPA1 receptorok blokkolását követően a Na₂S mindössze 1,5 ± 1,6 % véráramlás fokozódást, a CGRP receptorok blokkolását követően pedig 0,9 ± 2,7 % véráramlás csökkenést eredményezett. A Na₂S-dal kiváltott vazodilatáció nagy mértékben függött a NO egyidejű jelenlététől; a NO szintáz gátló L-NMMA topikális (1 mM) vagy szisztémás (12 mg/kg i.v.) adása egyaránt jelentős mértékben csökkentette azt. Topikális L-NMMA applikációt követően a Na₂S 6,8 ± 2,1 %, intravénás alkalmazását követően pedig 3 ± 0,8 % véráramlás fokozódást váltott ki **(23. ábra)**.



23. ábra. Na₂S topikális applikációjának hatása a meningeális véráramlásra. Az oszlopok a Na₂S (300 μ M) hatását, valamint a CGRP receptor antagonista CGRP₈₋₃₇ (100 μ M), a TRPA1 receptor gátló HC030031 (50 μ M) és a NO szintáz gátló L-NMMA topikális (1 mM) valamint intravénás (12 mg/kg) előkezések Na₂S vazodilatátor hatásra kifejtett módosító hatását ábrázolják (átlag ± SEM, n=9-12). Egy szempontos ANOVA-t követő Fisher teszt. *: szignifikánsan eltér a Na₂S véráramlás fokozó hatásától. **CGRP**₈₋₃₇: kalcitonin gén-rokon peptid 8-37 fragmentum, **L-NMMA**: N_{ω} -metil L-arginin acetát, **HC030031**: 1,2,3,6-tetrahidro-1,3-dimetil-*N*-[4-(1-metiletil)fenil]-2,6-dioxo-7*H*-purin-7-acetamid.

A fiziológiás körülmények között mért bazális meningeális CGRP felszabadulás függ a szövetekben folyamatosan termelődő NO és H₂S hatásától. *Ex vivo* dura mater modellünkben mind a NO szintézis gátlása (L-NMMA, 2 mM), mind a H₂S termeléséért felelős CBS és CSE enzimek működésének kikapcsolása (OA, 2 mM) mérhető csökkenést

eredményezett a trigeminális afferensekből történő CGRP felszabadulásban. A SIF applikáció mellett mért értékhez képest L-NMMA hatására a bazális CGRP felszabadulás 42,7 ± 3,2 %-kal, OA hatására pedig 14,2 ± 4,7 %-kal csökkent **(24. ábra)**.



24. ábra. A szöveti NO és H₂S termelés szerepe a meningeális afferensekből történő bazális CGRP felszabadulásra. Az oszlopok SIF, L-NMMA és oxálsav amid applikációja során nyert mintákban meghatározott CGRP tartalmat ábrázolnak, ezek applikációját megelőzően SIF jelenlétében mért értékekhez viszonyítva (átlag ± SEM, n=8). Student-féle egymintás t-próba. *: szignifikánsan eltér a SIF applikációjával kiváltott CGRP felszabadulástól. **SIF**: szintetikus intersticiális folyadék, **L-NMMA**: N_{ω} -metil L-arginin acetát, **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid.

A bazális mellett a stimulált CGRP felszabadulás is a két gáz halmazállapotú mediátor interakcióját mutatta; a Na₂S (300 μ M) hatására fokozódó CGRP felszabadulást a NO szintézis egyidejű gátlása (L-NMMA, 2 mM) visszaszorította (**25. ábra B**), míg extra NO hozzáadása a rendszerhez DEANONOate formájában (200 μ M) jelentősen fokozta (**25. ábra A**).



25. ábra. NO és H₂S szerepe a meningeális CGRP felszabadulásban. Na₂S (300 μ M) CGRP felszabadító hatása a NO donor DEANONOate (200 μ M) jelenlétében fokozódott (**A**), míg a NO szintáz gátló L-NMMA (2 mM) egyidejű alkalmazása esetén csökkent (**B**), (átlag ± SEM, n=8). Egy szempontos ANOVA-t követő Fisher teszt. *: szignifikánsan eltér a bazális CGRP felszabadulástól. #: szignifikánsan

eltér a Na₂S CGRP felszabadító hatásától. **DEANONOate**: 2-(*N*,*N*-dietilamin)-diazenolát-2-oxid dietilammónium só, **L-NMMA**: N_{ω} -metil L-arginin acetát, **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid. **6.3.4. Nitrogén-monoxid, kénhidrogén és nitroxil termelő szöveti struktúrák azonosítása a**

dura materben

A NO termelődését a meningeális szövetekben NADPH-diaforáz reakcióval és a nNOS immunhisztokémiai festésével mutattuk ki. A NADPH-diaforáz reakcióval NO termelő struktúrák elsősorban az arteria meningea media ágaiban, valamint a belőlük leágazó arteriolákban egészen a kapillárisokig megfigyelhetők voltak **(26. ábra A)**. NO termelő neuronális elemeket nNOS immunhisztokémiai festéssel is ki tudtunk mutatni. Néhány nNOS-immunreaktív axon azonosítható volt az artéria ágakat kísérő idegrost kötegekben **(26. ábra B)**.



26. ábra. NO termelés helyének kimutatása patkány dura materben. NADPH-diaforáz festődés kimutatása az arteria meningea media ágaiban, az arteriolákban egészen a kapillárisokig (**A**). nNOS-immunreaktív idegrostok kimutatása immunhisztokémiai festéssel az arteria meningea media ágainak közvetlen közelében (**B**). NADPH-d: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-diaforáz, nNOS: neuronális nitrogén-monoxid szintáz, MMA: arteria meningea media, **n**: idegrost köteg.

In vitro dura mater preparátumban a NO és H₂S érzékeny fluoreszcens szenzorok detektálható mértékű fluoreszcenciát csak az arteria meningea media ágainak endotheliumában eredményeztek. A normál körülmények között viszonylag kismértékű neuronális NO és H₂S termelés ezzel a módszerrel nem volt detektálható (27. ábra A, B). A HNO termelődése ezzel szemben számos szöveti struktúrában kimutatható volt; nem csak az artériák falában, hanem az artéria ágakat kísérő idegkötegekben, sőt számos egyéb kötőszöveti sejtben is megfigyelhető volt (27. ábra C). A dura mater előkezelése L-NMMA (2 mM) vagy OA (2 mM) oldatokkal nagyon jelentősen csökkentette, a két anyag együttes
alkalmazása pedig teljes mértékben megszüntette a HNO termelődését a szövetben (27. ábra D).



27. ábra. Konfokális mikroszkóppal készült felvételek patkány dura mater preparátumról, melyek az arteria meningea media NO termelő (A) és H₂S termelő (B) endotheljét, valamint a HNO termelő vaszkuláris, perivaszkuláris kötőszöveti és idegi elemeket (C) ábrázolják. A dura mater HNO szenzorral kimutatható fluoreszcenciáját a preparátum oxálsav amid (2 mM) és L-NMMA (2 mM) előkezelése teljesen megszüntette (D). NO: nitrogén-monoxid, H₂S: kénhidrogén, HNO: nitroxil, V: véna, A: artéria, n: idegrost, m: simaizom.

Patkány dura mater totálpreparátum kettős immunhisztokémiai festésével mind a TRPA1 receptor expresszióját, mind a CGRP neuropeptid jelenlétét ki tudtuk mutatni az arteria meningea media ágait kísérő idegrostokban **(28. ábra A, B)**. A ganglion trigeminale metszetein a TRPA1 receptor és a H₂S termelésért felelős CBS enzim kolokalizációját elsősorban a közepes és kisméretű neuronokban tudtuk igazolni **(28. ábra C)**.



28. ábra. A TRPA1 receptor, a CGRP és a H₂S termelésért felelős CBS enzim immunhisztokémiai kimutatása a trigeminális neuronokban. TRPA1 (**A**) és CGRP (**B**) kolokalizációja patkány dura mater afferenseiben kettős immunhisztokémiai festéssel. A TRPA1 receptor és a CBS enzim kolokalizációja a ganglion trigeminale kis és közepes méretű ganglion sejtjeiben (**C**). **TRPA1**: tranziens receptor potenciál ankyrin 1, **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid, **CBS**: cisztationin β-szintáz.

A szöveti NO és H₂S termelés mennyiségi kimutatása céljából a dura mater inkubációja során nyert felülúszó NO és H₂S szenzor jelenlétében mért fluoreszcenciáját határoztuk meg. OA (2 mM) előkezelést követően a NO szenzor fluoreszcenciája 51,4 ± 9,2 %-kal (n=5) emelkedett összehasonlítva a kontralaterális kezeletlen durában mért értékkel, ami azt mutatja, hogy H₂S hiányában a termelt NO-ból kevesebb használódik fel/alakul tovább egyéb metabolittá. A H₂S szenzor által produkált fluoreszcencia 32,9 ± 10,8 %-kal (n=5) emelkedett az L-NMMA-tal (2 mM) előkezelt koponyafélben, ami hasonlóan a NO hiányában csökkent mértékű szöveti H₂S felhasználásra utalt.

6.4. Megbeszélés

Eredményeink egyértelműen igazolták, hogy a NO-nak mint metabolikus eredetű vazodilatátor anyagnak a meningeális szövetekben megvalósuló hatása nem kizárólag az érfal simaizom sejtjein megnyilvánuló cGMP által közvetített hatás, hanem abban a peptiderg trigeminális afferensekből felszabadított CGRP is szerepet játszik. Ezeket a 2000-es évek elején tett megfigyeléseinket más kutatók eredményei is alátámasztották; NO-indukálta vazodilatáció kísérleti állatok dura materében hatásosan gátolható volt a migrén terápiájában is alkalmazott szumatriptánnal, amiről ismert, hogy gátolja a szenzoros neuronok 5-HT_{1B/1D} receptorain hatva a neuropeptidek, így a CGRP felszabadulását és a következményes vazodilatációt (Akerman és mtsai., 2002b). Mivel mind a mai napig nem ismerünk olyan mechanizmust, melynek során a NO közvetlenül tudna neuropeptid felszabadulást kiváltani a szenzoros neuronokból, már akkor felmerült valamiféle közvetítő molekula lehetséges szerepe, amely kapcsolatot létesíthetne a metabolikus és a neuronális vazodilatátor faktorok között. Az ezzel kapcsolatos kutatásainknak új lendületet adtak az egy évtizeddel később publikált eredmények, melyek ráirányították a figyelmet a NO-ból közvetlenül is képződő szintén erős vazodilatátor hatással rendelkező HNO-ra, mely azonban intracelluláris hatásmechanizmusát tekintve eltér a NO-tól (Fukuto és Carrington, 2011; Fukuto és mtsai., 2005; Hughes, 1999).

A kísérleteink során HNO donorként használt Angeli's salt 37 °C-on, szöveti pH mellett azonos mennyiségű nitritet és HNO-t képezve bomlik. A keletkező HNO féléletideje körülbelül 5 perc, gyorsan dimerizálódik, majd víz leadásával dinitrogén-oxidot (N₂O) képez. Ezeknek a kémiai tulajdonságoknak az ismeretében nem meglepő, hogy kísérleteink során viszonylag magas Angeli's salt koncentrációk használatára kényszerültünk, mivel az anyag

dc 1628 19

gyors szöveti inaktiválódása következtében a mérések idején csak kevesebb, mint a fele lehetett az eredeti Angeli's salt koncentrációnak a hatásos szöveti HNO koncentráció. Eredményeink, melyek kontroll állatokban igazolták a HNO trigeminális TRPA1 receptorokon kifejtett aktiváló hatását, ami az afferensekből CGRP-t felszabadítva fokozza a meningeális véráramlást, kiegészítették munkacsoportunk más kísérleti modelleken (hátsó gyöki ganglion neuronokon, kínai hörcsög ovárium sejteken) whole cell voltage clamp és calcium imaging módszerekkel nyert eredményeit. MALDI-TOF tömegspektrometriás mérések HNO hatására a TRPA1 receptor cisztein aminosavai között diszulfid kötések kialakulását igazolták, amit elektrofiziológiai mérések során alkalmazott redukáló dithiothreitol hatására a gyorsabban lecsengő HNO-válasz is alátámasztott. Természetesen ezen kísérletek folyamán felmerült annak lehetősége is, hogy a HNO-nak a kemoszenzitív peptiderg afferensek másik jellegzetes receptor típusán, a TRPV1 receptorokon is hasonló CGRP felszabadulást kiváltó hatása lehet, ezt a lehetőséget azonban TRPA1-/- egereken végzett calcium imaging mérések és a mi CGRP EIA-méréseink eredményeinek tükrében ki kellett zárnunk.

Eredményeink funkcionális, morfológia és hisztokémiai módszerek segítségével igazolták azt is, hogy a trigeminovaszkuláris rendszer ideális körülményeket biztosít mindkét gáz halmazállapotú mediátor, a NO és a H₂S termeléséhez, ezen idegi és endotheliális eredetű mediátorok reakciója révén termelődő HNO a kemoszenzitív nociceptorok TRPA1 receptorait aktiválva CGRP felszabaduláshoz vezet, ami a vaszkuláris simaizom sejteken relaxáló hatású.

A NO és H₂S interakciójaként a trigeminovaszkuláris rendszerben keletkező HNO képződését nem csak indirekt módon, a CGRP felszabadító és vazodilatátor hatás vizsgálatával, hanem közvetlenül is ki tudtuk mutatni a HNO érzékeny fluoreszcens festék CuBOT1 segítségével. A HNO termelődését jelző erős fluoreszcencia mind a dura mater NO termelésének, mind H₂S termelésének gátlását követően gyakorlatilag megszűnt. A dura mater preparátumok mikroszkópos vizsgálatával igazoltuk a HNO termelő szöveti elemek és a TRPA1 receptort expresszáló, CGRP-t tartalmazó trigeminális afferensek közeli lokalizációját, ami morfológiai alapját képezi a közöttük kialakuló interakcióknak.

Eredményeink igazolták, hogy a dura materben fiziológiás körülmények között mért spontán bazális CGRP felszabadulás, mely a szöveti perfúzió fenntartásában játszik szerepet, részben a HNO konstitutív szöveti termelődésének következménye. Elképzeléseink szerint a HNO-TRPA1-CGRP signalizációs út a dura materben a következőképpen valósulhat meg:

feltételezzük, hogy fiziológiás körülmények között a NO döntően a meningeális artériák endotheljéből származik, az eNOS termeli. A NO átdiffundál a perivaszkuláris afferensekbe, ahol a CBS hatására termelődő H₂S jelenlétében HNO-lá alakul. A CBS és TRPA1 kolokalizációja a trigeminális neuronokban lehetővé teszi, hogy a HNO Ca²⁺ beáramlást és következményes CGRP felszabadulást váltson ki, ami viszont a vaszkuláris simaizom CGRP receptorainak aktiválása révén eredményez véráramlás fokozódást **(29. ábra)**.



29. ábra. A HNO-TRPA1-CGRP szignalizációs út a meningeális szövetekben. CGRP: kalcitonin génrokon peptid, **NO**: nitrogén-monoxid, **DEANONOate**: 2-(*N*,*N*-dietilamin)-diazenolát-2-oxid dietilammónium só, **L-NMMA**: N_{ω} -metil L-arginin acetát, **eNOS**: endotheliális nitrogén-monoxid szintáz, **cAMP**: ciklikus adenozin-monofoszfát, **AC**: adenilát-cikláz, **CGRP**₈₋₃₇: kalcitonin gén-rokon peptid 8-37 fragmentum, **TRPA1**: tranziens receptor potenciál ankyrin 1, **H**₂**S**: kénhidrogén, **Na**₂**S**: nátrium szulfid, **CBS**: cisztationin β -szintáz, **HNO**: nitroxil.

Igen érdekes megfigyelés, hogy a DEANONOate-tal kiváltott vazodilatáció H₂S függő komponensének, vagyis a HNO termelésnek a kikapcsolását követően (OA blokk után) a NO

donor még mindig kb. 10 %-nyi véráramlás fokozódást tudott kiváltani a bazális véráramlás értékekkel összehasonlítva. A vazodilatációnak erről a komponenséről - mely nyilvánvalóan nem CGRP által kiváltott reakció - feltételeztük, hogy a klasszikus cGMP termelést fokozó NO hatás következménye lehet. Ennek ellenére NO donor hatására a cGMP termelését gátló ODQ kezelés után továbbra is 6-8 %-nyi véráramlás fokozódást mértünk, ami egyrészt azt mutatja, hogy a meningeális erekben meglepően kis mértékben játszik szerepet a klasszikus cGMP mediálta vazodilatáció, illetve hogy más vazodilatátor mechanizmus állhat ennek a komponensnek a hátterében. Magyarázat az OA gátlás mellett is fennálló kismértékű perzisztens H₂S termelés lehet, ami ATP függő K⁺-csatornák nyitása révén simaizom relaxáló hatású. Ilyen jellegű hatást korábban mi is igazoltunk laboratóriumunkban (Eberhardt és mtsai., 2014). Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a meningeális erekben a H₂S foszfodiészteráz 5 gátló hatása révén fokozottan megnyilvánuló cGMP szignalizáció sem jellemző útja a vazodilatációnak. Ebben a tulajdonságában a dura mater valószínűleg eltér más egyéb szövetektől, pl. a koronáriáktól, itt ugyanis az Angeli's salt hatására kialakuló fokozott véráramlás a HNO hatás, illetve a cGMP hatás kikapcsolásával csökkenthető volt, míg a CGRP receptorok gátlása nem befolyásolta (Chin és mtsai., 2014).

7. KEMOSZENZITÍV AFFERENSEK ÉS HÍZÓSEJTEK KÖZÖTTI INTERAKCIÓK A DURA MATERBEN 7.1. Bevezetés

Jancsó Miklós farmakológus professzor capsaicinnel végzett vizsgálatai során kimutatta, hogy az érző idegek antidrómos elektromos ingerlése, vagy kémiai irritánsokkal (pl. capsaicinnel) történő stimulálása az érintett ideg ellátási területén értágulatot és plazma extravazációt vált ki. Ezeket a jelenségeket összefoglalóan neurogén gyulladásnak nevezte. Farmakológiai és morfológiai vizsgálatokkal tisztázta, hogy a neurogén gyulladásért az érző idegvégződésekből felszabaduló, akkor még nem azonosított "neurohumor" felszabadulása tehető felelőssé. Mivel lokális vagy szisztémás capsaicin deszenzibilizációt követően a neurogén gyulladás nem volt kiváltható sem a bőrben, sem a nyálkahártyákon, felismerte, hogy az érintett érző neuronok kettős funkcióval rendelkeznek: egyrészt részt vesznek a fájdalmas ingerek központi idegrendszer felé történő továbbításában, másrészt aktivált állapotukban vazoaktív anyagokat szabadítanak fel perifériás érző idegvégződéseikből, amelyek neurogén gyulladást váltanak ki az innervált szövetben (Jancsó és mtsai., 1967,

1968). Későbbi vizsgálatok tisztázták ezen vazoaktív anyagok kémiai természetét; megállapították, hogy a neurogén gyulladásos válasz vazodilatációs komponensét a CGRP, az érpermeabilitás fokozódását pedig döntően a SP közvetíti.

Az aktivált kemoszenzitív nociceptorokból szabaddá váló vazoaktív peptidek a perifériás szövet neurogén gyulladását váltják ki. A neuropeptidek interakcióba lépnek a környező szöveti elemekkel; az ereket bélelő endothel sejtekkel, a vaszkuláris simaizommal és a hízósejtekkel, ami a gyulladásos reakciók kaszkádját indítja el, lokális véráramlás fokozódást, plazma extravazációt és a szenzoros neuronok szenzitizációját eredményezve (Jancsó-Gábor és Szolcsányi, 1972; Jancsó és mtsai., 1985b; Szolcsányi, 1988). A neurogén gyulladás jelentőségét számos betegség esetében igazolták, szerepe a primer fejfájások patofiziológiai folyamataiban is jelentős (Geppetti és mtsai., 2005; Lukacs és mtsai., 2017; Matsuda és mtsai., 2018). A dura mater hízósejtjei a nociceptorokkal létesített két irányú kapcsolatuk révén központi szerepet tölthetnek be a meningeális szövetek neurogén gyulladásos folyamataiban. A kemoszenzitív afferensekből felszabaduló CGRP és SP a hízósejtekből proinflammatorikus mediátorokat; hisztamint, szerotonint, prosztaglandinokat valamint proteolitikus hatású triptázt szabadítanak fel (Dimitriadou és mtsai., 1991; Rozniecki és mtsai., 1999). Ezek a mediátorok tovább erősítik a neuropeptidek által kiváltott vaszkuláris reakciókat, a nociceptorok érzékenységének fokozása révén pedig a fájdalomérző pályát aktiválhatják. A hízósejtek, peptiderg afferensek és meningeális erek egymáshoz közeli elhelyezkedése ideális körülményeket teremt ezen struktúrák közötti interakcióknak. Ezen interakciók jelentőségét mutatja, hogy emberben hisztamin infúziójával a migrénes rohamhoz igen hasonló jellegű fejfájás váltható ki (Krabbe és Olesen, 1980).

A neurogén gyulladás keretei között megvalósuló nociceptor szenzitizáció egyik módja a hízósejtekből felszabaduló triptáz aktiváló hatása, melyet a primer szenzoros neuronok jelentős populációján is expresszálódó G-fehérjéhez kapcsolt proteáz aktivált receptor 2-n (PAR2) fejt ki. A proteáz aktivált receptorok családjába tartozó PAR2 aktiválódása a sejtet az extracelluláris tér felől érő szerin proteázok, elsősorban a tripszin és triptáz hatásának következménye (Cottrell és mtsai., 2002; O'Brien és mtsai., 2001). Az enzimatikus hasítás eredményeként a receptor fehérje N-terminális végén szabaddá váló domén bekötődése a receptor fehérjéhez intracelluláris szignalizációt indít el (Hoogerwerf és mtsai., 2001; Macfarlane és mtsai., 2001; Nystedt és mtsai., 1994). A PAR2 által stimulált szignalizációs útvonalak rendkívül sokfélék, ismerünk adenilát-cikláz, PKC, PKA, foszfolipáz,

mitogén-aktivált protein kináz révén megvalósuló hatásokat is (Bao és mtsai., 2015; Kanke és mtsai., 2001; Suen és mtsai., 2010).

A PAR2 expresszióját mind humán, mind rágcsáló központi idegrendszeri struktúráin; neuronokon illetve asztrocitákon igazolták (D'Andrea és mtsai., 1998; Kempkes és mtsai., 2014; Noorbakhsh és mtsai., 2006). Előfordul a hippocampus, kortex, amygdala, thalamus, hypothalamus, striatum és a hátsó gyöki ganglionok neuronjain is (Steinhoff és mtsai., 2000; Striggow és mtsai., 2001).

Korábbi vizsgálatok a PAR2-t számos kisméretű és néhány közepes vagy nagyobb méretű hátsógyöki ganglion sejten mutatták ki immunhisztokémiai festéssel (Dai és mtsai., 2004; Steinhoff és mtsai., 2000). A PAR2 hátsó gyöki ganglion neuronokon jelentős kolokalizációt mutat mind a TRPV1 (Amadesi és mtsai., 2004; Hoogerwerf és mtsai., 2004), mind a TRPA1 receptorokkal (Dai és mtsai., 2007). Összességében a hátsógyöki ganglion sejtek több mint 60 %-expresszálja a PAR2-t, ezek jelentős hányada tartalmaz szenzoros neuropeptideket is; 40 %-a CGRP-t, 30 % pedig SP-t is (Steinhoff és mtsai., 2000). A PAR2 hasítása a szenzoros neuronokban aktiválódó intracelluláris folyamatoknak köszönhetően felszabadítja a végződésekben tárolt vazoaktív neuropeptideket.

A PAR2 receptor proteolitikus aktivációja irreverzibilis változást idéz elő a receptor szerkezetében, az aktiválódott receptor a lizoszómákban degradálódik. Rövid szintetikus peptidek, melyek az N-terminális, enzimatikus hasítással szabaddá tett ligand szerkezetéhez hasonlítanak és kötődnek a receptor megfelelő struktúráihoz, agonistái a receptornak (Barry és mtsai., 2010; Lerner és mtsai., 1996; Yau és mtsai., 2016). A szintetikus receptor agonisták hatása reverzibilis, mivel nem változtatja meg a receptor szerkezetét, alkalmazásuk lehetőséget teremt a receptor funkció kísérletes vizsgálatára. Korábbi megfigyelések igazolták a PAR2 jelentős szerepét a nociceptív működésekben. PAR2 agonista kis dózisának intraplantáris injekciója patkányban és egérben termális és mechanikai hiperalgéziát váltott ki, valamint emelkedett Fos fehérje expressziót eredményezett a gerincvelőben (Vergnolle és mtsai., 2001).

Mivel a meningeális szöveteket innerváló trigeminális afferensekből történő CGRP felszabadulás, ami a neurogén gyulladásos reakció részét képező vazodilatáció kiváltásáért felelős, fontos patofiziológiai tényezője a migrénes fejfájásnak, a hízósejtek pedig helyzetük és funkciójuk révén felerősíthetik azokat a hatásokat, melyek a nociceptorok perifériás és centrális végződéseiből peptideket szabadítanak fel és szenzitizálják a nociceptív pályát,

kísérleteink ezen szakaszában vizsgáltuk a dura mater trigeminális kemoszenzitív nociceptorai és a hízósejtek között lejátszódó interakciókat. Vizsgáltuk a CGRP hízósejteket degranuláló és hisztamint felszabadító hatását, a hisztamin által kiváltott meningeális véráramlás válaszok létrejöttében szerepet játszó receptorokat, a hisztamin trigeminális afferenseken kifejtett hatását, illetve a trigeminális afferenseken expresszálódó és a hízósejtekből felszabaduló triptáz hatására aktiválódó PAR2 receptorok trigeminovaszkuláris reakciókban betöltött szerepét.

7.2. Alkalmazott módszerek

Kísérleteink során *in vivo* véráramlás méréssel vizsgáltuk hisztamin topikális applikációját és intravénás injekcióját követő meningeális véráramlás változásokat, valamint a különböző vaszkuláris és neuronális lokalizációjú hisztamin receptorok szerepét a hisztamin által kiváltott véráramlás fokozódásban (**Módszerek 4.5.**). Vizsgáltuk, hogy van-e szerepe a hisztamin-indukálta véráramlás változásban az afferensekből történő CGRP felszabadulásnak (**Módszerek 4.6.**)? *Ex vivo* dura mater preparátumban meghatároztuk a CGRP hízósejtekre kifejtett hisztamint felszabadító hatását (**Módszerek 4.8.**). Kontroll és capsaicin deszenzibilizált (**Módszerek 4.2.**) állatokon vizsgáltuk a tripszin és a szintetikus PAR2 agonista peptid meningeális véráramlás változásokban. Immunhisztokémiai festéssel dura mater preparátumban kimutattuk a PAR2-t expresszáló neuronokat és hízósejteket, valamint a meningeális afferenseken a PAR2 és a TRPV1 receptor lokalizációját (**Módszerek 4.14.**).

7.3. Eredmények

7.3.1. Hisztamin szerepe a meningeális véráramlás szabályozásban

In vivo véráramlás méréseink során hisztamin topikális applikációja a meningeális erekben dózisfüggő, ismételhető véráramlás fokozódást váltott ki, ami nem befolyásolta az állatok átlagos artériás vérnyomását. 10 μ M hisztamin 3 egymást követő applikációja a véráramlást a bazális érték 114,2 ± 9,8; 116,7 ± 9,9 és 113,2 ± 4.8 %-ára (n=6) emelte. Hisztamin 100 μ M koncentrációban 135,1 ± 119,1; 137,6 ± 20,3 és 137,8 ± 12 %-ra (n=9) fokozta a meningeális véráramlást.

Azokban a kísérleteinkben, melyekben a hisztamin topikális applikációját megelőzően a dura matert 5 percig a H1 receptor antagonista cetirizinnel (2 és 20 μM) kezeltük, a

hisztamin által kiváltott véráramlás fokozódás nagyobb mértékű volt, mint a H1 receptor antagonista alkalmazását megelőzően mért érték. Bár a cetirizin applikációja önmagában nem volt hatással a meningeális véráramlásra, 2 μ M cetirizin a hisztaminnal (100 μ M) kiváltott meningeális perfúzió fokozódást az eredeti reakció 123,5 ± 14,7 %-ára, 20 μ M cetirizin 128,2 ± 31,2 %-ára emelte **(30. ábra)**.



30. ábra. A H1 receptor antagonista cetirizin hatása a hisztamin véráramlás fokozó hatására (átlag ± SEM, n=7-9). Egy szempontos ANOVA-t követő Fisher teszt. *: szignifikánsan eltér a hisztamin véráramlás fokozó hatásától. **HA**: hisztamin, **CET**: cetirizin.

A H2 receptorok aktivációjának részvételét a hisztamin által kiváltott meningeális véráramlás reakciókban a dura mater H2 receptor antagonista cimetidinnel történő előkezelésével és az azt megelőzően és azt követően mért hisztamin applikációra mutatott véráramlás válaszok összehasonlításával határoztuk meg. Cimetidin 0,04-4 mM koncentráció tartományban nem okozott változást a bazális véráramlásban, viszont dózis függően csökkentette a hisztamin hatását. 0,04, 0,4 illetve 4 mM cimetidin előkezelés a hisztamin (100 μ M) véráramlás fokozó hatását az eredeti reakció 80,1 ± 21,4; 63,4 ± 17 illetve 37,8 ± 18,8 %-ára mérsékelte (**31. ábra**).



31. ábra. A H2 receptor antagonista cimetidin hatása a hisztamin véráramlás fokozó hatására (átlag ± SEM, n=7-8). Egy szempontos ANOVA-t követő Fisher teszt. *: szignifikánsan eltér a hisztamin véráramlás fokozó hatásától. HA: hisztamin, CIM: cimetidin.

Fiziológiás sóoldat 0,3 ml-ének lassú intravénás injekciója nem befolyásolta sem az állatok átlagos artériás vérnyomását, sem a meningeális véráramlás értékeket. Az injekciót követő 5 percben mért perfúzió a bazális véráramlás 101,2 ± 2,6 %-a (n=8) volt. 10 µg/kg hisztamin intravénás injekciója az átlagos artériás vérnyomás gyors, átmeneti csökkenését okozta, melynek mértéke az egyes kísérletekben 20-40 Hgmm között változott. A vérnyomás értékek minden esetben 2 percen belül normalizálódtak. A meningeális erekben átlagosan 40-60 másodperccel a hisztamin injekcióját követően fokozódott a véráramlás. A véráramlás emelkedésnek minden esetben két fázisát tudtuk elkülöníteni. Az első fázis során, amely 90 másodperc alatt lezajlott, a véráramlás gyorsan emelkedett, majd csúcsszerű maximumot ért el, ezt követően a véráramlás a korábbi bazális értéket valamivel meghaladó szinten stabilizálódott **(32. ábra A)**. Mérési eredményeink kiértékelésekor a hisztamin válasz első fázisa során mért átlagos véráramlás értéket a bazális véráramlás 221,5 ± 12,4 %-ának (n=14) találtuk, ami szignifikánsan meghaladta a fiziológiás sóoldat injekciója mellett mért értékeket.

Néhány kísérletben a H1 receptor antagonista cetirizint (50 µg/kg) intravénás előkezelés formájában alkalmaztuk a hisztamin intravénás (10 µg/kg) adását vagy topikális (100 μM) applikációját megelőzően. A cetirizin szisztémás injekciója nem befolyásolta az állatok átlagos artériás vérnyomását, nem változtatta meg a bazális véráramlás értékeket és nem befolyásolta a hisztamin topikális applikációjával kiváltott véráramlás fokozódást sem. Cetirizin injekciót követően a hisztamin az előkezelést megelőzően mért véráramlás fokozódás 105,4 ± 14,6 %-át (n=8) váltotta ki. Az intravénás hisztamin injekció véráramlás fokozó hatását ellenben a szisztémásan adott cetirizin az eredeti reakció 31,9 ± 9 %-ára (n=5) mérsékelte **(32. ábra B)**.

A H2 receptor antagonista cimetidin (5 mg/kg) intravénás adása nem befolyásolta sem az állatok átlagos artériás vérnyomását, sem a bazális meningeális véráramlás értékeket. A cimetidin nem módosította szignifikánsan sem a topikálisan alkalmazott (az eredeti reakció 68,8 ± 30,9 %-a, n=5), sem az intravénásan adott hisztamin véráramlás fokozó hatását (az előkezelés nélkül mért reakció 116 ± 31,2 %-a volt, n=9).



32. ábra. Szisztémás H1 receptor antagonista cetirizin hatása az intravénás hisztamin véráramlás fokozó hatására. Lézer Doppler véráramlás mérő eredeti regisztrátum szakaszai, melyek az intravénásan adott hisztamin (10 μg/kg, **A**) és a cetirizin (50 μg/kg) injekcióját követően szisztémásan adott hisztamin (10 μg/kg, **B**) meningeális véráramlásra gyakorolt hatását ábrázolják. **HA**: hisztamin, **CET**: cetirizin, **PU**: perfúziós egység.

Annak eldöntésére, hogy a vaszkuláris receptorokon kifejtett hatás mellett a kemoszenzitív trigeminális afferensekből történő neuropeptid felszabadulás is hozzájárul-e a hisztamin véráramlás fokozó hatásának kialakításához, a CGRP receptorok gátlása mellett is meghatároztuk a dura mater hisztamin stimulációjával kiváltható véráramlás változásokat. A dura mater előkezelése a CGRP receptor antagonista CGRP₈₋₃₇ (100 μ M) oldatával nem befolyásolta a bazális véráramlást (102,1 ± 4,4 %). A hisztamin (100 μ M) véráramlás fokozó hatása sem különbözött a CGRP receptorok gátlását megelőzően mért értékektől, ennek mértéke a receptor gátlását megelőzően mért érték 96,8 ± 5,8 %-a volt (n=5).

Perifériás szöveteket innerváló kemoszenzitív afferensek esetében igazolták a hisztamin neuropeptid felszabadulásra kifejtett preszinaptikus H3 receptorok aktivációja révén megvalósuló gátló hatását. Szív, bőr, légutak esetében a kemoszenzitív nociceptorok

H3 receptorainak stimulációja jelentősen csökkentette mind a CGRP mind a SP felszabadulását és a következményes szöveti neurogén gyulladásos reakciót (Ichinose és mtsai., 1990; Imamura és mtsai., 1996; Ohkubo és mtsai., 1995). Felmerült bennünk is annak lehetősége, hogy a hisztamin általunk tapasztalt hatástalansága a trigeminális afferenseken a hisztamin nociceptorokon expresszálódó H3 receptorokon kifejtett gátló hatásának lehet a következménye, ami ellensúlyozza a hisztamin CGRP felszabadító hatását. Ennek eldöntésére meghatároztuk a hisztamin által kiváltott véráramlás válaszokat H3 receptor antagonista tioperamid maleát 100 μ M koncentrációjú oldatának applikációját követően is. A H3 receptor blokkolása nem módosította sem a bazális véráramlás (99,8 ± 0,8 %), sem a hisztamin-indukálta (100 μ M) véráramlás változások mértékét (az eredeti hisztamin válasz 99,4 ± 2,6 %-a, n=7). Néhány kísérletben a CGRP₈₋₃₇ (100 μ M) és tioperamid maleát (100 μ M) együttes applikációjának hatását is teszteltük, ami hasonlóan hatástalan volt a hisztamin reakció szempontjából. A két gátlószer együttes alkalmazását követően a hisztamin 100 μ M koncentrációban a gátlószerek nélkül mért véráramlás fokozódás 97 ± 5,8 %-át váltotta ki (n=5).

In vivo véráramlás vizsgálataink eredményéhez hasonlóan *ex vivo* dura mater preparátumunkban sem tudtunk hisztamin stimulációt követő CGRP felszabadulást igazolni. Ezekben a kísérletekben a trigeminális afferensekből származó bazális CGRP felszabadulás 15,2 ± 2,6 pg/ml volt, amit a hisztamin 100 µM koncentrációban nem módosított (15,3 ± 1,6 pg/ml, n=10). *Ex vivo* preparátumunkban is igazolást nyert a preszinaptikus H3 receptorok neuropeptid felszabadulásra kifejtett hatásának elhanyagolható volta. Hisztamin (100 µM) a H3 receptor blokkoló tioperamid maleát (100 µM) applikációját követően csupán kis mértékben fokozta a CGRP felszabadulást (14,4 ± 1,8 pg/ml-ről 16,9 ± 2,7 pg/ml-re, n=8), ami nem bizonyult szignifikáns mértékű különbségnek.

Patkányok *ex vivo* dura mater preparátumában vizsgáltuk a CGRP hízósejteket degranuláló hatását és a következményes hisztamin felszabadulást is. A CGRP applikációját megelőzően a preparátumokban a bazális hisztamin felszabadulás 12,5 ± 0,5 pg/ml volt. CGRP 10 μ M koncentrációban 33,1 ± 5,7 pg/ml-re emelte a hisztamin koncentrációját, ami szignifikánsan meghaladta a stimulust megelőzően mért értéket **(33. ábra A)**. Néhány mérés során, amikor a CGRP applikációját megelőzően és azzal együtt is CGRP receptor antagonista CGRP₈₋₃₇ 10 μ M-os oldatát pipettáztuk a koponyagödörbe, a CGRP hisztamint felszabadító hatása nem érvényesült **(33. ábra B)**.



33. ábra. CGRP hisztamint felszabadító hatása *ex vivo* dura mater preparátumban. Az értékek a CGRP applikációját (3. minta) megelőzően az inkubáló folyadékban mért bazális hisztamin koncentrációra (2. minta) normalizált értékeket ábrázol (átlag ± SEM, n=10). Egy szempontos ANOVA-t követő Fisher teszt. *: szignifikánsan eltér a 2. minta hisztamin koncentrációjától. **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid, **CGRP**₈₋₃₇: kalcitonin gén-rokon peptid 8-37 fragmentum.

7.3.2. Proteáz aktivált receptor 2 szerepe a meningeális véráramlás szabályozásban és a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 receptorok szenzitizálásában

Patkány dura mater kettős immunhisztokémiai festésével PAR2-t expresszáló trigeminális afferenseket és perivaszkuláris helyzetű hízósejteket azonosítottunk **(34. ábra)**. A PAR2-immunreaktív axonok jó része a nagyobb artéria ágak közelében helyezkedett el és koexpresszálta a TRPV1 ioncsatornát, valószínűsítve ezzel a PAR2 receptort aktiváló hatások nociceptor funkciót befolyásoló hatását, valamint megteremtve a két receptor közötti interakció lehetőségét.



34. ábra. PAR2-immunreaktív idegrostok és sejtek patkány dura materében. PAR2- és TRPV1immunreaktivitást mutató afferensek (**A**, **B**) és PAR2 immunreaktív hízósejtek (**C**) patkány dura mater preparátumában. **TRPV1**: tranziens receptor potenciál vanilloid 1, **PAR2**: proteáz aktivált receptor 2.

Annak eldöntésére, hogy az immunhisztokémiai preparátumainkban azonosított PAR2 receptor valóban szerepet játszik-e a kemoszenzitív afferensek működésének szabályozásában, *in vivo* és *ex vivo* állatmodellünkön vizsgáltuk a receptor aktiválásának hatását a nociceptorok CGRP felszabadító képességére és a következményes vazodilatációra. A PAR2 receptor hasításával aktiváló tripszin (0,1-10 μ M) és a receptor szerkezetének reverzibilis módosítása révén ható szintetikus PAR2 agonista peptid Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leuamide (SLIGRL-NH₂) 1-100 μ M koncentráció tartományban kontroll patkányokban dózisfüggő meningeális véráramlás fokozódást váltott ki **(6. táblázat)**. Ez a hatás a szintetikus PAR2 agonista esetében ismételhető volt. SLIGRL-NH₂ 10 μ M koncentrációban 3 egymást követő applikáció során 16 ± 1,8; 16 ± 2,8 és 14 ± 2,4 % (n=5) véráramlás fokozódást váltott ki. Az applikációk között eltelt 10 percben, amikor a dura matert ismételten átöblítettük SIF-kal, a véráramlás értékek minden esetben visszatértek a stimulust megelőzően mért értékre. A szintetikus PAR2 agonista topikális alkalmazása nem befolyásolta az átlagos artériás vérnyomást, ennek értéke a PAR2 agonista applikációját megelőzően átlagosan 105 ± 12 Hgmm, azt követően pedig 102 ± 9 Hgmm volt.

	Koncentráció (µM)	Véráramlás változás (%)
Tripszin	0,1	0,83 ± 1,1
(n=8-10)	1	7,02 ± 1,2*
	10	12,03 ± 1,1*
SLIGRL-NH ₂	1	2,12 ± 1,2
(n=8-10)	10	16,19 ± 0,9*
	100	28,11 ± 1,2*

6. táblázat. Tripszin és a PAR2 agonista SLIGRL-NH₂ topikális applikációjának hatása a meningeális véráramlásra (átlag ± SEM). Egy szempontos ANOVA-t követő Tukey teszt. *: szignifikánsan eltér a bazális véráramlás értéktől.

Mivel kísérleteink következő szakaszában tisztázni kívántuk, hogy a PAR2 aktiválásával kiváltott vazodilatátor válaszban szerepet játszanak-e a kemoszenzitív nociceptorok, ezért méréseinket elvégeztük előzetesen szisztémás capsaicin kezelésen átesett capsaicin deszenzibilizált állatokon is. Ezekben az állatokban minden esetben teszteltük a kemoszenzitív nociceptorok funkcionális állapotát, melynek eredményeképpen a capsaicin 100 nM koncentrációban kismértékben csökkentette a véráramlást (5,7 ± 2,9 %), ami egyértelműen igazolta a kemoszenzitív nociceptorok funkcióvesztését **(35. ábra)**.



35. ábra. Capsaicin, SLIGRL-NH₂ és hisztamin hatása a meningeális véráramlásra kontroll és capsaicin deszenzibilizált állatokban. Az oszlopok az 5 perces applikáció alatt mért értékeket ábrázolják (átlag ± SEM, n=5-8). Egy szempontos ANOVA-t követő Tukey teszt. *: szignifikánsan eltér a kontrollban mért véráramlás értéktől.

Capsaicin deszenzibilizált állatokban jelentősen csökkent a PAR2 agonista SLIGRL-NH₂ (10 μ M) vazodilatátor hatása, a topikális applikációt követően mindössze 3,4 ± 1,2 % véráramlás fokozódást mértünk. Capsaicin deszenzibilizált állatokban a vaszkuláris reakcióképesség megtartottságára utalt, hogy nem volt különbség a kontroll és a deszenzibilizált állatok esetében mért hisztamin (10 μ M) applikációval kiváltott véráramlás fokozódásban (kontroll: 15,3 ± 1,3 %, capsaicin deszenzibilizált: 18,3 ± 1,8 %) **(35. ábra)**.

Miután megbizonyosodtunk a kemoszenzitív afferensek PAR2 által közvetített véráramlás változásokban betöltött szerepéről, vizsgáltuk ezek TRPV1 receptorainak részvételét a reakcióban. Kontroll állatokban sem a capsaicin 10 nM koncentrációjú oldata, sem a PAR2 agonista SLIGRL-NH₂ 1 μ M koncentrációjú oldata nem okoz véráramlás változást. Ha azonban a PAR2 agonistát 1 μ M koncentrációban előkezelés formájában alkalmaztuk, jelentősen megnövelte az azt követően applikált capsaicin (10 nM) vazodilatátor hatását. Ennek eredményeként átlagosan 8,3 ± 2,1 %-os véráramlás fokozódást mértünk, amely az applikáció teljes időtartama alatt szignifikánsan meghaladta a PAR2 agonista alkalmazását megelőzően mért capsaicin által kiváltott vazodilatációs választ **(36. ábra)**.



36. ábra. SLIGRL-NH₂ előkezelés hatása a capsaicin meningeális véráramlás fokozó hatására. Az értékek a capsaicin (10 nM) által kiváltott véráramlás fokozódást ábrázolják a SLIGRL-NH₂ applikációt megelőzően és azt követően (átlag ± SEM, n=6). Egy szempontos ANOVA-t követő Tukey teszt. *: szignifikánsan eltér a capsaicin által a SLIGRL-NH₂ applikációt megelőzően kiváltott véráramlás változástól.

Eredményeink a PAR2 agonista hatására megvalósuló vazodilatáció mechanizmusaként a kemoszenzitív afferensekből történő CGRP felszabadulást és endotheliális NO termelést igazoltak. A dura mater előkezelése CGRP₈₋₃₇ (100 μM) peptiddel,

illetve NO szintáz gátló N_{ω} -nitro-L-arginin metilészter hidroklorid-dal (L-NAME) (100 μ M) jelentősen csökkentette a PAR2 agonista vazodilatátor hatását. A CGRP receptorok blokkolása a SLIGRL-NH₂ 10 μM koncentrációban kiváltott vazodilatátor hatását 17,1 ± 2,1 %ról 7,7 ± 2,6 %-ra csökkentette az 5 perces applikációs periódus alatt. A NO szintézis gátlása 16,7 ± 1,8 %-ról 6,2 ± 1,2 %-ra csökkentette a véráramlás fokozódást. Előkísérleteink során megbizonyosodtunk arról, hogy a nem specifikus NO szintáz gátló L-NAME maximális hatásának eléréséhez 15 percig tartó topikális applikáció szükséges. Ez alatt az idő alatt a meningeális véráramlás a kiindulási érték 82,4 ± 5,6 %-ára csökkent, majd ezen az értéken stabilizálódott. Annak eldöntésére, hogy a reakcióban szerepet játszó NO endotheliális vagy neuronális eredetű-e, neuronális NO teszteltük а szintáz gátló 1-(2trifluorometilfenil)imidazol (TRIM, 100 μ M) hatását a SLIGRL-NH₂ (10 μ M) véráramlás fokozó hatására. A neuronális NO szintézis gátlása sem a bazális véráramlás értékét, sem a PAR2 agonistával kiváltott véráramlás fokozódást nem befolyásolta (37. ábra). Ez a tény ismételten igazolta, hogy a dura materben fiziológiás körülmények között csak az endothel sejtek szolgáltatnak fukcionális szempontból jelentősebb mennyiségű NO-ot. Kísérleteinkben sem a lokális CGRP receptor blokkolásnak, sem a különféle NO szintáz gátlók alkalmazásának nem volt hatása az átlagos artériás vérnyomásra.



37. ábra. CGRP₈₋₃₇, L-NAME és TRIM hatása a SLIGR-NH₂ véráramlás fokozó hatására. Az értékek a percenként mért véráramlás adatait ábrázolják (átlag ± SEM, n=5-8). Egy szempontos ANOVA-t követő Tukey teszt. *: szignifikánsan eltér a SLIGRL-NH₂ által az antagonisták applikációját megelőzően kiváltott véráramlás változástól. CGRP₈₋₃₇: kalcitonin gén-rokon peptid 8-37 fragmentum, L-NAME: N_ω-nitro-L-arginin metilészter hidroklorid, TRIM: 1-(2-trifluorometilfenil)imidazol.

A kontroll és capsaicin deszenzibilizált állatok *ex vivo* dura mater preparátumaiban mért bazális CGRP felszabadulás 16,1 ± 1,6 illetve 13,3 ± 0,6 pg/ml volt. Bár a capsaicin deszenzibilizált állatokban mért értékek kis mértékben elmaradtak a kontroll állatok értékeitől, ez a különbség nem volt szignifikáns mértékű. SLIGRL-NH₂ 100 μ M koncentrációban jelentősen fokozta a CGRP felszabadulást, a bazális CGRP koncentráció 133,6 ± 13,3 %-ára. Capsaicin deszenzibilizált állatokban ez az érték mindössze 102,7 ± 5,4 % volt **(38. ábra)**. Eredményeink igazolták, hogy a kemoszenzitív afferensek funkcionális és morfológiai integritása alapvető a PAR2 mediálta CGRP felszabadulás és véráramlás válaszok kialakulásában.



^{38.} ábra. Capsaicin-deszenzibilizáció hatása a PAR2 agonista SLIGRL-NH2 meningeális CGRP felszabadító hatására (átlag ± SEM, n=6). Egy szempontos ANOVA-t követő Tukey teszt. *: szignifikánsan eltér a kontroll állatokban mért CGRP felszabadulástól. **SIF**: szintetikus intersticiális folyadék, **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid.

7.4. Megbeszélés

A kemoszenzitív nociceptorok aktiválódása és a perifériás neuropeptid felszabadulás következtében kialakuló szöveti neurogén gyulladásos reakció fontos komponense a szöveti hízósejtek aktiválódása és degranulációja, ami további vazodilatátor anyagokat tesz szabaddá, felerősítve ezzel a neurogén gyulladásos reakciót (Foreman, 1987; Jancsó-Gábor és Szolcsányi, 1972). A dura mater hízósejtjei a szenzoros végződésekből szabaddá váló CGRP és SP hatására egyaránt degranulálódnak (Ottosson és Edvinsson, 1997). Kísérleteink során két hízósejt aktivációval kapcsolatban kialakuló mechanizmus meningeális véráramlásra gyakorolt hatását és nociceptor aktivációban betöltött szerepét vizsgáltuk, mivel ezek a reakciók nagy valószínűséggel szerepet játszhatnak a migrénes fejfájás hátterében kialakuló perifériás és centrális szenzitizáció folyamataiban is.

In vivo és ex vivo kísérleteink eredményei egyértelműen igazolták a nociceptorok aktiválódása következtében felszabaduló CGRP hízósejteket degranuláló és hisztamint felszabadító hatását. A hisztamin azonban - a jelen kísérleti körülmények között - nem aktiválta a szenzoros végződéseket és azokból nem váltott ki további peptid felszabadulást még a preszinaptikus H3 receptorok blokkolását követően sem. Ebben a tekintetben az általunk vizsgált meningeális struktúrák viselkedése eltér egyéb, korábban tanulmányozott szövetekétől, melyekben a H3 receptor stimulációja gátolta a szenzoros neuropeptid felszabadulást (Ichinose és mtsai., 1990; Imamura és mtsai., 1996). Bár kísérleti modellünkben a hisztamin meningeális perfúziót befolyásoló hatását nagy valószínűséggel csak vaszkuláris lokalizációjú receptorokon fejtette ki, ezek a receptorok érfalon belüli elhelyezkedésük és funkciójuk szempontjából is több félének bizonyultak, aminek köszönhetően finoman szabályozható véráramlás változások valósulnak meg. Ezeknek a viszonyoknak a tisztázása céljából juttattuk két féle módon a hisztamint a meningeális szövetekbe; a szabaddá tett dura mater felszínére topikálisan applikálva a vaszkuláris receptorokat a simaizom irányából megközelítve, illetve intravénásan az endotheliális helyzetű receptorok irányából. Intravénás applikációhoz azt a hisztamin koncentrációt választottuk, melyről az irodalomból ismert, hogy infúziója emberben fejfájást vált ki (Lassen és mtsai., 1995).

Eredményeink alapján a hisztamin által kiváltott vaszkuláris simaizom relaxáció részben az endothel sejteken lokalizált H1 receptorok hatásának, részben pedig a valószínűleg simaizomsejteken lokalizált H2 receptorok aktivációjának következtében alakult ki. Emellett vazokonstriktor hatású H1 receptorok működését is igazoltuk, melyek valószínűleg szintén a simaizom sejteken helyezkednek el. Kísérleteinkben a H1 receptor antagonista cetirizin humán terápiában is hatásos koncentrációban alkalmazva (Petersen és mtsai., 1999) fokozta a hisztamin vazodilatátor hatását. Ez a megfigyelésünk összhangban áll korábbi vizsgálatok eredményeivel, melyek humán intracerebrális artériákon hisztaminnal kiváltható vazokonstrikciót igazoltak (Jansen-Olesen és mtsai., 1997). A kísérleteink során intravénásan adott cetirizin csökkentette az intravénásan adott hisztamin véráramlás fokozó hatását, ami a szisztémás adással jobban megközelíthető endotheliális eredetű vazodilatációt

magyarázhatja a hisztamin érfalon keresztül történő penetrálása, ennek révén a hisztamin elérheti és izgathatja a simaizomsejteken elhelyezkedő H2 receptorokat is. Természetesen nem zárhatjuk ki annak lehetőségét sem, hogy a hisztamin és a cetirizin az érfalon keresztül penetrálva topikális applikációt követően is elérheti az artériák endotheljén lokalizált receptorokat. A cimetidin esetében nem valószínű az anyag érfalon keresztül történő penetrációja, mivel az intravénásan adott cimetidin nem módosította sem az intravénás, sem a topikális hisztamin vaszkuláris hatását. A kísérleteink során nyert, a hisztamin vazodilatátor hatásának hátterében álló különböző receptorok szerepét igazoló megállapításaink összhangban vannak más munkacsoportok izolált cerebrális és meningeális ereken tett megfigyeléseivel (Akerman és mtsai., 2002c; Jansen-Olesen és mtsai., 1997).

Míg kísérleti modellünkben a topikálisan adott hisztamin erőteljes véráramlás fokozódást váltott ki, addig az intravénásan adott hisztaminnak csak rövid ideig tartó hatása volt. A keringési rendszerbe juttatott hisztamin valószínűleg csak kisebb koncentrációban éri el a durát, ami a hisztamin viszonylag gyors szöveti metabolizmusának is következménye. A különböző hisztamin receptorok eltérő intracelluláris jelátviteli utakat aktiválnak. A H1 receptorok esetében foszfolipáz C aktiválódása vezet inozitol-triszfoszfát és diacilglicerol képződéséhez, a H2 receptor aktiválódása viszont a cAMP termelés fokozása révén fejti ki hatását (Al-Gadi és Hill, 1985; Galeotti és mtsai., 2004). Intravénás hisztamin véráramlás fokozó hatásának hátterében endotheliális NO termelés valószínűsíthető (Akerman és mtsai., 2002c).

Bár a hisztamin esetében nem tudtuk bizonyítani annak nociceptorokat stimuláló hatását, feltételezhetően egy, a hízósejtek degranulációja során szintén szabaddá váló enzim, a hízósejt eredetű triptáz aktiválhatja a meningeális nociceptorokat. Eredményeink igazolták, hogy a PAR2 aktivációja meningeális véráramlás fokozódást vált ki a kemoszenzitív afferensek TRPV1 receptorainak közvetítésével, CGRP és NO felszabadítása révén. A PAR2 receptor olyan intracelluláris folyamatokat aktivál, melyek szenzitizálhatják a TRPV1 receptort más agonistáival szemben is. Kísérleti eredményeinkhez hasonlóan a PAR2 aktivációja szenzitizálta a bőr afferensek TRPV1 receptorait hőingerekkel szemben (Amadesi és mtsai., 2004). A szenzitizáció hátterében a TRPV1 receptor PKC és PKA általi foszforilációját igazolták, ami a mi esetünkben is valószínűsíthető mechanizmusa a receptor szenzitizációjának (Amadesi és mtsai., 2006; Dai és mtsai., 2004). A TRPV1 receptor PKC által történő foszforilációját a receptor bradykinin és ATP hatására bekövetkező szenzitizációja

esetében már korábban igazolták (Numazaki és mtsai., 2002; Sugiura és mtsai., 2002; Tominaga és mtsai., 2001).

Korábbi vizsgálatok trigeminális ganglion neuronok tenyészetén kimutatták, hogy a neuronoknak közel 80 %-a expresszálja a PAR2 receptort, ezek jelentős hányada a TRPV1 receptort is (Patwardhan és mtsai., 2006). Patkányokban az orr nyálkahártya irányából retrográd módon jelölt trigeminális ganglion neuronokban a tachykininek és a PAR2 kolokalizációja is kimutatható volt (Dinh és mtsai., 2005).

Kísérleti eredményeink a PAR2 aktiváció következményeként nem neuronális vazodilatátor mechanizmus aktiválódását, endotheliális eredetű NO termelődését is igazolták. A PAR2 által kiváltott NO termelődés helye egyértelműen a vaszkuláris endothel volt, amit a neuronális NOS gátló TRIM hatástalansága igazolt. Bár immunhisztokémiai preparátumunkon nem figyeltünk meg a vaszkuláris endothel sejteken PAR2 jelenlétére utaló festődést, más szövetekben ezek jelenlétét kimutatták. Az általunk is igazolt mechanizmushoz hasonlóan PAR2 aktivációja bőr és mezenteriális erek endothel sejtjeiben is NO termelés révén vált ki véráramlás fokozódást (Fujii és mtsai., 2017; Matsumoto és mtsai., 2009).

A PAR2 receptorokat hízósejtek is expresszálhatják, melyek triptáz általi aktiválódása tovább fokozhatja a sejtek degranulációját és a mediátorok felszabadulását (Moormann és mtsai., 2006; Zhang és Levy, 2008). A dura mater gyulladásos folyamatai a megemelkedett szöveti proteáz koncentráció és a PAR2 expresszió fokozódása révén ideális körülményeket teremthetnek a nociceptorok szenzitizációjához (Nystedt és mtsai., 1996).

Bár a hízósejtek degranulációjának és a belőlük felszabaduló mediátoroknak a migrén patofiziológiájában betöltött szerepe nem egyértelmű, ismert, hogy hisztamin infúziója a migrénhez hasonló lüktető jellegű fejfájást vált ki (Krabbe és Olesen, 1980), melyet a H1 receptor antagonista kezelés jótékonyan befolyásol (Lassen és mtsai., 1995). Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy amennyiben a hízósejtek aktiválódnak, számolnunk kell mind a nociceptorok további szenzitizációjával, ami fájdalomérzést vált ki, mind pedig fokozott meningeális véráramlás válaszokkal, ami viszont a szöveti metabolitok gyorsabb eltávolítása révén jótékony hatású lehet.

8. A TRIGEMINÁLIS NOCICEPTOROK AKTIVÁLÓDÁSÁT KÖVETŐ PERIFÉRIÁS ÉS CENTRÁLIS KALCITONIN GÉN-ROKON PEPTID FELSZABADULÁS VIZSGÁLATA

8.1. Bevezetés

A CGRP migrénes fejfájásban betöltött patofiziológiai szerepe és az utóbbi évtizedekben a migrén terápiában alkalmazott CGRP hatást csökkentő szereknek köszönhető előrelépés egyértelmű (Arulmani és mtsai., 2004; Edvinsson és Goadsby, 1994; Goadsby és Edvinsson, 1994; Lassen és mtsai., 2002). Ennek ellenére keveset tudunk ezen farmakonok hatásmechanizmusáról, ami valószínűleg annak is következménye, hogy bár ismerjük a kraniális szövetekben a CGRP lehetséges perifériás és centrális forrásait, nem tudjuk, hogy az ezekből történő CGRP felszabadulás milyen mértékben vesz részt a migrénes fájdalom kialakításában, milyen úton éri el a tünetek létrehozásában szerepet játszó CGRP receptorokat, illetve hogy hol vannak azok a kritikus struktúrák, melyek a felszabaduló CGRP és a CGRP hatást gátló gyógyszerek számára egyaránt elérhetőek?

A vér-agy gát jelenléte az intracerebrális erekben, valamint az agyat és agytörzset borító pia mater ereiben nem, vagy csak nagyon korlátozottan teszi lehetővé a gyógyszerek CGRP ellenes terápiás hatásának kifejtését a trigeminális nociceptív pálya centrális helyzetű struktúráin (Dux és Messlinger, 2015; Raffaelli és Reuter, 2018). Kísérletes és klinikai megfigyelések során, elsősorban a migrénes aura létrehozásáért is felelősnek tartott CSD következményeként tapasztalták a vér-agy gát átmeneti és reverzibilis diszfunkcióját, ami az erek fokozottan áteresztővé válását okozta és ezzel elméletileg a migrénes roham ideje alatt az egyébként intakt vér-agy gát által elzárt központi idegrendszeri területeket is hozzáférhetővé tette a terápiás szerek számára (Gupta, 2009; Gursoy-Ozdemir és mtsai., 2004). A vér-agy gát ilyen jellegű átmeneti áteresztővé válását azonban a migrénes fejfájás esetében sem általános, sem specifikus jelenségnek nem tekinthetjük. Egyéb neurológiai betegségekben, epilepszia és cerebrovaszkuláris kórképek esetében is megfigyeltek hasonló jelenséget (Martins-Ferreira és mtsai., 2000; Shibata és Suzuki, 2017; Wainsztein és Rodríguez Lucci, 2017).

A migrén terápiás szerekkel kapcsolatban felmerülő farmakokinetikai kérdések tisztázása mellett legalább ennyire fontos lenne ismernünk a roham idején felszabaduló CGRP szövetekben történő mozgását is. A meningeális szöveteket innerváló primer szenzoros neuronok minden kétséget kizáróan fő forrását képezik migrénes fejfájás során a szövetekbe, illetve a keringésbe jutó CGRP-nek. A meningeális szöveteket innerváló primer

szenzoros neuronok aktiválása nem csak a neuron perifériás végződéséből szabadít fel peptideket neurogén gyulladásos reakciót, vaszkuláris válaszokat generálva, hanem a sejttest is szabaddá teheti ezeket (Eberhardt és mtsai., 2009), aminek hatására a ganglionban elhelyezkedő glia sejtek aktiválódhatnak és mediátoraik révén szenzitizálhatják a neuronokat. A primer szenzoros neuronok centrális nyúlványából felszabaduló CGRP pedig a nociceptív információ centrális továbbításában játszik direkt vagy közvetett szerepet (Amrutkar és mtsai., 2011; Jansen-Olesen és mtsai., 2014; Kageneck és mtsai., 2014; Offenhauser és mtsai., 2005).

Ismert hogy migrénes roham esetén a CGRP felszabadulás olyan mértékű lehet, ami a kraniális szöveteket elhagyó vénás vérben is kimutatható koncentráció emelkedést okoz (Goadsby és mtsai., 1988, 1990). A felszabaduló CGRP szisztémás vénás keringés irányába történő továbbítását klinikai és kísérletes adatok is igazolták. Az aktiválódó primer szenzoros neuronok perifériás nyúlványaikból és sejttestükből egyaránt juttathatnak CGRP-t a vér-agy gát által nem védett környező venulákba, amely végső soron a vena jugularis vérének emelkedett CGRP tartalmát eredményezheti migrénes roham ideje alatt. Ezzel szemben a pia mater erei közelében szintén jelentős számban megfigyelhető CGRP-immunreaktív afferensek aktiválódása a vér-agy gát miatt már nem a vér, hanem valószínűleg a perivaszkuláris téren keresztül végül a szubarachnoidális likvor tér CGRP tartalmát fokozza. Kísérletes körülmények között gyulladásos mediátorok agykamrába juttatása fokozta a likvor CGRP tartalmát (Hoffmann és mtsai., 2012), amit követett a vénás vér CGRP koncentrációjának emelkedése is, valószínűleg a villi arachnoideales-en keresztül történő fokozott likvor transzportnak köszönhetően. Feltételezhetően a likvor elvezetést biztosít a trigeminovaszkuláris nociceptorok centrális nyúlványából szabaddá váló CGRP számára is. A primer szenzoros neuronok centrális végződéséből kiszabaduló peptid az ereket védő véragy gát miatt nagyobb valószínűséggel penetrál az agytörzs felszíne, végső soron a likvortér irányába. A felszabaduló neuropeptidek ilyen irányú mozgását korábban mikroprobetechnikával igazolták (Schaible és mtsai., 1997).

A felszabaduló CGRP sorsa szempontjából jelentős funkcióval bírhat az elmúlt években azonosított intrakraniális glimfatikus rendszer is. Kísérleti állatokban tracer alkalmazásával igazolták, hogy a likvor a szubarachnoidális térből a pia mater artériái mentén az intracerebrális artériákat körülvevő perivaszkuláris térbe jut (Iliff és mtsai., 2013), ahonnan a folyadék az asztrociták közvetítésével áramolhat a vénákat körülvevő

perivaszkuláris tér irányába (Tarasoff-Conway és mtsai., 2015). A folyadék a vénák mentén a dura mater irányába vándorol, ahonnan a vénás szinuszokat kísérő nyirokerekbe kerül. Így abban az esetben, ha az agyállományba penetráló cerebrális artériákat innerváló peptiderg neuronok aktiválódnak, a belőlük szabaddá váló CGRP a perivaszkuláris résbe jutva a glimfatikus rendszeren keresztül transzportálódhat a nyirokkeringés irányába, ami az intrakraniálisan felszabaduló CGRP elszállításában szerepet játszó harmadik lehetséges útvonal (Messlinger, 2018). Ennek a transzport útvonalnak a patofiziológiai jelentőségét látszik alátámasztani az a tény is, hogy CSD során a glimfatikus rendszer működésében károsodás lép fel (Schain és mtsai., 2017).

A trigeminovaszkuláris rendszer aktiválódásának következtében felszabaduló CGRP sorsával kapcsolatos bizonytalanságok miatt kísérleteink ezen szakaszában célul tűztük ki patkány dura mater afferenseinek kémiai úton történő aktivációja/depolarizációja következtében kialakuló perifériás és centrális CGRP felszabadulás vizsgálatát. Mértük a stimulációt megelőzően és azt követően a vena jugularis-ból vett vérminták és a cisterna cerebellomedullaris területéről nyert likvor CGRP tartalmát, amit egyidejűleg határoztunk meg a dura mater és az agytörzset fedő pia mater területén a CGRP felszabadulás által indukált véráramlás fokozódással.

8.2. Alkalmazott módszerek

Kísérleteink során módosítottuk az *in vivo* meningeális véráramlás modellünket. Az agytörzs szabaddá tételével lehetővé tettük a véráramlás mérést a meningeális nociceptorok centrális nyúlványainak közelében, a nyúltvelő dorzális felszínét borító pia mater artériáiban is (**Módszerek 4.5.**). Kísérleteink során *ex vivo* dura mater preparátumban meghatároztuk a meningeális afferensekből KCl stimulációval kiváltható CGRP felszabadulás mértékét is (**Módszerek 4.6.**). A vena jugularisba vezetett kanülön keresztül vett vérmintákban és a cisterna cerebellomedullarisból nyert likvor mintákban meghatároztuk a dura mater afferenseinek kémiai úton, KCl applikáció útján történő depolarizációjával kiváltott CGRP koncentráció változásokat, amit a primer szenzoros neuronok sejttesteit tartalmazó ganglion trigeminale lidokain kezelésével előidézett vezetési blokkot követően is megismételtünk (**Módszerek 4.7.**).

8.3. Eredmények

8.3.1. A dura mater KCl stimulációjával kiváltott meningeális véráramlás változásokban szerepet játszó tényezők



39. ábra. *In vivo* kísérleti elrendezés a meningeális és agytörzsi véráramlás egyidejű regisztrálására, vér- és likvor minták gyűjtésére és a ganglion trigeminale lidokain kezelésére.

In vivo kísérleti elrendezésünket mutatja a **39. ábra**. Az altatott állatokban a depolarizáló hatású KCl (60 mM) applikációja a dura mater felszínére a meningeális véráramlás gyors csökkenését okozta. Ennek mértéke az applikáció első 2 percében a bazális véráramlás 15,6 ± 6,1 %-a volt és a 10 perces applikációs periódus első 6 percében szigifikánsan eltért a bazális véráramlás értékétől. Az applikációs periódus 10. percének végére a meningeális perfúzió visszatért a kiindulási értékre. A dura mater α -receptor antagonista fentolamin-hidroklorid 100 μ M-os oldatával történő 5 perces előkezelését követően a KCl applikációja már nem csökkentette a véráramlást. Kismértékű, a bazális perfúzió értékét szigifikánsan nem meghaladó véráramlás fokozódást mértünk. Az α -receptor blokkolót megelőzően mért KCl által kiváltott véráramlás értékekhez képest azonban szignifikáns különbség mutatkozott az applikációs periódus első 6 percében **(40. ábra A).** 40 μ l 2 %-os lidokain-hidroklorid (Xylocain) injekciója az azonos oldali ganglion

trigeminale-ba vezetett kanülön keresztül nem befolyásolta a bazális véráramlás értékeket és nem módosította a KCl meningeális véráramlást csökkentő hatását sem.

Ex vivo dura mater preparátumunkban a meningeális afferensekből történő bazális CGRP felszabadulás 15,6 ± 4,7 pg/ml volt. Annak ellenére, hogy *in vivo* véráramlás modellünkben nem tudtunk lényeges véráramlás fokozódást igazolni, *ex vivo* preparátumunkban a KCl 60 mM koncentrációban jelentős mértékben, 76,7 ± 14,9 pg/ml-re (a bazális érték 492 %-a) növelte a CGRP felszabadulást **(40. ábra B)**.

Patkányok dura mater preparátumaiban kettős immunhisztokémiai festéssel az arteria meningea media ágai és a CGRP tartalmú afferensek közvetlen közelében számos tirozin-hidroxiláz-immunreaktív axont mutattunk ki, ami igazolta ezek szimpatikus efferens eredetét **(40. ábra C)**. *In vivo* kísérleteink során a vazokonstrikciót, amely legalább részben szimpatikus efferensek aktivációja következtében felszabaduló katecholaminok hatása, az afferensekből egyidejűleg történő CGRP felszabadulás valószínűleg nem tudta ellensúlyozni.



40. ábra. KCI hatása a meningeális véráramlásra és CGRP felszabadulásra. Meningeális véráramlás értékek (**A**) fentolamin applikációt megelőzően és azt követően (átlag ± SEM, n=10). Egy szempontos ANOVA-t követő Fisher teszt. KCI CGRP-t felszabadító hatása (**B**, átlag ± SEM, n=8). Student-féle kétmintás t-próba. A dura mater kettős immunhisztokémiai festése CGRP és tirozin-hidroxiláz ellenes antitestekkel (**C**). *: szignifikánsan eltér a bazális véráramlás értéktől. #: szignifikánsan eltér a KCI α-receptor blokkoló fentolamin kezelést megelőzően mért hatásától. ‡: szignifikánsan eltér a SIF CGRP felszabadító hatásától. **MMA**: arteria meningea media, **MV**: véna, **CGRP-ir**: kalcitonin gén-rokon peptid-immunreaktivitás, **TH-ir**: tirozin-hidroxiláz-immunreaktivitás, **SIF**: szintetikus intersticiális folyadék, **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid.

8.3.2. A dura mater KCI stimulációjával kiváltott agytörzsi véráramlás változások

A KCl (60 mM) applikációját követően kisebb mértékű, de stabil és a 10 perces applikációs idő alatt a bazális véráramlás 3,6 ± 0,5 %-áig emelkedő véráramlás fokozódást mértünk az agytörzs dorzális felszínét borító pia mater artériáiban. A trigeminális ganglion

lidokain kezelését követően ez a véráramlás fokozódás már nem volt kimutatható (41. ábra





41. ábra. Meningeális KCI applikáció hatása az agytörzsi pia mater artériáiban mért véráramlásra. KCI meningeális applikációjával kiváltott agytörzsi véráramlás változás a ganglion trigeminale lidokain injekcióját megelőzően és azt követően (**A**), (átlag ± SEM, n=10). Egy szempontos ANOVA-t követő Fisher teszt. *: szignifikánsan eltér a bazális véráramlás értéktől. #: szignifikánsan eltér a KCI lidokain injekciót megelőzően mért véráramlás fokozó hatásától. CGRP-immunreaktív axonok az agytörzset borító pia mater totálpreparátumában (**B**). **PA**: pia mater artéria, **CGRP-ir**: kalcitonin gén-rokon peptid-immunreaktivitás.

Az *in vivo* véráramlás méréseket követően eltávolított agytörzsi pia mater immunhisztokémiai festésével CGRP-immunreaktív axonokat azonosítottunk az artéria ágak közelében **(41. ábra B)**.

8.3.3. A dura mater KCl stimulációjának hatása a vér és a likvor kalcitonin gén-rokon peptid tartalmára

A vena jugularisból nyert plazma mintákban a KCl stimulációt megelőzően 15 ± 2,8 pg/ml CGRP koncentrációt mértünk. KCl meningeális applikációját követően ez az érték 21,8 ± 2,8 pg/ml-re nőtt, ami a bazális érték 148 %-a volt **(42. ábra D)**.

A ligamentum atlantooccipitale és az alatta fekvő dura mater eltávolításával megnyitott cisterna cerebellomedullaris-ból közvetlenül a műtéti beavatkozás után vett likvor mintákban a CGRP koncentrációja 245 ± 25 pg/ml volt. A 15 perccel később vett 2. mintában 133 ± 20 pg/ml. 15 perccel a meningeális véráramlás mérése céljából készített koponyaablak kifúrása után a likvor CGRP koncentrációja már csak 108 ± 12 pg/ml volt. A következő 4, 15 perces időközökkel gyűjtött minta CGRP tartalma kis mértékben tovább csökkent, de ez a csökkenés az egyes minták CGRP koncentrációjában már nem okozott szignifikáns mértékű változást **(42. ábra A)**. Ezen eredmények birtokában, a későbbi

kísérletekben a koponya preparálásának befejezése után 30 perces szünetet iktattunk be, ezt követően kezdtük meg a kísérletet és a likvor minták gyűjtését.

Azokban a likvor mintákban, melyeket a KCl meningeális applikációját követően nyertünk, a CGRP koncentráció 84,3 ± 4,9 pg/ml bazális értékről 94,9 ± 6,1 pg/ml-re emelkedett (a bazális érték 114,5 ± 5,7 %-a) **(42. ábra B)**. A trigeminális ganglion lidokain kezelése nem befolyásolta a likvor CGRP tartalmát, de megszüntette a meningeális KCl applikáció CGRP felszabadító hatását. A ganglion lidokainnal történő kezelését követően a KCl hatására bekövetkező CGRP felszabadulás nem különbözött a bazális értéktől, annak 91 ± 9,1 %-a volt **(42. ábra C)**.



42. ábra. A likvor és a vena jugularisból nyert vérminták CGRP tartalma. A cisterna cerebellomedullaris-ból nyert likvor CGRP tartalmának változása (A) közvetlenül a cisterna cerebellomedullaris feltárását követően (post prep), 15 perccel később, a koponyaablak kifúrását követően (post cran) majd ezt követően 15 percenként (átlag ± SEM, n=8-24). Egy szempontos ANOVA-t követő Fisher teszt. KCl stimulációt megelőzően és azt követően mért CGRP koncentrációk a likvorban a ganglion trigeminale lidokain kezelését megelőzően (B, n=18) és azt követően (C, n=8). KCl stimuláció hatása a vena jugularis vérmintáiból nyert plazma minták CGRP tartalmára (D, átlag ± SEM, n=8). Egy szempontos ANOVA-t követő Fisher teszt. ‡: szignifikánsan eltér minden további minta CGRP tartalmától. #: szignifikánsan eltér a koponyaablak megnyitását követően 60 perccel nyert minta CGRP tartalmától. *: szigifikánsan eltér a bazális CGRP koncentrációtól. **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid.

8.4. Megbeszélés

A trigeminovaszkuláris rendszer aktiválódása következtében felszabaduló neuropeptidek vaszkuláris hatásainak vizsgálata jó indikátora a nociceptorok funkcionális állapotának. A meningeális nocicepció perifériás mechanizmusainak vizsgálatával foglalkozó kutatómunkánk során sikerrel alkalmaztuk a dura mater artériáiban bekövetkező véráramlás válaszok analízisét és a meningeális perfúzió következményes változásainak vizsgálatát a primer szenzoros neuronok funkcionális állapotának megítélésére. Ezen eredmények birtokában gondoltunk arra, hogy a perifériás végződéshez hasonlóan a nociceptor aktiválódása során a centrális nyúlványból a nociceptív információt továbbító és/vagy moduláló funkcióval rendelkező peptid felszabadulás mértékére vonatkozóan is információt nyerhetünk az agytörzset borító agyburkok ereihez diffundáló neuropeptid vazodilatátor hatásának mérésével. Kísérleti eredményeink pozitív választ adtak arra a kérdésünkre is, hogy a koponyától elfolyó vér illetve likvor CGRP tartalmának változása tükrözi-e a nociceptorok aktiválódását?

Ezekben a kísérleteinkben a dura mater axonjainak depolarizációját kémiai stimulussal váltottuk ki. Az általunk alkalmazott ingerlési mód mellett természetesen nem tudjuk kizárni annak lehetőségét, hogy a dura mater felszínére juttatott KCl a mélyebb szövetrétegeket, a pia mater afferenseit is eléri és ott is aktiváló hatást fejt ki. A nociceptorok depolarizációjával kiváltott perifériás és centrális CGRP felszabadulás és következményes véráramlás változások meghatározását követően a ganglion trigeminale lidokain kezelésével blokkoltuk a szenzoros információ centrális irányú továbbítását és ennek hatását a centrális CGRP felszabadulásra és véráramlás változásokra (Becker és Reed, 2006; Covasala és mtsai., 2012).

Méréseink során a vér és likvor minták bazális CGRP koncentrációi között jelentős eltérést tapasztaltunk. A likvor minták CGRP tartalma jelentősen meghaladta a vérmintákban mért koncentrációt, ami a két folyadék eltérő keringésdinamikai sajátságainak figyelembe vétele mellett is megerősíteni látszik azt a feltételezésünket, miszerint a dura mater afferenseinek perifériás végződéseiből felszabaduló peptid a venulákon keresztül a vénás szinuszok, végső soron a vena jugularis vérébe kerülhet, a trigeminális primer afferens neuronok centrális végződéseiből, valamint a pia matert innerváló érző neuronok perifériás és centrális nyúlványaiból azonban a vér-agy gát miatt a likvor térbe továbbítódik. Nem tartjuk valószínűnek, hogy a dura materben felszabaduló CGRP a szubarachnoidális likvor tér

felé diffundáljon, mivel az itt elhelyezkedő sejtkapcsoló struktúrák ezt megakadályozzák (Rascol és Izard, 1976).

A CGRP vér-agy gáton keresztül történő transzportjáról nincsenek információink, de a másik szenzoros neuropeptid, a SP esetében ismert, hogy a peptidnek elhanyagolható, mindössze körülbelül 0,5 %-a kerül a vérből az agyállományba (Ermisch és mtsai., 1985). Ezeket a körülményeket figyelembe véve a kísérleteink során a likvorban mért CGRP feltételezhetően döntő mértékben a neuronok centrális végződéséből, az agytörzsi nucleus spinalis nervi trigemini területéről származik (Lennerz és mtsai., 2008). A felszínes laminákból a CGRP valószínűleg az agytörzs dorzális felszínére diffundál, onnan pedig a likvor térbe jut (43. ábra). A primer szenzoros neuronok centrális végződéseiből történő peptid felszabadulást korábban mikroprobe-technikát alkalmazva mutatták ki az agytörzsi nucleus tractus spinalis nervi trigemini szuperficiális lamináiban a dura mater savas oldattal történő nociceptív stimulációját követően (Schaible és mtsai., 1997). Egér nyúltvelő szeletekből in vitro capsaicin és KCl stimuláció hatására is jelentős mennyiségű CGRP felszabadulást mértek (Kageneck és mtsai., 2014). A centrális CGRP felszabadulásra vonatkozó feltételezésünket megerősítette az a tény, hogy a ganglion trigeminale lidokain kezelésével kiváltott vezetési blokk meggátolta a perifériás meningeális szövetekre applikált KCl likvor CGRP koncentrációt fokozó hatását. Hozzájárulhat a likvor magasabb CGRP koncentrációjához az is, hogy a likvorban a peptidázok nem fejtenek ki olyan gyors lebontó hatást a CGRP-re, mint a vérplazmában (Stern és mtsai., 1950).



43. ábra. A dura matert és a pia matert innerváló trigeminális neuronok perifériás és centrális végződéseiből felszabaduló CGRP lehetséges transzportja a vér és a likvor irányába. DA: dura mater artéria, DV: dura mater véna, PA: pia mater artéria, BBB: vér-agy gát, STN: nucleus tractus spinalis nervi trigemini, CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid.

Kísérleteink során a vérben és a likvorban mért CGRP koncentrációk jelentősen elmaradtak azoktól az értékektől, amikkel *in vitro* kísérletekben izolált ereken vazorelaxációt lehet kiváltani. Különböző állatfajok (macska, nyúl, patkány) prosztaglandin F2α hatására prekontrahált artériái esetében az EC50 értéket CGRP 5-10 nM (19-38 ng/ml) koncentrációjával lehetett elérni (Edvinsson és mtsai., 1985, 1987; McCulloch és mtsai., 1986). Ezzel szemben a kísérleteink során a vena jugularis vérében mért CGRP koncentráció sem valószínű, hogy elegendő lenne véráramlás fokozódás kiváltására. Feltételezésünk szerint a primer szenzoros neuronok centrális végződéseiből felszabaduló és lokális vazodilatációt kiváltó CGRP koncentrációja magasabb a vérben és likvorban detektálható értékeknél, ami viszont már eredményezhet véráramlás fokozódást.

In vivo véráramlás méréseink során a depolarizáló hatású KCl meningeális applikációja mindaddig véráramlás csökkenést eredményezett a meningeális szövetekben, amíg nem gátoltuk az adrenerg lpha-receptorokat fentolaminnal. Ez a megfigyelésünk arra enged következtetni, hogy a KCl hatására a dura materben az erek közelében dús hálózatot alkotó szimpatikus posztganglionáris efferensek is depolarizálódnak (Edvinsson és Uddman, 1981; Keller és mtsai., 1989). A szimpatikus vazokonstriktor hatás pedig ellensúlyozza az afferensekből történő CGRP felszabadulás véráramlás fokozó hatását. Bár az α-receptorok blokkolását követően véráramlás csökkenés már nem volt megfigyelhető KCl hatására, az ex vivo preparátumokban is kimutatható jelentős CGRP felszabadulás ellenére sem emelkedett jelentősen a szövet perfúziója. Ugyanakkor az agytörzs területén kismértékű, de következetes véráramlás fokozódást mértünk. Az a tény, hogy a szimpatikus vazokonstrikció kikapcsolását követően sem emelkedett jelentősen a meningeális szövet perfúziója, felveti annak lehetőségét, hogy a neuronális hatások mellett más mechanizmus is szerepet játszhat a KCl véráramlásra kifejtett hatásában. A CGRP meningeális és intracerebrális ereken kifejtett vazodilatátor hatásának hátterében döntően ATP-érzékeny K⁺-csatornák aktiválása áll, és a K⁺ kiáramlás miatti következményes simaizom hiperpolarizáció (Gozalov és mtsai., 2005; Ko és mtsai., 2008; Quayle és mtsai., 1997). Esetünkben ezt a hatást kompenzálhatta a K $^{^+}$ közvetlen, simaizmon kifejtett depolarizáló hatása. 60 mM KCl hatására a simaizom membránpotenciáljának depolarizáció irányába történő eltolódása feszültség függő Ca²⁺csatornákat nyit, ami az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelése révén aktiválja és kontrahálja a simaizomsejteket (Nelson és Quayle, 1995). A kísérleteinkben használt

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

Kísérleteink során lidokain intraganglionáris injekciója megszüntette a meningeális KCl stimuláció által kiváltott agytörzsi véráramlás fokozódást. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a ganglion lidokain kezelése blokkolta a meningeális receptív mezővel rendelkező neuronok agytörzsi másodlagos neuronok irányába történő információ továbbítását (Roch és mtsai., 2007). Az idegingerület terjedésének gátlása következtében, a centrális végződésekből történő CGRP felszabadulás hiányában nem valósult meg a vazodilatáció sem. Bár betegekben a migrénes roham alatt az érintett oldalon a vena jugularis vérében emelkedett CGRP koncentrációkat mértek (Goadsby és Edvinsson, 1993; Goadsby és mtsai., 1990), eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a meningeális afferensek kísérletes aktivációja során és valószínűleg a migrénes roham idején is a neuronokból felszabaduló CGRP ennél jóval nagyobb hányada a primer szenzoros neuronok centrális végződéseiből szabadul fel és közvetlenül a likvor térbe kerül.

9. A KEMOSZENZITÍV MENINGEÁLIS AFFERENSEK MŰKÖDÉSÉBEN BEKÖVETKEZŐ VÁLTOZÁSOK PATOFIZIOLÓGIÁS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

9.1. Bevezetés

A trigeminovaszkuláris rendszer nociceptorainak megváltozott működése kiemelt jelentőséggel bír a primer fejfájások patomechanizmusában szerepet játszó perifériás és centrális szenzitizáció folyamataiban (Burstein és mtsai., 2011). Epidemiológiai vizsgálatok számos szisztémás betegség esetében igazolták a primer fejfájások emelkedett prevalenciáját. Ezek a betegségek általában a szervezet egészét érintő metabolikus változások révén, az immunrendszer működésének megváltoztatása következtében vagy oxidatív/nitrozatív stressz révén módosítják a primer szenzoros neuronok működését (Capo és mtsai., 2018; Cavestro és Ferrero, 2018; Contreras és mtsai., 2018; Moisset és mtsai., 2017; Turan és mtsai., 2017).

Az Egészségügyi Világszervezet statisztikái alapján a túlsúly és az elhízás napjainkban már az egész világon népbetegségnek számít, a probléma kezelése egyike az évszázad nagy egészségügyi kihívásainak (GBD 2015 Obesity Collaborators és mtsai., 2017). A Központi

Statisztikai Hivatal adatai szerint a magyar lakosság több mint 50 %-a is túlsúlyos vagy elhízott. Elgondolkodtató, hogy ma Magyarországon minden ötödik gyermek súlyfelesleggel küzd, belőlük ugyanis nagyobb valószínűséggel lesz felnőtt korukban is túlsúlyos ember (Központi Statisztikai Hivatal, 2018; Nemzeti Egészségfejlesztési Intézet, 2017). Bár maga az elhízás nem tekinthető betegségnek, számos súlyos betegség rizikófaktoraként tartjuk számon. Elhízott emberekben nagyobb valószínűséggel alakulhat ki magas vérnyomás, 2-es típusú diabetes mellitus vagy különböző érrendszeri és mozgásszervi betegségek (Choudhary és mtsai., 2007). Klinikai megfigyelések egyértelmű kapcsolatot igazoltak az elhízás és a primer fejfájások okozta panaszok között is. Az elhízás fokozza a korábban is meglévő migrén rohamainak gyakoriságát és súlyosságát, a migrén kialakulásának kockázata is magasabb elhízott emberekben (Chai és mtsai., 2014a, 2014b).

Az elmúlt évtizedek kutatásai igazolták, hogy a zsírszövet alapvető tápanyag tároló működése mellett jelentős endokrin funkcióval is rendelkezik. A zsírszövet által termelt és a keringésbe juttatott fehérjék között találhatók többek között növekedési faktorok, citokinek, akut fázis proteinek, és adhéziós molekulák is. A zsírszövetből a keringésbe áramló proinflammatorikus hatású mediátorok krónikus gyulladásos állapotot tartanak fenn testszerte és ennek megfelelően módosíthatják a szervek működését (Daryabor és mtsai., 2018). A kemoszenzitív nociceptorok TRPV1 és TRPA1 receptorairól tudjuk, hogy célmolekulái lehetnek azoknak a gyulladásos mediátoroknak, melyek elhízás során fokozott mennyiségben termelődnek (Gouin és mtsai., 2017; López-Requena és mtsai., 2017). A receptorok szerkezetének megváltozása a nociceptorok szenzitizálása révén módosítja a fájdalomérzést és a perifériás neuropeptid felszabadulás következtében létrejövő véráramlás változásokat.

Hasonlóan mélyreható, hosszabb távon a perifériás idegek és a mikroerek funkcióját is veszélyeztető metabolikus változásokkal jár a pankreász inzulintermelő β-sejtjeinek pusztulása, ami 1-es típusú diabetes mellitus kialakulásához vezet (Derosa és Maffioli, 2016; Kazamel és Dyck, 2015; Sopacua és mtsai., 2019). Epidemiológiai vizsgálatok 1-es típusú diabetes mellitus esetében is igazolták a különböző primer fejfájások, mint a migrén és a cluster fejfájás tüneteinek súlyosbodását, illetve a primer fejfájások diabéteszes anyagcserezavar kialakulását követő jelentkezését is (Martins és Blau, 1989; Roberts, 1967; Split és Szydlowska, 1997).

A szervezet egészét érintő patofiziológiai változások meningeális nociceptív mechanizmusokra kifejtett hatásának tanulmányozása során vizsgáltuk a tumor terápiában használt citosztatikum, az adriamycin meningeális véráramlásra kifejtett hatását is. Természetesen adriamycin terápia esetén nem központi kérdés a kezelés esetleges fejfájást befolyásoló hatása, tudomásom szerint korábban nem is foglalkoztak klinikai tanulmányok a közöttük fennálló esetleges összefüggések kiderítésével. Számos adat utal azonban arra, hogy a kezelés súlyos funkcionális/morfológiai károsodást válthat ki a szöveteket innerváló kemoszenzitív neuronokban (Bigotte és Olsson, 1982; Kondo és mtsai., 1987; Minow és Gottlieb, 1975), ami az adriamycin kezelés következtében kialakuló legjelentősebb szövődmény, a kardiomiopátia súlyosságát is befolyásolja (Katona és mtsai., 2004).

Az adriamycin az egyik leggyakrabban alkalmazott antraciklin típusú citosztatikum, melyet számos rosszindulatú daganat kemoterápiája során használnak (Carvalho és mtsai., 2009; Kalyanaraman és mtsai., 2002). Az adriamycin terápia hatásosságát a dezoxiribonukleinsav (DNS) és ribonukleinsav (RNS) szintézis különböző mechanizmusok útján történő gátlása magyarázza (Buja és mtsai., 1974; Kellogg és mtsai., 1998; Meriwether és Bachur, 1972; Pigram és mtsai., 1972; Pommier és mtsai., 2010; Tewey és mtsai., 1984). Ezek közül a DNS oxidatív károsítása (Farhane és mtsai., 2017; Pilco-Ferreto és Calaf, 2016) vagy az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció megemelkedése következtében egyes membránvagy intracelluláris transzporterek károsodása (Keyes és mtsai., 1987; Kohnoe és mtsai., 1992) olyan hatások, melyek a nociceptorok működését és a trigeminovaszkuláris reakciókat is befolyásolhatják. Klinikai megfigyelések és kísérletes eredmények felhívták a figyelmet az adriamycin neurotoxikus hatására, mely érintheti a primer szenzoros neuronokat (Bigotte és Olsson, 1982; Kondo és mtsai., 1987; Minow és Gottlieb, 1975), a motoneuronokat (Liu és mtsai., 1996; Yamamoto és mtsai., 1984) és a szimpatikus efferenseket is (Jeon és mtsai., 2000). Korábbi tanulmányok a primer szenzoros neuronok kifejezett strukturális, neurokémiai és funkcionális károsodását írták le adriamycin kezelést követően (El-Agamy és mtsai., 2017; Kosoko és mtsai., 2017). Laboratóriumunkban végzett vizsgálatok korábban patkányok adriamycin kezelését követően a bőrt innerváló intraepidermális afferensek denzitásának jelentős csökkenését igazolták, ugyanakkor az afferensek eloszlása és sűrűsége a bőr mélyebb rétegeiben nem változott (Boros és mtsai., 2016).

Munkánk ezen szakaszában olyan patofiziológiai állapotokat modelleztünk kísérleti állatokon, melyek metabolikus és immunfolyamatokat befolyásoló, vagy direkt neurotoxikus

hatásuk révén befolyásolhatják a trigeminovaszkuláris rendszer működését és relevanciával bírhatnak a primer fejfájások patomechanizmusát illetően is. Célunk a trigeminovaszkuláris rendszer működésének olyan állat modelleken történő vizsgálata volt, amely hasonlít az emberi zsírban és szénhidrátban gazdag táplálkozás okozta elhízáshoz, illetve amely modellezi az 1-es típusú diabetes mellitus vagy az adriamycin kezelés okozta neuropátiás elváltozásokat.

9.2. Alkalmazott módszerek

Magas zsír és szénhidrát tartalmú táp fogyasztása következtében elhízott állatokban (Módszerek 4.1.), a streptozotocinnal kiváltott 1-es típusú diabetes mellitusban szenvedő és az adriamycinnel szisztémásan kezelt állatokban (**Módszerek 4.2.**) *in vivo* véráramlás méréssel (Módszerek 4.5.) és ex vivo CGRP felszabadulás meghatározásával (Módszerek 4.6.) vizsgáltuk a meningeális kemoszenzitív afferensek válaszkészségét. Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk az általunk alkalmazott magas zsír és szénhidrát tartalmú diéta hatásosságáról, ismételten mértük az állatok testtömegét, a diétás periódus végén meghatároztuk az állatok éhgyomri vércukor-, valamint plazma inzulin és citokin koncentrációit (Módszerek 4.3., 4.4.). Elhízott állatokban tanulmányoztuk a primer szenzoros neuronok stimulációjával kiváltott neurogén gyulladásos reakció másik komponensét, a neurogén plazma extravazációt is, amelyet a lábhátbőr mustárolajjal történő ecsetelését követően a szövetek közé kiáramló, albuminhoz kötődő Evans kék extravazációval vizsgáltunk (Módszerek **4.11.**). Dura mater preparátumban immunhisztokémiai festéssel határoztuk meg a peptiderg kemoszenzitív afferensek valamint az RCP és RAMP1 CGRP receptor komponensek denzitásában bekövetkező változásokat (Módszerek 4.14). A trigeminális ganglion TRPV1 és TRPA1 receptor fehérje mennyiségének változásait Western blot és EIA módszerrel mértük (Módszerek 4.9., 4.10.).

9.3. Eredmények

9.3.1. Magas zsír és szénhidrát tartalmú diéta hatása az állatok metabolikus paramétereire

A 20 hetes diétás periódus alatt azok az állatok, amelyek magas zsír és szénhidrát tartalmú tápot fogyasztottak és szacharóz oldatot ittak, jelentős súlytöbbletre tettek szert a kontroll csoporthoz képest. A diétás periódus végén a kontroll csoport átlagos testtömege 600 ± 14 g, a magas kalória tartalmú tápon tartott állatoké 745 ± 17 g volt. Az elhízott állatok

jóval több intraabdominális és epididimális zsírszövettel rendelkeztek és a zsírszövet testtömeghez viszonyított aránya is jóval meghaladta a kontroll állatokban számolt értéket **(7. táblázat)**.

	Intraabdominális	Epididimális	Zsírszövet/testtömeg
	zsírszövet (g)	zsírszövet (g)	(%)
Kontroll (n=14)	10,1 ± 3,4	12,5 ± 3,3	3,9 ± 0,8
Elhízott (n=14)	27 ± 9,3*	23,6 ± 5,9*	7,4 ± 1,4*

7. táblázat. Magas zsír és szénhidrát tartalmú diéta hatása az állatok intraabdominális- és epididimális zsírszövetének tömegére, valamint a zsírszövet testtömeghez viszonyított arányára (átlag ± SEM). Egy szempontos ANOVA-t követő Bonferroni teszt. *: szignifikánsan eltér a kontroll értéktől.



44. ábra. Magas zsír és szénhidrát tartalmú diéta hatása az állatok metabolikus paramétereire és plazma citokin koncentrációira. Az oszlopok az éhgyomri vércukor (**A**, n=14) és plazma inzulin (**B**, n=14) koncentrációkat, valamint a citokinek vérplazmában mért koncentrációit ábrázolják (**C**, átlag ± SEM, n=9). Egy szempontos ANOVA-t követő Bonferroni teszt a metabolikus paraméterek esetében, Mann-Whitney U teszt a plazma citokin koncentrációk esetében.*: szignifikánsan eltér a kontroll állatokban mért értékektől. **TNF** α : tumor nekrózis faktor α , **IL-1** β : interleukin-1 β , **IL-6**: interleukin-6.
Az elhízott állatokban magasabbnak mértük az éhgyomri vércukor (kontroll: 5,75 ± 0,13; elhízott: 6,54 ± 0,33 mmol/l) **(44. ábra A)** és plazma inzulin koncentrációkat is (kontroll: 17,46 ± 3,31; elhízott: 48,51 ± 8,67 µU/ml) **(44. ábra B)**. A három vizsgált citokin közül a TNF α koncentrációja nem különbözött a két állatcsoportban (kontroll: 18,63 ± 0,92; elhízott: 17,12 ± 1,2 pg/ml), míg az IL-1 β (59,04 ± 2,99 vs. 170,04 ± 23,78 pg/ml) és IL-6 koncentrációk (56,39 ± 2,15 vs. 114,46 ± 11,32 pg/ml) elhízott állatok mintáiban jóval meghaladták a kontrollban mért értékeket **(44. ábra C)**.

9.3.2. Elhízás hatása a bőr neurogén plazma extravazációjára

Az állatok metabolikus paraméterei; a súlytöbblet, az extra zsírszövet és a gyulladásos citokinek fokozott termelődése jól tükrözték az emberi elhízásra is jellemző változásokat. A kemoszenzitív nociceptorok efferens funkciójában bekövetkező változások átfogó vizsgálata céljából teszteltük a neurogén gyulladás plazma extravazációs komponensében bekövetkező változásokat is. Evans kék intravénás injekcióját és az állatok lábhát bőrének mustárolajjal történő ecsetelését követően a fokozottan áteresztővé váló venulákból a szövetekbe kilépő albuminhoz kötött festék mennyisége elhízott állatokban nagyobb mértékű volt, amit a bőr intenzívebb kék elszíneződése mutatott **(45. ábra)**. Ezt tükrözték az átlagos pixel intenzitás (világosság) kiértékelésével nyert eredményeink is. Az elhízott állatok lábhát bőrében a kontroll értéknek mindössze 62,7 ± 9,3 %-át mértük (n=3).



45. ábra. Evans kék extravazációja a lábhát bőrében. A festék intravénás injekcióját követően kontroll (**A**) és elhízott (**B**) állatok mustárolajjal ecsetelt lábhát bőréről 5 perccel később készült fotók.

dc_1628_19

9.3.3. Elhízás hatása a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 receptorok által közvetített trigeminovaszkuláris reakciókra

In vivo meningeális véráramlás méréseink során a kontroll és elhízott állatok sem az átlagos artériás vérnyomás értékeikben (kontroll: 128 ± 17 Hgmm, elhízott: 134 ± 13 Hgmm), sem a bazális meningeális perfúzió tekintetében nem különböztek egymástól (kontroll: 245,2 ± 18,1; elhízott: 244,1 ± 19,6 PU). Kontroll állatokban 100 nM capsaicin topikális applikációja kismértékű véráramlás fokozódást eredményezett (átlagosan 4,3 ± 2,1 %), mely csak az 5 perces applikáció utolsó 2 percében különbözött szignifikáns mértékben a bazális véráramlástól. Elhízott állatokban ez a capsaicin koncentráció sokkal erőteljesebb véráramlás fokozódást váltott ki (átlagosan 15,9 ± 3,6 %), mely hatását tekintve a teljes applikáció ideje alatt szignifikánsan meghaladta a kontrollban mért értékeket. A magasabb, 10 μ M-os capsaicin oldat vazokonstriktor hatása is szignifikánsan nagyobb volt az elhízott állatokban (kontroll: 4 ± 2,1 %, elhízott: 12 ± 2,7 % átlagos véráramlás csökkenés) **(46. ábra)**.



46. ábra. Magas zsír és szénhidrát tartalmú diétával indukált elhízás hatása a capsaicin által kiváltott meningeális véráramlás válaszokra. Capsaicin 100 nM-os (**A**) és 10 μM-os (**B**) oldatának topikális applikációja által kiváltott véráramlás változások. Az értékek a percenként mért átlagos véráramlás változásokat ábrázolják (átlag ± SEM, n=6-9). Mann-Whitney U-teszt. *: szignifikánsan eltér a bazális véráramlás értéktől. #: szignifikánsan eltér a kontrollban mért értéktől.

9.3.4. Elhízás hatása a tranziens receptor potenciál ankyrin 1 receptorok által közvetített szenzoros neurogén vazodilatációra

Kontroll patkányokban a TRPA1 receptorokat aktiváló akrolein dózisfüggő véráramlás fokozódást váltott ki a meningeális erekben, ami 100 és 300 μ M akrolein koncentrációk mellett szignifikánsan eltért a bazális véráramlástól (annak 107,7 ± 1,4 %-a illetve 114,4 ± 2,3 %-a volt a maximális véráramlás változást mutató egy percben).



47. ábra. Akrolein véráramlás fokozó hatása kontroll és elhízott állatokban. Eredeti regisztrátumok (**A**) és az eredmények statisztikai kiértékelése (**B**). Az oszlopok a maximális véráramlás fokozó hatást ábrázolják (átlag ± SEM, n=8-12). Student-féle egymintás t-próba vagy Mann-Whitney U-teszt. *: szignifikánsan eltér a bazális véráramlás értéktől. #: szignifikánsan eltér az akrolein (300 μ M) hatásától, ‡: szignifikánsan eltér a kontrollban mért értéktől. **PU**: perfúziós egység, **CGRP**₈₋₃₇: kalcitonin gén-rokon peptid 8-37 fragmentum, **HC030031:** 1,2,3,6-tetrahidro-1,3-dimetil-*N*-[4-(1-metiletil)fenil]-2,6-dioxo-7*H*-purin-7-acetamid.

Az akrolein véráramlás fokozó hatását a TRPA1 receptorok stimulációja révén, CGRP felszabadításával váltotta ki, mivel a TRPA1 receptor antagonista HC030031 (50 μ M) és a CGRP₈₋₃₇ (100 μ M) egyaránt kivédte az akrolein (300 μ M) véráramlás fokozó hatását. A TRPA1 receptorok blokkolását követően applikált akrolein mindössze 2 ± 1,2 %, míg a CGRP receptorok gátlását követően 1,9 ± 1,2 % maximális véráramlásfokozódást váltott ki. Elhízott állatokban a TRPA1 receptor stimulációja (akrolein 100 μ M) - hasonlóan a capsaicin TRPV1 receptoron kifejtett hatásához - nagyobb mértékű véráramlás fokozódást váltott ki (a bazális érték 13,1 ± 2,2 %-a), mint kontroll állatokban **(47. ábra)**.

Annak eldöntésére, hogy a zsír és szénhidrát dús táplálás befolyásolja-e a meningeális erek funkcionális tulajdonságait és ezen keresztül a vaszkuláris reaktivitást, vizsgáltuk a vazodilatátor CGRP (100 μ M) és hisztamin (100 μ M) közvetlen dura materre történő applikációjával kiváltott véráramlás változásokat is. Mindkét anyag mindkét állatcsoportban szignifikáns mértékű véráramlás fokozódást váltott ki, amely nem különbözött egymástól a két állatcsoportban és mind mértékében, mind jellegében megfelelt az általunk korábban más kísérletekben megfigyelt reakcióknak. A hisztamin kontroll állatokban átlagosan 9,7 ± 2,1 %, elhízott állatokban 9,4 ± 2,1 %, a CGRP applikációja pedig kontroll állatokban 10,6 ± 2,8 %, elhízottakban 10,2 ± 3,1 % véráramlás fokozódást váltott ki **(48. ábra)**.



48. ábra. Hisztamin (A) és CGRP (B) topikális applikációjának hatása a meningeális véráramlásra kontroll és elhízott patkányokban. Az értékek a percenként mért átlagos véráramlás változásokat ábrázolják (átlag ± SEM, n=8-10). Mann-Whitney U-teszt. *: szignifikánsan eltér a bazális véráramlás értéktől. **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid.

9.3.5. Elhízás hatása a trigeminális nociceptorokból történő kalcitonin gén-rokon peptid

felszabadulásra

Elhízott állatok *ex vivo* dura mater preparátumaiban mért bazális CGRP felszabadulás mértéke meghaladta a kontroll állatokban mért értékeket (kontroll: 16 ± 1,5; elhízott: 40,23

 \pm 6,2 pg/ml). Capsaicin mindkét állat csoportban dózis függő módon fokozta a CGRP felszabadulását, elhízott állatokban azonban ennek mértéke mindkét vizsgált capsaicin koncentráció esetében szignifikánsan meghaladta a kontroll állatokban mért értékeket. Capsaicin 10 nM-os koncentrációja 34,7 \pm 2,3 pg/ml illetve 120 \pm 27,6 pg/ml, míg capsaicin 100 nM-os koncentrációja 75,6 \pm 7 pg/ml illetve 358,1 \pm 95,5 pg/ml CGRP felszabadulást váltott ki a két állatcsoportban (49. ábra).



49. ábra. TRPV1 receptorok aktivációjával kiváltott CGRP felszabadulás a meningeális afferensekből SIF és capsaicin applikációját követően kontroll és elhízott állatokban (átlag ± SEM, n=6-22). Student-féle egymintás t-próba vagy Mann-Whitney U-teszt. *: szignifikánsan eltér a SIF applikáció mellett mért bazális véráramlás értéktől. #: szignifikánsan eltér a kontrollban mért értéktől. SIF: szintetikus intersticiális folyadék, CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid.

Kontroll preparátumokban a vizsgált két alacsonyabb akrolein koncentrációnak (10 és 50 μ M) nem volt jelentős CGRP felszabadító hatása, a két nagyobb koncentrációnak (100 és 300 μ M) ellenben igen. A TRPA1 receptorok aktivációjának CGRP felszabadulásban betöltött szerepét *ex vivo* méréseink eredménye is alátámasztotta; TRPA1 receptor antagonista előkezelés az akrolein (300 μ M) által kiváltott CGRP felszabadulás mértékét a bazális értékhez viszonyított 232,7 ± 18,8 %-ról 132,2 ± 15,9 %-ra csökkentette. Elhízott állatokban

az akrolein (100 μM) szignifikánsan nagyobb mennyiségű CGRP-t szabadított fel (kontroll: 227,1 ± 29,9 %, elhízott: 336 ± 33,1 %).

Az afferensek KCl (60 mM) applikációval kiváltott depolarizációja bár mindkét állatcsoportban jelentősen megemelte a CGRP felszabadulást, ennek mértéke elhízott állatokban elmaradt a kontrollban mért értéktől (kontroll: 307,4 ± 38,3 %, elhízott: 189,9 ± 13,4 % a bazális értékhez viszonyítva) **(50. ábra)**.





9.3.6. A tranziens receptor potenciál vanilloid 1 és tranziens receptor potenciál ankyrin 1 receptorok expressziója kontroll és elhízott állatok trigeminális neuronjaiban

Western blot méréseink elhízott állatok trigeminális ganglionjaiban a TRPA1 fehérje mennyiségének kis mértékű, de szignifikáns csökkenését igazolták **(51. ábra A)**. Immunhisztokémiai festéssel a TRPV1- és CGRP-immunreaktív axonok mind kontroll, mind elhízott állatok dura mater totálpreparátumában kimutathatóak voltak, főleg az artéria ágakat kísérő idegrost kötegek formájában. Bár kontroll és elhízott állatok esetében sem az axonok számában, sem eloszlásukban nem volt különbség, elhízott állatok dura mater preparátumaiban számos axon mutatott strukturális elváltozást. Míg kontroll preparátumokban a CGRP-immunreaktivitás egyenletes eloszlását láttuk az axonok teljes hosszában, elhízott állatokban gyakran gyöngysor szerű festődés volt megfigyelhető, ami feltételezéseink szerint összefüggésben állhat az ezen axonok esetében megfigyelt fokozott peptid felszabadulással **(51. ábra B)**.



51. ábra. TRPA1 és TRPV1 receptorok expressziója a trigeminális neuronokban kontroll és elhízott állatokban. A TRPA1 receptor fehérje expressziója a ganglion trigeminale neuronjaiban (**A**, átlag ± SEM, n=7-8). Mann-Whitney U-teszt. *: szignifikánsan eltér a kontrolltól. Kontroll és elhízott állatokból származó dura mater kettős immunhisztokémiai festése TRPV1 és CGRP ellenes antitestekkel (**B**). Elhízott állat dura mater preparátumában a CGRP immunreaktivitás gyöngysor szerű festődést mutatott. **TRPA1**: tranziens receptor potenciál ankyrin 1, **TRPV1**: tranziens receptor potenciál vanilloid 1, **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid, **MMA**: arteria meningea media.

9.3.7. Diabetes mellitus hatása a trigeminovaszkuláris reakciókra és a dura mater nociceptorainak tranziens receptor potenciál vanilloid 1 expressziójára

Streptozotocin intravénás injekciójával állatok egy csoportjában a pankreász Langerhans szigetek β -sejtjeinek elpusztításával diabetes mellitus-t váltottunk ki. A streptozotocinnal kezelt állatok egyik csoportja a diabétesz kiváltását követő 3. naptól kezdve folyamatosan inzulin szubsztitúcióban részesült. A három állatcsoport vércukor értékei a kísérletek időpontjában 102,7 ± 18,5 (kontroll), 384,5 ± 46 (diabéteszes) és 154,3 ± 38,9 mg/dl (inzulinnal kezelt diabéteszes) voltak. Az állatok testtömege is jól tükrözte az anyagcseréjük állapotát. A 6 héttel korábban streptozotocin, illetve oldószer kezelésen

átesett állatok tömege 325 ± 12,9 (kontroll), 248 ± 15 (diabéteszes) és 322,5 ± 6,7 g (inzulinnal kezelt diabéteszes) volt. A trigeminovaszkuláris rendszer funkcionális állapotát a korábbi vizsgálataink során vazodilatátor illetve vazokonstriktor hatásúnak talált capsaicin koncentrációkkal teszteltük. In vivo véráramlás méréssel kontroll állatok meningeális ereiben a korábbi kísérleteinknek megfelelő mértékű véráramlás fokozódást (13,2 ± 2,2 %) mértünk 100 nM capsaicin oldat applikációját követően. Diabéteszes állatokban 2 és 4 héttel a diabétesz kiváltása után még a kontrollal megegyező mértékű véráramlás fokozódást mértünk (9,4 ± 2,8 %, illetve 12 ± 1,8 %), 6 héttel utána azonban már csak enyhe konstrikciót regisztráltunk (5,9 ± 2,1 % véráramlás csökkenés), ami a kemoszenzitív afferensekből történő CGRP felszabadulás károsodására és ennek következtében a capsaicin válasz véráramlást fokozó komponensének kiesésére és a háttérben meghúzódó direkt vazokonstriktor hatás érvényre jutására utalt. A diabétesz kiváltását követően megkezdett inzulin szubsztitúció helyreállította a capsaicin véráramlás fokozó hatását (15 ± 2,9 %). A magasabb, vazokonstrikciót kiváltó capsaicin koncentráció (10 µM) mindhárom állatcsoportban függetlenül a diabétesz fennállásának időtartamától - hasonló mértékű (21-28 % közötti) véráramlás csökkenést eredményezett (52. ábra). A peptiderg afferensek közreműködése nélkül ható CGRP (10 µM) és hisztamin (10 µM) applikációjával kiváltott véráramlás fokozódás a három állatcsoportban nem különbözött. CGRP applikációját követően 14,6 ± 2,8 (kontroll), 19 ± 3 (diabéteszes) és 22,1 ± 2,8 % (inzulinnal kezelt diabéteszes), hisztamin applikációját követően pedig 12,8 ± 3,4 (kontroll), 11 ± 1,6 (diabéteszes) és 17,2 ± 2,8 % (inzulinnal kezelt diabéteszes) véráramlás fokozódást mértünk (n=5-8).



52. ábra. Különböző koncentrációjú capsaicin oldatok hatása a meningeális véráramlásra kontroll állatokban, 2-, 4-, 6 héttel a diabétesz kiváltását követően, illetve a diabétesz kiváltását követően inzulinnal kezelt állatokban. Az oszlopok a 3 perces applikációs idő alatt mért értékeket ábrázolják

(átlag ± SEM, n=5-9). Egy szempontos ANOVA-t követő Tukey teszt. *: szignifikánsan eltér a kontroll állatokban mért értéktől.

Immunhisztokémiai festéssel mind kontroll, mind diabéteszes állatok dura mater preparátumaiban 6 héttel a diabétesz kiváltását követően a TRPV1-immunreaktív afferensek korábban már megfigyelt elhelyezkedését tapasztaltuk. Egyes rostok mind az erek közelében, a perivaszkuláris régióban, mind az erektől távolabbi "avaszkuláris" régióban megfigyelhetőek voltak. Mivel a rostkötegek esetében nem volt megbízhatóan meghatározható az azokban haladó rostok pontos száma, morfometriai kiértékelésünk során a cikloid görbéket tartalmazó mérő sablonnal képezett metszéspontokat külön határoztuk meg az egyes axonok és a rostkötegek vonatkozásában (Howard és Reed, 1998). Morfometriai vizsgálataink diabéteszes állatok dura materében mind az artériákat kísérő idegrost kötegekben, mind az erektől távolabbi területeken a TRPV1 receptort expresszáló axonok denzitásának jelentős csökkenését igazolták, mely egyaránt érintette a perivaszkuláris és az avaszkuláris régiókat **(8. táblázat)**.

	Perivaszkuláris régió		"Avaszkuláris" régió	
	egyes rostok	rost kötegek	egyes rostok	rost kötegek
Kontroll (n=3)	51,16 ± 6,13	68,63 ± 6,31	39,44 ± 8,57	9,5 ± 4,58
Diabéteszes (n=3)	19,76 ± 2,28*	53,88 ± 7,41*	11,8 ± 3,86*	4,14 ± 3,76*

8. táblázat. TRPV1-immunreaktív idegrostok denzitása a dura materben kontroll állatokban és 6 héttel a diabétesz kiváltását követően. Az értékek a cikloid mérő sablon egyes idegrostokkal és rost kötegekkel képezett metszéspontjainak számát mutatja a dura mater 1 mm² felületére vonatkoztatva (átlag ± SEM). Student-féle kétmintás t-próba. *: szignifikánsan eltér a kontroll értéktől.

9.3.8. Szisztémás adriamycin kezelés hatása a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 és tranziens receptor potenciál ankyrin 1 receptorok aktivációjával kiváltott meningeális véráramlás válaszokra

In vivo kísérleteink során kontroll és adriamycinnel szisztémásan kezelt patkányok méret és topográfia szempontjából is hasonló meningeális ereiben mértük a véráramlás változásokat. A bazális véráramlás értékek mindkét állatcsoportban 200-500 PU közötti értékek voltak. Kontroll állatokban capsaicin 100 nM koncentrációban a dura mater felszínén topikálisan alkalmazva jelentősen fokozta a véráramlást (28,6 ± 7,9 %), míg adriamycinnel kezelt állatokban a véráramlás fokozódás csak 11 ± 3 % volt. A capsaicin véráramlás fokozó hatása kontroll állatokban ismételt applikációk esetében reprodukálható volt, a 2. és 3.

applikációk 30,3 ± 4 és 21,5 ± 3,4 % véráramlás fokozódást eredményeztek. Adriamycinnel kezelt állatokban a capsaicin ismételt applikációja véráramlás változást gyakorlatilag nem váltott ki (2,6 ± 1,8 és 1 ± 0,6 %) (53. ábra A).

Akrolein ismételt topikális applikációja hasonló eredményre vezetett. Kontroll állatokban 300 μ M akrolein 3 egymást követő applikációja 14,4 ± 2,4; 13,3 ± 3,7 és 8,9 ± 2,5 % véráramlás fokozódást váltott ki, míg adriamycin kezelést követően az acroleinnel kiváltható véráramlás fokozódás jelentős csökkenését figyeltük meg (4,1 ± 1,1; 2,6 ± 1,3 és 1,4 ± 1,8 %) **(53. ábra B)**.



53. ábra. Ismételt capsaicin (A) és akrolein (B) applikációk hatása a meningeális véráramlásra kontroll és adriamycin-kezelt állatokban (átlag ± SEM, n=8-14). Egy szempontos ANOVA-t követő Fisher teszt. *: szignifikánsan eltér a bazális véráramlás értékétől, #: szignifikánsan eltér a kontroll állatokban mért értéktől, ‡: szignifikánsan eltér az első applikáció véráramlás fokozó hatásától.

9.3.9. Szisztémás adriamycin kezelés hatása a kalcitonin gén-rokon peptid, hisztamin és acetilkolin applikációjával kiváltott meningeális véráramlás válaszokra

A vazodilatátor CGRP (10 μ M) három egymást követő applikációja kontroll állatokban 20,3 ± 5,3; 21,8 ± 3,9 és 24,7 ± 5,3 %-os véráramlás fokozódást eredményezett. Az adriamycinnel kezelt állatokban a CGRP vazodilatátor hatása csak körülbelül fele volt a kontrollban mért értéknek, de ismételt applikációk esetén a véráramlás fokozó hatásban nem tapasztaltunk további csökkenő tendenciát (9,8 ± 1,6; 10 ± 1,9 illetve 8,6 ± 1,8 %) **(54. ábra A)**.

A két állatcsoportban nem mértünk különbséget sem a 10 μ M hisztamin (21,3 ± 3,9 vs. 22,3 ± 4,6 %), sem a 100 μ M acetilkolin (15,8 ± 3,7 vs. 16,9 ± 4,5 %) vazodilatátor hatásában. A CGRP hatásának intracelluláris mediálásáért felelős cAMP szintjét növelő forskolin (100 μ M) hatását sem befolyásolta az adriamycin kezelés (22 ± 8 vs. 22,9 ± 9,8 %) **(54. ábra B)**.



54. ábra. Ismételt CGRP applikáció (A) valamint hisztamin, acetilkolin és forskolin (B) meningeális véráramlás fokozó hatása kontroll és adriamycin-kezelt állatokban (átlag ± SEM, n=10-17). Egy szempontos ANOVA-t követő Fisher teszt a CGRP hatás esetében, Student-féle egymintás t-próba a hisztamin, acetilkolin és forskolin esetében. *: szignifikánsan eltér a bazális véráramlás értékétől, #: szignifikánsan eltér a kontroll állatokban mért értéktől. **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid.

9.3.10. Szisztémás adriamycin kezelés hatása a meningeális kalcitonin gén-rokon peptid felszabadulásra

Ex vivo dura mater preparátumokban a bazális CGRP felszabadulás adriamycin-kezelt állatokban valamivel meghaladta a kontrollban mért értéket (13 ± 2,7 vs. 20 ± 1,9 pg/ml). Kontroll állatok dura mater preparátumaiban capsaicin 100 nM koncentrációban szignifikánsan fokozta a CGRP felszabadulás mértékét, ami a stimulus ismétlése esetén sem

váltott ki az elsőtől eltérő hatást. A 3 egymást követő capsaicin stimuláció során a CGRP felszabadulás a kontroll, SIF applikáció mellett mért bazális értékhez viszonyítva 294,2 \pm 51,6; 229,5 \pm 56,7 és 251,4 \pm 101,4 %-ot tett ki. Adriamycinnel kezelt állatokban az első capsaicin applikáció szignifikánsan nagyobb CGRP felszabadulást váltott ki (a bazális érték 564,1 \pm 71,2 %-a) mint kontroll állatokban, a további capsaicin applikációk viszont már gyakorlatilag nem eredményeztek további CGRP felszabadulást. A CGRP felszabadulás mindössze 117,1 \pm 19,9 és 80,1 \pm 12,5 %-a volt a bazális felszabadulásnak a második és a harmadik applikáció során **(55. ábra A).**

Kontroll állatokban az akrolein (300 μ M) ismételt applikációja is szignifikáns és hasonló mértékű CGRP felszabadulást váltott ki (a bazális CGRP koncentráció 277,2 ± 25,9; 361,9 ± 50,6 és 385,6 ± 83,3 %-a). Adriamycin-kezelt állatokban az 1. akrolein applikáció a kontrollal összevethető mértékű CGRP felszabadulást eredményezett (273,9 ± 56,2 %), a további applikációknak azonban csak mérsékelt hatása volt (162,5 ± 40,3 és 189,1 ± 56,8 %re történő fokozódás a 2. és a 3. applikáció során) **(55. ábra B)**.



55. ábra. Capsaicin (100 nM, A) és akrolein (300 μM, B) hatása a meningeális afferensekből történő CGRP felszabadulásra kontroll és adriamycinnel kezelt állatokban. Az adatok átlag ± SEM értékeket ábrázolnak (n=6-9). Egy szempontos ANOVA-t követő Fisher teszt. *: szignifikánsan eltér a SIF applikációja mellett mért bazális CGRP felszabadulástól. #: szignifikánsan eltér a kontroll állatok értékétől. SIF: szintetikus intersticiális folyadék, CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid, caps: capsaicin.

dc_1628_19

9.3.11. Szisztémás adriamycin kezelés hatása a ganglion trigeminale tranziens receptor potenciál vanilloid 1 fehérje tartalmára, a dura mater kemoszenzitív peptiderg afferenseinek denzitására és a kalcitonin gén-rokon peptid receptort alkotó fehérjékre

Kontroll állatokból származó trigeminális ganglion mintákban átlagosan 6,25 ± 2,7 pg/mg (n=10) TRPV1 koncentrációt mértünk. Adriamycin kezelt állatokban ez az érték 4 ± 0,5 pg/mg-ra (n=11) csökkent. Kontroll és adriamycin-kezelt állatok dura materében sem a TRPV1- sem a CGRP immunreaktív axonok denzitásában, sem lokalizációjában nem volt szembetűnő különbség. A receptor és a peptid az axonok többségében együtt fordult elő. Ezzel szemben lényeges különbséget figyeltünk meg a meningeális erek CGRP receptor komponens RCP-immunreaktivitásában. Míg kontroll állatokból származó dura mater preparátumokban mind az RCP, mind a RAMP1 receptor komponensek kimutathatóak voltak a meningeális artériák és vénák falában, addig az adriamycin-kezelt állatok mintáiban csak a RAMP1-immunreaktivitás volt megfigyelhető, az RCP-immunreaktivitás azonban nem **(56. ábra)**.



56. ábra. Kontroll (A,B) és adriamycinnel szisztémásan kezelt állatok (C,D) dura mater totálpreparátumainak kettős immunhisztokémiai festése. A CGRP és a TRPV1 receptor, valamint a RAMP1 és a RCP CGRP receptor komponensek kimutatása. **MMA**: arteria meningea media, **V**: véna, **TRPV1**: tranziens receptor potenciál vanilloid 1, **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid, **RAMP1**: receptor activity-modifying protein 1, **RCP**: receptor component protein.

9.4. Megbeszélés

Magas zsír és szénhidrát tartalmú táp etetésével kísérleti állatokban az emberi elhízáshoz sok tekintetben hasonló állapotot hoztunk létre, amit nem csak a 20 hetes diétás periódus végén mért nagyobb testtömeg, nagyobb zsírszövet mennyiség, hanem az állatok metabolikus paramétereiben bekövetkezett változások is egyértelműen igazoltak (Horwich és Fonarow, 2010; Singla és mtsai., 2010). Az elhízott állatokban a zsírszövet fokozott aktivitása a glükóz és inzulin homeosztázis károsodásával kombinálódott, a plazma emelkedett citokin koncentrációi pedig mérsékelt szisztémás gyulladásos folyamatra utaltak (Ellulu és mtsai., 2017; O'Rourke, 2009). Eredményeink direkt bizonyítékul szolgálnak arra vonatkozóan, hogy az elhízás megváltoztatja a kemoszenzitív nociceptorok funkcióját, bár abban nem lehetünk biztosak, hogy az általunk regisztrált változások a speciális diétával kiváltott elhízott állapot következményei, vagy ezekért maga az elhízott állapot, az elhízás etiológiájától függetlenül tehető felelőssé.

A patkányokban magas zsír és szénhidrát tartalmú diétával kiváltott elhízás a TRPV1 és a TRPA1 receptorok aktivációjára bekövetkező meningeális szenzoros neurogén vazodilatáció fokozódását eredményezte, amelynek hátterében fokozott CGRP felszabadulást igazoltunk. Elhízott állatok lábhát bőrében hasonlóan intenzívebbé vált a neurogén gyulladásos válasz másik komponense, a döntően SP hatásnak tulajdonítható neurogén plazma extravazáció is. Mivel a meningeális erekben sem a hisztaminnal, sem a CGRP-vel kiváltott direkt vazodilatátor válasz nem különbözött kontroll és elhízott állatokban, a vaszkuláris reakciók intenzitásában capsaicin és akrolein applikációt követően tapasztalt változásokért az elhízott állatok nociceptor funkcióiban bekövetkező változások tehetők felelőssé. Bár elhízott állatokban a TRPV1 és TRPA1 receptorok stimulációjára bekövetkező CGRP felszabadulás és következményes vazodilatáció hasonló érintettséget mutat, ismert, hogy TRPA1 receptorral a TRPV1-et expresszáló neuronoknak csak egy kisebb populációja rendelkezik (Kobayashi és mtsai., 2005). Az elhízott állatokban bekövetkező TRPA1 receptor szenzitizáció mégsem tekinthető elhanyagolható jelenségnek, hiszen korábbi vizsgálataink igazolták, hogy a meningeális nociceptorok egy része kollaterálisaik révén a koponyán áthaladva extrakraniális struktúrákat is innervál (Schueler és mtsai., 2013). Az orr nyálkahártyát beidegző trigeminális afferensek szenzitizált TRPA1 receptorai, melyek érzékenyek a levegőből belégzett kémiai irritánsokra (Kunkler és mtsai., 2011), a trigeminovaszkuláris nociceptív pálya fokozott aktiválódását eredményezhetik elhízott

állatokban és feltételezhetően emberben is, ami összefüggésbe hozható a primer fejfájások gyakoribb és súlyosabb formában való jelentkezésével is (Chai és mtsai., 2014a, 2014b).

Bár a fejfájásokkal foglalkozó kísérletes és klinikai vizsgálatok döntően a peptid tartalmú neuronpopulációkra és az azokat érintő funkcionális változásokra fókuszálnak, nem szabad elfelejtenünk, hogy a TRPV1 receptort expresszáló kemoszenzitív neuronoknak egy jelentős populációja nem tartalmaz peptideket (Price és Flores, 2007). Ezek a nem-peptiderg érző ganglion sejtek Griffonia simplicifolia izolektin B4 (IB4) kötő képességük alapján azonosíthatók. nem-peptiderg nociceptív afferensek А szerepe а fejfájások patomechanizmusában még tisztázásra vár. Elképzelhető, hogy a peptiderg és a nem peptiderg TRPV1 receptort expresszáló neuronok párhuzamos utakat képviselnek a nociceptív információ centrális irányba történő továbbításában (Dux és mtsai., 2012). A peptiderg neuronok aktivációja a periférián CGRP felszabadulás révén véráramlás változásokat generál, a centrális nyúlványokból szabaddá váló CGRP azonban valószínűleg csak módosítja az egyéb primer szenzoros neuronokból történő neurotranszmitter felszabadulást és ilyen módon moduláló szerepet tölt be az információ centrális irányú továbbításában (Lennerz és mtsai., 2008). Ezzel szemben a nem peptiderg TRPV1 receptort expresszáló neuronok nem vesznek részt a dura mater lokális keringés szabályozásában, de az agytörzsi másodlagos neuronokkal létesített kapcsolataik révén felelősek a nociceptív információ közvetlen centrális irányú továbbításáért (Dux és mtsai., 2012). Az elhízott állatokban megfigyelt TRPV1 receptor funkciót érintő változások valószínűleg hasonlóan érvényesülnek a peptideket nem tartalmazó trigeminális szenzoros neuron populáción is.

Az elhízás okozta trigeminovaszkuláris rendszert érintő funkcionális változások nem korlátozódnak a kemoszenzitív afferensek TRP receptoraira. Eredményeink a magas capsaicin koncentráció vazokonstriktor hatásának kiváltásáért felelős vaszkuláris TRPV1 receptorok és/vagy egyéb kation csatornák, valamint a neuronok depolarizációját követő CGRP felszabadításért felelős feszültség függő Ca²⁺-csatornák funkcionális változásait is igazolták. A magas zsír és szénhidrát tartalmú diétával kiváltott elhízás erősítette a capsaicin-indukálta vazokonstriktor választ, aminek szerepe lehet az elhízottakban megfigyelhető gyakoribb és súlyosabb formában jelentkező fejfájások kiváltásában is (Chai és mtsai., 2014a, 2014b). A fokozott vazokonstriktor válasz lassíthatja a nociceptorokat aktiváló/szenzitizáló szöveti mediátorok eltávolítását és ezzel gátolhatja a szöveti homeosztázis helyreállítását.

dc_1628_19

A TRP receptorok szenzitizációja nem csak a receptorok foszforilált állapotának függvénye. A receptorok fokozott membránba történő kihelyeződése és/vagy fokozott expressziója is lehetséges mechanizmusai a nociceptorok szenzitizációjának (Meents és mtsai., 2010). Elhízott állatokban sem az immunhisztokémiai festéssel kimutatható kemoszenzitív afferensek denzitása, sem a trigeminális ganglion TRPA1 fehérje növekedést koncentrációjának meghatározása nem igazolt а TRP receptorok expressziójában. Eredményeink alapján valószínűbbnek tűnik az elhízás okozta metabolikus és immunológiai változások, az oxidatív és nitrozatív stressz komplex hatásainak eredményeként létrejövő nociceptor szenzitizáció (Freeman és mtsai., 2013). Bár ezeket a változásokat nem vizsgáltuk minden részletre kiterjedően, az elhízott állatokban mért emelkedett plazma IL-1^β és IL-6 koncentrációk mellett megfigyelt trigeminovaszkuláris változások összhangban állnak korábbi megfigyelésekkel, melyek trigeminális ganglion sejtekben igazolták az IL-1β TRPV1 receptort szenzitizáló hatását, melynek hátterében kizárható volt a receptor fokozott expressziója (Camprubí-Robles és mtsai., 2009). Emellett IL-1β fokozta a neuronok bazális és capsaicin-indukálta CGRP felszabadító képességét (Capuano és mtsai., 2009; Neeb és mtsai., 2011), valamint intraplantáris injekciót követően potencírozta a capsaicin-indukálta neurogén szenzoros vazodilatációt anélkül, hogy megváltoztatta volna a CGRP által kiváltott vaszkuláris reakciókat (Herbert és Holzer, 1994). In vitro patkány bőr preparátumban mind IL-1 β , mind IL-6 hatására fokozódott a hőingerek CGRP felszabadító hatása (Oprée és Kress, 2000).

Tekintettel а trigeminális kemoszenzitív afferensek primer fejfájások patomechanizmusában betöltött központi szerepére, mind a TRPV1 receptor agonisták (a receptor fehérje deszenzibilizálása révén), mind a receptor antagonistái potenciális migrén terápeutikumok (Brederson és mtsai., 2013). Új módja lehet a receptor funkció befolyásolásának olyan szerek fejlesztése, melyek a receptor foszforilációját megakadályozva csökkentik az ioncsatorna nyitásának valószínűségét. Így kináz gátlók, melyek megakadályozzák a receptor szenzitizációját, új stratégiaként lehetnek bevethetők a migrén terápiájában, elsősorban elhízott emberek esetében, akikben a TRPV1 receptor megváltozott funkciója patofiziológiai tényezője a fejfájások kialakulásának (Brederson és mtsai., 2013; Meents és mtsai., 2010).

Streptozotocin injekciójával kiváltott 1-es típusú diabetes mellitus károsította a TRPV1 receptorok aktivációjával CGRP felszabadulás révén kiváltott neurogén szenzoros

vazodilatációt patkány dura materében. Kontroll állatok vaszkuláris reakcióival összehasonlítva, a Langerhans szigetek inzulin-termelő β-sejtjeinek pusztulását követően 2 és 4 héttel végzett mérések még nem mutattak eltérést, 6 héttel később azonban capsaicin applikációját követően már nem mértünk meningeális véráramlás fokozódást. A capsaicin vazodilatátor hatásának károsodása a kemoszenzitív afferensekből történő CGRP kvantitatív felszabadulás csökkenésének következménye, ami immunhisztokémiai vizsgálataink eredménye alapján a TRPV1 receptorokat expresszáló meningeális afferensek csökkent denzitására vezethető vissza. Az a tény, hogy a capsaicin-indukálta vazodilatáció mértéke csak több héttel a streptozotocin injekciót követően csökken, összhangban áll a neuronális peptid szintek változásával (Rittenhouse és mtsai., 1996); patkány trigeminális ganglion sejtjeinek CGRP tartalma csak a streptozotocin injekciót követő 5. héten kezd csökkenni (Troger és mtsai., 1999). A β-sejtek pusztulását követően megkezdett inzulin szubsztitúció helyreállította a TRPV1 receptorok stimulációjával kiváltott vazodilatációt. Ennek alapján a szenzoros efferens funkció károsodása nem a streptozotocin toxikus hatásának, hanem magának a diabéteszes állapotnak a következménye. A diabétesz késői szövődményeként kialakuló vaszkuláris endothel károsodás hosszabb távon szintén hozzájárulhat a véráramlás szabályozás zavarához (Rask-Madsen és King, 2013), ennek szerepe azonban a kísérleteinkben vizsgált időszakon belül nem mutatkozott jelentősnek.

Bár a kísérleti állatok szisztémás adriamycin kezelését követően a trigeminális ganglionban mért csökkent TRPV1 fehérje koncentráció egyértelműen mutatja a kemoszenzitív neuronok károsodását, immunhisztokémiai festéssel sem a TRPV1 receptorral rendelkező, sem a CGRP-t tartalmazó meningeális afferensek denzitásában nem láttunk szembetűnő változást. Ennek ellenére funkcionális vizsgálataink a kemoszenzitív afferensek működésének károsodását igazolták. Adriamycin kezelést követően mind a TRPV1, mind a TRPA1 receptorok stimulációjával kiváltott vazodilatáció mértéke csökkent. A csökkent válaszkészség különösen szembetűnő volt az ioncsatornákat aktiváló capsaicin illetve akrolein ismételt applikációja esetén. Jelentős eltérés mutatkozott a trigeminális TRPV1 és TRPA1 receptorok ismételt stimulációjával kiváltott CGRP felszabadulás mértékében is. Kontroll állatokban az egymást követő capsaicin és akrolein applikációk hasonló mennyiségű CGRP-t szabadítanak fel a meningeális afferensekből. Bár adriamycinnel kezelt állatok dura materéből az első stimuláció a kontrollal összevethető mennyiségű CGRP-t szabadított fel,

dc_1628_19

sőt capsaicin esetében azt még meg is haladta, az ezt követő stimulációk hatása jelentősen elmaradt a kontrollban mért értékektől.

Adramycinnel kezelt állatokban a kezdeti fokozott neuropeptid felszabadulás kapcsolatban állhat a neuronok megváltozott intracelluláris Ca²⁺ szintjével. Ismert hogy az intracelluláris/intraterminális Ca²⁺ koncentráció emelkedése elengedhetetlen a szenzoros rostból történő neuropeptid felszabaduláshoz. Ca²⁺ beáramlást mind a TRPV1, mind a TRPA1 receptorok nyitása, mind egyéb Ca²⁺ csatornák aktiválódása kivált. Adriamycin hatására HeLa sejtekben is fokozott sejtbe irányuló Ca²⁺ transzportot igazoltak (Dasdia és mtsai., 1979). Kíséleteinkben a kemoszenzitív afferensek ismételt stimulálását követő csökkenő CGRP felszabadulást a neuronok alapvetően alacsonyabb peptid tartalma magyarázhatja.

Mivel in vivo véráramlás méréseink eredményei nem tükrözték a kezdeti erőteljes CGRP felszabadulást (a véráramlás fokozódás mértéke már az első applikáció esetében is csökkent mértékű volt), próbáltunk olyan mechanizmus nyomára bukkanni, ami magyarázatul szolgálhat a CGRP csökkent vazodilatátor hatására adriamycin kezelést követően. Teszteltük különböző, a szenzoros neurogén funkciók részvétele nélkül az endothel vagy a vaszkuláris simaizom közvetlen stimulációja útján ható vazodilatátor anyagokat (Brunt és mtsai., 2015; Dux és mtsai., 2002; Holzer, 1998). A hisztamin és az acetilkolin vazodilatátor hatása nem változott adriamycin kezelést követően, a CGRP-re mutatott véráramlás változás ellenben csak körülbelül fele volt a kontrollban mért értéknek, ismételt applikációk esetében azonban nem mutatott további csökkenő tendenciát. Bár korábbi vizsgálatok adriamycin kezelést követően az érfal apoptotikus és nekrotikus változásait írták le (Murata és mtsai., 2001), funkcionális vizsgálataink nem támasztották alá ezeket a megfigyeléseket. A hisztaminra és acetilkolinra mutatott válaszreakciók alapján kizárhatjuk, hogy valamiféle általános vaszkuláris károsodás ronthatná a CGRP vazodilatátor hatását. Hasonlóan épnek tűnt a CGRP vazodilatátor hatásáért felelős intracelluláris mechanizmus: az adenilát-ciklázt aktiváló és az intracelluláris cAMP szintet növelő forskolin hatásában sem figyeltünk meg eltérést a kontrollhoz képest (Kanse és mtsai., 1991).

Adriamycinnel kezelt állatok dura mater preparátumaiban immunhisztokémiai festéssel jelentős változást figyeltünk meg a vaszkuláris CGRP receptorok szerkezetében, amely magyarázatul szolgálhat a CGRP gyengébb vazodilatátor hatására. Adriamycinnel kezelt patkányok dura materében a CGRP receptor komplex RCP komponense nem volt kimutatható. A CGRP receptor complex szerkezetében kialakuló változás arra utal, hogy

adriamycin kezelést követően károsodik a CGRP kötődése receptorához és ennek következtében a G-fehérje útján megvalósuló intracelluláris szignalizációs mechanizmusok is zavart szenvednek.

Eredményeink a trigeminovaszkuláris rendszerben a receptor fehérjék komplex, ugyanakkor szelektív funkcionális károsodását igazolták adriamycin kezelést követően. Laboratóriumunkban korábban tett megfigyelések a bőr érző beidegzésének funkcionális károsodása mellett az intraepidermális axonvégződések morfológiai károsodását is leírták adriamycin kezelést követően (Boros és mtsai., 2016). Hasonló morfológiai károsodás kialakulása a meningeális szövetekben sem zárható ki, de ennek megítélése a dura mater eltérő szöveti szerkezete miatt egyelőre nem lehetséges.

10. A TRIGEMINOVASZKULÁRIS NOCISZENZOR KOMPLEX KONCEPCIÓJA

Minden betegség, így a fejfájások esetében is a betegség kórélettanának részletes megismerése előfeltétele a racionális terápiás lehetőségek feltárásának. A primer fejfájások, így a migrén patofiziológiai mechanizmusai azonban részleteiben nem ismertek. Ezért kutatómunkánk célját olyan új, az alkalmazott experimentális fejfájás modellekben megfigyelhető jelenségek felismerése képezte, amelyek hozzájárulhatnak ennek a jelentős életminőség romlással járó, és nem elhanyagolható szociális és gazdasági terhet jelentő betegség patomechanizmusának további tisztázásához.

Jelenlegi ismereteink alapján a migrént neurovaszkuláris megbetegedésnek tekintjük, melynek kialakulásában a trigeminovaszkuláris rendszer diszfunkciója játszik lényeges szerepet (Burstein és mtsai., 2015; Pietrobon és Moskowitz, 2013). Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a trigeminovaszkuláris rendszer által közvetített meningeális neurogén vaszkuláris reakciók kialakulásában alapvető szerepet játszanak a nociceptív TRP ioncsatornákat kifejező, a dura materben elektronmikroszkópos és funkcionális vizsgálatokkal elsőként általunk azonosított kemoszenzitív primer afferensek. Igazoltuk a kemoszenzitív érző idegeken kifejeződő TRPV1 és TRPA1 receptorok szerepét a meningeális szenzoros neurogén vazodilatáció és a nociceptív primer szenzoros neuronok szenzitizációjának mechanizmusában. *Ex vivo* modell kísérletekben farmakomorfológiai, immunhisztokémiai és funkcionális módszerek alkalmazásával tisztáztuk, hogy a meningeális

szenzoros neurogén vazodilatációs választ döntően az érintett idegekből felszabaduló CGRP mediálja.

Kimutattuk, hogy a nociceptív ingerek integrációjában és a nociceptív primer afferens neuronok működésében kulcsszerepet betöltő TRPV1 és TRPA1 receptorokat aktiválhatják és/vagy szenzitizálhatják olyan mediátorok, amelyek fiziológiás körülmények között is jelen vannak a nociceptorok környezetében, kóros körülmények között pedig szöveti szintjük megemelkedik. Bizonyítottuk, hogy a NO és a H₂S interakciója során keletkező endogén HNO szerepet játszik a meningeális TRPA1 aktiválásában és a következményes vaszkuláris reakciók közvetítésében.

A kemoszenzitív afferensek TRP ioncsatornáinak funkcióját jelentősen befolyásolhatja az afferenseken expresszálódó PAR2 receptorok aktivációja. Kimutattuk, hogy a meningeális nociceptorok PAR2 receptorainak aktiválódása következtében kialakuló nociceptor szenzitizációt fokozott CGRP felszabadulás és neurogén szenzoros vazodilatáció kíséri. Állatkísérletes modellünkben kimutattuk, hogy az elhízás következtében megváltozott metabolikus és immunológiai státusz, többek között a proinflammatorikus citokinek emelkedett plazma és szöveti szintjének köszönhetően, a nociceptorok szenzitizációját, fokozott meningeális vazodilatációt és CGRP felszabadulást eredményez. Ezek a változások kiváltó tényezői lehetnek a fejfájások, elsősorban a migrén elhízott emberekben megfigyelt fokozott incidenciájának. Streptozotocinnal előidézett kísérletes diabetes mellitusban a meningeális vaszkuláris válaszok és a CGRP felszabadulás jelentős csökkenését figyeltük meg, amit a meningeális kemoszenzitív idegek strukturális (csökkent innervációs denzitás) és következményes funkcionális (csökkent CGRP felszabadulás és vazodilatáció) változásai magyarázhatnak. Az onkoterápiában széleskörűen alkalmazott adriamycin kezelést követő funkcionális károsodások hátterében nem csak a nociceptorok funkcióját és CGRP felszabadító képességét, hanem a CGRP véráramlás fokozó hatásának közvetítéséért felelős vaszkuláris CGRP receptorok szerkezetét érintő elváltozásokat is igazoltunk.

Vizsgálataink a humán medicina, a fejfájások, elsősorban a migrén patomechanizmusának további tisztázása szempontjából is jelentőséggel bírnak. Eredményeink, miszerint a CGRP központi szerepet játszik a nociceptív TRP receptorok által közvetített meningeális vaszkuláris reakciókban, összhangban állnak azokkal a humán megfigyelésekkel, amelyek szerint a migrénes fájdalom közvetítésében alapvető jelentőségű a trigeminovaszkuláris érző idegekben lokalizált CGRP. Ezeknek a megfigyeléseknek a

jelentőségét bizonyítják azok az új terápiás törekvések, amelyeknek eredményeként küszöbön áll a CGRP hatást gátló szerek széleskörű alkalmazása a migrén kezelésében.

A fejfájások patomechanizmusa szempontjából jelentősége lehet azon megfigyelésünknek, miszerint a meningeális afferensek extrakraniális szövetekben végződő kollaterálisainak aktivációja/szenzitizációja befolyásolja az intrakraniális afferens idegek funkcióit is. Az extrakraniális kollaterálisoknak lényeges szerepe lehet olyan fejfájás típusok provokálásában, amelyek a belélegzett kémiai irritánsok orr nyálkahártyán kifejtett irritáló hatásával (Kunkler és mtsai., 2015), vagy a perikraniális izmok fokozott tónusával hozhatók összefüggésbe (Burstein és mtsai., 2017).

Eredményeink alapján felvetjük a trigeminális nociszenzor komplex, mint az agyburkok fiziológiás és patofiziológiás folyamataiban kulcsszerepet betöltő funkcionális egység koncepcióját **(57. ábra)**.



57. ábra. A trigeminovaszkuláris nociszenzor komplex. A dura mater nociceptorai, hízósejtjei és a meningeális erek között létrejövő interakciók, melyek a primer szenzoros neuronok szenzitizációját és vaszkuláris válaszokat eredményezhetnek. **BK**: bradykinin, **CGRP**: kalcitonin gén-rokon peptid, **5-HT**: szerotonin, **IB4**: Griffonia simplicifolia izolektin B4, **NKA**: neurokinin A, **PAR-2**: proteáz aktivált receptor **2**, **PGE2**: prosztaglandin E2, **SP**: P-anyag, **TRPA1**: tranziens receptor potenciál ankyrin 1, **TRPV1**: tranziens receptor potenciál vanilloid 1, **NGF**: idegnövekedési faktor, **HA**: hisztamin, **CNS**: központi idegrendszer.

dc_1628_19

A nociszenzor komplex elemei a kemoszenzitív trigeminális afferensek, a meningeális erek és a meningeális szövetek egyéb sejtes elemei, a hízósejtek és a makrofágok (Dux és mtsai., 2012). Ezek a szövetelemek a kemény agyhártyában olyan szoros anatómiai és funkcionális kapcsolatban állnak egymással, ami lehetővé teszi összehangolt működésüket. A nociceptív idegvégződésekből felszabaduló CGRP és SP a környező hízósejtekből további vazoaktív mediátorokat, többek között hisztamint, illetve proteolitikus hatású triptázt szabadít fel. A hízósejtekből felszabaduló hisztamin, hasonlóan a SP-hez és a CGRP-hez, vazodilatációt és plazma extravazációt vált ki, a triptáz pedig az afferens idegek PAR2 receptorainak aktiválásával szenzitizálja a nociceptív idegvégződéseket, ami további neuropeptid felszabadulást eredményezhet. A hízósejtekből szabaddá váló triptáz a hízósejtek által is expresszált PAR2 receptorokon hatva ezekből autokrin vagy parakrin módon további mediátorokat tehet szabaddá, felerősítve mind a neuronális, mind a vaszkuláris reakciókat.

A nociszenzor komplex működésével kapcsolatos elképzeléseink jól összhangba állíthatók azokkal a klinikai megfigyelésekkel, amelyek a migrénes roham lefolyására vonatkoznak. Jelenlegi ismereteink szerint a vérből vagy a meningeális szövetekből származó mediátorok hatására bekövetkező meningeális nociceptor aktiválódás és/vagy szenzitizáció a leglényegesebb mechanizmus, ami a migrén perifériás és centrális szenzitizációt eredményező folyamataiban egyaránt szerepet játszhat (Durham, 2016). A nociceptor szenzitizációt kiváltó anyagok egy része saját receptorain, míg mások a TRPV1 és a TRPA1 nociceptív ioncsatornákon fejtik ki hatásukat. A nociszenzor komplexen belül lezajló interakciók azonban nem csak a migrénes roham kezdetén súlyosbodó tünetek kialakulásához, hanem a roham megszűnéséhez is hozzájárulhatnak. A migrénes rohamot kísérő meningeális vazodilatáció ugyanis - a nociceptorok szenzitizációját kiváltó mediátorok helyi koncentrációjának csökkentése és/vagy eltávolítása révén - fontos tényezője lehet a szöveti és nociceptor integritás helyreállításának.

11. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

11.1. Eredeti közlemények fejezetek szerint

5. fejezet

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

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

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

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

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

6. fejezet

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

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

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

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

7. fejezet

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

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

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

8. fejezet

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

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

9. fejezet

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

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

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

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

11.2. Összefoglaló közlemények, könyvfejezetek a témából

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

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

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

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

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

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

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

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

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

13. IRODALOMJEGYZÉK

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

Akerman, S., Williamson, D.J., Kaube, H., Goadsby, P.J. (2002a). Nitric oxide synthase inhibitors can antagonize neurogenic and calcitonin gene-related peptide induced dilation of dural meningeal vessels. Br. J. Pharmacol. *137*, 62–68.

Akerman, S., Williamson, D.J., Kaube, H., Goadsby, P.J. (2002b). The effect of anti-migraine compounds on nitric oxide-induced dilation of dural meningeal vessels. Eur. J. Pharmacol. *452*, 223–228.

Akerman, S., Williamson, D.J., Kaube, H., Goadsby, P.J. (2002c). The role of histamine in dural vessel dilation. Brain Res. *956*, 96–102.

Akerman, S., Kaube, H., Goadsby, P.J. (2003). Vanilloid type 1 receptors (VR1) on trigeminal sensory nerve fibres play a minor role in neurogenic dural vasodilatation, and are involved in capsaicin-induced dural dilation. Br. J. Pharmacol. *140*, 718–724.

Akerman, S., Kaube, H., Goadsby, P.J. (2004). Anandamide acts as a vasodilator of dural blood vessels in vivo by activating TRPV1 receptors. Br. J. Pharmacol. *142*, 1354–1360.

Al-Gadi, M., Hill, S.J. (1985). Characterization of histamine receptors mediating the stimulation of cyclic AMP accumulation in rabbit cerebral cortical slices. Br. J. Pharmacol. *85*, 877–888.

Altaany, Z., Moccia, F., Munaron, L., Mancardi, D., Wang, R. (2014). Hydrogen sulfide and endothelial dysfunction: relationship with nitric oxide. Curr. Med. Chem. *21*, 3646–3661.

Amadesi, S., Nie, J., Vergnolle, N., Cottrell, G.S., Grady, E.F., Trevisani, M., Manni, C., Geppetti, P., McRoberts, J.A., Ennes, H., et al. (2004). Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 24, 4300–4312.

Amadesi, S., Cottrell, G.S., Divino, L., Chapman, K., Grady, E.F., Bautista, F., Karanjia, R., Barajas-Lopez, C., Vanner, S., Vergnolle, N., et al. (2006). Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase Cepsilon- and A-dependent mechanisms in rats and mice. J. Physiol. *575*, 555–571.

Amara, S.G., Jonas, V., Rosenfeld, M.G., Ong, E.S., Evans, R.M. (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. Nature *298*, 240–244.

Amrutkar, D.V., Ploug, K.B., Olesen, J., Jansen-Olesen, I. (2011). Role for voltage gated calcium channels in calcitonin gene-related peptide release in the rat trigeminovascular system. Neuroscience *172*, 510–517.

Amrutkar, D.V., Ploug, K.B., Hay-Schmidt, A., Porreca, F., Olesen, J., Jansen-Olesen, I. (2012). mRNA expression of 5-hydroxytryptamine 1B, 1D, and 1F receptors and their role in controlling the release of calcitonin gene-related peptide in the rat trigeminovascular system. Pain *153*, 830–838.

Andersson, D.A., Gentry, C., Moss, S., Bevan, S. (2008). Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 28, 2485–2494.

Andlin-Sobocki, P., Jönsson, B., Wittchen, H.-U., Olesen, J. (2005). Cost of disorders of the brain in Europe. Eur. J. Neurol. *12 Suppl* 1, 1–27.

Andres, K.H., von Düring, M., Muszynski, K., Schmidt, R.F. (1987). Nerve fibres and their terminals of the dura mater encephali of the rat. Anat. Embryol. (Berl.) *175*, 289–301.

Arulmani, U., Maassenvandenbrink, A., Villalón, C.M., Saxena, P.R. (2004). Calcitonin gene-related peptide and its role in migraine pathophysiology. Eur. J. Pharmacol. *500*, 315–330.

Aubdool, A.A., Kodji, X., Abdul-Kader, N., Heads, R., Fernandes, E.S., Bevan, S., Brain, S.D. (2016). TRPA1 activation leads to neurogenic vasodilatation: involvement of reactive oxygen nitrogen species in addition to CGRP and NO. Br. J. Pharmacol. *173*, 2419–2433.

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

Bao, Y., Gao, Y., Hou, W., Yang, L., Kong, X., Zheng, H., Li, C., Hua, B. (2015). Engagement of signaling pathways of protease-activated receptor 2 and μ -opioid receptor in bone cancer pain and morphine tolerance. Int. J. Cancer *137*, 1475–1483.

Barbanti, P., Aurilia, C., Fofi, L., Egeo, G., Ferroni, P. (2017). The role of anti-CGRP antibodies in the pathophysiology of primary headaches. Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol. *38*, 31–35.

Barry, G.D., Suen, J.Y., Le, G.T., Cotterell, A., Reid, R.C., Fairlie, D.P. (2010). Novel agonists and antagonists for human protease activated receptor 2. J. Med. Chem. *53*, 7428–7440.

Becker, D.E., Reed, K.L. (2006). Essentials of local anesthetic pharmacology. Anesth. Prog. *53*, 98–108; quiz 109–110.

Bellamy, J., Bowen, E.J., Russo, A.F., Durham, P.L. (2006). Nitric oxide regulation of calcitonin generelated peptide gene expression in rat trigeminal ganglia neurons. Eur. J. Neurosci. 23, 2057–2066.

Bełtowski, J., Jamroz-Wiśniewska, A. (2014). Hydrogen sulfide and endothelium-dependent vasorelaxation. Mol. Basel Switz. *19*, 21183–21199.

Benemei, S., Nicoletti, P., Capone, J.G., De Cesaris, F., Geppetti, P. (2009). Migraine. Handb. Exp. Pharmacol. 75–89.

Benemei, S., Fusi, C., Trevisan, G., Geppetti, P. (2014). The TRPA1 channel in migraine mechanism and treatment. Br. J. Pharmacol. *171*, 2552–2567.

Benemei, S., Patacchini, R., Trevisani, M., Geppetti, P. (2015). TRP channels. Curr. Opin. Pharmacol. 22, 18–23.

Benemei, S., Cortese, F., Labastida-Ramírez, A., Marchese, F., Pellesi, L., Romoli, M., Vollesen, A.L., Lampl, C., Ashina, M., School of Advanced Studies of the European Headache Federation (EHF-SAS) (2017). Triptans and CGRP blockade - impact on the cranial vasculature. J. Headache Pain *18*, 103.

Bessac, B.F., Jordt, S.-E. (2008). Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control. Physiol. Bethesda Md 23, 360–370.

Bevan, S., Quallo, T., Andersson, D.A. (2014). TRPV1. Handb. Exp. Pharmacol. 222, 207–245.

Bhave, G., Hu, H.-J., Glauner, K.S., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., Gereau, R.W. (2003). Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 12480–12485.

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

Bleys, R.L., Groen, G.J., Hommersom, R.F. (1996). Neural connections in and around the cavernous sinus in rat, with special reference to cerebrovascular innervation. J. Comp. Neurol. *369*, 277–291.

Bolay, H., Reuter, U., Dunn, A.K., Huang, Z., Boas, D.A., Moskowitz, M.A. (2002). Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. Nat. Med. *8*, 136–142.

Boros, K., Jancsó, G., Dux, M., Fekécs, Z., Bencsik, P., Oszlács, O., Katona, M., Ferdinandy, P., Nógrádi, A., Sántha, P. (2016). Multiple impairments of cutaneous nociceptor function induced by cardiotoxic doses of Adriamycin in the rat. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *389*, 1009–1020.

Bower, R.L., Eftekhari, S., Waldvogel, H.J., Faull, R.L.M., Tajti, J., Edvinsson, L., Hay, D.L., Walker, C.S. (2016). Mapping the calcitonin receptor in human brain stem. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *310*, R788-793.

Brain, S.D., Grant, A.D. (2004). Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. Physiol. Rev. *84*, 903–934.

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

Brederson, J.-D., Kym, P.R., Szallasi, A. (2013). Targeting TRP channels for pain relief. Eur. J. Pharmacol. *716*, 61–76.

Brian, J.E., Faraci, F.M., Heistad, D.D. (1996). Recent insights into the regulation of cerebral circulation. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23, 449–457.

Brunt, V.E., Fujii, N., Minson, C.T. (2015). Endothelial-derived hyperpolarization contributes to acetylcholine-mediated vasodilation in human skin in a dose-dependent manner. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 *119*, 1015–1022.

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

Buck, S.H., Burks, T.F. (1986). The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. Pharmacol. Rev. *38*, 179–226.

Buja, L.M., Ferrans, V.J., Roberts, W.C. (1974). Drug-induced cardiomyopathies. Adv. Cardiol. *13*, 330–348.

Burch, R., Rizzoli, P., Loder, E. (2018). The Prevalence and Impact of Migraine and Severe Headache in the United States: Figures and Trends From Government Health Studies. Headache *58*, 496–505.

Burstein, R. (2001). Deconstructing migraine headache into peripheral and central sensitization. Pain *89*, 107–110.

Burstein, R., Jakubowski, M. (2004). Analgesic triptan action in an animal model of intracranial pain: a race against the development of central sensitization. Ann. Neurol. *55*, 27–36.

Burstein, R., Levy, D., Jakubowski, M., Woolf, C. (2006). Peripheral and central sensitization related to headache. In The Headaches, (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 119–126.

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

Burstein, R., Noseda, R., Borsook, D. (2015). Migraine: multiple processes, complex pathophysiology. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *35*, 6619–6629.

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

Buzzi, M.G., Moskowitz, M.A. (1991). Evidence for 5-HT1B/1D receptors mediating the antimigraine effect of sumatriptan and dihydroergotamine. Cephalalgia Int. J. Headache *11*, 165–168.

Buzzi, M.G., Sakas, D.E., Moskowitz, M.A. (1989). Indomethacin and acetylsalicylic acid block neurogenic plasma protein extravasation in rat dura mater. Eur. J. Pharmacol. *165*, 251–258.

Cai, W.Q., Bodin, P., Loesch, A., Sexton, A., Burnstock, G. (1993). Endothelium of human umbilical blood vessels: ultrastructural immunolocalization of neuropeptides. J. Vasc. Res. *30*, 348–355.

Calhoun, A.H., Ford, S., Millen, C., Finkel, A.G., Truong, Y., Nie, Y. (2010). The prevalence of neck pain in migraine. Headache *50*, 1273–1277.

Camprubí-Robles, M., Planells-Cases, R., Ferrer-Montiel, A. (2009). Differential contribution of SNARE-dependent exocytosis to inflammatory potentiation of TRPV1 in nociceptors. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *23*, 3722–3733.

Capo, A., Affaitati, G., Giamberardino, M.A., Amerio, P. (2018). Psoriasis and migraine. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV 32, 57–61.

dc_1628_19

Capuano, A., De Corato, A., Lisi, L., Tringali, G., Navarra, P., Dello Russo, C. (2009). Proinflammatoryactivated trigeminal satellite cells promote neuronal sensitization: relevance for migraine pathology. Mol. Pain *5*, 43.

Carr, D.B., Lipkowski, A.W. (1990). Neuropeptides and pain. Agressol. Rev. Int. Physio-Biol. Pharmacol. Appl. Aux Eff. Agression *31*, 173–177.

Carr, R., Frings, S. (2018). Neuropeptides in sensory signal processing. Cell Tissue Res. 375, 217-225.

Carvalho, C., Santos, R.X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P.J., Santos, M.S., Moreira, P.I. (2009). Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. Curr. Med. Chem. *16*, 3267–3285.

Caterina, M.J., Pang, Z. (2016). TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. Pharm. Basel Switz. 9.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature *389*, 816–824.

Cavanaugh, D.J., Chesler, A.T., Jackson, A.C., Sigal, Y.M., Yamanaka, H., Grant, R., O'Donnell, D., Nicoll, R.A., Shah, N.M., Julius, D., et al. (2011). Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 5067–5077.

Cavestro, C., Ferrero, M. (2018). Migraine in Systemic Autoimmune Diseases. Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets *18*, 124–134.

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

Chai, N.C., Bond, D.S., Moghekar, A., Scher, A.I., Peterlin, B.L. (2014b). Obesity and headache: Part II-potential mechanism and treatment considerations. Headache *54*, 459–471.

Chard, P. S., Bleakman, D., Savidge, J. R., Miller, R. J. (1995). Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of calcium-activated proteases. Neuroscience. *65*, 1099-1108.

Charles, A.C., Baca, S.M. (2013). Cortical spreading depression and migraine. Nat. Rev. Neurol. 9, 637–644.

Chin, K.Y., Qin, C., Cao, N., Kemp-Harper, B.K., Woodman, O.L., Ritchie, R.H. (2014). The concomitant coronary vasodilator and positive inotropic actions of the nitroxyl donor Angeli's salt in the intact rat heart: contribution of soluble guanylyl cyclase-dependent and -independent mechanisms. Br. J. Pharmacol. *171*, 1722–1734.

Choudhary, A.K., Donnelly, L.F., Racadio, J.M., Strife, J.L. (2007). Diseases associated with childhood obesity. AJR Am. J. Roentgenol. *188*, 1118–1130.

Contreras, E.F.R., Fernandes, G., Ongaro, P.C.J., Campi, L.B., Gonçalves, D.A.G. (2018). Systemic diseases and other painful conditions in patients with temporomandibular disorders and migraine. Braz. Oral Res. *32*, e77.

Corey, D.P., García-Añoveros, J., Holt, J.R., Kwan, K.Y., Lin, S.-Y., Vollrath, M.A., Amalfitano, A., Cheung, E.L.-M., Derfler, B.H., Duggan, A., et al. (2004). TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. Nature *432*, 723–730.

Cottrell, G.S., Coelho, A.-M., Bunnett, N.W. (2002). Protease-activated receptors: the role of cell-surface proteolysis in signalling. Essays Biochem. *38*, 169–183.

Covasala, O., Stirn, S.L., Albrecht, S., De Col, R., Messlinger, K. (2012). Calcitonin gene-related peptide receptors in rat trigeminal ganglion do not control spinal trigeminal activity. J. Neurophysiol. *108*, 431–440.

Cristino, L., de Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., Di Marzo, V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. Neuroscience *139*, 1405–1415.

Csati, A., Tajti, J., Tuka, B., Edvinsson, L., Warfvinge, K. (2012). Calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human sphenopalatine ganglion -- interaction with the sensory system. Brain Res. *1435*, 29–39.

Dai, Y., Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Tominaga, M., Noguchi, K. (2004). Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 4293–4299.

Dai, Y., Wang, S., Tominaga, M., Yamamoto, S., Fukuoka, T., Higashi, T., Kobayashi, K., Obata, K., Yamanaka, H., Noguchi, K. (2007). Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. J. Clin. Invest. *117*, 1979–1987.

D'Andrea, M.R., Derian, C.K., Leturcq, D., Baker, S.M., Brunmark, A., Ling, P., Darrow, A.L., Santulli, R.J., Brass, L.F., Andrade-Gordon, P. (1998). Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. *46*, 157–164.

Daryabor, G., Kabelitz, D., Kalantar, K. (2018). An update on immune dysregulation in obesity-related insulin resistance. Scand. J. Immunol. e12747.

Dasdia, T., Di Marco, A., Goffredi, M., Minghetti, A., Necco, A. (1979). Ion level and calcium fluxes in HeLa cells after adriamycin treatment. Pharmacol. Res. Commun. *11*, 19–29.

De Logu, F., Patacchini, R., Fontana, G., Geppetti, P. (2016). TRP functions in the broncho-pulmonary system. Semin. Immunopathol. *38*, 321–329.

De Petrocellis, L., Harrison, S., Bisogno, T., Tognetto, M., Brandi, I., Smith, G.D., Creminon, C., Davis, J.B., Geppetti, P., Di Marzo, V. (2001). The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. J. Neurochem. *77*, 1660–1663.

Derosa, G., Maffioli, P. (2016). A review about biomarkers for the investigation of vascular function and impairment in diabetes mellitus. Vasc. Health Risk Manag. *12*, 415–419.

Di Marzo, V., Blumberg, P.M., Szallasi, A. (2002). Endovanilloid signaling in pain. Curr. Opin. Neurobiol. *12*, 372–379.

Dimitriadou, V., Buzzi, M.G., Moskowitz, M.A., Theoharides, T.C. (1991). Trigeminal sensory fiber stimulation induces morphological changes reflecting secretion in rat dura mater mast cells. Neuroscience 44, 97–112.

Dinh, Q.T., Cryer, A., Dinh, S., Trevisani, M., Georgiewa, P., Chung, F., Geppetti, P., Heppt, W., Klapp, B.F., Fischer, A. (2005). Protease-activated receptor 2 expression in trigeminal neurons innervating the rat nasal mucosa. Neuropeptides *39*, 461–466.

dc_1628_19

Dinis, P., Charrua, A., Avelino, A., Yaqoob, M., Bevan, S., Nagy, I., Cruz, F. (2004). Anandamide-evoked activation of vanilloid receptor 1 contributes to the development of bladder hyperreflexia and nociceptive transmission to spinal dorsal horn neurons in cystitis. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 24, 11253–11263.

Dodick, D., Silberstein, S. (2006). Central sensitization theory of migraine: clinical implications. Headache *46 Suppl 4*, S182-191.

Domoki, F., Sántha, P., Bari, F., Jancsó, G. (2003). Perineural capsaicin treatment attenuates reactive hyperaemia in the rat skin. Neurosci Lett. *341*, 127-130.

Duckles, S.P. (1986). Effects of capsaicin on vascular smooth muscle. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *333*, 59–64.

Durham, P.L. (2016). Diverse Physiological Roles of Calcitonin Gene-Related Peptide in Migraine Pathology: Modulation of Neuronal-Glial-Immune Cells to Promote Peripheral and Central Sensitization. Curr. Pain Headache Rep. *20*, 48.

Dux, M.J., Messlinger, K.B. (2015). New options for migraine treatment: focus on CGRP blocking antibodies. Drugs Future *40*, 589–599.

Dux, M., Schwenger, N., Messlinger, K. (2002). Possible role of histamine (H1- and H2-) receptors in the regulation of meningeal blood flow. Br. J. Pharmacol. *137*, 874–880.

Dux, M., Sántha, P., Jancsó, G. (2003). Capsaicin-sensitive neurogenic sensory vasodilatation in the dura mater of the rat. J. Physiol. *552*, 859–867.

Dux, M., Sántha, P., Jancsó, G. (2012). The role of chemosensitive afferent nerves and TRP ion channels in the pathomechanism of headaches. Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol. *464*, 239–248.

Earley, S. (2012). TRPA1 channels in the vasculature. Br. J. Pharmacol. 167, 13–22.

Earley, S., Gonzales, A.L., Crnich, R. (2009). Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca2+-Activated K+ channels. Circ. Res. *104*, 987–994.

Eberhardt, M., Neeb, L., Vogel, E.-M., Tiegs, G., Reuter, U., Messlinger, K., Fischer, M.J.M. (2009). Glyceroltrinitrate facilitates stimulated CGRP release but not gene expression of CGRP or its receptor components in rat trigeminal ganglia. Neuropeptides *43*, 483–489.

Eberhardt, M., Dux, M., Namer, B., Miljkovic, J., Cordasic, N., Will, C., Kichko, T.I., de la Roche, J., Fischer, M., Suárez, S.A., et al. (2014). H2S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. Nat. Commun. *5*, 4381.

Ebersberger, A., Averbeck, B., Messlinger, K., Reeh, P.W. (1999). Release of substance P, calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 from rat dura mater encephali following electrical and chemical stimulation in vitro. Neuroscience *89*, 901–907.

Edvinsson, L., Goadsby, P.J. (1994). Neuropeptides in migraine and cluster headache. Cephalalgia Int. J. Headache *14*, 320–327.

Edvinsson, L., Uddman, R. (1981). Adrenergic, cholinergic and peptidergic nerve fibres in dura mater--involvement in headache? Cephalalgia Int. J. Headache 1, 175–179.

Edvinsson, L., Uddman, R. (2005). Neurobiology in primary headaches. Brain Res. Brain Res. Rev. 48, 438–456.

Edvinsson, L., Warfvinge, K. (2019). Recognizing the role of CGRP and CGRP receptors in migraine and its treatment. Cephalalgia Int. J. Headache *39*, 366-373.

Edvinsson, L., Fredholm, B.B., Hamel, E., Jansen, I., Verrecchia, C. (1985). Perivascular peptides relax cerebral arteries concomitant with stimulation of cyclic adenosine monophosphate accumulation or release of an endothelium-derived relaxing factor in the cat. Neurosci. Lett. *58*, 213–217.

Edvinsson, L., Ekman, R., Jansen, I., McCulloch, J., Uddman, R. (1987). Calcitonin gene-related peptide and cerebral blood vessels: distribution and vasomotor effects. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. 7, 720–728.

Edvinsson, L., Elsås, T., Suzuki, N., Shimizu, T., Lee, T.J. (2001). Origin and Co-localization of nitric oxide synthase, CGRP, PACAP, and VIP in the cerebral circulation of the rat. Microsc. Res. Tech. *53*, 221–228.

Edvinsson, L., Villalón, C.M., MaassenVanDenBrink, A. (2012). Basic mechanisms of migraine and its acute treatment. Pharmacol. Ther. *136*, 319–333.

Eftekhari, S., Edvinsson, L. (2010). Possible sites of action of the new calcitonin gene-related peptide receptor antagonists. Ther. Adv. Neurol. Disord. *3*, 369–378.

Eftekhari, S., Salvatore, C.A., Calamari, A., Kane, S.A., Tajti, J., Edvinsson, L. (2010). Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human trigeminal ganglion. Neuroscience *169*, 683–696.

Eftekhari, S., Warfvinge, K., Blixt, F.W., Edvinsson, L. (2013). Differentiation of nerve fibers storing CGRP and CGRP receptors in the peripheral trigeminovascular system. J. Pain Off. J. Am. Pain Soc. 14, 1289–1303.

Eftekhari, S., Gaspar, R.C., Roberts, R., Chen, T.-B., Zeng, Z., Villarreal, S., Edvinsson, L., Salvatore, C.A. (2016). Localization of CGRP receptor components and receptor binding sites in rhesus monkey brainstem: A detailed study using in situ hybridization, immunofluorescence, and autoradiography. J. Comp. Neurol. *524*, 90–118.

El-Agamy, S.E., Abdel-Aziz, A.K., Wahdan, S., Esmat, A., Azab, S.S. (2017). Astaxanthin Ameliorates Doxorubicin-Induced Cognitive Impairment (Chemobrain) in Experimental Rat Model: Impact on Oxidative, Inflammatory, and Apoptotic Machineries. Mol. Neurobiol. *55*, 5727-5740.

Ellis, A., Li, C.G., Rand, M.J. (2000). Differential actions of L-cysteine on responses to nitric oxide, nitroxyl anions and EDRF in the rat aorta. Br. J. Pharmacol. *129*, 315–322.

Ellulu, M.S., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A., Abed, Y. (2017). Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. Arch. Med. Sci. AMS *13*, 851–863.

Ermisch, A., Rühle, H.J., Landgraf, R., Hess, J. (1985). Blood-brain barrier and peptides. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. 5, 350–357.

Evans, B.N., Rosenblatt, M.I., Mnayer, L.O., Oliver, K.R., Dickerson, I.M. (2000). CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. J. Biol. Chem. *275*, 31438–31443.

Fabbretti, E., D'Arco, M., Fabbro, A., Simonetti, M., Nistri, A., Giniatullin, R. (2006). Delayed upregulation of ATP P2X3 receptors of trigeminal sensory neurons by calcitonin gene-related peptide. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 6163–6171.

Fanciullacci, M., Alessandri, M., Figini, M., Geppetti, P., Michelacci, S. (1995). Increase in plasma calcitonin gene-related peptide from the extracerebral circulation during nitroglycerin-induced cluster headache attack. Pain *60*, 119–123.

Faraci, F.M., Heistad, D.D. (1991). Regulation of cerebral blood vessels by humoral and endotheliumdependent mechanisms. Update on humoral regulation of vascular tone. Hypertens. Dallas Tex 1979 *17*, 917–922.

Farhane, Z., Bonnier, F., Maher, M.A., Bryant, J., Casey, A., Byrne, H.J. (2017). Differentiating responses of lung cancer cell lines to Doxorubicin exposure: in vitro Raman micro spectroscopy, oxidative stress and bcl-2 protein expression. J. Biophotonics *10*, 151–165.

Feindel, W., Penfield, W., McNaughton, F. (1960). The tentorial nerves and localization of intracranial pain in man. Neurology *10*, 555–563.

Ferdinandy, P., Csont, T., Csonka, C., Török, M., Dux, M., Németh, J., Horváth, L.I., Dux, L., Szilvássy, Z., Jancsó, G. (1997). Capsaicin-sensitive local sensory innervation is involved in pacing-induced preconditioning in rat hearts: role of nitric oxide and CGRP? Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *356*, 356–363.

Filipovic, M.R., Eberhardt, M., Prokopovic, V., Mijuskovic, A., Orescanin-Dusic, Z., Reeh, P., Ivanovic-Burmazovic, I. (2013). Beyond H2S and NO interplay: hydrogen sulfide and nitroprusside react directly to give nitroxyl (HNO). A new pharmacological source of HNO. J. Med. Chem. *56*, 1499–1508.

Fischer, M.J.M., Messlinger, K. (2007). Cannabinoid and vanilloid effects of R(+)-methanandamide in the hemisected meningeal preparation. Cephalalgia Int. J. Headache *27*, 422–428.

Fischer, M.J.M., Uchida, S., Messlinger, K. (2010). Measurement of meningeal blood vessel diameter in vivo with a plug-in for ImageJ. Microvasc. Res. *80*, 258–266.

Flegel, C., Schöbel, N., Altmüller, J., Becker, C., Tannapfel, A., Hatt, H., Gisselmann, G. (2015). RNA-Seq Analysis of Human Trigeminal and Dorsal Root Ganglia with a Focus on Chemoreceptors. PloS One *10*, e0128951.

Flores-Santana, W., Salmon, D.J., Donzelli, S., Switzer, C.H., Basudhar, D., Ridnour, L., Cheng, R., Glynn, S.A., Paolocci, N., Fukuto, J.M., et al. (2011). The specificity of nitroxyl chemistry is unique among nitrogen oxides in biological systems. Antioxid. Redox Signal. *14*, 1659–1674.

Flühmann, B., Muff, R., Hunziker, W., Fischer, J.A., Born, W. (1995). A human orphan calcitonin receptor-like structure. Biochem. Biophys. Res. Commun. *206*, 341–347.

Foreman, J.C. (1987). Substance P and calcitonin gene-related peptide: effects on mast cells and in human skin. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. *82*, 366–371.

Freeman, L.R., Zhang, L., Nair, A., Dasuri, K., Francis, J., Fernandez-Kim, S.-O., Bruce-Keller, A.J., Keller, J.N. (2013). Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brain function. Free Radic. Biol. Med. *56*, 226–233.

Freichel, M., Berlin, M., Schürger, A., Mathar, I., Bacmeister, L., Medert, R., Frede, W., Marx, A., Segin, S., Londoño, J.E.C. (2017). TRP Channels in the Heart. In Neurobiology of TRP Channels, T.L.R. Emir, ed. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis), Chapter 9.

Fujii, N., McNeely, B.D., Zhang, S.Y., Abdellaoui, Y.C., Danquah, M.O., Kenny, G.P. (2017). Activation of protease-activated receptor 2 mediates cutaneous vasodilatation but not sweating: roles of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase. Exp. Physiol. *102*, 265–272.

Fukuto, J.M., Carrington, S.J. (2011). HNO signaling mechanisms. Antioxid. Redox Signal. 14, 1649–1657.

Fukuto, J.M., Switzer, C.H., Miranda, K.M., Wink, D.A. (2005). Nitroxyl (HNO): chemistry, biochemistry, and pharmacology. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45, 335–355.

Galeotti, N., Malmberg-Aiello, P., Bartolini, A., Schunack, W., Ghelardini, C. (2004). H1-receptor stimulation induces hyperalgesia through activation of the phospholipase C-PKC pathway. Neuropharmacology *47*, 295–303.

Gallai, V., Sarchielli, P., Floridi, A., Franceschini, M., Codini, M., Glioti, G., Trequattrini, A., Palumbo, R. (1995). Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally. Cephalalgia Int. J. Headache *15*, 384–390.

Gao, W.D., Murray, C.I., Tian, Y., Zhong, X., DuMond, J.F., Shen, X., Stanley, B.A., Foster, D.B., Wink, D.A., King, S.B., et al. (2012). Nitroxyl-mediated disulfide bond formation between cardiac myofilament cysteines enhances contractile function. Circ. Res. *111*, 1002–1011.

GBD 2015 Obesity Collaborators, Afshin, A., Forouzanfar, M.H., Reitsma, M.B., Sur, P., Estep, K., Lee, A., Marczak, L., Mokdad, A.H., Moradi-Lakeh, M., et al. (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. N. Engl. J. Med. *377*, 13–27.

Gees, M., Owsianik, G., Nilius, B., Voets, T. (2012). TRP channels. Compr. Physiol. 2, 563–608.

Geppetti, P., Capone, J.G., Trevisani, M., Nicoletti, P., Zagli, G., Tola, M.R. (2005). CGRP and migraine: neurogenic inflammation revisited. J. Headache Pain *6*, 61–70.

Goadsby, P.J. (2005). Migraine, allodynia, sensitisation and all of that... Eur. Neurol. 53 Suppl 1, 10–16.

Goadsby, P.J., Edvinsson, L. (1993). The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. Ann. Neurol. *33*, 48–56.

Goadsby, P.J., Edvinsson, L. (1994). Human in vivo evidence for trigeminovascular activation in cluster headache. Neuropeptide changes and effects of acute attacks therapies. Brain J. Neurol. *117 (Pt 3)*, 427–434.

Goadsby, P.J., Edvinsson, L., Ekman, R. (1988). Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system. Ann. Neurol. *23*, 193–196.

Goadsby, P.J., Edvinsson, L., Ekman, R. (1990). Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. Ann. Neurol. *28*, 183–187.

Gouin, O., L'Herondelle, K., Lebonvallet, N., Le Gall-Ianotto, C., Sakka, M., Buhé, V., Plée-Gautier, E., Carré, J.-L., Lefeuvre, L., Misery, L., et al. (2017). TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. Protein Cell *8*, 644–661.

Gozalov, A., Petersen, K.A., Mortensen, C., Jansen-Olesen, I., Klaerke, D., Olesen, J. (2005). Role of KATP channels in the regulation of rat dura and pia artery diameter. Cephalalgia Int. J. Headache *25*, 249–260.

Gray, D.W., Marshall, I. (1992). Human alpha-calcitonin gene-related peptide stimulates adenylate cyclase and guanylate cyclase and relaxes rat thoracic aorta by releasing nitric oxide. Br. J. Pharmacol. *107*, 691–696.

Guo, A., Vulchanova, L., Wang, J., Li, X., Elde, R. (1999) Immunocytochemical Localization of the Vanilloid Receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. Eur. J. Neurosci. *11*, 946-958.

Gupta, V.K. (2009). CSD, BBB and MMP-9 elevations: animal experiments versus clinical phenomena in migraine. Expert Rev. Neurother. *9*, 1595–1614.

Gupta, P., Harte, A.L., da Silva, N.F., Khan, H., Barnett, A.H., Kumar, S., Sturdee, D.W., McTernan, P.G. (2007). Expression of calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin, and receptor modifying proteins in human adipose tissue and alteration in their expression with menopause status. Menopause N.Y. N *14*, 1031–1038.

Gupta, S., Akerman, S., van den Maagdenberg, A.M.J.M., Saxena, P.R., Goadsby, P.J., van den Brink, A.M. (2006). Intravital microscopy on a closed cranial window in mice: a model to study trigeminovascular mechanisms involved in migraine. Cephalalgia Int. J. Headache *26*, 1294–1303.

Gursoy-Ozdemir, Y., Qiu, J., Matsuoka, N., Bolay, H., Bermpohl, D., Jin, H., Wang, X., Rosenberg, G.A., Lo, E.H., Moskowitz, M.A. (2004). Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9. J. Clin. Invest. *113*, 1447–1455.

Haddock, R.E., Grayson, T.H., Brackenbury, T.D., Meaney, K.R., Neylon, C.B., Sandow, S.L., Hill, C.E. (2006). Endothelial coordination of cerebral vasomotion via myoendothelial gap junctions containing connexins 37 and 40. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. *291*, H2047-2056.

Hajna, Z., Sághy, É., Payrits, M., Aubdool, A.A., Szőke, É., Pozsgai, G., Bátai, I.Z., Nagy, L., Filotás, D., Helyes, Z., et al. (2016). Capsaicin-Sensitive Sensory Nerves Mediate the Cellular and Microvascular Effects of H2S via TRPA1 Receptor Activation and Neuropeptide Release. J. Mol. Neurosci. MN *60*, 157–170.

Headache Classification Committee (2018). Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. Cephalalgia *38*, 1–211.

Helyes, Z., Thán, M., Oroszi, G., Pintér, E., Németh, J., Kéri, G., Szolcsányi, J. (2000). Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogues in the rat. Neurosci. Lett. *278*, 185–188.

Henrich, F., Magerl, W., Klein, T., Greffrath, W., Treede, R.-D. (2015). Capsaicin-sensitive C- and A-fibre nociceptors control long-term potentiation-like pain amplification in humans. Brain J. Neurol. *138*, 2505–2520.

Herbert, M.K., Holzer, P. (1994). Interleukin-1 beta enhances capsaicin-induced neurogenic vasodilatation in the rat skin. Br. J. Pharmacol. *111*, 681–686.

Hergenhahn, M., Kusumoto, S., Hecker, E. (1984). On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). V. Extremely skin-irritant and moderately tumor-promoting diterpene esters from Euphorbia resinifera Berg. J. Cancer Res. Clin. Oncol. *108*, 98–109.

Hinman, A., Chuang, H.-H., Bautista, D.M., Julius, D. (2006). TRP channel activation by reversible covalent modification. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 19564–19568.
Ho, T.W., Edvinsson, L., Goadsby, P.J. (2010). CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. Nat. Rev. Neurol. *6*, 573–582.

Hoffmann, J., Wecker, S., Neeb, L., Dirnagl, U., Reuter, U. (2012). Primary trigeminal afferents are the main source for stimulus-induced CGRP release into jugular vein blood and CSF. Cephalalgia Int. J. Headache *32*, 659–667.

Hökfelt, T., Lundberg, J.M., Schultzberg, M., Johansson, O., Skirboll, L., Anggård, A., Fredholm, B., Hamberger, B., Pernow, B., Rehfeld, J., et al. (1980). Cellular localization of peptides in neural structures. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. *210*, 63–77.

Holwerda, K.M., Karumanchi, S.A., Lely, A.T. (2015). Hydrogen sulfide: role in vascular physiology and pathology. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. *24*, 170–176.

Holzer, P. (1991). Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. Adv. Exp. Med. Biol. 298, 3–16.

Holzer, P. (1998). Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. Gen. Pharmacol. *30*, 5–11.

Holzer, P. (2011). Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. Pharmacol. Ther. *131*, 142–170.

Holzer, P., Lippe, I.I., Raybould, H.E., Pabst, M.A., Livingston, E.H., Amann, R., Peskar, B.M., Peskar, B.A., Taché, Y., Guth, P.H. (1991). Role of peptidergic sensory neurons in gastric mucosal blood flow and protection. Ann. N. Y. Acad. Sci. *632*, 272–282.

Hong, K.W., Yoo, S.E., Yu, S.S., Lee, J.Y., Rhim, B.Y. (1996). Pharmacological coupling and functional role for CGRP receptors in the vasodilation of rat pial arterioles. Am. J. Physiol. *270*, H317-323.

Hoogerwerf, W.A., Zou, L., Shenoy, M., Sun, D., Micci, M.A., Lee-Hellmich, H., Xiao, S.Y., Winston, J.H., Pasricha, P.J. (2001). The proteinase-activated receptor 2 is involved in nociception. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *21*, 9036–9042.

Hoogerwerf, W.A., Shenoy, M., Winston, J.H., Xiao, S.-Y., He, Z., Pasricha, P.J. (2004). Trypsin mediates nociception via the proteinase-activated receptor 2: a potentially novel role in pancreatic pain. Gastroenterology *127*, 883–891.

Horwich, T.B., Fonarow, G.C. (2010). Glucose, obesity, metabolic syndrome, and diabetes relevance to incidence of heart failure. J. Am. Coll. Cardiol. *55*, 283–293.

Hottenstein, O.D., Pawlik, W.W., Remak, G., Jacobson, E.D. (1991). Capsaicin-sensitive nerves modulate resting blood flow and vascular tone in rat gut. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *343*, 179–184.

Hou, M., Uddman, R., Tajti, J., Kanje, M., Edvinsson, L. (2002). Capsaicin receptor immunoreactivity in the human trigeminal ganglion. Neurosci. Lett. *330*, 223–226.

Hou, Q., Barr, T., Gee, L., Vickers, J., Wymer, J., Borsani, E., Rodella, L., Getsios, S., Burdo, T., Eisenberg, E., et al. (2011). Keratinocyte expression of calcitonin gene-related peptide β : implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms. Pain *152*, 2036–2051.

Howard CV, Reed MG (1998). Unbiased stereology (Oxford, Bios Scientific Publisher).

Howlett, A.C., Blume, L.C., Dalton, G.D. (2010). CB(1) cannabinoid receptors and their associated proteins. Curr. Med. Chem. 17, 1382–1393.

Huang, D., Li, S., Dhaka, A., Story, G.M., Cao, Y.-Q. (2012). Expression of the transient receptor potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons innervating the dura. Mol. Pain *8*, 66.

Hughes, M.N. (1999). Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite. Biochim. Biophys. Acta 1411, 263–272.

Hughes, S.R., Brain, S.D. (1994). Nitric oxide-dependent release of vasodilator quantities of calcitonin gene-related peptide from capsaicin-sensitive nerves in rabbit skin. Br. J. Pharmacol. *111*, 425–430.

Hwang, S.J., Oh, J.M., Valtschanoff, J.G. (2005). Expression of the vanilloid receptor TRPV1 in rat dorsal root ganglion neurons supports different roles of the receptor in visceral and cutaneous afferents. Brain Res. *1047*, 261–266.

Ichikawa, H., Sugimoto, T. (2004). The co-expression of P2X3 receptor with VR1 and VRL-1 in the rat trigeminal ganglion. Brain Res. *998*, 130–135.

Ichinose, M., Belvisi, M.G., Barnes, P.J. (1990). Histamine H3-receptors inhibit neurogenic microvascular leakage in airways. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 *68*, 21–25.

Iliff, J.J., Lee, H., Yu, M., Feng, T., Logan, J., Nedergaard, M., Benveniste, H. (2013). Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. J. Clin. Invest. *123*, 1299–1309.

Imamura, M., Smith, N.C., Garbarg, M., Levi, R. (1996). Histamine H3-receptor-mediated inhibition of calcitonin gene-related peptide release from cardiac C fibers. A regulatory negative-feedback loop. Circ. Res. *78*, 863–869.

Iversen, H.K., Olesen, J., Tfelt-Hansen, P. (1989). Intravenous nitroglycerin as an experimental model of vascular headache. Basic characteristics. Pain *38*, 17–24.

Jancsó, G. (1992). Pathobiological reactions of C-fibre primary sensory neurones to peripheral nerve injury. Exp. Physiol. 77, 405–431.

Jancsó, G., Kiraly, E., Jancsó-Gábor, A. (1977). Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. Nature *270*, 741–743.

Jancsó, G., Sávay, G., Király, E. (1978). Appearance of histochemically detectable ionic calcium in degenerating primary sensory neurons. Acta Histochem. *62*, 165–169.

Jancsó, G., Király, E., Jancsó-Gábor, A. (1980). Direct evidence for an axonal site of action of capsaicin. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *313*, 91–94.

Jancsó, G., Hökfelt, T., Lundberg, J.M., Kiraly, E., Halász, N., Nilsson, G., Terenius, L., Rehfeld, J., Steinbusch, H., Verhofstad, A., et al. (1981). 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. *10*, 963-980.

Jancsó, G., Király, E., Joó, F., Such, G., Nagy, A. (1985a). Selective degeneration by capsaicin of a subpopulation of primary sensory neurons in the adult rat. Neurosci. Lett. *59*, 209–214.

Jancsó, G., Obál, F. Jr., Tóth-Kása, I., Katona, M., Husz, S. (1985b). The modulation of cutaneous inflammatory reactions by peptide-containing sensory nerves. Int. J. Tissue React. *7*, 449-457.

Jancsó, G., Király, E., Such, G., Joó, F., Nagy, A. (1987). Neurotoxic effect of capsaicin in mammals. Acta Physiol. Hung. *69*, 295–313.

Jancsó, N., Jancsó, A. (1949). Desensitization of sensory nerve endings. Kísérletes Orvostudomány 2 (Suppl.) 15.

Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A., Szolcsányi, J. (1967). Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. Br. J. Pharmacol. Chemother. *31*, 138–151.

Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A., Szolcsányi, J. (1968). The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. Br. J. Pharmacol. Chemother. *33*, 32–41.

Jancsó-Gábor, A., Szolcsányi, J. (1972). Neurogenic inflammatory responses. J. Dent. Res. 51, 264–269.

Jankowski, M.P., Koerber, H.R. (2010). Neurotrophic Factors and Nociceptor Sensitization. In Translational Pain Research: From Mouse to Man, L. Kruger, and A.R. Light, eds. (Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis).

Jansen-Olesen, I., Mortensen, A., Edvinsson, L. (1996). Calcitonin gene-related peptide is released from capsaicin-sensitive nerve fibres and induces vasodilatation of human cerebral arteries concomitant with activation of adenylyl cyclase. Cephalalgia Int. J. Headache *16*, 310–316.

Jansen-Olesen, I., Ottosson, A., Cantera, L., Strunk, S., Lassen, L.H., Olesen, J., Mortensen, A., Engel, U., Edvinsson, L. (1997). Role of endothelium and nitric oxide in histamine-induced responses in human cranial arteries and detection of mRNA encoding H1- and H2-receptors by RT-PCR. Br. J. Pharmacol. *121*, 41–48.

Jansen-Olesen, I., Jørgensen, L., Engel, U., Edvinsson, L. (2003). In-depth characterization of CGRP receptors in human intracranial arteries. Eur. J. Pharmacol. *481*, 207–216.

Jansen-Olesen, I., Baun, M., Amrutkar, D.V., Ramachandran, R., Christophersen, D.V., Olesen, J. (2014). PACAP-38 but not VIP induces release of CGRP from trigeminal nucleus caudalis via a receptor distinct from the PAC1 receptor. Neuropeptides *48*, 53–64.

Jensen, K. (1993). Extracranial blood flow, pain and tenderness in migraine. Clinical and experimental studies. Acta Neurol. Scand. Suppl. 147, 1–27.

Jeon, T.J., Lee, J.D., Ha, J.W., Yang, W.I., Cho, S.H. (2000). Evaluation of cardiac adrenergic neuronal damage in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy using iodine-131 MIBG autoradiography and PGP 9.5 immunohistochemistry. Eur. J. Nucl. Med. *27*, 686–693.

Jordt, S.-E., Bautista, D.M., Chuang, H.-H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Högestätt, E.D., Meng, I.D., Julius, D. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. Nature *427*, 260–265.

Julius, D. (2013). TRP channels and pain. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 29, 355–384.

Kabil, O., Banerjee, R. (2014). Enzymology of H2S biogenesis, decay and signaling. Antioxid. Redox Signal. 20, 770–782.

Kabil, O., Motl, N., Banerjee, R. (2014). H2S and its role in redox signaling. Biochim. Biophys. Acta 1844, 1355–1366.

Kageneck, C., Nixdorf-Bergweiler, B.E., Messlinger, K., Fischer, M.J. (2014). Release of CGRP from mouse brainstem slices indicates central inhibitory effect of triptans and kynurenate. J. Headache Pain *15*, 7.

Kalyanaraman, B., Joseph, J., Kalivendi, S., Wang, S., Konorev, E., Kotamraju, S. (2002). Doxorubicininduced apoptosis: implications in cardiotoxicity. Mol. Cell. Biochem. 234–235, 119–124.

Kang, S., Wu, C., Banik, R.K., Brennan, T.J. (2010). Effect of capsaicin treatment on nociceptors in rat glabrous skin one day after plantar incision. Pain *148*, 128–140.

Kanke, T., Macfarlane, S.R., Seatter, M.J., Davenport, E., Paul, A., McKenzie, R.C., Plevin, R. (2001). Proteinase-activated receptor-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory kappa B kinases in NCTC 2544 keratinocytes. J. Biol. Chem. *276*, 31657–31666.

Kanse, S.M., Takahashi, K., Warren, J.B., Perera, T., Porta, M., Ghatei, M., Bloom, S.R. (1991). Production of endothelin by vascular smooth muscle cells. J. Cardiovasc. Pharmacol. *17 Suppl 7*, S113-116.

Kark, T., Bagi, Z., Lizanecz, E., Pásztor, E.T., Erdei, N., Czikora, A., Papp, Z., Edes, I., Pórszász, R., Tóth, A. (2008). Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. Mol. Pharmacol. *73*, 1405–1412.

Katona, M., Boros, K., Sántha, P., Ferdinandy, P., Dux, M., Jancsó, G. (2004). Selective sensory denervation by capsaicin aggravates adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *370*, 436–443.

Kazamel, M., Dyck, P.J. (2015). Sensory manifestations of diabetic neuropathies: anatomical and clinical correlations. Prosthet. Orthot. Int. *39*, 7–16.

Keller, J.T., Marfurt, C.F. (1991). Peptidergic and serotoninergic innervation of the rat dura mater. J. Comp. Neurol. *309*, 515–534.

Keller, J.T., Saunders, M.C., Beduk, A., Jollis, J.G. (1985). Innervation of the posterior fossa dura of the cat. Brain Res. Bull. *14*, 97–102.

Keller, J.T., Marfurt, C.F., Dimlich, R.V., Tierney, B.E. (1989). Sympathetic innervation of the supratentorial dura mater of the rat. J. Comp. Neurol. *290*, 310–321.

Kellogg, G.E., Scarsdale, J.N., Fornari, F.A. (1998). Identification and hydropathic characterization of structural features affecting sequence specificity for doxorubicin intercalation into DNA double-stranded polynucleotides. Nucleic Acids Res. *26*, 4721–4732.

Kempkes, C., Buddenkotte, J., Cevikbas, F., Buhl, T., Steinhoff, M. (2014). Role of PAR-2 in Neuroimmune Communication and Itch. In Itch: Mechanisms and Treatment, E. Carstens, and T. Akiyama, eds. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis).

Kestell, G.R., Anderson, R.L., Clarke, J.N., Haberberger, R.V., Gibbins, I.L. (2015). Primary afferent neurons containing calcitonin gene-related peptide but not substance P in forepaw skin, dorsal root ganglia, and spinal cord of mice. J. Comp. Neurol. *523*, 2555–2569.

Keyes, S.R., Hickman, J.A., Sartorelli, A.C. (1987). The effects of adriamycin on intracellular calcium concentrations of L1210 murine leukemia cells. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 23, 295–302.

Khasabova, I.A., Holman, M., Morse, T., Burlakova, N., Coicou, L., Harding-Rose, C., Simone, D.A., Seybold, V.S. (2013). Increased anandamide uptake by sensory neurons contributes to hyperalgesia in a model of cancer pain. Neurobiol. Dis. *58*, 19–28.

Kimura, H. (2017). Hydrogen Sulfide and Polysulfide Signaling. Antioxid. Redox Signal. 27, 619–621.

Király, E., Jancsó, G., Hajós, M. (1991). Possible morphological correlates of capsaicin desensitization. Brain Res. *540*, 279–282.

Ko, E.A., Han, J., Jung, I.D., Park, W.S. (2008). Physiological roles of K+ channels in vascular smooth muscle cells. J. Smooth Muscle Res. Nihon Heikatsukin Gakkai Kikanshi 44, 65–81.

Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A., Noguchi, K. (2005). 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. *493*, 596–606.

Koedel, U., Bernatowicz, A., Paul, R., Frei, K., Fontana, A., Pfister, H.W. (1995). Experimental pneumococcal meningitis: cerebrovascular alterations, brain edema, and meningeal inflammation are linked to the production of nitric oxide. Ann. Neurol. *37*, 313–323.

Kohnoe, S., Maehara, Y., Emi, Y., Takahashi, I., Yoshida, M., Sugimachi, K. (1992). Intracellular accumulation of free calcium in mouse tumor cells exposed to anticancer drugs. Anticancer Res. *12*, 2203–2207.

Kondo, A., Ohnishi, A., Nagara, H., Tateishi, J. (1987). Neurotoxicity in primary sensory neurons of adriamycin administered through retrograde axoplasmic transport in rats. Neuropathol. Appl. Neurobiol. *13*, 177–192.

Korytko, P.J., Boje, K.M. (1996). Pharmacological characterization of nitric oxide production in a rat model of meningitis. Neuropharmacology *35*, 231–237.

Kosaras, B., Jakubowski, M., Kainz, V., Burstein, R. (2009). Sensory innervation of the calvarial bones of the mouse. J. Comp. Neurol. *515*, 331–348.

Köse, S.A., Nazıroğlu, M. (2015). N-acetyl cysteine reduces oxidative toxicity, apoptosis, and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome. Free Radic. Res. *49*, 338–346.

Kosoko, A.M., Olurinde, O.J., Akinloye, O.A. (2017). Doxorubicin induced neuro- and cardiotoxicities in experimental rats: Protection against oxidative damage by Theobroma cacao Stem bark. Biochem. Biophys. Rep. *10*, 303–317.

Központi Statisztikai Hivatal (2018). Egészségi állapot és egészségmagatartás, 2016–2017. Statisztikai Tükör.

Krabbe, A.A., Olesen, J. (1980). Headache provocation by continuous intravenous infusion of histamine. Clinical results and receptor mechanisms. Pain *8*, 253–259.

Kunkler, P.E., Ballard, C.J., Oxford, G.S., Hurley, J.H. (2011). TRPA1 receptors mediate environmental irritant-induced meningeal vasodilatation. Pain *152*, 38–44.

Kunkler, P.E., Zhang, L., Pellman, J.J., Oxford, G.S., Hurley, J.H. (2015). Sensitization of the trigeminovascular system following environmental irritant exposure. Cephalalgia Int. J. Headache *35*, 1192–1201.

Kurosawa, M., Messlinger, K., Pawlak, M., Schmidt, R.F. (1995). Increase of meningeal blood flow after electrical stimulation of rat dura mater encephali: mediation by calcitonin gene-related peptide. Br. J. Pharmacol. *114*, 1397–1402.

Lambert, G.A., Michalicek, J. (1994). Cortical spreading depression reduces dural blood flow--a possible mechanism for migraine pain? Cephalalgia Int. J. Headache *14*, 430–436; discussion 393-394.

Lassen, L.H., Thomsen, L.L., Olesen, J. (1995). Histamine induces migraine via the H1-receptor. Support for the NO hypothesis of migraine. Neuroreport *6*, 1475–1479.

Lassen, L.H., Haderslev, P.A., Jacobsen, V.B., Iversen, H.K., Sperling, B., Olesen, J. (2002). CGRP may play a causative role in migraine. Cephalalgia Int. J. Headache 22, 54–61.

Lassen, L.H., Jacobsen, V.B., Haderslev, P.A., Sperling, B., Iversen, H.K., Olesen, J., Tfelt-Hansen, P. (2008). Involvement of calcitonin gene-related peptide in migraine: regional cerebral blood flow and blood flow velocity in migraine patients. J. Headache Pain *9*, 151–157.

Lazzeri, M., Vannucchi, M.G., Zardo, C., Spinelli, M., Beneforti, P., Turini, D., Faussone-Pellegrini, M.-S. (2004). Immunohistochemical evidence of vanilloid receptor 1 in normal human urinary bladder. Eur. Urol. *46*, 792–798.

Lehmann, R., Schöbel, N., Hatt, H., van Thriel, C. (2016). The involvement of TRP channels in sensory irritation: a mechanistic approach toward a better understanding of the biological effects of local irritants. Arch. Toxicol. *90*, 1399–1413.

Lembeck, F., Donnerer, J., Barthó, L. (1982). Inhibition of neurogenic vasodilation and plasma extravasation by substance P antagonists, somatostatin and [D-Met2, Pro5]enkephalinamide. Eur. J. Pharmacol. *85*, 171-176.

Lennerz, J.K., Rühle, V., Ceppa, E.P., Neuhuber, W.L., Bunnett, N.W., Grady, E.F., Messlinger, K. (2008). Calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the rat trigeminovascular system: differences between peripheral and central CGRP receptor distribution. J. Comp. Neurol. *507*, 1277–1299.

Lerner, D.J., Chen, M., Tram, T., Coughlin, S.R. (1996). Agonist recognition by proteinase-activated receptor 2 and thrombin receptor. Importance of extracellular loop interactions for receptor function. J. Biol. Chem. *271*, 13943–13947.

Levy, D. (2012). Endogenous mechanisms underlying the activation and sensitization of meningeal nociceptors: the role of immuno-vascular interactions and cortical spreading depression. Curr. Pain Headache Rep. *16*, 270–277.

Levy, D., Jakubowski, M., Burstein, R. (2004). Disruption of communication between peripheral and central trigeminovascular neurons mediates the antimigraine action of 5HT 1B/1D receptor agonists. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 4274–4279.

Levy, D., Zhang, X.-C., Jakubowski, M., Burstein, R. (2008). Sensitization of meningeal nociceptors: inhibition by naproxen. Eur. J. Neurosci. 27, 917–922.

Li, J., Vause, C.V., Durham, P.L. (2008). Calcitonin gene-related peptide stimulation of nitric oxide synthesis and release from trigeminal ganglion glial cells. Brain Res. *1196*, 22–32.

Lipton, R.B., Stewart, W.F., Diamond, S., Diamond, M.L., Reed, M. (2001). Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II. Headache *41*, 646–657.

Lipton, R.B., Dodick, D., Sadovsky, R., Kolodner, K., Endicott, J., Hettiarachchi, J., Harrison, W., ID Migraine validation study (2003). A self-administered screener for migraine in primary care: The ID Migraine validation study. Neurology *61*, 375–382.

Liu, L., Simon, S.A. (1996). Similarities and differences in the currents activated by capsaicin, piperine, and zingerone in rat trigeminal ganglion cells. J. Neurophysiol. *76*, 1858–1869.

Liu, B., Yang, F., Zhan, H., Feng, Z., Zhang, Z., Li, W., Zhou, X. (2014). Increased severity of inflammation correlates with elevated expression of TRPV1 nerve fibers and nerve growth factor on interstitial cystitis/bladder pain syndrome. Urol. Int. *92*, 202–208.

Liu, M., Pertl, C., Markowitz, K., Dörscher-Kim, J., Kim, S. (1992). The effects of capsaicin on pulpal blood flow. Proc. Finn. Dent. Soc. Suom. Hammaslaakariseuran Toim. *88 Suppl 1*, 463–467.

Liu, R.H., Yamuy, J., Engelhardt, J.K., Xi, M.C., Morales, F.R., Chase, M.H. (1996). Cell size and geometry of spinal cord motoneurons in the adult cat following the intramuscular injection of adriamycin: comparison with data from aged cats. Brain Res. *738*, 121–130.

López-Requena, A., Boonen, B., Van Gerven, L., Hellings, P.W., Alpizar, Y.A., Talavera, K. (2017). Roles of Neuronal TRP Channels in Neuroimmune Interactions. In Neurobiology of TRP Channels, T.L.R. Emir, ed. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis).

Lukacs, M., Tajti, J., Fulop, F., Toldi, J., Edvinsson, L., Vecsei, L. (2017). Migraine, Neurogenic Inflammation, Drug Development - Pharmacochemical Aspects. Curr. Med. Chem. *24*, 3649–3665.

Lundberg, J.M., Franco-Cereceda, A., Alving, K., Delay-Goyet, P., Lou, Y.P. (1992). Release of calcitonin gene-related peptide from sensory neurons. Ann. N. Y. Acad. Sci. *657*, 187–193.

von Luschka, H. (1856). Die Nerven der Harten Hirnhaut (Tübingen: H. Laupp).

Lynn, B. (1990). Capsaicin: actions on nociceptive C-fibres and therapeutic potential. Pain 41, 61–69.

Macfarlane, S.R., Seatter, M.J., Kanke, T., Hunter, G.D., Plevin, R. (2001). Proteinase-activated receptors. Pharmacol. Rev. *53*, 245–282.

Macone, A.E., Perloff, M.D. (2017). Triptans and migraine: advances in use, administration, formulation, and development. Expert Opin. Pharmacother. *18*, 387–397.

Macpherson, L.J., Xiao, B., Kwan, K.Y., Petrus, M.J., Dubin, A.E., Hwang, S., Cravatt, B., Corey, D.P., Patapoutian, A. (2007a). An ion channel essential for sensing chemical damage. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 27, 11412–11415.

Macpherson, L.J., Dubin, A.E., Evans, M.J., Marr, F., Schultz, P.G., Cravatt, B.F., Patapoutian, A. (2007b). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. Nature *445*, 541–545.

Maggi, C.A., Meli, A. (1988). The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. Gen. Pharmacol. 19, 1–43.

Manzoni, G.C., Torelli, P., International Headache Society (2003). International Headache Society classification: new proposals about chronic headache. Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol. *24 Suppl 2*, S86-89.

Marsh, N., Marsh, A. (2000). A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. *27*, 313–319.

Marsh, S.J., Stansfeld, C.E., Brown, D.A., Davey, R., McCarthy, D. (1987). The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. Neuroscience 23, 275–289.

Martins, I., Blau, J.N. (1989). Headaches in insulin-dependent diabetic patients. Headache 29, 660–663.

Martins, L.B., Teixeira, A.L., Domingues, R.B. (2017). Neurotrophins and Migraine. Vitam. Horm. 104, 459–473.

Martins-Ferreira, H., Nedergaard, M., Nicholson, C. (2000). Perspectives on spreading depression. Brain Res. Brain Res. Rev. *32*, 215–234.

Matsuda, M., Huh, Y., Ji, R.-R. (2018). Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. J. Anesth. *33*, 131-139.

Matsumoto, T., Ishida, K., Taguchi, K., Kobayashi, T., Kamata, K. (2009). Mechanisms underlying enhanced vasorelaxant response to protease-activated receptor 2-activating peptide in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat mesenteric artery. Peptides *30*, 1729–1734.

McCulloch, J., Uddman, R., Kingman, T.A., Edvinsson, L. (1986). Calcitonin gene-related peptide: functional role in cerebrovascular regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *83*, 5731–5735.

McGillis, J.P., Humphreys, S., Reid, S. (1991). Characterization of functional calcitonin gene-related peptide receptors on rat lymphocytes. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *147*, 3482–3489.

McNaughton, M. (1938). The innervation of the intracranial blood vessels and dural sinuses. Res Nerv Ment Dis 18, 178–200.

McVey, D.C., Schmid, P.C., Schmid, H.H.O., Vigna, S.R. (2003). Endocannabinoids induce ileitis in rats via the capsaicin receptor (VR1). J. Pharmacol. Exp. Ther. *304*, 713–722.

Meents, J.E., Neeb, L., Reuter, U. (2010). TRPV1 in migraine pathophysiology. Trends Mol. Med. 16, 153–159.

Meents, J.E., Fischer, M.J.M., McNaughton, P.A. (2017). Sensitization of TRPA1 by Protein Kinase A. PloS One *12*, e0170097.

Meriwether, W.D., Bachur, N.R. (1972). Inhibition of DNA and RNA metabolism by daunorubicin and adriamycin in L1210 mouse leukemia. Cancer Res. *32*, 1137–1142.

Messlinger, K. (2018). The big CGRP flood - sources, sinks and signalling sites in the trigeminovascular system. J. Headache Pain *19*, 22.

Messlinger, K., Hanesch, U., Baumgärtel, M., Trost, B., Schmidt, R.F. (1993). Innervation of the dura mater encephali of cat and rat: ultrastructure and calcitonin gene-related peptide-like and substance P-like immunoreactivity. Anat. Embryol. (Berl.) *188*, 219–237.

Messlinger, K., Suzuki, A., Pawlak, M., Zehnter, A., Schmidt, R.F. (2000). Involvement of nitric oxide in the modulation of dural arterial blood flow in the rat. Br. J. Pharmacol. *129*, 1397–1404.

Mezey, E., Tóth, Z.E., Cortright, D.N., Arzubi, M.K., Krause, J.E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P.M., Szallasi, A. (2000). Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 3655–3660.

Minow, R.A., Gottlieb, J.A. (1975). Letter: Adriamycin cardiotoxicity. Ann. Intern. Med. 82, 855–856.

Mizumura, K., Murase, S. (2015). Role of nerve growth factor in pain. Handb. Exp. Pharmacol. 227, 57–77.

Moisset, X., Bommelaer, G., Boube, M., Ouchchane, L., Goutte, M., Dapoigny, M., Dallel, R., Guttmann, A., Clavelou, P., Buisson, A. (2017). Migraine prevalence in inflammatory bowel disease patients: A tertiary-care centre cross-sectional study. Eur. J. Pain Lond. Engl. *21*, 1550–1560.

Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. (1988). The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. Hypertens. Dallas Tex 1979 *12*, 365–372.

Moormann, C., Artuc, M., Pohl, E., Varga, G., Buddenkotte, J., Vergnolle, N., Brehler, R., Henz, B.M., Schneider, S.W., Luger, T.A., et al. (2006). Functional characterization and expression analysis of the proteinase-activated receptor-2 in human cutaneous mast cells. J. Invest. Dermatol. *126*, 746–755.

Morris, H.R., Panico, M., Etienne, T., Tippins, J., Girgis, S.I., MacIntyre, I. (1984). Isolation and characterization of human calcitonin gene-related peptide. Nature *308*, 746–748.

Muff, R., Leuthäuser, K., Bühlmann, N., Foord, S.M., Fischer, J.A., Born, W. (1998). Receptor activity modifying proteins regulate the activity of a calcitonin gene-related peptide receptor in rabbit aortic endothelial cells. FEBS Lett. *441*, 366–368.

Mulderry, P.K., Ghatei, M.A., Bishop, A.E., Allen, Y.S., Polak, J.M., Bloom, S.R. (1985). Distribution and chromatographic characterisation of CGRP-like immunoreactivity in the brain and gut of the rat. Regul. Pept. *12*, 133–143.

Murata, T., Yamawaki, H., Hori, M., Sato, K., Ozaki, H., Karaki, H. (2001). Chronic vascular toxicity of doxorubicin in an organ-cultured artery. Br. J. Pharmacol. *132*, 1365–1373.

Nagy, I., Sántha, P., Jancsó, G., Urbán, L. (2004). The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. Eur. J. Pharmacol. *500*, 351–369.

Nagy, J.I. (1982). Capsaicin's action on the nervous system. Trends in Neurosci. 5, 362-365.

Nagy, J.I., Iversen, L.L., Goedert, M., Chapman, D., Hunt, S.P. (1983). Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *3*, 399–406.

Nassini, R., Materazzi, S., Vriens, J., Prenen, J., Benemei, S., De Siena, G., la Marca, G., Andrè, E., Preti, D., Avonto, C., et al. (2012). The "headache tree" via umbellulone and TRPA1 activates the trigeminovascular system. Brain J. Neurol. *135*, 376–390.

Neeb, L., Hellen, P., Boehnke, C., Hoffmann, J., Schuh-Hofer, S., Dirnagl, U., Reuter, U. (2011). IL-1 β stimulates COX-2 dependent PGE₂ synthesis and CGRP release in rat trigeminal ganglia cells. PloS One *6*, e17360.

Nelson, M.T., Quayle, J.M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. Am. J. Physiol. *268*, C799-822.

Nelson, M.T., Huang, Y., Brayden, J.E., Hescheler, J., Standen, N.B. (1990). Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K+ channels. Nature *344*, 770–773.

Nemade, R.V., Lewis, A.I., Zuccarello, M., Keller, J.T. (1995). Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in vessels of the dura mater of the Sprague-Dawley rat. Neurosci. Lett. *197*, 78–80.

Nemzeti Egészségfejlesztési Intézet (2017). EGÉSZSÉGJELENTÉS 2016, Információk a népegészségügyi beavatkozások célterületeinek azonosításához a nem fertőző betegségek és az egészségmagatartási mutatók elemzése alapján.

Nieto-Posadas, A., Jara-Oseguera, A., Rosenbaum, T. (2011). TRP channel gating physiology. Curr. Top. Med. Chem. *11*, 2131–2150.

Nilius, B., Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. Genome Biol. *12*, 218.

Nilius, B., Voets, T., Peters, J. (2005). TRP channels in disease. Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ. 2005, re8.

Ninomiya, Y., Tanuma, S.-I., Tsukimoto, M. (2017). Differences in the effects of four TRPV1 channel antagonists on lipopolysaccharide-induced cytokine production and COX-2 expression in murine macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. *484*, 668–674.

Noorbakhsh, F., Tsutsui, S., Vergnolle, N., Boven, L.A., Shariat, N., Vodjgani, M., Warren, K.G., Andrade-Gordon, P., Hollenberg, M.D., Power, C. (2006). Proteinase-activated receptor 2 modulates neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. J. Exp. Med. *203*, 425–435.

Novakova-Tousova, K., Vyklicky, L., Susankova, K., Benedikt, J., Samad, A., Teisinger, J., Vlachova, V. (2007). Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization. Neuroscience *149*, 144–154.

Nozaki, K., Moskowitz, M.A., Maynard, K.I., Koketsu, N., Dawson, T.M., Bredt, D.S., Snyder, S.H. (1993). Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. *13*, 70–79.

Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H., Tominaga, M. (2002). Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. J. Biol. Chem. *277*, 13375–13378.

Nystedt, S., Emilsson, K., Wahlestedt, C., Sundelin, J. (1994). Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 9208–9212.

Nystedt, S., Ramakrishnan, V., Sundelin, J. (1996). The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor. J. Biol. Chem. *271*, 14910–14915.

O'Brien, P.J., Molino, M., Kahn, M., Brass, L.F. (2001). Protease activated receptors: theme and variations. Oncogene 20, 1570–1581.

O'Connor, T.P., van der Kooy, D. (1986). Pattern of intracranial and extracranial projections of trigeminal ganglion cells. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *6*, 2200–2207.

Offenhauser, N., Zinck, T., Hoffmann, J., Schiemann, K., Schuh-Hofer, S., Rohde, W., Arnold, G., Dirnagl, U., Jansen-Olesen, I., Reuter, U. (2005). CGRP release and c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis of the rat following glyceryltrinitrate infusion. Cephalalgia Int. J. Headache *25*, 225–236.

Ohkubo, T., Shibata, M., Inoue, M., Kaya, H., Takahashi, H. (1995). Regulation of substance P release mediated via prejunctional histamine H3 receptors. Eur. J. Pharmacol. *273*, 83–88.

Olah, Z., Szabo, T., Karai, L., Hough, C., Fields, R.D., Caudle, R.M., Blumberg, P.M., Iadarola, M.J. (2001). Ligand-induced dynamic membrane changes and cell deletion conferred by vanilloid receptor 1. J. Biol. Chem. *276*, 11021–11030.

Olesen, J., Thomsen, L.L., Iversen, H. (1994). Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. Trends Pharmacol. Sci. 15, 149–153.

Oprée, A., Kress, M. (2000). Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factoralpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heatevoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 20, 6289–6293.

O'Rourke, R.W. (2009). Inflammation in obesity-related diseases. Surgery 145, 255–259.

Ottosson, A., Edvinsson, L. (1997). Release of histamine from dural mast cells by substance P and calcitonin gene-related peptide. Cephalalgia Int. J. Headache *17*, 166–174.

Pacher, P., Bátkai, S., Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. Pharmacol. Rev. 58, 389–462.

Pan, Y., Thapa, D., Baldissera, L., Argunhan, F., Aubdool, A.A., Brain, S.D. (2018). Relevance of TRPA1 and TRPM8 channels as vascular sensors of cold in the cutaneous microvasculature. Pflugers Arch. *470*, 779-786.

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

Patwardhan, A.M., Diogenes, A., Berg, K.A., Fehrenbacher, J.C., Clarke, W.P., Akopian, A.N., Hargreaves, K.M. (2006). PAR-2 agonists activate trigeminal nociceptors and induce functional competence in the delta opioid receptor. Pain *125*, 114–124.

Peitl, B., Pethô, G., Pórszász, R., Németh, J., Szolcsányi, J. (1999). Capsaicin-insensitive sensoryefferent meningeal vasodilatation evoked by electrical stimulation of trigeminal nerve fibres in the rat. Br. J. Pharmacol. *127*, 457–467.

Pejler, G., Hu Frisk, J.M., Sjöström, D., Paivandy, A., Öhrvik, H. (2017). Acidic pH is essential for maintaining mast cell secretory granule homeostasis. Cell Death Dis. *8*, e2785.

Petersen, L.J., Church, M.K., Rihoux, J.P., Skov, P.S. (1999). Measurement of interstitial cetirizine concentrations in human skin: correlation of drug levels with inhibition of histamine-induced skin responses. Allergy *54*, 607–611.

Peterson, E.C., Wang, Z., Britz, G. (2011). Regulation of cerebral blood flow. Int. J. Vasc. Med. 2011, 823525.

Pietrobon, D., Moskowitz, M.A. (2013). Pathophysiology of migraine. Annu. Rev. Physiol. 75, 365–391.

Pigram, W.J., Fuller, W., Hamilton, L.D. (1972). Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA. Nature. New Biol. 235, 17–19.

Pilco-Ferreto, N., Calaf, G.M. (2016). Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. Int. J. Oncol. *49*, 753–762.

Pintér, E., Helyes, Z., Szolcsányi, J. (2006). Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. Pharmacol. Ther. *112*, 440–456.

Pintér, E., Thán, M., Chu, D.Q., Fogg, C., Brain, S.D. (2002). Interaction between interleukin 1beta and endogenous neurokinin 1 receptor agonists in mediating plasma extravasation and neutrophil accumulation in the cutaneous microvasculature of the rat. Neurosci. Lett. *318*, 13-16.

Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., Marchand, C. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. Chem. Biol. *17*, 421–433.

Pórszász, R., Porkoláb, A., Ferencz, A., Pataki, T., Szilvássy, Z., Szolcsányi, J. (2002). Capsaicin-induced nonneural vasoconstriction in canine mesenteric arteries. Eur. J. Pharmacol. 441, 173–175.

Premkumar, L.S., Qi, Z.-H., Van Buren, J., Raisinghani, M. (2004). Enhancement of potency and efficacy of NADA by PKC-mediated phosphorylation of vanilloid receptor. J. Neurophysiol. *91*, 1442–1449.

Price, T.J., Flores, C.M. (2007). Critical evaluation of the colocalization between calcitonin generelated peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse. J. Pain Off. J. Am. Pain Soc. *8*, 263–272.

Price, T.J., Helesic, G., Parghi, D., Hargreaves, K.M., Flores, C.M. (2003). The neuronal distribution of cannabinoid receptor type 1 in the trigeminal ganglion of the rat. Neuroscience *120*, 155–162.

Price, T.J., Patwardhan, A., Akopian, A.N., Hargreaves, K.M., Flores, C.M. (2004). Modulation of trigeminal sensory neuron activity by the dual cannabinoid-vanilloid agonists anandamide, N-arachidonoyl-dopamine and arachidonyl-2-chloroethylamide. Br. J. Pharmacol. *141*, 1118–1130.

Puchałowicz, K., Tarnowski, M., Baranowska-Bosiacka, I., Chlubek, D., Dziedziejko, V. (2014). P2X and P2Y receptors—role in the pathophysiology of the nervous system. Int. J. Mol. Sci. *15*, 23672–23704.

Quayle, J.M., Nelson, M.T., Standen, N.B. (1997). ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. Physiol. Rev. 77, 1165–1232.

Radi, R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *115*, 5839–5848.

Raffaelli, B., Reuter, U. (2018). The Biology of Monoclonal Antibodies: Focus on Calcitonin Gene-Related Peptide for Prophylactic Migraine Therapy. Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother. *15*, 324– 335.

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

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

Rasmussen, B.K. (1999). Epidemiology and socio-economic impact of headache. Cephalalgia Int. J. Headache *19 Suppl 25*, 20–23.

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

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

Reuter, U., Bolay, H., Jansen-Olesen, I., Chiarugi, A., Sanchez del Rio, M., Letourneau, R., Theoharides, T.C., Waeber, C., Moskowitz, M.A. (2001). Delayed inflammation in rat meninges: implications for migraine pathophysiology. Brain J. Neurol. *124*, 2490–2502.

Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208–212.

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

Roberts, H.J. (1967). Migraine and related vascular headaches due to diabetogenic hyperinsulinism. Observations on pathogenesis and rational treatment in 421 patients. Headache 7, 41–62.

Roch, M., Messlinger, K., Kulchitsky, V., Tichonovich, O., Azev, O., Koulchitsky, S. (2007). Ongoing activity in trigeminal wide-dynamic range neurons is driven from the periphery. Neuroscience *150*, 681–691.

Rocha, B.S., Gago, B., Pereira, C., Barbosa, R.M., Bartesaghi, S., Lundberg, J.O., Radi, R., Laranjinha, J. (2011). Dietary nitrite in nitric oxide biology: a redox interplay with implications for pathophysiology and therapeutics. Curr. Drug Targets *12*, 1351–1363.

Rohacs, T. (2015). Phosphoinositide regulation of TRPV1 revisited. Pflugers Arch. 467, 1851–1869.

Rosenbaum, T., Simon, S.A. (2007). TRPV1 Receptors and Signal Transduction. In TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades, W.B. Liedtke, and S. Heller, eds. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis).

Rosenfeld, M.G., Mermod, J.J., Amara, S.G., Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J., Vale, W.W., Evans, R.M. (1983). Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. Nature *304*, 129–135.

Rosenfeld, M.G., Amara, S.G., Evans, R.M. (1984). Alternative RNA processing: determining neuronal phenotype. Science 225, 1315–1320.

Rosenthal, J., Lippard, S.J. (2010). Direct detection of nitroxyl in aqueous solution using a tripodal copper(II) BODIPY complex. J. Am. Chem. Soc. *132*, 5536–5537.

Rotstein, D.L., Aviv, R.I., Murray, B.J. (2012). Migraine with aura associated with unilateral cortical increase in vascular permeability. Cephalalgia Int. J. Headache *32*, 1216–1219.

Rozniecki, J.J., Dimitriadou, V., Lambracht-Hall, M., Pang, X., Theoharides, T.C. (1999). Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell-neuron interactions in vitro and in vivo. Brain Res. *849*, 1–15.

Rózsa, Z., Jancsó, G., Varró, V. (1984). Possible involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in the regulation of intestinal blood flow in the dog. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *326*, 352-356.

Ruan, H.Z., Burnstock, G. (2003). Localisation of P2Y1 and P2Y4 receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat. Histochem. Cell Biol. *120*, 415–426.

Russell, F.A., King, R., Smillie, S.-J., Kodji, X., Brain, S.D. (2014). Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. Physiol. Rev. *94*, 1099–1142.

Sabbah, H.N., Tocchetti, C.G., Wang, M., Daya, S., Gupta, R.C., Tunin, R.S., Mazhari, R., Takimoto, E., Paolocci, N., Cowart, D., et al. (2013). Nitroxyl (HNO): A novel approach for the acute treatment of heart failure. Circ. Heart Fail. *6*, 1250–1258.

Salas, M.M., Hargreaves, K.M., Akopian, A.N. (2009). TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. Eur. J. Neurosci. *29*, 1568–1578.

Sand, C.A., Grant, A.D., Nandi, M. (2015). Vascular Expression of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1). J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. *63*, 449–453.

Sandow, S.L., Neylon, C.B., Chen, M.X., Garland, C.J. (2006). Spatial separation of endothelial smalland intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (K(Ca)) and connexins: possible relationship to vasodilator function? J. Anat. *209*, 689–698.

Sanz-Salvador, L., Andrés-Borderia, A., Ferrer-Montiel, A., Planells-Cases, R. (2012). Agonist- and Ca2+-dependent desensitization of TRPV1 channel targets the receptor to lysosomes for degradation. J. Biol. Chem. *287*, 19462–19471.

Sarchielli, P., Alberti, A., Codini, M., Floridi, A., Gallai, V. (2000). Nitric oxide metabolites, prostaglandins and trigeminal vasoactive peptides in internal jugular vein blood during spontaneous migraine attacks. Cephalalgia Int. J. Headache *20*, 907–918.

Scadding, J.W. (1980). The permanent anatomical effects of neonatal capsaicin on somatosensory nerves. J. Anat. *131*, 471–482.

Schaible, H.G., Ebersberger, A., Peppel, P., Beck, U., Messlinger, K. (1997). Release of immunoreactive substance P in the trigeminal brain stem nuclear complex evoked by chemical stimulation of the nasal mucosa and the dura mater encephali--a study with antibody microprobes. Neuroscience *76*, 273–284.

Schain, A.J., Melo-Carrillo, A., Strassman, A.M., Burstein, R. (2017). Cortical Spreading Depression Closes Paravascular Space and Impairs Glymphatic Flow: Implications for Migraine Headache. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *37*, 2904–2915.

Schueler, M., Messlinger, K., Dux, M., Neuhuber, W.L., De Col, R. (2013). Extracranial projections of meningeal afferents and their impact on meningeal nociception and headache. Pain *154*, 1622–1631.

Schwenger, N., Dux, M., de Col, R., Carr, R., Messlinger, K. (2007). Interaction of calcitonin generelated peptide, nitric oxide and histamine release in neurogenic blood flow and afferent activation in the rat cranial dura mater. Cephalalgia Int. J. Headache *27*, 481–491.

Shibata, M., Suzuki, N. (2017). Exploring the role of microglia in cortical spreading depression in neurological disease. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. *37*, 1182–1191.

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

Silva-Néto, R.P., Peres, M.F.P., Valença, M.M. (2014). Odorant substances that trigger headaches in migraine patients. Cephalalgia Int. J. Headache *34*, 14–21.

Simonetti, M., Giniatullin, R., Fabbretti, E. (2008). Mechanisms mediating the enhanced gene transcription of P2X3 receptor by calcitonin gene-related peptide in trigeminal sensory neurons. J. Biol. Chem. *283*, 18743–18752.

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

Sopacua, M., Hoeijmakers, J.G.J., Merkies, I.S.J., Lauria, G., Waxman, S.G., Faber, C.G. (2019). Small fibre neuropathy: expanding the clinical pain universe. J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS. *24*, 19-33.

Split, W., Szydlowska, M. (1997). Headaches in non insulin-dependent diabetes mellitus. Funct. Neurol. 12, 327–332.

Staikopoulos, V., Sessle, B.J., Furness, J.B., Jennings, E.A. (2007). Localization of P2X2 and P2X3 receptors in rat trigeminal ganglion neurons. Neuroscience *144*, 208–216.

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

Steenbergh, P.H., Höppener, J.W., Zandberg, J., Visser, A., Lips, C.J., Jansz, H.S. (1986). Structure and expression of the human calcitonin/CGRP genes. FEBS Lett. *209*, 97–103.

Steinhoff, M., Vergnolle, N., Young, S.H., Tognetto, M., Amadesi, S., Ennes, H.S., Trevisani, M., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Caughey, G.H., et al. (2000). Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. Nat. Med. *6*, 151–158.

van der Stelt, M., Trevisani, M., Vellani, V., De Petrocellis, L., Schiano Moriello, A., Campi, B., McNaughton, P., Geppetti, P., Di Marzo, V. (2005). Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca2+ influx via TRPV1 channels. EMBO J. *24*, 3026–3037.

Stern, K., Cullen, A.M., Barber, V.T., Richer, R. (1950). Peptidases in the cerebrospinal fluid. Can. Med. Assoc. J. *63*, 473–475.

Stewart, W.F., Shechter, A., Liberman, J. (1992). Physician consultation for headache pain and history of panic: results from a population-based study. Am. J. Med. *92*, 35S-40S.

Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., et al. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. Cell *112*, 819–829.

Stovner, L., Hagen, K., Jensen, R., Katsarava, Z., Lipton, R., Scher, A., Steiner, T., Zwart, J.-A. (2007). The global burden of headache: a documentation of headache prevalence and disability worldwide. Cephalalgia Int. J. Headache *27*, 193–210.

Strassman, A.M., Weissner, W., Williams, M., Ali, S., Levy, D. (2004). Axon diameters and intradural trajectories of the dural innervation in the rat. J. Comp. Neurol. *473*, 364–376.

Striggow, F., Riek-Burchardt, M., Kiesel, A., Schmidt, W., Henrich-Noack, P., Breder, J., Krug, M., Reymann, K.G., Reiser, G. (2001). Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. Eur. J. Neurosci. *14*, 595–608.

Suen, J.Y., Gardiner, B., Grimmond, S., Fairlie, D.P. (2010). Profiling gene expression induced by protease-activated receptor 2 (PAR2) activation in human kidney cells. PloS One *5*, e13809.

Sugiura, T., Tominaga, M., Katsuya, H., Mizumura, K. (2002). Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. J. Neurophysiol. *88*, 544–548.

Sullivan, M.N., Gonzales, A.L., Pires, P.W., Bruhl, A., Leo, M.D., Li, W., Oulidi, A., Boop, F.A., Feng, Y., Jaggar, J.H., et al. (2015). Localized TRPA1 channel Ca2+ signals stimulated by reactive oxygen species promote cerebral artery dilation. Sci. Signal. *8*, ra2.

Szallasi, A., Blumberg, P.M. (1990). Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. Life Sci. *47*, 1399–1408.

Szallasi, A., Blumberg, P.M. (1996). Vanilloid receptors: new insights enhance potential as a therapeutic target. Pain *68*, 195–208.

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

Szentágothai, J., Réthelyi, M. (2002). Funkcionális anatómia (Medicina Könyvkiadó).

Szigeti, C., Sántha, P., Körtvély, E., Nyári, T., Horváth, V.J., Deák, É., Dux, M., Gulya, K., Jancsó, G. (2012). Disparate changes in the expression of transient receptor potential vanilloid type 1 receptor mRNA and protein in dorsal root ganglion neurons following local capsaicin treatment of the sciatic nerve in the rat. Neuroscience *201*, 320–330.

Szolcsányi, J. (1984). Capsaicin-sensitive chemoceptive neural system with dual sensory efferent function. In: LA Chahl, J Szolcsányi, F Lembeck (eds): Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. Akadémiai Kiadó, Budapest, 27–56.

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

Szolcsányi, J. (2004). Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. Neuropeptides *38*, 377–384.

Szolcsányi, J., Jancsó-Gábor, A. (1975). Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. Arzneimittelforschung. *25*, 1877–1881.

Szolcsányi, J., Helyes, Z., Oroszi, G., Németh, J., Pintér, E. (1998). Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. Br. J. Pharmacol. *123*, 936–942.

Tajti, J., Vécsei, L. (2009). [The mechanism of peripheral and central sensitization in migraine. A literature review]. Neuropsychopharmacol. Hung. Magy. Pszichofarmakologiai Egyesulet Lapja Off. J. Hung. Assoc. Psychopharmacol. *11*, 15–21.

Tajti, J., Möller, S., Uddman, R., Bodi, I., Edvinsson, L. (1999). The human superior cervical ganglion: neuropeptides and peptide receptors. Neurosci. Lett. *263*, 121–124.

Tang, G., Wu, L., Liang, W., Wang, R. (2005). Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. Mol. Pharmacol. *68*, 1757–1764.

Tarasoff-Conway, J.M., Carare, R.O., Osorio, R.S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B.V., et al. (2015). Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. Nat. Rev. Neurol. *11*, 457–470.

Taylor-Clark, T.E. (2016). Role of reactive oxygen species and TRP channels in the cough reflex. Cell Calcium *60*, 155–162.

Tewey, K.M., Rowe, T.C., Yang, L., Halligan, B.D., Liu, L.F. (1984). Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. Science *226*, 466–468.

Toda, N., Usui, H., Nishino, N., Fujiwara, M. (1972). Cardiovascular effects of capsaicin in dogs and rabbits. J. Pharmacol. Exp. Ther. *181*, 512–521.

Tominaga, M., Caterina, M.J. (2004). Thermosensation and pain. J. Neurobiol. 61, 3–12.

Tominaga, M., Tominaga, T. (2005). Structure and function of TRPV1. Pflugers Arch. 451, 143–150.

Tominaga, M., Wada, M., Masu, M. (2001). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 6951–6956.

Tong, J., Ganguly, P.K., Singal, P.K. (1991). Myocardial adrenergic changes at two stages of heart failure due to adriamycin treatment in rats. Am. J. Physiol. *260*, H909-916.

Trevisani, M., Siemens, J., Materazzi, S., Bautista, D.M., Nassini, R., Campi, B., Imamachi, N., Andrè, E., Patacchini, R., Cottrell, G.S., et al. (2007). 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 13519–13524.

Troger, J., Humpel, C., Kremser, B., Kralinger, M., Teuchner, B., Kunze, C., Philipp, W., Kieselbach, G. (1999). The effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on substance P and calcitonin generelated peptide expression in the rat trigeminal ganglion. Brain Res. *842*, 84–91.

Tsukagoshi, M., Goris, R.C., Funakoshi, K. (2006). Differential distribution of vanilloid receptors in the primary sensory neurons projecting to the dorsal skin and muscles. Histochem. Cell Biol. *126*, 343–352.

Turan, M.O., Susuz, Ç.Ç., Turan, P.A. (2017). Presence of Headache and Migraine in Asthma Patients. Turk. Thorac. J. *18*, 47–51.

Vass, Z., Nuttall, A.L., Coleman, J.K., Miller, J.M. (1995). Capsaicin-induced release of substance P increases cochlear blood flow in the guinea pig. Hear. Res. *89*, 86–92.

Vass, Z., Dai, C.F., Steyger, P.S., Jancsó, G., Trune, D.R., Nuttall, A.L. (2004). Co-localization of the vanilloid capsaicin receptor and substance P in sensory nerve fibers innervating cochlear and vertebro-basilar arteries. Neuroscience *124*, 919–927.

Vergnolle, N., Bunnett, N.W., Sharkey, K.A., Brussee, V., Compton, S.J., Grady, E.F., Cirino, G., Gerard, N., Basbaum, A.I., Andrade-Gordon, P., et al. (2001). Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. Nat. Med. *7*, 821–826.

Wainsztein, N., Rodríguez Lucci, F. (2017). Cortical Spreading Depression and Ischemia in Neurocritical Patients. Neurol. Clin. *35*, 655–664.

Wang, S., Dai, Y., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Cui, X., Tominaga, M., Noguchi, K. (2008). Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. Brain J. Neurol. *131*, 1241–1251.

Wang, X.-L., Cui, L.-W., Liu, Z., Gao, Y.-M., Wang, S., Li, H., Liu, H.-X., Yu, L.-J. (2019). Effects of TRPA1 activation and inhibition on TRPA1 and CGRP expression in dorsal root ganglion neurons. Neural Regen. Res. *14*, 140–148.

Wemmie, J.A., Price, M.P., Welsh, M.J. (2006). Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. Trends Neurosci. 29, 578–586.

Williamson, D.J., Hargreaves, R.J. (2001). Neurogenic inflammation in the context of migraine. Microsc. Res. Tech. *53*, 167–178.

Wimalawansa, S.J., Morris, H.R., Etienne, A., Blench, I., Panico, M., MacIntyre, I. (1990). Isolation, purification and characterization of beta-hCGRP from human spinal cord. Biochem. Biophys. Res. Commun. *167*, 993–1000.

Wimhurst, J.M., Manchester, K.L. (1970). A comparison of the effects of diabetes induced with either alloxan or streptozotocin and of starvation on the activities in rat liver of the key enzymes of gluconeogenesis. Biochem. J. *120*, 95–103.

Wrobel Goldberg, S., Silberstein, S.D. (2015). Targeting CGRP: A New Era for Migraine Treatment. CNS Drugs *29*, 443–452.

Yamamoto, T., Iwasaki, Y., Konno, H. (1984). Retrograde axoplasmic transport of adriamycin: an experimental form of motor neuron disease? Neurology *34*, 1299–1304.

Yan, J., Edelmayer, R.M., Wei, X., De Felice, M., Porreca, F., Dussor, G. (2011). Dural afferents express acid-sensing ion channels: a role for decreased meningeal pH in migraine headache. Pain *152*, 106–113.

Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A.K., Mu, W., Zhang, S., et al. (2008). H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. Science *322*, 587–590.

Yau, M.-K., Suen, J.Y., Xu, W., Lim, J., Liu, L., Adams, M.N., He, Y., Hooper, J.D., Reid, R.C., Fairlie, D.P. (2016). Potent Small Agonists of Protease Activated Receptor 2. ACS Med. Chem. Lett. *7*, 105–110.

Yokomizo, A., Takatori, S., Hashikawa-Hobara, N., Goda, M., Kawasaki, H. (2015). Characterization of Perivascular Nerve Distribution in Rat Mesenteric Small Arteries. Biol. Pharm. Bull. *38*, 1757–1764.

Yoshimoto, R., Mitsui-Saito, M., Ozaki, H., Karaki, H. (1998). Effects of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide on contractions of the rat aorta and porcine coronary artery. Br. J. Pharmacol. *123*, 1645–1654.

Yuan, H., Lauritsen, C.G., Kaiser, E.A., Silberstein, S.D. (2017). CGRP Monoclonal Antibodies for Migraine: Rationale and Progress. BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther. *31*, 487–501.

Zhang, X.-C., Levy, D. (2008). Modulation of meningeal nociceptors mechanosensitivity by peripheral proteinase-activated receptor-2: the role of mast cells. Cephalalgia Int. J. Headache *28*, 276–284.

Zhang, H., Wickley, P.J., Sinha, S., Bratz, I.N., Damron, D.S. (2011a). Propofol restores transient receptor potential vanilloid receptor subtype-1 sensitivity via activation of transient receptor potential ankyrin receptor subtype-1 in sensory neurons. Anesthesiology *114*, 1169–1179.

Zhang, X., Daugherty, S.L., de Groat, W.C. (2011b). Activation of CaMKII and ERK1/2 contributes to the time-dependent potentiation of Ca2+ response elicited by repeated application of capsaicin in rat DRG neurons. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *300*, R644-654.

Zhang, X.-C., Strassman, A.M., Burstein, R., Levy, D. (2007). Sensitization and activation of intracranial meningeal nociceptors by mast cell mediators. J. Pharmacol. Exp. Ther. *322*, 806–812.

Zhang, Y., Malmberg, A.B., Yaksh, T.L., Sjölund, B., Sundler, F., Håkanson, R. (1997). Capsaicin-evoked release of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) from rat spinal cord in vivo. Regul. Pept. *69*, 83–87.

Zhao, Q., Wang, W., Wang, R., Cheng, Y. (2016). TRPV1 and neuropeptide receptor immunoreactivity and expression in the rat lung and brainstem after lung ischemia-reperfusion injury. J. Surg. Res. *203*, 183–192.

Zimmermann, K., Reeh, P.W., Averbeck, B. (2002). ATP can enhance the proton-induced CGRP release through P2Y receptors and secondary PGE(2) release in isolated rat dura mater. Pain *97*, 259–265.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sørgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., Högestätt, E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. Nature 400, 452–457.