

VÁLASZOK PROF. DR. BARTHÓ LÓRÁND OPPONENSI VÉLEMÉNYÉRE

Köszönöm Barthó Lóránd Professzor Úrnak, hogy elvállalta értekezésem bírálatát, és annak alapos, részletes értelmezését adta.

Formai és stiláris jegyek

- A jelölt eltúlozza a rövidítések, betűszók alkalmazását. A jelenleginek 1/3-a, 1/4-e teszi ki a gyakrabban használt betűszavakat: ennyi elég is volna.
- Az értekezés nyelvezete nem dicsérhető egyértelműen. Valószínűleg kellett volna még egy átolvasás a Jelölt, ill. kollégája által. Néhány kirívó példa: „Humánban” (számos helyen), „Ezen képletek...receptorokkal ellátottak” (17.o.); az alany és állítmány egyeztetések hiánya (több helyütt); „...a reakcióban el lett hagyva...”; végett → miatt; „...dilatációját figyelték meg az artéria temporalis superficialisnak” stbl. A legutóbbi példa az anatómiai képletek következtelen, kevert leírását is mutatja; „arteria temporalis superficialis”, azaz tisztán latin írásmód helyesebb lett volna (sok ilyen jellegű példát lehetne felsorolni). Nagyjából következtetek, de nem helyeselhetők a betűszók ragokkal való ellátásának módja; pl. a Jelölt logikája szerint CGRP-del, CGR-et helyett a CGRP-vel, CGRP-t írásmódot javasolnám. Mivel sok fejezet foglalkozik neuropeptidekkel, ez a probléma gyakran fölmerül.
- Több ábraszövegben megfigyelhető egyes fogalmak kétszeres megmagyarázása (a második apró betűvel írva).

Professzor Úrnak a dolgozat formai és stiláris jegyeiről szóló véleményét elfogadom.

Szakmai kérdések és megjegyzések

1. A VR1 helyett több mint 10 éve a TRPV1 megnevezést használjuk, tehát a VR1 megjelölés egy 2015-ös szövegben anakronisztikus.

A humán ganglion trigeminaleban (TRIG) a capsaicin receptorral kapcsolatos immunhisztokémiai munkánkat 2002-ben közzétettük (Hou et al. 2002). Akkor még a Vanilloid Receptor1 (VR1) elnevezés volt az elfogadott. Ugyanezen időszakban indult azonban a Tranziens Receptor Potenciál (TRP) ioncsatorna család klasszifikációja (Clapham et al. 2001; Gunthorpe et al. 2002). Azért hagytam meg a dolgozatban a VR1 jelölést, hogy az eredeti közleménnyel történő esetleges összevetéskor a nevezék ne különbözzön. Az értekezésben lévő VR1 helyett ma már a Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid1 (TRPV1) elnevezést használjuk.

Irodalom

Clapham D.E, Runnels L.W., Strübing C. The TRP ion channel family. Nature Reviews Neuroscience 2:387-396, 2001.

Gunthorpe M.J., Benham C.D., Randall A., Davis J.B. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 23:183-191, 2002.

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

2. *Mivel számos „nitrogén-oxid” létezik (ld. NO_x), az NO-t helyesebb lett volna nitrogén-monoxidnak nevezni (néhány helyen így szerepel).*

Professzor Úr megjegyzésével egyetérve a nitrogén-monoxid (NO) a helyes kifejezés, hiszen a dízelmotoroknak is működésük közben igen jelentős a nitrogén-oxid (NO_x) kibocsátásuk, melyeket különböző technológiával próbálnak mérsékelni az autóiparban. A nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) hatására az L-arginin konvertálódik L-citrullinné, melynek során nitrogén-monoxid (NO) szabadul fel. Humánban a NOS enzimnek három izomerje ismert: a neuronális NOS (nNOS), az endothelialis NOS (eNOS) és az indukálható NOS (iNOS) (Förstermann and Sessa 2012.) A nNOS elsősorban a perifériás és a centrális idegrendszerben a neuronokban, az eNOS az endothelialis sejtekben, az iNOS pedig a gliákban és az immunsejtekben lelhetőek fel (Annedi et al. 2012). Az nNOS és az eNOS konstitucionális, míg az iNOS indukálható izoform. Az NO a trigemino-vascularis rendszerben kísérletes körülmények között interakcióba lépett a calcitonin génnel-rokon peptiddel (CGRP) és meningeális vazodilatációt okozott, így szerepet kapott a migrén pathomechanizmusában (Messlinger et al. 2012, Barbanti et al. 2014). Sicuteri volt az első, aki felhívta a figyelmet az NO és a migrén lehetséges kapcsolatára. Az NO-donor nitroglycerin (NTG) adását követően migrénos páciensekben késleltetett migrén-szerű fejfájásroham alakult ki (Sicuteri et al. 1987). Az NO szerepére migrénben a meningeális vazodilatáció mellett, a neuronális aktiváció és a centrális szenzitizáció utal (Olesen et al. 1995; Thomsen and Olesen 2001; Toda et al. 2009; Prast and Philippu 2001; Luo and Cizkova 2000, Wu et al. 2001).

Irodalom

Annedi S.C., Maddaford S.P., Ramnauth J., Renton P., Rybak T., Silverman S., Rakhit S., Mladenova G., Dove P., Andrews J.S., Zhang D., Porreca F. Discovery of a potent, orally bioavailable and highly selective human neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor, N-(1-(piperidin-4-yl)indolin-5-yl)thiophene-2-carboximidamide as a pre-clinical development candidate for the treatment of migraine. *Eur. J. Med. Chem.* 55:94-107. 2012.

Barbanti P., Egeo G., Aurilia C., Fofi L. Della-Morte D. Drugs targeting nitric oxide synthase for migraine treatment. *Expert Opin. Investig. Drugs* 23:1141-1148, 2014.

Förstermann U, Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33:829-37, 2012.

Luo Z.D., Cizkova D. The role of nitric oxide in nociception. *Curr. Rev. Pain* 4:459-466, 2000.

Messlinger K., Lennerz J.K., Eberhardt M., Fischer M.J.M. CGRP and NO in the trigeminal system: mechanisms and role in headache generation. *Headache* 52:1411-27, 2012.

Olesen J., Thomsen L.L., Lassen L.H. The nitric oxide hypothesis of migraine and other vascular headaches. *Cephalalgia* 15:94-100, 1995.

Prast H., Philippu A. Nitric oxide as modulators of neuronal function. *Prog. Neurobiol.* 64:51-68, 2001.

Sicuteri F., Delbene E., Poggioni M., Bonazzi A. Unmasking latent dynociception in healthy-subjects. *Headache* 27:180-185, 1987.

Thomsen L.L., Olesen J. Nitric oxide in primary headaches. *Curr. Opin. Neurol.* 14:315-321, 2001.

Toda N., Ayajiki K., Okamura T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances. *Pharmacol. Rev.* 61:62-97, 2009.

Wu J., Fang L., Lin Q., Willis W.D. Nitric oxide synthase in spinal cord central sensitization following intradermal injection of capsaicin. *Pain* 94:47-58, 2001.

3. *Bevezetés: 1.9. A patomechanizmussal a Szerző feltűnően keveset foglalkozik. Ez azt látszik előlegezni, hogy majd a továbbiakban a tárgyalásra sor kerül. Ez azonban csak részben történik meg, az elvégzett kísérletekkel, vizsgálatokkal kapcsolatban. Átfogó, akár a már kevésbé érvényes elgondolásokkal is foglalkozó elemzés nem történik. Így azt gondolom, hogy az 1.9. pontot bőségesebben kellett volna tárgyalni.*

Az értekezés minden egyes részében a „Háttér” című alfejezetben igyekeztem összefoglalni a pathomechanizmussal kapcsolatos megállapításokat és hipotéziseket. Helyesebb lett volna egységesíteni és bővíteni ezt az 1.9. pontban.

Szintézist adó összefoglalás:

Munkám során azon nemzetközi klinikai és kísérletes gondolkörhöz csatlakoztam, mely a trigemino-vascularis rendszer aktivitását, szenzitizációját, a neuropeptidek szerepét és az agyi hiperexcitabilitást a migrén pathomechanizmusában lehetséges

tényezőknak tekintette. A trigemino-vascularis rendszer központi eleme a TRIG, melyben humán vizsgálataink alapján CGRP és hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) proteinek és receptoraik jelenlétét igazoltuk. A trigemino-vascularis rendszer – feltételezhetően a kúszó depolarizáció/depresszió (CSD) hatására keletkezett – aktivitása következtében a ganglion trigeminale pseudounipolaris neuronjainak perifériás ágán a durális vasculatúrába CGRP és PACAP kiáramlás következik be. A folyamat eredőjeként neurogén inflammáció (vasodilatatio, plasma protein extravasatio) és hízósejt degranuláció jön létre, melyek a trigeminális afferensek perifériás szenzitizációját váltják ki. Klinikailag ezt jelzi a fejfájás lüktető jellege, valamint a fizikai aktivitásra erősödő fájdalom. Terápiás szempontból a közeljövőben már esély mutatkozik a ganglion trigeminalera ható, CGRP-, valamint CGRP-receptor ellenes ellenanyagok alkalmazására, mint a migrén profilaktikus kezelési módja. A trigeminális perifériás ágak és a trigemino-vascularis rendszer parasympathicus karja által ellátott nyálmirigyekből észlelésünk szerint a migrénesekben glutaminsavban gazdag nyál szabadul fel, mely hyperexcitábilis állapotot tükröz. Ez lehetőséget jelenthet a migrénes betegekben biomarker meghatározására, mely segítséget nyújthat a differenciál diagnosztikában, a terápiás válaszban és a prognosztikában. A migrénes páciensek jelentős részében a fejfájásroham során tapasztalt craniális autonóm jelek (pl.: könnyedzés, orrfolyás) hátterében, vizsgálataink alapján a trigeminális rendszer által befolyásolt parasympathicus ganglion funkció áll. Erre utaltak a parasympathicus ganglion sphenopalatinumban általunk kimutatott szenzoros neuropeptidet (CGRP) tartalmazó idegrostok, és a satellita glia sejteken észlelt funkcionális CGRP receptor komponensek (CLR, RAMP1) jelenléte. Megfigyeléseink szerint a migrénes rosszullétek állandósulásának, a krónikus migrén kialakulásának a hátterében a ganglion trigeminale-ban zajló szignalizációs rendszer aktivitása feltételezhető. Ez felismerésünk szerint a MAPK rendszerben az ERK1/2 működésén át valósul meg, következményes fokozott CGRP megjelenéssel neuronális és gliális szinten egyaránt. A jövőbe tekintve, az innovatív gyógyszergyártásban az ERK1/2 gátlókat, mint migrén ellenes farmakonok kifejlesztését célozhatják meg. A trigemino-vascularis rendszer központi ágát a TRIG-ből a trigemino-cervicalis komplexbe (TCC) jutó rostok jelentik. A humán TCC-ben igen jelentős CGRP és PACAP immunreaktív idegrost arborizációt találtunk. Ez lehetőséget teremt, hogy az itt felszabaduló CGRP és PACAP aktiválja, szenzitizálja a TCC-ben a másodlagos átkapcsoló neuronokat, mely hátterét jelentheti a migrénes fejfájásroham során gyakran létrejövő cephalikus allodynia kialakulásának. Az

agytörzsi „migrén-generátorok” értékelése során arra a következtetésre jutottunk, hogy a locus ceruleus (LC) a PACAP és a CGRP által befolyásolhatja a TCC-ben a nociceptív folyamatok transzmisszióját. A migrénes betegek komorbid tényezői között szerepel az ischaemiás stroke. A migrénes páciensek vérlemezke eikozanoid rendszerének elemzése nyomán úgy tartjuk, hogy a megnövekedett thrombocyta aggregabilitás az egyik lényeges eleme a migrén és az ischaemiás stroke közötti szoros kapcsolatnak. A migrénes betegek neurológiai vizsgálata során gyakori tünet a látórendszeri eltérés (pl.: homályoslátás, fotofóbia). Kérdésként merült fel a magnocellularis, illetve a parvocellularis vizuális pályarendszer funkciózavara. A vizuális rendszer elektrofiziológiai vizsgálatával megállapítottuk, hogy az aura nélküli migrénes betegekben a magnocellularis pályarendszer zavara volt kimutatható. Az a klinikai megfigyelés, miszerint a migrénes páciensekben az intravénás infúzióban adott PACAP-38 késleltetett aura nélküli migrénes rohamot provokált, megerősítette a PACAP-38 szerepét a migrén kórfolyamatában. Ezért a trigemino-vascularis rendszerben a PACAP előfordulását feltárni igyekvő immunhisztokémiai vizsgálatainkat követően a migrénes betegekben spontán rohamban, valamint fájdalommentes időszakban meghatároztuk a PACAP-38 koncentrációját az antecubitalis vénás vérplazmában. Eredményként a roham alatt jelentősen megemelkedett PACAP-38 koncentrációt tapasztaltunk. A trigemino-vascularis rendszer perifériás és centrális területén immunhisztokémiai vizsgálatainkkal kimutatott PACAP jelenlét, a betegekben az iktális és interiktális PACAP-38 koncentrációváltozás, valamint azon elektrofiziológiai vizsgálatok eredményei, melyek felvetik a PAC1 receptor szerepét a TCC-ben a másodlagos átkapcsoló neuronok aktivitásában, együttesen célozzák a közeljövőben a PAC1 receptor antagonisták előállításának a fontosságát a migrénes páciensek akut terápiájában.

Áttekintve a migrén kórfolyamatának vizsgálatára irányuló törekvéseim eredményeit és az abból levonható következtetéseket, úgy vélem, hogy a migrén neurovascularis megbetegedés, melyben a trigemino-vascularis rendszer neuropeptidek által meghatározott működésének elsődleges szerepe van.

További terveim között szerepel a kémiai és elektromos úton aktivált trigemino-vascularis rendszerben a PACAP és a kynureninek, mint a glutamáterg rendszeren keresztül ható komponensek együttes vizsgálata. Az ezzel kapcsolatos előkísérletek már megtörténtek, a továbbiakban ezt folytatjuk munkacsoportunkkal.

4. 3.1.3. és bizonyos további részek. A receptorok jelenléte eltérést mutathat az endogén agonisták megoszlásától („mismatch”). A mediátorok, ill. szintetizáló enzimeik specifikus kimutatása sokkal erősebb bizonyíték, mint a receptoroké.

Professzor Úr 4. és 13. pontban leírt megjegyzéseit, megállapításait egybekapcsoltam és azokat elfogadom. Vizsgálataink során azért végeztünk receptor kimutatást, hogy felmérjük annak a lehetőségét, hogy vajon az intraganglionáris szignalizációs rendszerben a neuronok és/vagy a gliák szerepet játszhatnak-e. Szerettük volna látni, hogy van-e esélye a ganglionon belüli neuropeptidok által közvetített kapcsolatrendszer kialakulásának. A ganglion trigeminaleban CGRP és CGRP-receptor komponensek (CLR, RAMP1) immunreaktivitását tapasztaltuk. A CGRP immunreaktív neuronok szinte sohasem mutattak ko-lokalizációt CLR-rel és RAMP1-el. A CLR és a RAMP1 azonban ko-lokalizációt adott számos neuronban. A satellita glia sejtekben nem figyeltünk meg CGRP immunreaktivitást, ugyanakkor a glia sejtek CLR és RAMP1 immunreaktivitást adtak (Eftekhari et al. 2010). A ganglion sphenoplatinumban a neuronokban láttunk PACAP immunreaktivitást, míg a satellita glia sejtek PAC1 és VPAC1 receptor immunpozitivitással rendelkeztek (Csáti et al. 2012). A receptorokra ható exogén ligandumok felhasználásával végzendő munka a következő évek feladatait célozza számomra.

Irodalom

Csati A., Tajti J., Kuris A., Tuka B., Edvinsson L., Warfvinge K. Distribution of vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, nitric oxide synthase, and their receptors in human and rat sphenopalatine ganglion. *Neuroscience* 202:158-168, 2012.

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

5. Meglepő, hogy ilyen mértékű nociceptin-IR ellenére a Jelölt viszonylag keveset foglalkozik ezzel a peptiddel.

A nociceptinnel (az akkor még igen újnak számító, 17 aminosavból álló neuropeptiddel) kapcsolatos ganglion trigeminale-t érintő vizsgálatainkat 2003-ban publikáltuk (Hou et al. 2003). A nociceptin/orphanin FQ endogén ligandja az opioid receptor-szerű receptornak (ORL1). Kezdetben már ismert volt a nocicepcióval kapcsolatos

tulajdonsága, azonban a receptor még a ligand megismerése előtt felfedezésre került (orphan receptor) (Meunier et al. 1995; Reinscheid et al. 1995). Munkánkat nagymértékben inspirálta a Helyes, Németh, Pintér és Szolcsányi munkacsoport megállapítása, miszerint a nociceptin gátolta a CGRP és a P-anyag (SP) felszabadulását a nociceptív neuronok végződéseiből (Helyes et al. 1997). Továbbá Bartsch vizsgálatai, miszerint a nociceptin gátolta a patkányban a neurogén durális vazodilatációt (Bartsch et al. 2002). Megfigyelésünk szerint a ganglion trigeminale-ban a neuronok 70%-a mutatott nociceptin immunpozitivitást. A nociceptin pozitív sejtek 78%-a közepes nagyságú (30-60 μm), 14%-a kis méretű (<30 μm), míg 8%-a nagy méretű (>60 μm) neuron volt. Kettősimmunfestéssel azt találtuk, hogy a nociceptin pozitív sejtek 61%-a CGRP-t, 54%-a SP-t, 50%-a NOS-t és 68%-a PACAP-ot tartalmazott (Hou et al. 2003). Witta, Palkovits, Rosenberger és Cox 2004-ben közölte, hogy radioimmunoassay (RIA) mérésekkel magas koncentrációban találtak nociceptint a periaqueductalis szürkeállomány (PAG) dorsalis régiójában, valamint a LC-ban, melyek a „migrén generátorok”-hoz tartoznak (Witta et al. 2004). Örömmel tovább fokozta Ertsey és munkatársainak azon megállapításai, hogy cluster fejfájásban, a cluster periódusban a rohamot követően legalább 3 órával, továbbá az aura nélküli migrénes betegekben a rohammentes időszakban a plazma nociceptin koncentrációja alacsonyabb volt, mint a kontrollban (Ertsey et al. 2004; Ertsey et al. 2005). Ezen eredmények felvetették a trigemino-vascularis neuronok regulációs zavarát az elsődleges fejfájásokban (Ertsey et al. 2005). A későbbiekben azonban a nociceptinnel és a migrénnel kapcsolatos munkák száma nagymértékben lecsökkent. Feltehetően a migrén pathomechanizmusában előtérbe került CGRP és PACAP lehetséges funkcióira utaló elméletek miatt. Én is ezen utóbbi gondolatkörhöz csatlakoztam és kevesebb figyelmet szenteltem a nociceptin szerepére a migrén kórfolyamatában. Ez is oka lehet, hogy kevesebbet foglalkoztam a dolgozatban a nociceptin és a migrén lehetséges kapcsolatával.

Irodalom

Bartsch T., Akerman S., Goadsby P.J. The ORL-1 (NOP1) receptor ligand nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) inhibits neurogenic dural vasodilatation in the rat. *Neuropharmacology* 43:991-998, 2002.

Ertsey C., Hantos M., Bozsik G., Tekes K. Circulating nociceptin levels during the cluster headache period. *Cephalalgia* 24:280-283, 2004.

Ertsey C., Hantos M., Bozsik G., Tekes K. Plasma nociceptin levels are reduced in migraine without aura. *Cephalalgia* 25:261-266, 2005.

Helyes Zs., Németh J., Pintér E., Szolcsányi J. Inhibition by nociceptin of neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals. *British Journal of Pharmacology* 121:613-615, 1997.

Hou M., Uddman R., Tajti J., Edvinsson L. Nociceptin immunoreactivity and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *Brain Res.* 964:179-186, 2003.

Meunier J.C., Mollereau C., Toll L., Suaudeau C., Moisand C., Alvinerie P., Butour J.L., Guillemot J.C., Ferrara P., Monsarrat B. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377:532-535, 1995.

Reinscheid R.K., Nothacker H.P., Bourson A., Ardati A., Henningsen R.A., Bunzow J.R., Grandy D.K., Langen H., Monsma F.J. Jr., Civelli O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270:792-794, 1995.

Witta J., Palkovits M., Rosenberger J., Cox B.M. Distribution of nociceptin/orphanin FQ in adult human brain. *Brain Res.* 997:24-29, 2004.

6. „Lipofukszin” – nem lévén morfológus, megkérdézem, mi ennek a viszonya a lipofuszcinhoz.

Azonos fogalomról van szó. A lipofuscin klasszikus, korhoz kötött, intracelluláris fluorescens pigment, mely elsősorban a szívizomban és a neuronokban jelenik meg (Yin D. 1996). A pigment granulumokról először 1842-ben Hannover számolt be. A „lipofuscin” elnevezést Borst javasolta és először 1912-ben Hueck használta munkájában a melanin pigmentektől való elkülönítéshez (Yin D. 1996). Jelenleg a leggyakrabban használt forma a „lipofuscin”, de találunk példát a „lipofuscin” megnevezésre (Fox K.M. 1987; McInnes E.F. 2012; Rosmini et al. 2016), valamint magyar nyelvű környezetben a „lipofukszin” formára is (Erdei et al. 2012; Szentágothai és Réthelyi 2006).

Irodalom

Erdei Anna, Sármay Gabriella, Prechl József. *Immunológia. Medicina Könyvkiadó Zrt. 2012.*

Fox K.M. *Ischaemic heart disease.* MTP Press Limited, Lancaster, England. pp:58, 1987.

McInnes E.F. *Background lesions in laboratory animals. A Color Atlas.* Saunders Elsevier. pp:114, 2012.

Rosmini S., Bulluck H., Treibel T.A., Abdel-Gadir A., Bhuva A.N., Culotta V., Merghani A., Maestrini V., Herrey A.S., Kellman P., Manisty C. and Moon J. Native myocardial T1 and ECV with age and gender developing normal reference ranges - a 94 healthy volunteer study. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 18(Suppl 1): O42, 2016. doi: 10.1186/1532-429X-18-S1-O42

Szentágothai János, Réthelyi Miklós. *Funkcionális Anatómia* III. p. 188, 2006.

Yin D. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radical Biology & Medicine*. 21:871-888, 1996.

7. A 2. ábrának a 20. oldalon látható A-D része FF, a 21. oldalon az E rész és az ebből kinagyított további 2 rész színes, miért? A megmagyarázott TRIG rövidítést nem találom a képekben.

A 2. ábra a humán ganglion trigeminale-ban végzett immunhisztokémiai vizsgálataink eredményeit példázza. A 20. oldalon lévő fotó (A-D) azért fekete-fehér, mert hagyományos fotókamerával, fekete-fehér film felhasználásával készítettük, míg a 21. oldalon lévő ábrákat digitális kamerával fotóztuk.

A TRIG rövidítést a képeken nem tüntettem fel, csak a címben, mivel mindegyik metszetet a TRIG-ből készítettem. Még egyértelműbbé tehettem volna közlésemet, ha a TRIG megjelölést a fotókon is elhelyezem.

8. 3. ábrán: „A CGRP elsősorban a kicsiny és a közepes méretű neuronokban, míg a CLR és a RAMP1 a nagy méretű neuronokban jelent meg...” – az ábra alapján nekem ez nem látszik egyértelműnek.

A pontatlanul használt jelzővel (nagy, helyesen: nagyobb) okoztam nehézséget a 3. ábra elemzésénél. A mondat helyesen: ...A CLR és a RAMP1 a nagyobb méretű neuronokban jelent meg.... Eredeti közleményünkben megfelelően alkalmaztuk a mondatfűzést „... whereas CLR and RAMP1 immunoreactivity was expressed primarily in larger neurons” (Eftekhari et al. *Neuroscience* 169:683-696, 2010. - 689. oldal, Distribution of CGRP, CLR and RAMP1 c. fejezet). Munkánk megjelenését követően két közleményben immunhisztokémiai vizsgálatokkal elemezték (emberi és patkány szöveteken) a trigemino-vascularis rendszer elemeiben (TRIG, dura mater, TNC) a CGRP, a CLR és a RAMP1 immunpozitív rostok megjelenését és megoszlását. A CGRP immunpozitív rostok velőshüvely nélküli C-rostok voltak. CLR és RAMP1

immunpozitivitást a vastagabb, myelinizált rostok mutattak, A-rost markerrel ko-expressziót adtak (Eftekhari et al. 2011; Eftekhari et al. 2013).

Irodalom

Eftekhari S., Edvinsson L. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its receptor components in human and rat spinal trigeminal nucleus and spinal cord at C1-level. BMC Neurosci. 12:112-131, 2011.

Eftekhari S., Warfvinge K., Blixt F.W., Edvinsson L. Differentiation of nerve fibers storing CGRP and CGRP receptors in the peripheral trigeminovascular system. J. Pain 14:1289-1303, 2013.

9. A 6. ábra talán elhagyható lett volna. A 7. ábrán kétféle nyíl látható, ami nincs megmagyarázva. A 8. ábrán bemutatott eloszlás (nociceptin-IR sejtek mérete) eléggé hasonlít a 6. ábráéhoz. Kár, hogy éppen a CGRP-re nézve nincs analóg ábra. A 9. ábra minősége nekem gyöngének tűnik; esetleg raszterizált kép utólagos „beszkenneléséről” van szó?

Professzor Úrral egyetértek, a 6. ábra elhagyható lett volna.

A 7. ábrán látható két nyíl közül a nagyobbik nyilak a nociceptin immunreaktív sejtestekre mutatnak. A nyílhegyek az autofluorescenciát adó lipofuscin granulumokat jelölik.

A sejtek átmérőjének a mérésekor a láthatóan sejtmaggal rendelkező neuronok esetében a leghosszabb átmérőt meghatározva a Scion Image software felhasználásával végeztük munkánkat. A CGRP-re is analóg ábrát kellett volna megadnom.

Professzor Úrral egyetérve a 9. ábra minősége valóban nem követi a többi ábra minőségét. Az eredeti közleményünk 4. oldalán látható 3. ábra „D” fotójáról van szó (Uddman et al. 2004). A papíralapú publikációnk digitalizálása során csökkent le a kép minősége.

Irodalom

Uddman, R., Tajti, J., Sundler, F., Cardell, L.O. The presence of heme-oxygenase and biliverdin reductase in human cranial ganglia indicates a role for carbon monoxide in neural transmission. Neurol. Endocrinol. Lett. 24:423-428, 2004.

10. 11-12. ábra: nincs pontosan leírva, mi a bal, ill. a jobb képoszlop. 18. ábra: a megmagyarázott rövidítések nem az ábrán, hanem az ábraszövegben találhatók, így az ábraszövegnek mintegy további magyarázó szövege van.

A 11. ábrán a bal oldali sorban lévő képeken (A, B, C) nyilak jelölik az 5-HT_{1B} receptor-immunreaktív neuronokat. Ugyanezen az ábrán a jobb oldali sorban nyilak jelölik az 5-HT_{1B} receptor ko-lokalizációját a CGRP-vel (A), az 5-HT_{1B} receptor ko-lokalizációját az SP-vel (B) és az 5-HT_{1B} receptor ko-lokalizációját a NOS-sal (C).

A 12. ábrán a bal oldali sorban lévő képeken (D, E, F) nyilak jelölik az 5-HT_{1D} receptor-immunreaktív neuronokat. Ugyanezen az ábrán a jobb oldali sorban nyilak jelölik az 5-HT_{1D} receptor ko-lokalizációját a CGRP-vel (D), az 5-HT_{1D} receptor ko-lokalizációját az SP-vel (E) és az 5-HT_{1D} receptor ko-lokalizációját a NOS-sal (F).

A 18. ábrán valóban tetszetősebb lett volna a rövidítéseket az ábrán feltüntetni.

11. 35. old.: „Az előbbi (az α -CGRP) az idegrendszerben, az utóbbi (β -CGRP) a gastrointestinalis traktusban fordul elő.” – Ez a szétválasztás figyelmen kívül hagyja az enterális idegrendszert, amely kb. a gerinvelőéhez hasonló számú neuront tartalmaz. Milyen sejtípusokban mutatható ki a β -CGRP a GIT-ben?

Northern blot és *in situ* hibridizációval végzett vizsgálatok alapján az α - és a β -CGRP isoformok közül csak β -CGRP mRNS-t mutatták ki az enterális neuronokban a myenterialis és a submucosalis plexusban, a vékony- és a vastagbélben (ileum, colon) (Mulder et al. 1988; Sternini and Andreson 1992; Schütz et al. 2004; Chiochetti et al. 2006). Az enterális idegrendszerben az intrinsic primer afferens neuronok (IPANs), melyek CGRP immunpozitivitást mutattak Dogiel II-es típusú morfológiával rendelkeznek. Ezen sejtek nagy kerek vagy ovális neuronok, melyeknek pseudounipolaris vagy elágazó nyúlványaik vannak (Furness et al. 2004). A Dogiel II-es típusú neuronok a myenterialis plexusban és a submucosalis plexusban helyezkednek el (Furness 2000; Furness et al. 2004). Dogiel orosz kutató volt, aki Szentpéterváron dolgozott és elsőként számolt be az enterális neuronok alakjáról és elágazódásairól 1895-ben és 1899-ben (Furness 2006). A spinális hátsó gyöki ganglionokban (DRG), valamint a ganglion nodosa-ban (a n. vagus szenzoros ganglionja) mind az α -CGRP, mind a β -CGRP mRNS jelenlétét kimutatták, bár az utóbbi igen gyenge jelet adott (Sternini and Anderson 1992).

Kiemeljük, hogy az enterális idegrendszerben a CGRP-nek igen jelentős regulációs hatása van. Barthó és munkatársai igazolták, hogy a CGRP a tengerimalacok ileumában a longitudinális izomrelaxációt koncentráció-függő módon befolyásolja (Barthó et al. 1987). Továbbá szerepe van a motilitásban, a szenzoros funkcióban, az intesztinális mikrocirkuláció, szekréció, aminosav felszívódás és a lymphaticus mikrocirkuláció szabályozásában (Chiocchetti el. 2006).

Irodalom

Barthó L., Lembeck F., Holzer P. Calcitonin gene-related peptide is a potent relaxant of intestinal muscle. Eur. J. Pharmacol. 135:449-451, 1987.

Chiocchetti R., Grandis A., Bombardi C., Lucchi M.L., Dal Lago D.T., Bortolami R., Furness J.B. Extrinsic and intrinsic sources of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the lamb ileum: a morphometric and neurochemical investigation. Cell Tissue Res. 323:183-196, 2006.

Furness J.B. Types of neuron in the enteric nervous system. Journal of the Autonomic System 81:87-96, 2000.

Furness J.B. Novel gut afferents: Intrinsic afferent neurons and intestinofugal neurons. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical 125:81-85, 2006.

Furness J.B., Jones C., Nurgali K., Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. Prog. Neurobiol. 72:143-164, 2004.

Mulderry P.K., Ghatei M.A., Spokes R.A., Jones P.M., Pierson A.M., Hamid Q.A., Kanse S., Amara S.G., Burrin J.M., Legon S. Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. Neuroscience 25:195-205, 1988.

Schütz B., Mauer D., Salmon A.M., Changeux J.P., Zimmer A. Analysis of the cellular expression pattern of beta-CGRP in alpha-CGRP-deficient mice. J. Comp. Neurol. 476:32-43, 2004.

Sternini C., Anderson K. Calcitonin gene-related peptide-containing neurons supplying the rat digestive system: differential distribution and expression pattern. Somatosens. Mot. Res. 9:45-59, 1992.

12. A 35 oldalon, ahol Tajti dr. a CGRP-antitestek terápiás karrierjéről beszél – vagy a 36. oldalon, jó lett volna a CGRP-antagonisták klinikai sorsát is röviden vázolni.

A migrén akut kezelésében „gold standardot” jelentő 5-hydroxy-triptamin_{1B/1D} (5-HT_{1B/1D}) -receptor agonista triptánok vazokonstriktációt okozó hatásuk miatt nem

alkalmazhatóak minden migrénes betegben. Különösen azoknál nem ajánlható, akiknek magas a vascularis rizikójuk vagy már volt cardiovascularis megbetegedésük, hypertoniásak, triptán érzékenyek vagy nem reagálnak jól triptánra. Ezek kapcsán került sor - a vascularis mellékhatások elkerülése céljából - a CGRP receptor antagonisták, a „gepantok” kifejlesztésére (Vécsei et al. 2015). Az első „gepant” az olcegepant (BIBN4096BS) volt, mely azonban relatíve nagy molekulásúlya ($M_w=870$) és alacsony orális hasznosulása miatt csak intravénásan került alkalmazásra. Multicentrikus, kettősvak, randomizált klinikai vizsgálat alapján az olcegepant hatékony volt az akut migrénes rohamok kezelésében, azonban az intravénás használat miatt nem terjedt el a széleskörű klinikai gyakorlatban (Olesen et al. 2004).

Az első orálisan alkalmazható „gepant”, a telcagepant (MK-0974) volt, mely placebonál hatékonyabbnak bizonyult, sőt a per os zolmitriptannal (5 mg) hasonló effektivitást mutatott migrénes roham során a fejfájás intenzitásának csökkentésében (Ho et al. 2008/a; Ho et al. 2008/b). Egyéb CGRP receptor antagonisták (MK-3207, MK-1602, BMS-694153, BMS-927711, BI 44370 TA) szintén hatékonynak mutatkoztak a placebohoz képest az akut migrén terápiában (Negro et al. 2012; Vécsei et al. 2015). A közelmúlt kontrollált vizsgálatai szerint a telcagepant a migrén prevenciójában is hatékony vegyület (Ho et al. 2014). A nagy probléma azonban ezen vegyületcsoporttal, hogy gyakori alkalmazás esetén kórosan megnövelik a máj transzaminázok, különösen a gamma-glutamil transzferáz (GGT) szintjét (Tepper and Cleves 2009; Villalón and Olesen 2009; Vécsei et al. 2015). Ez a hepatikus mellékhatás a mai napig gátat vetett a széleskörű klinikai alkalmazásnak.

Irodalom

Ho T.W., Connor K.M., Zhang Y. Randomized controlled trial of the CGRP receptor antagonist telcagepant for migraine prevention. *Neurology* 83:958-966, 2014.

Ho T.W., Ferrari M.D., Dodick D.W., Galet V., Kost J., Fan X., Leibensperger H., Froman S., Assaid C., Lines C., Koppen H., Winner P.K. Efficacy and tolerability of MK-0974 (telcagepant), a new oral antagonist of calcitonin gene-related peptide receptor, compared with zolmitriptan for acute migraine: a randomised, placebo-controlled, parallel-treatment trial. *Lancet* 372:2115-2223, 2008/b.

Ho T.W., Mannix L.K., Fan X., Assaid C., Furtek C., Jones C.J., Lines C.R., Rapoport A.M.; MK-0974 Protocol 004 study group. Randomized controlled trial of an oral CGRP receptor antagonist, MK-0974, in acute treatment of migraine. *Neurology* 70:1304-1312, 2008/a.

Olesen J., Diener H.C., Husstedt I.W., Goadsby P.J., Hall D., Meier U., Pollentier S., Lesko L.M.; BIBN 4096 BS Clinical Proof of Concept Study Group. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N. Engl. J. Med.* 350:1104-1110, 2004.

Negro A., Lionetto L., Simmaco M., Martelletti P. CGRP receptor antagonists: an expanding drug class for acute migraine? *Expert Opin. Investig. Drugs* 21:807-818, 2012.

Tepper S. J., Cleves C. Telcagepant, a calcitonin gene-related peptide antagonist for the treatment of migraine. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10:711–720, 2009.

Vécsei L., Szok D., Csáti A., Tajti J. CGRP antagonists and antibodies for the treatment of migraine. *Expert Opin. Investig. Drugs* 24:31-41, 2015.

Villalón C.M., Olesen J. The role of CGRP in the pathophysiology of migraine and efficacy of CGRP receptor antagonists as acute antimigraine drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 124:309–323, 2009.

13. 37. old.: a VIP és NPY receptorok kimutatása a TRIG-ben (és a receptorok kimutatásával foglalkozó további részek) – ezekkel kapcsolatban ld. Korábbi megjegyzésemet a receptorok jelenlétének korlátozott bizonyító erejét a transzmitter-azonosításban. Különösen érvényes ez az 5. táblázatra, amelyben elegyítve vannak feltüntetve a transzmitterek és receptoraik. Ezt valószínűleg szét kellett volna választani. Más volna a helyzet, ha az ezeken a receptorokon ható exogén ligandumok felhasználásáról volna szó.

A 4. pontnál foglaltam össze a válaszomat.

14. 40. old.: „... a szérummente tápoldat jelentette a környezeti stresszt...” – még meggyőzőbb volna, ha más környezet stresszhatások hasonló hatást fejtettek volna ki. Történtek tájékozódó vizsgálatok ilyen irányban?

Laboratóriumunkban csak szérummentes tápoldattal történtek megfigyelések saját munkáinkban, valamint a korábbi vizsgálatokban is (Kristiansen and Edvinsson 2009; Kuris et al. 2007; Tajti et al. 2011). Az 1990-es évek közepén került felismerésre, hogy a sejt kultúrában a sejtek számára a környezet változása stresszt jelent pl.: ozmotikus sokk (0.5 M szorbitol) vagy ultraibolya besugárzás (60 J/m²). Ezen stresszt okozó stimulusok hatására válaszként stressz-aktiválta protein kinázok válnak aktívvá (pl.: p38, JNK) (Sánchez et al. 1994; Yan et al. 1994).

Irodalom

Kristiansen, K.A., Edvinsson, L. Regulatory effect of inflammation on cytokines in rat trigeminal ganglion. *Cephalalgia* 29:84, 2009.

Kuris, A., Xu, C.B., Zhou, M.F., Tajti, J., Uddman, R., Edvinsson, L. Enhanced expression of CGRP in rat trigeminal ganglion neurons during cell and organ culture. *Brain Res.* 1173:6-133, 2007.

Tajti, J., Kuris A., Vécsei, L., Xu, CB, Edvinsson, L. Organ culture of the trigeminal ganglion induces enhanced expression of calcitonin gene-related peptide via activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2. *Cephalalgia* 31:95-105, 2011.

Sánchez I., Hughes R.T., Mayer B.J., Yee K., Woodgett J.R., Avruch J., Kyriakis J.M., Zon L.I. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* 372(6508):794-798, 1994.

Yan M., Dai T., Deak J.C., Kyriakis J.M., Zon L.I., Woodgett J.R., Templeton D.J. Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature* 372(6508):798-800, 1994.

15. 22. ábra: (A) A CGRP-IR tekintetében két sejtre mutatnak nyilak, de további sejtek mutatnak hasonló fluoreszcenciát. A 2 db csak példa? 23. ábra: a kérdés ugyanez, a RAMP1-IR sejtekkel kapcsolatban, valamint a SP-IR-t mutató 26. ábra kapcsán. A 26-27. ábráknál számomra a több magyarázat lett volna szükséges. A 32. ábra címe nem említi a CGRP-IR-t (oszlopdigrammok). Itt még megkérdezném: az UO126 megmutatott hatása specifikus, vagy ez a gátlószer sokrétű hatásokkal rendelkezik?

A 22. ábrán a nyilak csak két sejtre mutatnak, mintegy példaként a CGRP-immunreaktív neuronokra. A 23. ábrán a RAMP1-immunreaktív sejtekkel, valamint a 26. ábrán az SP-immunreaktív sejtekkel kapcsolatban a helyzet ugyanez. A 26-27. ábráknál valóban csak alapinformációkat adtam meg ábramagyarázatként. A 26. ábránál az SP-immunreaktív neuronok száma nem növekedett az inkubációt követően 24 vagy 48 órával. A satellita glia sejtek nem mutattak SP-immunkreativitást a szervtenyészet folyamán. A 27. ábránál a szövetkultúrába nem vitt, nem inkubált (fresh) TRIG-ben elsősorban a nagyobb méretű neuronokban láttunk RAMP1-immunreaktivitást. Szervkultúra esetén, 24 órás inkubációt követően megnövekedett a RAMP1-immunreaktív neuronok száma a TRIG-ben. CGRP-vel történt ko-lokalizációs vizsgálatainkban megfigyeltük, hogy csak igen csekély számban voltak jelen olyan neuronok, melyek RAMP1-immunreaktivitást mutattak és CGRP-t is tartalmaztak (Tajti et al. 2011).

A 32. ábra címéből valóban kimaradt a „CGRP-immunreaktivitás” kifejezés.

A mitogén-aktivált protein kináz kináz (MAPKK) családnak hét tagja van: MEK1 és 2, MKK3, MKK4, MEK5, MKK6, MKK7.

Az UO126 elsősorban a MEK1-et és 2-t gátolja (Duncia et al. 1998; Favata et al. 1998). Az UO126 csak igen kismértékben gátolja a kináz aktivitását a PKC, a Raf, az Abl, az ERK, a JNK, a MEKK, a MKK3, a SEK1/MKK4, a MKK6, a Cdk2 és a Cdk4 esetében (Favata et al. 1998).

(A rövidítések magyarázata a Rövidítések jegyzékében található).

Irodalom

Duncia J.V., Santella J.B. 3rd, Higley C.A., Pitts W.J., Wityak J., Fietze W.E., Rankin F.W., Sun J.H., Earl R.A., Tabaka A.C., Teleha C.A., Blom K.F., Favata M.F., Manos E.J., Daulerio A.J., Stradley D.A., Horiuchi K., Copeland R.A., Scherle P.A., Trzaskos J.M., Magolda R.L., Trainor G.L., Wexler R.R., Hobbs F.W., Olson R.E. MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:2839-2844, 1998.

Favata M.F., Horiuchi K.Y., Manos E.J., Daulerio A.J., Stradley D.A., Feeser W.S., Van Dyk D.E., Pitts W.J., Earl R.A., Hobbs F., Copeland R.A., Magolda R.L., Scherle P.A., Trzaskos J.M. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 273:18623-18632, 1998.

Tajti J., Kuris A., Vécsei L., Xu C.B., Edvinsson L. Organ culture of the trigeminal ganglion induces enhanced expression of calcitonin gene-related peptide via activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2. *Cephalalgia* 31:95-105, 2011.

16. A 3. táblázat adatai az előző szövegben meg vannak adva, így ettől a táblázattól el lehetett volna tekinteni.

Szigorúan véve a 3. táblázatot valóban el lehetett volna hagyni. A gyors és egyszerű áttekinthetőség miatt helyeztem el az 50. oldalon.

17. 65. old.: „A VIP hatását G-proteinhez kötött...” – ez általában jellemző a neuropeptid-receptorokra; föl lehetett volna tüntetni, mely G-proteinekről van szó. „... emelkedett VIP koncentrációt találtak...” – nincs leírva, hol.

A G-proteinhez kapcsolt receptorok (GPCRs) az egyik legnagyobb családot képezik az emlősök genomjában (Lander et al. 2001; Fredriksson et al. 2003). Kezdetben A, B, C, D, E és F betűvel jelölt osztályozást alkalmaztak, az alosztályokat pedig római számokkal tüntették fel (Attwood and Findlay 1994; Kolakowski 1994). A jelenleg használt beosztás

a humán genom phylogenetikai analízisén alapul és öt fő családot különböztet meg, glutamat, rhodopsin, adhesion, frizzled/taste2 és secretin. Ezt nevezik a kezdőbetűkön alapulva GRAFS klasszifikációnak is (Fredriksson et al. 2003). A VIP a secretin receptor családba (korábban: B osztály) tartozó VPAC1, VPAC2 és PAC1 receptorhoz kötődik (legkevésbé a PAC1 receptorhoz) (Fredriksson et al. 2003; White et al. 2010). A secretin család receptorai hosszú N-terminálissal rendelkeznek, melyet cystein-hidak stabilizálnak. Az N-terminális lényeges a ligand kötésében (Schiöth and Fredriksson 2005).

A 65. oldalon „Klinikai vizsgálatok szerint emelkedett VIP koncentrációt mértek mind a krónikus, mind az epizódikus migrénes betegekben fejfájásmentes periódusban a kontrollhoz képest” az antecubitalisan gyűjtött vénás vérben, a serumban ELISA módszerrel (Cernuda-Morollon et al. 2014).

Irodalom

Attwood T.K. and Findlay J.B. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng.* 7:195-203, 1994.

Cernuda-Morollon, E., Martinez-Camblor, P., Ramon, C., Larrosa, D., Serrano-Pertierra, E., Pascual, J. CGRP and VIP levels as predictors of efficacy of Onabotulinumtoxin type A in chronic migraine. *Headache* 54:987-995, 2014.

Fredriksson R., Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63:1256-1272, 2003.

Kolakowski L.F. Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2:1-7, 1994.

Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W. The International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature (Lond)* 409: 860–921, 2001.

Schiöth H.B., Fredriksson R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142:94-101, 2005.

White C.M., Ji S., Cai H., Maudsley S., Martin B. Therapeutic potential of vasoactive intestinal peptide and its receptors in neurological disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9:661-666, 2010.

18. 46. ábra: *nem lévén morfológus, nem egyértelmű számomra, hogy a jelölt képletek mindhárom esetben rostok. A 73. oldalon a szövegben egyszer a CGRP neuronális izgató hatásáról van szó, majd alatta, átmenet nélkül, Meng 2009-es adatára hivatkozva ugyenezen peptid gátló hatásáról olvashatunk az átkapcsoló másodlagos agytörzsi neuronokban. Kaphatunk magyarázatot?*

Elfogadva Professzor Úr véleményét, valóban nagyobb nagyítással egyértelműbbé tudtam volna tenni állításomat, miszerint a 46. ábránál a jelölt képletek idegrostok.

A 73. oldalon sajnos a végső javításom során a mondatból 4 szó kimaradt. Helyesen a mondat így szól: „Bizonyítást nyert, hogy a kapszaicin által kiváltott, és így felszabadított CGRP, valamint a közvetlenül a szövetfürdőbe helyezett CGRP AKTIVÁLTA, míg A CGRP ANTAGONISTA (CGRP8-37) megszüntette az átkapcsoló másodlagos neuronok excitabilitását az agytörzsi szeletekben a TNC-ben” (Meng et al. 2009).

Irodalom

Meng J., Ovsepian S.V., Wang J., Pickering M., Sasse A., Aoki K.R., Lawrence G.W., Dolly J.O. Activation of TRPV1 mediates calcitonin gene-related peptide release, which excites trigeminal sensory neurons and is attenuated by a retargeted botulinum toxin with anti-nociceptive potential. J. Neurosci. 29:4981-4992, 2009.

19. 80. old.: *Bizonyos ellentmondás mutatkozik Palkovits és mtsai (1995) idézett adata és a Szerző és mtsai eredményei közt, ami több magyarázatot tett volna szükségessé. 83. old.: a kúszó depolarizáció / kúszó depresszió leírásából az utóbbi hatás mechanizmusa kevésbé van megmagyarázva.*

A humán „migrén-generátorok” immunhisztokémiai feltérképezésekor ismert volt számomra Palkovits és munkatársainak radioimmunoassay (RIA) felhasználásával végzett PACAP-pal kapcsolatos közlése (Palkovits et al. 1995). Palkovits Professzor Úrék nagy koncentrációjú PACAP jelenlétét mutatták ki a periaqueductalis szürkeállományban (PAG) és a LC-ben. Immunhisztokémiai vizsgálatainkkal az LC-ben a neuronok nagy százaléka PACAP immunreaktivitást mutatott, ugyanakkor a PAG-ban kevés PACAP immunreaktív rostot figyeltünk meg.

Megjegyezzük, hogy munkánk során nem a PACAP mennyiségét határoztuk meg, csak a strukturális előfordulására voltunk kíváncsiak.

A látórendszer fiziológiájával foglalkozó kutató Lashley volt az első, aki 1941-ben saját vizuális aura terjedésének a lerajzolásával felvetette a látókérgen átvonuló folyamat

sebességét (3 mm/min) (Lashley 1941). Aristides Leao 1944-ben írta le az agykérgi kúszó depolarizáció jelenségét. Kísérletesen kiváltott epilepszia terjedését vizsgálta, mely során elektrokortikogrammon az agyi elektromos aktivitás tovaterjedő időleges megszűnését észlelte. Ezt a jelenséget elnevezte „cortical spreading depression”-nak (CSD). A hazai szakirodalomban az agykérgi kúszó depresszió/depolarizáció kifejezés terjedt el.

Az agykérgi kúszó depolarizáció (spreading depolarisation) a kortexen tovaterjedő depolarizációs hullám, melyet a neuronok duzzadása, a dendrittüskék torzulása, a lassú elektromos potenciál (slow electrical potential) változása, az agyi elektromos aktivitás csendje (kúszó depresszió, spreading depression), valamint a cerebrális vérátáramlás eltérései kísérnek (Leao 1944; Tfelt-Hansen 2010; Dreier 2011; Lauritzen et al. 2011). A kúszó depresszió következménye vagy epifenoménje a kúszó depolarizációnak. A kúszó depresszió a depolarizációt követően jelenik meg és azzal együtt propagálódik. A kúszó depresszió csak akkor jön létre, ha az energia-státusz és a metabolizmus intakt a kúszó depolarizáció bekövetkeztéig (Dreier 2011). Feltételezések szerint a kúszó depolarizáció iniciálja a kúszó depressziót, ugyanakkor más mechanizmusokat is feltételeznek, mint az intracelluláris cink és kalcium akkumuláció, az extracelluláris adenzin felhalmozódás és a Na/K-ATPase aktiváció (Lindquist and Shuttleworth 2012; Carter et al. 2013; Ayata and Lauritzen 2015; Dreier and Reiffurth 2015; Dreier et al. 2016). A kúszó depresszió patofiziológiailag a migrénes aura tüneteivel korrelál (Leao and Morison 1945; Tfelt-Hansen 2010; Lauritzen et al. 2011). Az aurával járó migrénes betegekben fizikai aktivitás által kiváltott aura során készült funkcionális MRI (fMRI) vizsgálatok BOLD szignál változást tártak fel az occipitalis lebenyben (Hadjikhani et al. 2001). Egyrészt a vizuális kortexben (calcarina) a BOLD szignál változások posterior irányból anterior felé terjedtek, másrészt a BOLD változásokból arra következtettek, hogy először néhány percen át tartó vérátáramlás emelkedés jött létre. Ezt követően azonban hosszantartó vérátáramlás csökkenés alakult ki. Tehát a kezdeti hyperaemiát egy elnyújtott hypoperfúzió követte (Hadjikhani et al. 2001). A CSD transcallosalis terjedését a homológ ellenoldali régiókra állatkísérletekben felvetették (Leao 1944; Woods et al. 1994). Spontán migrénes rohamban PET ($H_2^{15}O$) vizsgálattal bilaterális tovaterjedő cerebrális hypoperfúziót igazoltak. A kétoldali vérátáramlás csökkenés az occipitalis lebenyben kezdődött, majd anterior irányba terjedt a temporalis és a parietalis lebenyekre. A hypoperfusio megkímélte a cerebellumot, a basalis ganglionokat és a thalamust (Woods et al. 1994).

Irodalom

Ayata C., Lauritzen M. Spreading depression, spreading depolarizations, and the cerebral vasculature. *Physiol. Rev.* 95:953-993, 2015.

Carter R.E., Seidel J.L., Lindquist B.E., Sheline C.T., Shuttleworth C.W. Intracellular Zn²⁺ accumulation enhances suppression of synaptic activity following spreading depolarization. *J. Neurochem.* 125:673-684, 2013.

Dreier J.P. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat. Med.* 17:439-447, 2011.

Dreier J.P., Fabricius M., Ayata C. et al. Recording, analysis, and interpretation of spreading depolarizations in neurointensive care: Review and recommendations of the COSBID research group. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* DOI: 10.1177/0271678X16654496, 2016.

Dreier J.P., Reiffurth C. The stroke-migraine depolarization continuum. *Neuron* 86:902-922, 2015.

Hadjikhani N., Sanchez Del Rio M., Wu O., Schwartz D., Bakker D., Fischl B., Kwong K.K., Cutrer F.M., Rosen B.R., Tootell R.B., Sorensen A.G., Moskowitz M.A. Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:4687-4692, 2001.

Lashley K.S. Patterns of cerebral integration indicated by the scotoma of migraine. *Arch. Neurol. Psych.* 42:259-264, 1941.

Lauritzen M., Dreier J.P., Fabricius M., Hartings J.A., Graf R., Strong A.J. Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31:17-35, 2011.

Leao A.A.P. Spreading depression of activity in cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 7:359-390, 1944.

Leao A.A.P., Morison R.S. Propagation of spreading cortical depression. *J. Neurophysiol.* 8:33-45, 1945.

Lindquist B.E., Shuttleworth C.W. Adenosine receptor activation is responsible for prolonged depression of synaptic transmission after spreading depolarization in brain slices. *Neuroscience* 223:365-376, 2012.

Palkovits M., Somogyvári-Vígh A., Arimura A. Concentrations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in human brain nuclei. *Brain Res.* 699:116-120, 1995.

Tfelt-Hansen P.C. History of migraine with aura and cortical spreading depression from 1941 and onwards. *Cephalalgia* 30:780-792, 2010.

Woods R.P., Iacoboni M., Mazziotta J.C. Brief report: bilateral spreading cerebral hypoperfusion during spontaneous migraine headache. N. Engl. J. Med. 331:1689-1692, 1994.

20. *A 8. táblázatban a szignifikáns különbségek nincsenek feltüntetve. A változások azonos irányúak aurás és aura nélküli migrénben. Eszerint a talált adatok mindkét esetben a rohammal magával állnak összefüggésben? Az 54. ábra nem jó minőségű, és valószínűleg fölösleges is.*

A 8. táblázatnál a „p” érték feltüntetése sajnos lemaradt. Ezen adatokra vonatkozó számításaink alapján: $p < 0.05$. A „p” értéket az eredeti közleményben a 645. oldalon adtuk meg (Rajda et al. 1999). Az aurával járó és az aura nélküli migréneselek csoportja között az aminosav koncentrációban nem volt szignifikáns különbség. Ez arra utal, hogy adataink mindkét esetben a migrénnel, mint betegséggel állnak összefüggésben.

Az 54. ábrával kapcsolatban Professzor Úr megjegyzését elfogadom. Az ábra nem jó minőségű és fölösleges.

Irodalom

Rajda C., Tajti J., Komoróczy R., Seres E., Klivényi P., Vécsei L. Amino acids in the saliva of migraine patients. Headache 39:644-649, 1999.

21. *A 87. oldalon tromboxán A_2 helyett csak tromboxán, az 5-lipoxigenáz helyett csak lipoxigenáz szerepel, bár később a teljes név is előfordul. Az 57. ábra egy 2015-ös szövegben valószínűleg nem állja meg a helyét. A címe: „Arachidonsav kaszkád” –; elvárható lett volna, hogy a (szövegben egyébként említett) leukotriének, továbbá esetleg a rezolvinok, endocannabinoidok, prostanoidok is feltüntetésre kerüljenek. Enélkül legfőljebb a kaszkád egyes kiemelt elemeiről beszélhetünk. A 3.8.3. pontban a Szerző nem említi, vajon aurával járó vagy nem járó migrénről van szó. Továbbá igen érdekes lett volna (miként a 3.7.4. pontnál is), mi történik a vizsgált paraméterekkel roham alatt (és/vagy közvetlenül utána). Ha jól látom, a vérlemezke-aggregációt e részben nem mérték a Jelölt és mutsai, csak logikai úton következtetnek a lehetsége változásra.*

Professzor Úr véleményét elfogadom. Az „Arachidonsav kaszkád” c. ábránál (57. ábra), elsősorban az általunk vizsgált komponenseket tüntettük fel. Teljesebb lett volna a kép, ha a 87. oldalon ismertetett leukotriéneket a lipoxigenáz útnál az ábrán is megadjuk.

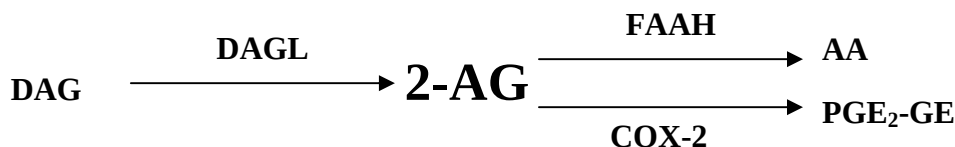
Az endocannabinoidok közé tartozik az anandamid (arachnodil-etanolamid, AEA) és a 2-arachnodil-glicerin (2-AG). Az AEA biokémiai prekursora az N-acil-foszfátidil etanolamin (NAPE). A NAPE-t a NAPE-specifikus foszfolipáz D hidrolizálja és így

keletkezik az AEA. Az AEA-t a zsírsavamid-hidroláz (FAAH) arachidonsavvá (AA), a cyclo-oxigenáz-2 (COX-2) pedig prosztamiddá (prostaglandinE₂-etanolamid, PGE₂-EA) metabolizálja (Nicolaou et al. 2014).



A 2-AG keletkezésének és lebontásának lépései:

A prekursor diacil-glicerinből (diglicerid, DAG) a diacil-glicerin-lipáz készíti a 2-AG-t. Lebontásában részben a FAAH vesz részt, és arachidonsavra, a COX-2 pedig PGE₂ glicerin-észterre (PGE₂-GE) bontja (Nicolaou et al. 2014).



A resolvinok a pro-resolvin mediátorok (SPMs) egyik tagja (resolvinok, lipoxinok, protectinek és maresinek). Az omega-3 többszörösen telítetlen zsírsavból (n-3 PUFA) az eikozapenaénsavból (EPA) és a dokozaheksaénsavból (DHA) keletkeznek és anti-inflammációs tulajdonságúak (Serhan 2014; Serhan and Petasis 2011; Levy and Serhan 2014; Weylandt et al. 2007; Hong et al. 2003; Arita et al. 2005).

Az omega-6, arachidonsav lipoxin útvonal termékei (lipoxin A4-LXA4, 15-epi-LXA4, 15-epi-LXB4) szintén anti-inflammációs tulajdonságúak (Weylandt et al. 2007).

Az első prosztamid, amit felfedeztek a PGE₂-etanolamid (PGE₂-EA) volt, ami az anandamidból COX-2 hatására képződött (Woodward et al. 2008; Yu et al. 1997). Ezt követően ismerték fel a prosztamid D₂, prosztamid E₂ és prosztamid F_{2α} formákat (Woodward et al. 2008; Woodward et al. 2013).

A 3.8.3. ponthoz tartozó „Anyag és módszer” fejezetben (5.1.1.2.2. Vérlemezkek nyerése) tüntettem fel, hogy aurával járó és aura nélküli migrénes nőbetegektől gyűjtöttünk vénás vért. Itt számoltam be arról is, hogy az anyagvétel a fájdalommentes időszakban történt és legalább 10 nap telt el az utolsó migrénes rohamtól a vérvételig. Professzor Úrral egyetértve, jövőbeni feladatomban tekintem roham alatti időszakból származó mintákon is elvégezni a vizsgálatokat. Vérlemezke-aggregációt nem mértünk ezen tanulmányunk során. Eredményeinkből (migrénes betegek vérlemezkeiben kisebb mennyiségű thrombocytá aggregációgátló cyclooxygenáz termék PGD₂, PGI₂, 12-HHT

keletkezett, mint a kontrollban; a TxA₂ mennyisége viszont nem mutatott jelentős eltérést) csak következtettünk a vérlemezke-aggregációval kapcsolatos lehetséges változásokra. Megjegyezzük, hogy más munkánkban mértük a vérlemezke aggregációt migrénés betegekben és erről tudományos fórumon számoltunk be (Tajti J., Somogyi I., Bereczki Cs., Túri S. Platelet aggregability and migraine. National Meeting of the Hungarian Chapter of IASP, Budapest, 1992).

Irodalom

Arita M., Yoshida M., Hong S. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protect against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 7671-7676, 2005.

Hong S., Gronert K., Devchand P.R. Novel docosatrienes and 17S-reolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J. Biol. Chem.* 278:14677-14687, 2003.

Levy B.D., Serhan C.N. Resolution of acute inflammation in the lung. *Annu. Rev. Physiol.* 76:467-492, 2014.

Serhan C.N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510:92-101, 2014.

Nicolaou A., Mauro C., Urquhart P., Marelli-Berg F. Polyunsaturated fatty acid-derived lipid mediators and T cell function. *Frontiers in Immunology* 5:1-15, 2014.

Serhan C.N., Petasis N.A. Resolvins and protectins in inflammation-resolution. *Chem. Rev.* 111:5922-5943, 2011.

Yu M., Ives D., Ramesha C.S. Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 272: 21181–21186, 1997.

Weylandt K., Kang J.X., Wiedenmann B., Baumgart D.C. Lipoxins and resolvins in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 13:797-799, 2007.

Woodward D.F., Liang Y., Krauss A.H. Prostaglandin-ethanolamides and their pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* 153:410-419, 2008.

Woodward D.F., Wang J.W., Poloso N.J. Recent progress in prostaglandin F2 α ethanolamide (prostamide F2 α) research and therapeutics. *Pharmacol. Rev.* 65:1135-1147, 2013.

22. 3.10. pont: Jobban ki lehetett volna emelni, milyen fokban hasonlítanak a vizsgálat paraméterek patkányban a humán eredményekhez – minél inkább, annál valószínűbb, hogy az eredmények emberre is vonatkozhatnak. A TRIG ingerlés paraméterei: 10Hz, 1mA, 30 perc. Ez az optimum? Vizsgáltak más frekvenciákat is? A nitroglicerinnel kapcsolatban: bár föltehető, itt nincs bizonyítva a szer aktiváló hatása a trigeminovaskuláris rendszerre. A 59. ábra is viszonylag, kis emelkedéseket ábrázol a vena cava superiorban.

Összehasonlítás esetén két nehézség adódik. Az egyik abból fakad, hogy állatkísérletben nem tudtunk interiktális csoportot produkálni, talán az álingerelt (sham) csoportot feleltethetjük meg interiktálisnak. A másik gondot az okozza, hogy az élő betegek agyszövetére vonatkozóan nem állt rendelkezésünkre olyan technika mellyel a PACAP-38 koncentráció változást nyomonkövethettük volna.

Professzor Úr javaslatát követve, adatainkat elemezve a következőket állapíthatjuk meg. A plazmában létrejött változások:

Migrénes betegekben, az önkontrollos vizsgálatok során az interiktális és iktális szakasz között megközelítően 18%-os (18.11%) emelkedést tapasztaltunk a plazma PACAP-38 változásában. Állatkísérleteinkben elektromos TRIG ingerlést követően az álingerlést véve alapul, az ingerlés után 90 perccel 35%-os, az ingerlés után 180 perccel 20%-os plazma PACAP-38 koncentráció növekedést figyeltünk meg.

NTG adására állatkísérleteinkben a plazmában nem láttunk szignifikáns változást.

A TNC-ben létrejött változások:

NTG adására a TNC-ben megközelítően 35%-os (34.78%) PACAP-38 koncentráció növekedést tapasztaltunk.

Elektromos TRIG ingerlést követően az álingerléshez viszonyítva 70%-os, míg az intakt kontrollhoz képest 80%-os PACAP-38 koncentráció emelkedést láttunk.

Részletesen:

Humán eredmények:

21 alanyt tekintve: interiktális 23,74 fmol/ml-ről emelkedett 28,04 fmol/ml-re.

Itt a 40 kontroll alany PACAP értéke: 26,54 fmol/ml volt.

Állatkísérletes eredmények:

NTG modell:

plazma: nincs szignifikáns változás

TNC: 4,6-ről 6,2 fmol/mg-ra emelkedik a PACAP-38 szint az NTG hatására.

Elektromos ingerlés-TRIG modell:

plazma: intakt értéke: 18 fmol/ml

ingerlés után 30 perccel: 22 fmol/ml

ingerlés után 90 perccel: 27 fmol/ml

ingerlés után 180 perccel: 24 fmol/ml

álingerlés után minden időpillanatban 20 fmol/ml körüli értéken mozog

TNC:

Intakt: 4,7-ről emelkedik 8,5 fmol/mg-ra a PACAP szint.

Álingerlés: 5 fmol/mg az érték.

Moskowitz munkacsoportjából Gabriella Buzzi 1991-ben közölte, mint lehetséges migrén modellt, a TRIG elektromos stimulációját (Buzzi et al. 1991). Vizsgálatunkig 6 közleményben adtunk számot a TRIG elektromos ingerléséről, különböző paraméterek mellett:

Knyihár-Csillik et al. 1995: négyszög impulzus, 5 Hz, 5 ms, 0.1-1.0 mA, 5-30 min.

Knyihár-Csillik et al. 1997: négyszög impulzus, 5 Hz, 5 ms, 0.5 mA, 30 min.

Knyihár-Csillik et al. 1998: négyszög impulzus, 5 Hz, 5 ms, 0.5 mA, 30 min.

Knyihár-Csillik et al. 2000: négyszög impluzus, 5 Hz, 5 ms, 0.1-1.0 mA, 30 min.

Knyihár-Csillik et al. 2004: négyszög impulzus, 5 Hz, 5 ms, 0.1-1.0 mA, 60 min.

Knyihár-Csillik et al. 2007: négyszög impulzus, 5 Hz, 5 ms, 0.1-1.0 mA, 30 min.

Ezen munkák elemzését követően választottuk a használt paramétereket: 10 Hz, 1 mA, 30 perc. Ez feltehetően nem az optimum, hanem egy nagyon masszív stimuláció.

A NTG, mint NO donor által kiváltott C-fos megjelenés a másodlagos érző neuronokban (a TNC-ben), azok aktivitását jelzi (Tassorelli et al. 2005; Knyihár-Csillik et al. 2008). Munkánk során NTG adására a plazmában nem tapasztaltunk szignifikáns PACAP koncentrációváltozást (eredeti közleményben: Tuka et al. 2012. 1. ábra, 390. oldal). Ugyanakkor a TNC-ben a PACAP koncentráció szignifikánsan megemelkedett (59. ábra). A TRIG-ben és a gerincvelő C3-C4 régióban ezt nem tapasztaltuk (eredeti közlemény: Tuka et al. 2012. 2. ábra, 310. oldal). Ezért véltük úgy, hogy az NTG stimulálja a trigemino-vascularis rendszert. Az NO aurás és aura nélküli migrénes betegekben migrénes fejfájást produkál, de nem vált ki agykérgi kúszó depolarizációt állatokban, nem vált ki aura tünetet migréneseekben és nem okoz migrénes fejfájást egészséges egyéneknél (Afridi et al. 2004; Dreier and Reiffurth 2015). Az 59. ábrán az

NTG adását követően a TNC-ben keletkezett PACAP koncentrációnövekedést igyekeztem bemutatni, melyet statisztikailag szignifikáns volt.

Irodalom

Afridi S.K., Kaube H., Goadsby P.J. Glyceryl trinitrate triggers premonitory symptoms in migraineurs. *Pain* 110:675-680, 2004.

Buzzi M.G., Carter W.B., Shimizu T., Heath H., Moskowitz M.A. Dihydroergotamine and sumatriptan attenuate levels of CGRP in plasma in rat superior sagittal sinus during electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Neuropharmacology* 30:1193-200, 1991.

Dreier J.P., Reiffurth C. The stroke-migraine depolarization continuum. *Neuron* 86:902-922, 2015.

Knyihár-Csillik E., Chadaide Z., Okuno E., Krisztin-Péva B., Toldi J., Varga C., Molnár A., Csillik B., Vécsei L. Kynurenine aminotransferase in the supratentorial dura mater of the rat: effect of stimulation of the trigeminal ganglion. *Exp. Neurol.* 186:242-247, 2004.

Knyihár-Csillik E., Mihály A., Krisztin-Péva B., Robotka H., Szatmari I., Fulop F., Toldi J., Csillik B., Vécsei L. The kynurenate analog SZR-72 prevents the nitroglycerol-induced increase of c-fos immunoreactivity in the rat caudal trigeminal nucleus: comparative studies of the effects of SZR-72 and kynurenic acid. *Neurosci. Res.* 61:429-432, 2008.

Knyihár-Csillik E., Tajti J., Csillik A.E., Chadaide Z., Mihály A., Vécsei L. Effects of eletriptan on the peptidergic innervation of the cerebral dura mater and trigeminal ganglion, and on the expression of c-fos and c-jun in the trigeminal complex of the rat in an experimental migraine model. *Eur. J. Neurosci.* 12:3991-4002, 2000.

Knyihár-Csillik E., Tajti J., Mohtasham S., Sari G., Vécsei L. Electrical stimulation of the Gasserian ganglion induces structural alterations of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive perivascular sensory nerve terminals in the rat cerebral dura mater: a possible model of migraine headache. *Neurosci. Lett.* 184:189-192, 1995.

Knyihár-Csillik E., Tajti J., Samsam M., Sárosi G., Buzás P., Vécsei L. Depletion of calcitonin gene-related peptide from the caudal trigeminal nucleus of the rat after electrical stimulation of the Gasserian ganglion. *Exp. Brain Res.* 118:111-114, 1998.

Knyihár-Csillik E., Tajti J., Samsam M., Sárosi G., Slezák S., Vécsei L. Effect of a serotonin agonist (sumatriptan) on the peptidergic innervation of the rat cerebral dura mater and on the expression of c-fos in the caudal trigeminal nucleus in an experimental migraine model. *J. Neurosci. Res.* 48:449-464, 1997.

Knyihár-Csillik E., Toldi J., Krisztin-Péva B., Chadaide Z., Németh H., Fenyő R., Vécsei L. Prevention of electrical stimulation-induced increase of c-fos immunoreaction in the caudal trigeminal nucleus by kynurenine combined with probenecid. *Neurosci. Lett.* 418:122-126, 2007.

Tassorelli C., Greco R., Morazzoni P., Riva A., Sandrini G., Nappi G. Parthenolide is the component of tanacetum parthenium that inhibits nitroglycerin-induced Fos activation: studies in an animal model of migraine. *Cephalalgia* 25:612-621, 2005.

Tuka, B., Helyes, Zs., Markovics, A., Bagoly, T., Németh, J., Márk, L., Brubel, R., Reglődi, D., Párdutz, Á., Szolcsányi, J., Vécsei, L., Tajti, J. Peripheral and central alterations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-like immunoreactivity in the rat in response to activation of the trigeminovascular system. *Peptides* 33:307-316, 2012.

23. 3.10.4. „... a trigemino-vascularis rendszer ... aktivációja során a PACAP-27/38 koncentrációja specifikusan emelkedett...” – mit jelent a határozó? Más agyrészek vizsgálatát nem látom, csak a TNC (trig. Caud. Magcsopopot). Lejjebb: „... migrénes roham magyarázatát adta...” – inkább összhangban volt vele.

A specifikusan emelkedett kifejezéssel arra utaltam, hogy csak a TNC-ben találtunk PACAP koncentrációemelkedést, mind a kémiai, mind az elektromos ingerlést követően. A TRIG-ben és a gerincvelői C3-C4 régióban nem volt PACAP koncentrációváltozás (eredeti közlemény: Tuka et al. 2012. 2. ábra, 310. oldal és 4. ábra, 312. oldal).

A „migrénes roham magyarázatát adta” megfogalmazás helyett mértéktartóbb lett volna az „összhangban volt” kifejezés:

„A Schytz-féle munkacsoport koppenhágai eredményeinek lényegét, azaz a migrénes betegekben a PACAP iv. hatását követően késleltetetten kialakult aura nélküli migrénes rohammal összhangban volt, az általunk a trigemino-vascularis rendszer aktivációja során a TNC-ban tapasztalt PACAP koncentrációnövekedés”.

24. 3.11. Kár, hogy a peptidszintek vizsgálata csak rohammentes periódusban történt. Talán nagyobb különbségek adódtak volna roham alatt, ill. közvetlenül utána. A migrénes betegeknek iv. adott VIP, ill. PACAP hatáskülönbségét (Rahmann és mtsai 2008; Schytz és mtsai, 2009) eltérő receptorok bevonásával magyarázza Tajti dr. (és talán a fenti szerzők is). A latenciát figyelembe véve nem lehetséges-e, hogy a kép peptid lebomlása során keletkező eltérő fragmenumok rendelkeznek különböző hatásokkal?

A 3.11. fejezetben a migrénes betegekben a PACAP-38 koncentrációt meghatároztuk a vérplazmában roham alatt és rohammentes időszakban is. Statisztikailag szignifikánsan emelkedett PACAP-38 koncentrációt mértünk a migrénes roham során.

A PACAP-ot és a VIP-et a dipeptidyl peptidáz IV (DPP/CD₂₆) bontja (Lambeir et al. 2011; Zhu et al. 2003, Vaudry et al. 2009; Jungraithmayr et al. 2010). A DPP IV azonos

a T-sejt felszíni glycoprotein CD₂₆-tal (II-es típusú transmembran molekula) (De Meester 1999). Konstitucionális a T-sejteken, de az aktivált B-sejteken, az epithelialis és az endothelialis sejteken és a fibroblastokon is megtalálható (Buljevic et al. 2013). Solubilis formában a humán plazmában is kimutatták (Gorrell et al. 2001; Lambeir et al. 2001). Az enzim a hasítást az N-terminálison kezdi (Green et al. 2006). Dipeptidek formájában két lépésben történik a vágás. Először a szerin (Ser) mögött mind a VIP, mind a PACAP₂₇ és a PACAP₃₈ esetében (VIP₃₋₂₇, PACAP₃₋₂₇, PACAP₃₋₃₈). Ezt követően a csonkítás a VIP esetében az alanin után (VIP₅₋₂₇), illetve a glycine mögött következik be (PACAP₅₋₂₇, PACAP₅₋₃₈). A degradációt követően létrejött metabolitok elveszítik az anyavegyület jellegzetes hatását. Megfigyelések szerint a PACAP₍₁₋₂₇₎-nek koncentrációtól függően inzulin-szekréciót fokozó hatása van. A PACAP₍₁₋₂₇₎-ből a DPP IV hatására létrejött PACAP₍₃₋₂₇₎ és PACAP₍₅₋₂₇₎ nem hatnak az inzulin-szekrécióra (Green et al. 2006). Ezért lényeges felvetés és kérdés, hogy migrénben miként hatnak a degradátumok, hiszen a PACAP₍₁₋₃₈₎-nak a féleletideje 2-10 perc között van (Zhu et al. 2003; Li et al. 2007; Bourgaud et al. 2008). A PACAP a PAC1 receptor agonistája. A PACAP metabolizációja során a DPP IV az N-terminálisról dipeptidet hasít (Zhu et al. 2003). Ugyanakkor az N-terminális részt vesz a PAC1 receptor aktiválásában (Gourlet et al. 1991; Robberecht et al. 1992). Az N-terminális megrövidítésével létrejött metabolitok a PACAP₍₃₋₃₈₎ és a PACAP₍₅₋₃₈₎ már új farmakológiai hatással rendelkeznek, PAC1 receptor antagonisták (Robberecht et al. 1992). Érdekes megfigyelés volt, hogy humán neuroblastoma NB-OK-1 sejtmembránon a PACAP₍₃₋₂₇₎, ₍₃₋₃₈₎, ₍₄₋₂₇₎, ₍₄₋₃₈₎, ₍₅₋₂₇₎, ₍₅₋₃₈₎, ₍₆₋₂₇₎, ₍₆₋₃₈₎, ₍₇₋₂₇₎, ₍₇₋₃₈₎, ₍₈₋₂₇₎, ₍₈₋₃₈₎, ₍₉₋₂₇₎, ₍₉₋₃₈₎ antagonistaként fejtik ki hatásukat (a legerőteljesebb antagonisták a PACAP₍₆₋₃₈₎). Ugyanakkor a rövidebb formák agonista hatást mutatnak: PACAP₍₁₀₋₂₇₎, ₍₁₀₋₃₈₎, ₍₁₁₋₂₇₎, ₍₁₁₋₃₈₎, ₍₁₂₋₂₇₎, ₍₁₂₋₃₈₎, ₍₁₃₋₂₇₎, ₍₁₃₋₃₈₎, ₍₁₄₋₂₇₎, ₍₁₄₋₃₈₎ (Vandermeers et al. 1992).

A feltett kérdés korrekt megválaszolására, a fenti tények ismeretében új, a metabolitokra fókuszáló vizsgálatokat kell indítani migrénben. Kiemelendő, hogy a PAC1 receptorra ható szuperagonistákat, melyek ellenállnak a DPP IV-nek (az N-terminális módosításával) már sikerült létrehozni (acetyl-[Ala¹⁵, Ala²⁰]PACAP₃₈-propylamid) és (acetyl-PACAP₂₇-propylamid), bár még nem szelektívek, mert a VPAC1 és a VPAC2 receptorra is hatnak iv. adást követően. A kérdés másik oldala a DPP IV szerepére irányul. Rheumatoid arthritisben szenvedő betegek synovialis folyadékában emelkedett VIP koncentrációt mértek, míg ugyanitt és a szérumban csökkent DPP IV koncentrációt és aktivitást tapasztaltak (Buljevic et al. 2013). Továbbá a DPP IV enzim

aktivitását gátló AB192 adásának következtében egér tüdő transzplantációs modellben a makrofágokban megnövekedett VIP immunreaktivitást, valamint emelkedett VIP mRNS expressziót figyeltek meg (Jungraithmayr et al. 2010). Ezért a metabolitok mellett az enzimet is vizsgálni kell a komplex válasz igényeként.

Irodalom

Bourgault S., Vaudry D., Botia B., Couvineau A., Laburthe M., Vaudry H., Fournier A. Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* 29:919-932, 2008.

Buljevic S., Detel D., Pucar L.B., Mihelic R., Madarevic T., Sestan B., Varljen J. Levels of dipeptidyl peptidase IV/CD26 substrates neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol. Int.* 33:2867-2874, 2013.

De Meester I., Korom S., Van Damme J., Scharpe S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunology Today* 20:367–375, 1999.

Green B.D., Irwin N., Flatt P.R. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP): assessment of dipeptidyl peptidase IV degradation, insulin-releasing activity and antidiabetic potential. *Peptides* 27:1349-1358, 2006.

Gorrell M.D., Gysbers V., McCaughan G.W. (2001) CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 54:249-264, 2001.

Gourlet P., Woussen-Colle M.C., Robberecht P., de Neef P., Cauvin A, Vandermeers-Piret. Structural requirements for the binding of the pituitary adenylatecyclase-activating peptide to receptors and adenylatecyclase activation in pancreatic and neuronal membranes. *Eur. J. Biochem.* 195:535–5341, 1991.

Jungraithmayr W., De Meester I., Matheeussen V., Inci I., Augustyns K., Scharpé S., Weder W., Korom S. Inhibition of CD26/DPP IV attenuates ischemia/reperfusion injury in orthotopic mouse lung transplants: the pivotal role of vasoactive intestinal peptide. *Peptides* 31:585-591, 2010.

Lambeir A.M., Durinx C., Proost P., Van Damme J., Scharpé S., De Meester I. Kinetic study of the processing by dipeptidyl-peptidase IV/CD26 of neuropeptides involved in pancreatic insulin secretion. *FEBS Lett.* 2001 Nov 2;507(3):327-30. Erratum in: *FEBS Lett.* 2002 Feb 13;512(1-3):353.

Li M., Maderdrut J.L., Lertora J.J., Batuman V. Intravenous infusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in a patient with multiple myeloma and myeloma kidney: a case study. *Peptides* 28:1891-1895, 2007.

Robberecht P., Gourlet P., De Neef P., Woussen-Colle M.C., Vandermeers-Piret MC, Vandermeers A. Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylatecyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NBOK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6-38) as a potent antagonist. Eur. J. Biochem. 207:239–246, 1992.

Vandermeers A., Vandenborre S., Hou X., de Neef P., Robberecht P., Vandermeers-Piret M.C., Christophe J. Antagonistic properties are shifted back to agonistic properties by further N-terminal shortening of pituitary adenylate-cyclase-activating peptides in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Eur. J. Biochem. 208:815-819, 1992.

Vaudry D., Falluel-Morel A., Bourgault S., Basille M., Burel D., Wurtz O., Fournier A., Chow B.K., Hashimoto H., Galas L., Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. Pharmacol. Rev. 61:283-357, 2009.

Zhu L., Tamvakopoulos C., Xie D., Dragovic J., Shen X., Fenyk-Melody J.E., Schmidt K., Bagchi A., Griffin P.R., Thornberry N.A., Sinha Roy R. The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). J. Biol. Chem. 278:22418-22423, 2003.

25. Módszerek (5.5.2.): a GTN felhasználás preparátuma (spray) vizes oldat? 125. old. Alul: számomra szokatlan az ingerlési paraméterek megadása – 10 pps x 1; 5 ms x 1; 20x5 mA = 1 mA (az utóbbit értem legkevésbé).

Nitrolingual spray

Hatóanyag: glicerín-trinitrát. Egy adag nyelv alatt spray 0,40 mg glicerín-trinitrátot tartalmaz. **Egyéb összetevők:** telített közepes lánc hosszúságú trigliceridek, részlegesen telített közepes lánc hosszúságú gliceridek, vízmentes etanol, borsmenta olaj. (Gyártó: Pohl-Boskamp Pharmaceuticals, Németország.)

Később vizsgálatokat kezdeményeztünk, mivel felmerült annak a lehetősége, hogy a Nitrolingual spray-ben található egyéb összetevők pl. borsmenta, etanol is ingerlő hatásúak lehetnek a trigemino-vascularis rendszerre. Ezen sejtésünk igazolódott, amikor a Nitrolingual spray-t összehasonlítottuk a Nitro Pohl-lal, melynek egyszerű vizes, cukros oldószer van. (Gyártó Pohl-Boskamp Pharmaceuticals, Németország.) Ezért úgy véljük, hogy állatkísérletekben NTG modell esetén a Nitro Pohl a megfelelőbb stimuláló farmakon (Farkas et al. 2016).

Az ingerlés 30 percig tartott. A stimulációs arány 10 pps, vagyis 10 puls-per-secundum = 10 Hz, 1 impulzus késése 5 ms, az impulzus ideje 5 ms, az áramerősség 1 mA% (mivel a stimuláló gépezeten – Elektrostimulátor ST3 Medicor, Magyarország - úgy lehetett

beállítani az 1 mA-t, hogy 5 mA-re állítottuk, majd ennek az értéknek alkalmaztuk a 20%-át).

Összesítve: négyszögimpulzusos ingerlést alkalmaztunk, az ingerlési idő 30 perc, az impulzusok frekvenciája 10 Hz és az áramerőssége 1 mA volt.

Irodalom

Farkas S., Bölcskei K., Markovics A., Varga A., Kis-Varga Á., Kormos V., Gaszner B., Horváth C., Tuka B., Tajti J., Helyes Z. Utility of different outcome measures for the nitroglycerin model of migraine in mice. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 77:33-44, 2016.

Rövidítések jegyzéke:

AA: arachidonsav

Abl: Abl kináz

2-AG: 2-arachnodil-glicerín

AEA: arachnodil etanolamid

Cdk2: cyclin-dependens kináz2

Cdk4: cyclin-dependens kináz4

CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid

CLR: calcitonin receptor-szerű receptor

COX-2: cyclo-oxigenáz-2

DAG: diacil-glicerín, diglicerid

DRG: hátsó gyöki ganglion

eNOS: endothelialis NOS

ERK: extracellularis szignál-szabályzott kináz

FAAH: zsírsavamid hidroláz

fMRI: funkcionális mágneses rezonanciális képalkotás

iNOS: indukálható NOS

iPANs: intrinsic primer afferens neuronok

JNK: C-Jun N-terminális kináz

LC: locus ceruleus

MAPKK: mitogén-aktivált protein kináz kináz

MEK: mitogén-aktivált protein kináz/extracelluláris szignál regulált kináz kináz

MEKK (MAPKKK): mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz1

MKK3 (MAPKK): mitogén-aktivált protein kináz kináz3

MKK6: mitogén-aktivált protein kináz kináz6
NAPE: N-acil-foszfatidil etanolamin
nNOS: neuronális NOS
NO: nitrogén-monoxid
NOS: nitrogén-monoxid-szintáz
NTG: nitroglycerin
PAC1: PACAP1 receptor
PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid
PAG: periaqueductalis szürkeállomány
PGE₂-EA: prostaglandin E₂ etanolamid
PKC: protein kináz C
Raf: Raf kináz
RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1
RIA: radioimmunoassay
SEK1/MKK4: stressz aktiválta protein kináz (SAPK) ERK kináz1/MAP kináz kináz4
SP: P-anyag
TCC: trigemino-cervicalis komplex
TRIG: ganglion trigeminale
TRP: tranziens receptor potenciál
TRPV1: tranziens receptor potenciál vanilloid1 (kation ioncsatorna)
VPAC1: VIP1 vagy PACAP2 receptor
VPAC2: VIP2 vagy PACAP3 receptor
VR1: vanilloid receptor1

Végezetül ismételtelen köszönöm Barthó Lóránd Professzor Úrnak, hogy disszertációm bírálatával számtalan új gondolatot ébresztett bennem, melyek megszabják a jövőbeni tevékenységemet is.

Szeged, 2016. november 28.

Dr. Tajti János