

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A MIGRÉN KÓRFOLYAMATÁNAK VIZSGÁLATA



Dr. Tajti János

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
NEUROLÓGIAI KLINIKA**

2015.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
1. BEVEZETÉS.....	7
1.1. TÖRTÉNETI ÁTTEKINTÉS	7
1.2. A FEJFÁJÁSOK CSOPORTOSÍTÁSA.....	8
1.3. EPIDEMIOLOGIA	8
1.3.1. Prevalencia	8
1.3.2. Incidencia.....	9
1.4. KLINIKUM.....	10
1.4.1. Prodroma	10
1.4.2. Aura.....	10
1.4.3. Fejfájás.....	11
1.4.4. Lábadozás (rekonvaleszcencia).....	12
1.5. ROHAMGYAKORISÁG	12
1.6. ÖRÖKLŐDÉS.....	12
1.7. TÁRSADALMI-GAZDASÁGI HATÁS	14
1.8. ÉLETMINŐSÉG.....	15
1.9. PATHOMECHANIZMUS	16
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	16
3. A CÉLKITŰZÉSEK IRÁNYÁBA VÉGZETT MUNKA.....	17
3.1. NEUROPEPTID ÉS RECEPTOR MRNS MEGOSZLÁSÁNAK VIZSGÁLATA A HUMÁN GANGLION TRIGEMINALE- BAN (TRIG).....	17
3.1.1. Háttér	17
3.1.2. Anyag és módszer	19
3.1.3. Eredmények.....	19
3.1.4. Megfigyeléseink jelentősége.....	35
3.2. NEUROPEPTID ÉS MRNS MEGOSZLÁS VIZSGÁLATA PATKÁNY GANGLION TRIGEMINALE (TRIG) SZERVKULTÚRÁJÁBAN. A MIGRÉN KRONICIZÁLÓDÁSÁNAK MAGYARÁZATA	39
3.2.1. Háttér	39
3.2.2. Anyag és módszer	40
3.2.3. Eredmények.....	41
3.2.4. Megfigyeléseink jelentősége.....	48
3.3. NEUROPEPTID ÉS RECEPTOR MRNS MEGOSZLÁSÁNAK VIZSGÁLATA A HUMÁN GANGLION CERVICALE SUPERIUS-BAN (SCG)	49
3.3.1. Háttér	49
3.3.2. Anyag és módszer	50
3.3.3. Eredmények.....	50
3.3.4. Megfigyeléseink jelentősége.....	52
3.4. NEUROPEPTID ÉS RECEPTOR MRNS MEGOSZLÁSÁNAK VIZSGÁLATA HUMÁN GANGLION SPHENOPALATINUM-BAN (SPG) ÉS HUMÁN GANGLION OTICUMBAN. A MIGRÉNES BETEGEK FEJFÁJÁSROHAMA SORÁN TAPASZTALT PARASYMPATHICUS RENDSZERI AKTIVÁCIÓ MAGYARÁZATA.....	54
3.4.1. Háttér	54
3.4.2. Anyag és módszer	55
3.4.3. Eredmények.....	55
3.4.4. Megfigyeléseink jelentősége.....	65
3.5. NEUROPEPTID MEGOSZLÁS VIZSGÁLATA A HUMÁN TRIGEMINO-CERVICALIS KOMPLEXBEN (TCC)	68
3.5.1. Háttér	68
3.5.2. Anyag és módszer	69
3.5.3. Eredmények.....	69
3.5.4. Megfigyeléseink jelentősége.....	72
3.6. NEUROPEPTID MEGOSZLÁS VIZSGÁLATA A HUMÁN AGYTÖRZS EGYES MAGCSOPORTJAIBAN („MIGRÉN GENERÁTOR-MODULÁTOR”), A RAPHE MAGCSOPORTBAN (NR), A LOCUS CERULEUSBAN (LC) ÉS A PERIAQUEDUCTALIS SZÜRKEÁLLOMÁNYBAN (PAG).....	74
3.6.1. Háttér	74
3.6.2. Anyag és módszer	75
3.6.3. Eredmények.....	75
3.6.4. Megfigyeléseink jelentősége.....	79

3.7.	KLINIKAILAG KÖNNYEN ELÉRHETŐ, A MIGRÉNES BETEGEK CEREBRÁLIS HIPEREXCITABILITÁSÁT TÜKRÖZŐ BIOMARKEREK (NYÁLBAN LÉVŐ AMINOSAVAK) MEGHATÁROZÁSA	81
3.7.1.	Háttér	81
3.7.2.	Anyag és módszer	83
3.7.3.	Eredmények	83
3.7.4.	Megfigyeléseink jelentősége	84
3.8.	AZ EIKOZANOID SZINTÉZIS VIZSGÁLATA FÁJDALOMMENTES PERIÓDUSBAN LÉVŐ MIGRÉNES NŐK VÉRLEMEZKÉIBEN	87
3.8.1.	Háttér	87
3.8.2.	Anyag és módszer	89
3.8.4.	Megfigyeléseink jelentősége	90
3.9.	AZ AURA NÉLKÜLI MIGRÉNES BETEGEK TÉRBELI KONTRASZTÉRZÉKENYSÉGE	91
3.9.1.	Háttér	91
3.9.2.	Anyag és módszer	92
3.9.3.	Eredmények	92
3.9.4.	Megfigyeléseink jelentősége	94
3.10.	A HIPOFÍZIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP) CENTRÁLIS ÉS PERIFÉRIÁS IMMUNREAKTIVITÁS VÁLTOZÁSA A TRIGEMINO-VASCULARIS RENDSZER KÉMIAI ÉS ELEKTROMOS INGERLÉSE SORÁN PATKÁNYBAN	94
3.10.1.	Háttér	94
3.10.2.	Anyag és módszer	95
3.10.3.	Eredmények	95
3.10.4.	Megfigyeléseink jelentősége	98
3.11.	A MIGRÉNES BETEGEK VÉRPLAZMÁJÁBAN A HIPOFÍZIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID-38-IMMUNREAKTIVITÁS (PACAP-38-IR) VÁLTOZÁSA A MIGRÉNES ROHAMBAN ÉS A FEJFÁJÁSMENTES IDŐSZAKBAN	99
3.11.1.	Háttér	99
3.11.2.	Anyag és módszer	99
3.11.3.	Eredmények	100
3.11.4.	Megfigyeléseink jelentősége	102
4.	ÖSSZEGZÉS (ÚJ EREDMÉNYEK, MEGÁLLAPÍTÁSOK)	104
5.	ANYAG ÉS MÓDSZER (RÉSZLETES)	106
5.1.	ANYAG ÉS MÓDSZER A 3.1.2.; 3.3.2.; 3.4.2.; 3.5.2.; 3.6.2.; 3.7.2.; 3.8.2. FEJEZETEKHEZ	106
5.1.1.	Anyaggyűjtés	106
5.1.2.	Módszerek	108
5.2.	ANYAG ÉS MÓDSZER A 3.2.2. FEJEZETHEZ	117
5.2.1.	Anyaggyűjtés	117
5.2.2.	Módszerek	117
5.3.	ANYAG ÉS MÓDSZER A 3.4.2. FEJEZETHEZ	122
5.3.1.	Anyaggyűjtés	122
5.3.2.	Módszerek	123
5.4.	ANYAG ÉS MÓDSZER A 3.9.2. FEJEZETHEZ	125
5.4.1.	Anyaggyűjtés	125
5.4.2.	Módszerek	125
5.5.	ANYAG ÉS MÓDSZER A 3.10.2. FEJEZETHEZ	126
5.5.1.	Anyaggyűjtés	126
5.5.2.	Módszerek	127
5.6.	ANYAG ÉS MÓDSZER A 3.11.2. FEJEZETHEZ	129
5.6.1.	Anyaggyűjtés	129
5.6.2.	Módszerek	130
6.	IRODALOMJEGYZÉK	131
	AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	158
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	160

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

a.: artéria
 AA: arachidonsav
 Ach: acetilkolin
 ADP: adenzin-difoszfát
 AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionsav
 ANOVA: variancianalízis
 Arg: arginin
 ASA: acetilszalicilsav
 ATP: adenzin-trifoszfát
 BA: arteria basilaris
 BK: bradykinin
 BOLD: vér oxigén-szint függő
 bp: bázispár
 BVR: biliverdin reduktáz
 C1-C2: cervicalis gerincvelői 1-2 szegmentum
 Ca⁺⁺: kalcium ion
 CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid
 CGRP-R: CGRP receptor
 CLR: calcitonin receptor-szerű receptor
 CO: szénmonoxid
 COX: cyclooxygenáz
 C-PON: neuropeptid Y C-terminális flanking peptidje
 CSD: tovaterjedő kérgi gátlás
 CSF: agy-gerincvelői folyadék
 DBH: dopamin-béta-hidroxiáz
 DMEM: Dulbecco szerint módosított Eagle-féle médium
 DNS: deoxiribonukleinsav
 DPM: bomlás per perc
 DRG: hátsó gyöki ganglion
 EAA: excitátoros aminosav
 EET: epoxyzikozatriénsav
 ERK1/2: extracelluláris szignál-szabályzott kináz 1 és 2
 FHM: familiáris hemiplégiás migrén
 FITC: fluorescein izotiocyanát
 fMRI: funkcionális mágneses rezonanciás képalkotó vizsgálat
 Glu: glutaminsav
 Gly: glicin
 GABA: γ -amino-vajsav
 GFAP: glia fibrilláris savi protein
 GHRH: növekedési hormon felszabadító hormon
 GON: nervus occipitalis major
 GS: glutamin szintetáz
 H⁺: hidrogén ion
 5-HT: 5-hidroxi-triptamin
 12-HHT: 12-hidroxi-heptadecatriénsav
 HETE: hidroxi-eikozatetraénsav
 HO: hem-oxigenáz
 HO-1: hem-oxigenáz-1
 HO-2: hem-oxigenáz-2
 HPETE: hidroperoxy-eikozatetraénsav
 HPLC: magasnyomású folyadékkromatográfia
 HRQoL: egészséggel kapcsolatos életminőség
 IHS: International Headache Society, Nemzetközi Fejfájás Társaság
 IL: interleukin
 ip.: intraperitoneális
 ir: immunreaktivitás/immunreaktív
 iv.: intravénás
 K⁺: kálium ion
 KIR: központi idegrendszer

LC: locus ceruleus
 LO: lipoxygenáz
 m.: musculus
 MAPK: mitogén-aktivált protein kináz
 MEK: MAPK/ERK kináz
 Mg^{2+} : magnézium ion
 MRA: mágneses rezonanciás angiographia
 MRI: mágneses rezonanciás képalkotó vizsgálat
 mRNS: hírvivő ribonukleinsav
 MRS: mágneses rezonanciás spectroscopia
 MS: tömegspektrometria
 n.: nervus
 Na^+ : nátrium ion
 NA: noradrenalin
 NKA: neurokinin A
 NK-1: neurokinin-1
 NMDA: N-Methyl-D-Aspartat
 NO: nitrogén-monoxid
 NOS: nitrogén-oxid-szintetáz
 NPY: neuropeptid Y
 NPY Y_1 : neuropeptid Y Y_1 receptor
 NPY Y_2 : neuropeptid Y Y_2 receptor
 NR: raphe magcsoport
 NRM: nucleus raphe magnus
 NTG: nitroglycerin
 OBOT-A: onabotulinumtoxin-A
 OTC: over-the-counter, vény nélkül kapható
 PAC₁: PACAP1 receptor
 PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid
 PAG: periaqueductalis szürkeállomány
 PCR: polimeráz láncreakció
 pERK1/2: foszforilált extracelluláris szignál-szabályzott kináz 1 és 2
 PET: pozitron emissziós tomográfia
 PGD₂: prosztaglandin D₂
 PGE₂: prosztaglandin E₂
 PGF₂: prosztaglandin F₂
 PGF_{2 α} : prosztaglandin F_{2 α}
 PGG₂: prosztaglandin G₂-endoperoxid
 PGH₂: prosztaglandin H₂-endoperoxid
 PGHS: prosztaglandin-H szintáz
 PGI₂: prostacyclin
 pH: pondus Hydrogenii, hidrogénion-kitevő, kémhatás
 PHI: peptid histidin isoleucin
 PHM: peptid histidin metionin
 pro-CT: pro-calcitonin
 qPCR: kvantitatív polimeráz láncreakció
 r.: ramus
 rCBF: regionális agyi vérátáramlás
 RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1
 RCP: receptor komponens protein
 RIA: radioimmunoassay
 RP-HPLC: reverz fázisú-magasnyomású folyadékkromatográfia
 RT-PCR: reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció
 SCG: ganglion cervicale superius
 S.D.: standard deviáció
 S.E.: standard error
 S.E.M.: standard error of the mean, az átlag és az átlag szórása
 Ser: szerin
 SF: térbeli frekvencia
 SGC: satellita glia sejt
 SP: P-anyag
 SPG: ganglion sphenopalatinum

SSN: nucleus salivatorius superior
SSS: sinus sagittalis superior
TCC: trigemino-cervicalis komplex
TF: időbeli frekvencia
TH: tyrozin hydroxyláz
TMS: transzkraniális mágneses ingerlés
TNC: caudalis trigeminális magcsoport
TNF- α : tumor nekrosis faktor- α
TRIG: ganglion trigeminale
TRITC: tetramethyl rhodamin izothiocyánát
TxA₂: thromboxan A₂
TxB₂: thromboxan B₂
Tyr: tyrozin
USA: Amerikai Egyesült Államok
VEP: vizuális kiváltott válasz
VIP: vasoactiv intestinalis polipeptid
VMAT: vesicula monoamin transzporter
VR₁: vanilloid receptor1
VPAC₁: VIP₁ vagy PACAP₂ receptor
VPAC₂: VIP₂ vagy PACAP₃ receptor
vs.: versus
WDR: wide dynamic range, széles dinamikájú tartomány
WHO: World Health Organization, Egészségügyi Világszervezet

1. BEVEZETÉS

1.1. Történeti áttekintés

A migrénről alkotott elképzelések összefüggnek az orvoslás fejlődésével. Kultúrtörténeti emlékeink szerint a koponyalékeléseket azért végezték (i.e. 7000-ben), hogy szabad utat nyissanak a fejfájást okozó gonosz szellemek távozásához (Lyons and Petrucelli 1987). Csontosodási vizsgálatok szerint – bár meglepő – egyes páciensek túléltek ezen idegsebészeti beavatkozást (Thorwald 1962; Edmeads 1990; Rawlings and Rossitch 1994; Rapoport and Edmeads 2000). Időszámításunk előtt 1200-ból a mai Egyiptom területéről való az a papirusz tekercs (felfedezőjéről George Ebers lipcsei egyiptológusról elnevezett – „Ebers-féle” tekercs), mely az első írásos bizonyítéka a migrén tüneti leírásának, sőt terápiás javaslatokat is tartalmaz. Ajánlja, hogy a beteg fejére agyagból készült krokodilt helyezzenek, annak szájába gyógyfüveket tegyenek, és azt vászoncsíkkal, melyre az istenek nevét írták, szorosan a páciens fejére rögzítsék (Den Boer 1993). Hippokratész (i.e. 460-377) úgy vélte, hogy a migrént a májból kigőzölgő és a fejbe jutó „pára” okozza. Ugyanakkor ő volt az első, aki az aurával járó migrén vizuális jeleit leírta (Critchley 1967; Den Boer 1993; Lance and Goadsby 1998). Kappadóciai Aretaeus (i.u. I. század) már csoportosította a fejfájásokat. Megkülönböztette a „cephalalgia”-t (rövid ideig tartó, enyhe), a „cephalea”-t (krónikus, súlyos), és a „heterocrania”-t (féloldali, hányingerrel, hányással társuló) (Adams 1856; Prusinski 1993). Galenus (i.u. II. század) a „heterocrania” helyett bevezette a „hemicrania” elnevezést, melyet a mai napig alkalmazunk. A „migraine” fogalom a galenusi „hemicrania”-ból jött létre, ősi angol és francia szavak átalakulásának eredményeként (Lance and Goadsby 1998). A XVII. században Thomas Willis – a neurológia kifejezés megalkotója, az agyalapi artériás rendszer a „Willis kör” leírója (Willis 1664) – a „de Anima Brutorum” (1672) című művének második fejezetében, a „de Cephealea”-ban vascularis eredetűnek vélte a migrént. Elképzelése szerint a rohamot a koponyán belüli erek spazmusa és dilatációja váltja ki. Súlyosságuk szerint osztályozta a rohamokat. Kapcsolatot fedezett fel a légköri nyomásváltozás, az évszakok, a diéta és a migrénes rosszullétek jelentkezése között (Sacks 1992; Prusinski 1993). A XIX. században Edward Liveing munkásságaként felmerült a migrén neuronális eredete. A migrénes rohamot az agyban keletkező „viharnak” („nerve storms”) – az idegi elemek túlfokozott működésének - tartotta. Összefüggést látott a migrén és az epilepszia között, a központi idegrendszeri (KIR) eredetüknél fogva (Liveing 1873). A modernkori laboratóriumi migrén kutatások kezdetei Harold Wolff nevéhez fűződnek (Wolff 1938; Graham and Wolff 1938; Ray and Wolff 1940; Schumacher and Wolff 1941). A Willis

iskolája nyomán kifejlődő vascularis és a Liveing-féle neurogén elmélet tanai közötti tudományos viták, és hipotézisek versengése (Goadsby et al. 2002) a migrén pathomechanizmusával kapcsolatban mind a mai napig tartanak. Modern vizsgálatok eredményei azonban egy új közös szemléletmód kialakítását eredményezték, a „neurovascularis” rendszer elméletét (Goadsby 2005/a.; Edvinsson et al. 2012; Tajti et al. 2011; Tajti et al. 2012; Pietrobon and Moskowitz 2013). Számos történelmi személyiségről vagy a tudományok és a művészetek területén kiemelkedő alkotóról jegyezték fel, hogy migrénben szenvedett: Julius Caesar, Szent Pál, John Calvin, Queen Mary Tudor, Blaise Pascal, Carolus Linnaeus, Thomas Jefferson, Friedrich Nietzsche, Immanuel Kant, Edgar Allan Poe, Frédéric Chopin, Charles Darwin, Karl Marx, Pjotr Csajkovszkij, Alfred Nobel, Lev Tolsztoj, Grant Ulysses, Sigmund Freud (Adler et al. 1987; Jones 1999).

1.2. A fejfájások csoportosítása

A Nemzetközi Fejfájás Társaság (International Headache Society, IHS) a klinikai és a kutatói munka hatékonyságának növelése céljából először 1988-ban tette közzé a fejfájások csoportosítását (Headache Classification Committee of the International Headache Society 1988), melyet 2004-ben és 2013-ban megújított (Headache Classification Committee of the International Headache Society 2004, 2013). E rendszerezés alapján a fejfájásoknak két fő típusát különböztetjük meg: az önálló (elsődleges) és a tüneti (másodlagos) formákat. Az önálló fejfájásokat a fejfájás és a jellegzetes klinikai tünetek határozzák meg. Ide tartoznak a migrén, a tenziós típusú fejfájás és a trigemino-autonóm cephalalgia. A migrénnek számos altípusa van, melyek közül az aura nélküli és az aurával járó forma a leggyakoribb. A tüneti csoportba a különböző megbetegedéseket kísérő fejfájásokat soroljuk.

1.3. Epidemiológia

1.3.1. Prevalencia

Kezdeti tanulmányok alapján a migrén prevalenciáját igen eltérő (1-35%) értékekre becsülték (Rasmussen 1994). Az IHS kritériumrendszere, a felmérési formák, az érzékenységi és specificitási statisztikai tényezők meghatározása és egységes alkalmazása jelentősen pontosította az eredményeket (Olsen 1994; Overvad 1994). Amerikai (Breslau and Davis 1991; Stewart et al. 1992, Lipton et al. 2007), kanadai (Edmeads et al. 1993; Pryse-Philips et al. 1992), angliai (Steiner et al. 2003) és egyéb európai (Henry et al. 1992; Rasmussen et al. 1991) felmérések hasonló eredményeket adtak. Európa nyugati országaiban a felnőtt lakosság

11-16%-a érintett (Scher et al. 1999; Lipton et al. 2007). Más tanulmányok az európai populációban 17%-os női és 8%-os férfi megjelenéssel számoltak (Stovner and Hagen 2006). Gyermekkorban a fiú és leány arány 1:1, míg pubertást követően fokozatosan eltolódik a nemi megoszlás aránya és a korai 40-es évekre a férfi:nő arány 1:3-ra módosul (MacGregor 1999).

Dán vizsgálatok szerint a migrén élettartam-prevalenciája 16% (a férfiakban 8% és a nőkben 25%), a férfi:nő arány 1:3 volt. Az egy évre vonatkoztatott migrén prevalencia 10% volt: 6% a férfiakban és 15% a nőkben (Rasmussen et al. 1991). Ugyanezen régióban néhány évvel később végzett felmérések szerint az egy évre vonatkoztatott prevalencia 5% volt a férfiakban (2% aura nélküli, 3% aurával) és 16% a nőkben (11% aura nélküli, 5% aurával) (Rasmussen 1995). Franciaországban 12,1% volt az éves prevalencia mértéke (férfiakban 6,1%, nőkben 17,6%) (Rasmussen et al. 1991). Későbbi felmérések az USA-ban férfiakban 5,7-7%-os, míg nőkben 17,6-18%-os migrén prevalenciát állapítottak meg (Lipton et al. 1992; Stewart et al. 1992; Lipton et al. 2001/a, b, c; Bigal et al. 2004). Újabb vizsgálatok magasabb értékeket találtak: férfiakban 6-10%-os, nőkben 17-25% -os migrén prevalenciát (Victor et al. 2010; Smitherman et al. 2013). Felmérések szerint az USA-ban a prevalencia magasabbnak mutatkozott az alacsony szocio-ökonómiai státuszú egyéneknél (Lipton and Bigal 2005). Az élettartam prevalenciát nőkben 33%-nak, férfiakban 13%-nak találták (Launer et al. 1999; Waters 1970). Magyarországon egy kis városban (15188 lakos, 748 válaszadó) és egy faluban (1680 lakos, 767 válaszadó) végzett felmérések szerint a városban 9,6%, míg a faluban 12% gyakoriságot találtak, a férfi:nő arány 1:3 volt (Guseo and Giczi 1994). Hazai vizsgálatok szerint az aura nélküli migrén 1 éves prevalenciája 7,6% (férfi:nő arány=1:3), míg az aurával járó migrén esetében 2% volt (férfi:nő arány=1:2) (Bánk and Márta 2000). A fentiek alapján Magyarországon megközelítően 1,2-1,6 millió főre tehető a migrénben szenvedő páciensek száma. Az elmúlt évek során a világ különböző országaiban készült 39 tanulmányt összegezve a migrén prevalenciája nőkben 12,6%, a férfiakban 8,4% értékeket mutatott, mely a 25-55. életévek között volt a legmagasabb (Lipton and Bigal 2005). Globálisan a felnőtt népesség 11%-a szenved migrénben (Stovner et al. 2007), mely 2010-re már elérte a 3. leggyakoribb prevalenciájú megbetegedést (Headache Classification Committee of the International Headache Society 2013).

1.3.2. Incidencia

A migrén incidenciája relatíve kicsi, melyet több meghatározó tanulmány is bizonyít.

Stewart prevalencia vizsgálateiben azt az életkort vette elsődleges szempontnak, amelyben az első migrénes roszullét kialakult, és ebből indirekt módon becsülte meg a migrén

incidenciáját. Férfiakban az aurával járó migrén 5 éves korban (6,6/1000 fő/év), míg az aura nélküli migrén 10-11 éves kor között mutatott csúcserőket (10/1000 fő/év). Nőkben az aurával járó migrén incidenciája 12-13 éves kor között (14,1/1000 fő/év), az aura nélküli migrénben 14-17 éves életkorban (18,9/1000 fő/év) a legnagyobb. Tehát a férfiakban a migrén korábbi életkorban kezdődik, mint a nőkben. Az aurával járó migrén hamarabb jelentkezik, mint az aura nélküli migrénes fejfájás (Stewart et al. 1993).

Breslau és munkatársai fiatal felnőttek (21-30. életév) random csoportjából merítették az adataikat. Felmérésük szerint nőkben 22/1000 fő/év, férfiakban 5/1000 fő/év volt az incidencia mértéke (Breslau et al. 1994).

Stang tanulmányát orvosi dokumentumokból állította össze, 60 éves korig bezárólag. Nőkben 2,9/1000 fő/év, férfiakban 1,4/1000 fő/év volt az incidencia mértéke. Nőkben az incidencia legalacsonyabb volt az egészen fiatal és az idős életkorokban, magas volt a 10-49 évesek között, míg a csúcserőket a 20-29 évesek között találták (Stang et al. 1996).

Dániában a 25-64 évesek között a migrén éves incidenciája nőkben 3/1000 fő/év, férfiakban 15/1000 fő/év volt. Nőkben az incidencia csúcsa a 37-44 évesek között volt, 20/1000 fő/év arányban (Lyngberg et al. 2003).

1.4. Klinikum

A migrén és fejfájásroham négy fő szakaszra osztható: *prodroma*, *aura*, *fejfájás*, *lábadozás* (*rekonvaleszcencia*).

1.4.1. Prodroma

A migrénesek több, mint felében kialakul a prodroma, mely egyenlő arányban jelentkezik az aurával járó és az aura nélküli migrén esetében (Silberstein et al., 1998). A prodroma során a mentális, a neurogén és az általános állapot változását tükröző tünetek alakulnak ki.

Mentális tünetek: depresszív hangulat, hiperaktivitás, euphoria, dysphoria, beszédesség, irritabilitás, nyugtalanság, koncentráció gyengeség.

Neurogén tünetek: photophobia, phonophobia, hypersomnia.

Általános tünetek: a nyak és a tarkó izmainak merevsége, étvágytalanság vagy élelem utáni sóvárgás, ödéma készség, fokozott vizeletürítés, hasmenés vagy székrekedés (Silberstein and Young, 1995).

1.4.2. Aura

A migrén aura jelek, melyek a migrénesek kb. 30%-ában alakulnak ki a cortexbe vagy az agytörzsbe lokalizálható reverzibilis neurológiai tünetek, melyek fokozatosan, 5-20 perc alatt alakulnak ki és általában 60 percig tartanak (Ziegler and Hassanein, 1990). A migrénes aura

tüneteket vizuális, szenzoros, motoros eltérések, beszédzavar, agytörzsi funkciózavar vagy ezek kombinációi alkotják. E jeleket azonnal, vagy kevesebb, mint egy óra múlva fejfájás, és/vagy hányinger, illetve photophobia követ. Egyes felmérések szerint az aurát csak 80%-ban kíséri fejfájás (Jensen et al. 1986).

Vizuális tünetek: a látótérben kialakuló scotoma, mely a páciensek harmadában jelentkezik (Lance, 1982). Gyakori a látótér különböző pontjaiban felvillanó vagy a látótéren áthaladó színes foltok, csillagok (scotoma scintillans) jelentkezése. Jellegzetes aura jelenség a középkori erődítményhez hasonló alakzat (fortifikációs spektrum) megjelenése a látótérben. Homályos látás, a látótér csőszzerű beszűkülése („csőlátás”), az egyik vagy mindkét szem elsötétülő látóterében kialakuló „lyuk” látás jöhet létre. Vizuális hallucinációk, micropsia, macropsia, mozaiklás is kialakulhat.

Szenzoros tünetek: gyakori aura tünet a végtag paraesthesia, mely általában a felső végtag ujjából induló és az alkar, felkar irányába tovahaladó zsibbadásérzésből áll (Manzoni et al., 1985).

Motoros tünetek: végtag gyengeség, ügyetlenség, koordinációs zavar.

Beszédzavar: szótalálási, szóhasználati nehezítettség.

Agytörzsi tünetek: vertigo, kettőslátás.

Időszakosan apraxia, agnosia, beszédzavar, „déja vu”, „jamais vu” élmények, delirózus állapot is létrejöhet a migrénes rosszullét aura szakaszában (Jensen et al. 1986; Manzoni et al., 1985; Silberstein and Young, 1995). Leggyakrabban a vizuális, a szenzoros tünetek és a beszédzavar alakul ki (Russel and Olesen, 1996).

1.4.3. Fejfájás

A típusos migrénes fejfájás egyoldali, lüktető-görcsös jellegű, a fájdalom intenzitása az enyhétől a súlyos mértékig terjed, melyet a fizikai aktivitás kifejezetten ront. A fájdalom lehet kétoldali (az esetek 40%-ában) vagy az egyik oldalon kezdődik, de a későbbiekben áttérjed az ellenoldalra és bilaterálissá válik (Selby and Lance, 1960).

A migrénes fejfájás a nap minden szakában kialakulhat, de leggyakrabban a reggeli órákban jelentkezik (Selby and Lance, 1960). Fokozatosan fejlődik ki és 4-72 órán át tart. A fájdalomhoz a betegek 90%-ában hányinger és 1/3-ban hányás csatlakozik (Silberstein, 1995). Gyakran társul a fejfájáshoz photo- és phonophobia, sápadtság, a szemhéj-arc ödémásodása, hideg-melegségérzés és a nyaki izmok merevsége (Selby and Lance, 1960; Silberstein and Saper, 1993).

1.4.4. Lábadozás (rekonvaleszcencia)

Fejfájást követően - mely általában lassan, fokozatosan oldódik - a betegek rendszerint fáradtak, ingerlékenyek, figyelmetlenek, koncentrációra képtelenek. A páciensek kis százalékban a fájdalom elmúltával euforikus hangulatba kerülnek, míg mások depresszálttá válnak. Rendszerint a fájdalmat követően 24 óra múlva érik el a betegek szokásos napi aktivitásukat (Silberstein et al., 1998).

1.5. Rohamgyakoriság

Dániában végzett tanulmányok alapján évente a migrénes betegek 59%-ának 1-7, 25%-ának 8-14 és 16%-ának 15-30 fejfájásrohamra volt (Rasmussen et al. 1991). Az USA-ban a nőkben a havi migrénes rohamgyakoriság: 25%-a 4, 35%-a 1-4 és 40%-a 1 súlyos migrénes rohamot szenvedett el havonta (Silberstein et al. 1998). Az aktív migrénesek között a rohamfrekvencia átlaga 1,5 roham/hó és a betegek 10%-ának hetente 1 rosszulléte volt (Stewart 1994/a; Stewart 1994/b). A rohamok átlagos időtartama 1 napon belüli volt, de a betegek 1/5-ében elérte a 2-3 napot (Ferrari 1998).

Magyarországon a fenti adatok alapján évente 21 millió migrénes roham valószínűsíthető (Berky 1999).

1.6. Öröklődés

Megfigyelések szerint a migrén családokon belül halmozottan fordul elő, ugyanakkor az öröklődés menete nem egyértelmű (Stewart et al. 1997; Silberstein et al. 2002). A migrénnek a szülőkről a gyermekekre való átvitelét már a XVII. században megfigyelték (Willis 1682). Ezt követően számos kutatócsoport felismerte a pozitív családi kórtörténetet. Az eddigi tanulmányok alapján úgy tűnik, hogy az aurával járó migrén kialakulása nagymértékben függ a genetikai tényezőktől, míg az aura nélküli migrén genetikai és környezeti tényezők együttes függvénye (Russel and Olesen 1995). Monozigóta és dizigóta ikreken végzett megfigyelések során jelentős monozigóta konkordanciát állapítottak meg, és hangsúlyozták a genetikai és a környezeti hatások jelentőségét (Merikangas et al. 1994; Honkasalo et al. 1995; Larsson et al. 1995; Ziegler et al. 1998; Ulrich et al. 1999; Gervil et al. 1999/a; Gervil et al. 1999/b). A migrén különböző formái közül ezideig a familiáris hemiplégiás migrénnek (FHM) ismert a genetikai háttere. A FHM autoszomális domináns öröklődésű. A betegek vezető aura tünete az átmeneti, a teljes bénulásig fokozódó testfélgyengeség, melyhez gyakran magas láz, szédülésérzés, zavartság vagy kóma is társulhat (Ptacek 1998). Ez igen ritka formája a migrénnek, csak kevés (néhány száz) család ismert világszerte. A FHM kialakulását

pontmutáció hozza létre. A pontmutáció létre jöhet a P/Q-típusú "feszültség függő" kalcium ioncsatorna α -1A-alegységét kódoló génben (CACNA1A) a 19p13 kromoszómán (Ophoff et al. 1996). Ez a típus az FHM-1 elnevezést kapta. A P/Q típusú „feszültség függő” kalcium ioncsatornák elsősorban a cerebellumban, a cortexben, a thalamusban, a hypothalamusban és a felső agytörzsben vannak jelen. A „feszültség függő” kalcium ioncsatornák a membránon áthaladó feszültségnek megfelelően szabályozzák a kalcium ionok (Ca^{2+}) bejutását a sejtbe. Az ioncsatornák rendkívüli fontosságát az adja, hogy az intra- és extracelluláris térben lévő Ca^{2+} grádiens befolyásolja a neurotranszmitter felszabadulását és a neuronális excitációt (Ophoff et al. 1996; Ophoff et al. 1998), továbbá szabályozzák a caudalis trigeminális magcsoportban (TNC) a durális nocicepcióban résztvevő neuronok aktivitását (Ebersberg et al. 2004). Az FHM-1-ben szenvedő különböző családokban eltérő mutációkat találtak a CACNA1A génben. Az egyik mutáció (R192Q) a Ca^{2+} ioncsatorna feszültségérzékelő domain alegységében alakult ki. A másik, mely a leggyakoribb mutáció (T666M) a csatorna második domain-jén („por-forming P hairpin loop”) történt. A harmadik és negyedik mutációk (V714A és I1811L) azon transzmembrán egységekben jöttek létre, melyek befolyásolják a Ca^{2+} ioncsatorna inaktivációját és így a Ca^{2+} transzport blokkolását (Ahmed et al. 1996; Eliot et al. 1996; Ophoff 1996; Ophoff et al. 1998; Terwindt et al. 1997/b). Az FHM-1-ben észlelt mutációk funkcionális jelentőségére utalnak azok a kísérleti megfigyelések, melyekben „knock-in” egér modelleket alkalmaztak. Ezen törzsek a humán FHM-1 R192Q mutációt hordozzák és a neuromuscularis junkcióban fokozott neurotranszmissziót, valamint a tovaterjedő kérgi gátlás (cortical spreading depression, CSD) csökkent küszöbét és megnövekedett sebességét eredményezik (van den Maagdenberg et al. 2004). Az adatok szerint ezen mutáció megnöveli a corticalis hiperexcitabilitásra való hajlamot. Migrénos testvérpárok genetikai vizsgálata szerint azonban az FHM-mel nem járó esetekben is találtak a 19-es kromoszóma rövid karján (19p13) az α -1A kalcium csatorna gén régióját érintő mutációkat (May et al. 1995; Terwindt et al. 1997/a, Terwindt et al. 2001). Olasz (De Fusco et al. 2003) és dán (Vanmolkot et al. 2003) vizsgálatokban az 1-es kromoszómán találtak „missense” mutációkat. Ez a forma az FHM-2 típus elnevezést kapta. Az ATP1A2-génben történt két különböző „missense” mutáció, mely a Na^+ , K^+ -ATPase α_2 alegységét kódolja (De Fusco et al. 2003). Ez az alegység köti a nátrium ionokat (Na^+), a kálium ionokat (K^+), az ATP-t és az ATP hidrolízisét felhasználva eltávolítja a Na^+ -okat. A Na^+ -pumpa által biztosított telített Na^+ grádiens esszenciális az aminosavak és a Ca^{2+} transzportjához. Az ioncsatorna károsodása következtében csökken a K^+ és a glutamát szinaptikus részből történő elmozdítása. Feltételezések szerint ezen mutáció következtében fogékonyabbá válik az agy a

CSD kialakulására. Német FHM-ben szenvedő családokban ismertek fel egy másik missense mutációt, mely a FHM-3 nevet kapta. A mutáció a 2-es kromoszóma hosszú karján (2q24 kromoszóma) az SCN1A génben jött létre, mely a neuronális feszültség-függő Na^+ ($\text{Na}_v 1.1$) ioncsatorna α_1 alegységét kódolja (Dichgans et al. 2005). Az SCN1A génmutáció következtében megváltozott funkciójú Na^+ -ioncsatorna nagy mennyiségű extracelluláris Na^+ felhalmozódáshoz vezet. Ezen ioncsatorna működése alapvetően befolyásolja a corticális neuronokban az akciós potenciál keletkezését és terjedését. A mutáció következtében megnő a neuronok tüzelési ideje és excitabilitása, melyek eredményeként CSD alakul ki (Ferrari 2005; van den Maagdenberg et al. 2005; Dichgans et al. 2005). Az FHM-ben szenvedő családok 55%-ában a hibás gén a 19-es kromoszómán (Terwindt et al. 2001), 15%-ában az 1-es (Ducros et al. 2001; Gardner et al. 1997), míg a maradék 30%-ában a 2-es kromoszómán található, illetve nem ismert a pontos lokalizáció. Az FHM-es családokban (19-es kromoszómához kapcsolt vagy ehhez nem kötődő) genotípus-fenotípus korrelációkat sem lehetett felállítani (Ducros et al. 2001). Ugyanakkor az egyes klinikai tünetek, mint a cerebellaris ataxia megjelenése a 19-es kromoszómán eltérést mutató családok 50%-ában alakult ki (Joutel et al. 1994; Ophoff et al. 1994; Joutel et al. 1993; Haan et al. 1994; Teh et al. 1995), a fejfájásrohamok gyakran a fejét ért kisebb traumás ütések után alakultak ki, vagy a rohamhoz coma társult (Terwindt et al. 1996). Az FHM-2 altípushoz gyakran epilepszia csatlakozott (Vanmolkot et al. 2003; Jurkat-Rott et al. 2004). Az ismert mutációk alapján felmerült, hogy a migrént vagy legalábbis egyes neurológiai vonatkozású göctüneteit (mint pl. az aurát) ioncsatorna eltérések okozzák, így ezeket ioncsatorna betegség következményének is tarthatjuk (Goadsby and Ferrari 2001; Goadsby 2004; Ferrari 2005; van den Maagdenberg et al. 2005).

1.7. Társadalmi-gazdasági hatás

Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) 2001-ben a migrént a 19. helyre sorolta be azon okok között, melyek egészségkárosodást okoznak (World Health Organization, 2001; Leonardi et al. 2005). Globális, 2010-ben végzett felmérés szerint a hetedik leggyakoribb megbetegedés, mely egészségkárosodást okoz (Headache Classification Committee of the International Headache Society 2013).

Az Amerikai Egyesült Államokban (USA) (az American Migraine Study II becslése szerint) 28 millió ember szenved súlyos fejfájással járó migréntől (Lipton et al. 2001/a). A betegek vény nélkül kapható (over-the-counter, OTC) gyógyszerekre minden típusú fájdalom csillapítása céljából megközelítően 3,2 milliárd US dollárt költöttek, ezen összeg 1/3-a volt,

melyet csak a fejfájás csillapítására szántak (Consumer Healthcare Products Association 2000). Az Európai Unióban is nagy terhet jelent a fejfájásban szenvedők gondozása (Menken et al. 2000, Steiner et al. 2014), több mint 27 milliárd eurót fordítanak évente kezelésükre (Andlin-Sobocki et al. 2005; Olesen et al. 2012). Az USA-ban 1976-77 között a betegek 4%-a fejfájás miatt jelentkezett a családorvosi rendelésen, mely több, mint 10 millió vizsgálatot jelentett (National Center of Health Statistics 1979; Celentano et al. 1992). Washington államban a férfiak 8%-a és a nők 14%-a a Stang-féle tanulmány 4 hetes időszaka alatt migrénes rosszullét miatt maradt távol a munkahelyéről, vagy hiányzott az oktatásból (Stang et al. 1994). A kiesett vagy csökkent hatékonysággal ledolgozott munkanapok - páciensekként évente 19,5 nap - miatti anyagi veszteség évente megközelíti a 17 milliárd US dollárt (Micieli 1993; Osterhaus et al. 1992; Stang and Osterhaus 1992; Gerth et al. 2001). Magyarországra számítva a nemzetközi adatokat 1,4 millió a migrén miatt a munkából kiesett és 2,8 millió a csökkent hatékonysággal ledolgozott munkanapok száma (Berky 1999). Ezen adatok gazdasági következményeinek értékelése közgazdászok feladata.

1.8. Életminőség

Az életminőség magába foglalja az egyén fizikai és lelki állapotát, társadalmi kapcsolatait, vallásos meggyőződését, környezete jelenségeihez fűződő viszonyát, vagyis jelenti az egyén észleletét az életben elfoglalt helyzetéről (World Health Organization 1997; Lipton and Bigal 2005). Az egészséggel kapcsolatos életminőség (health-related quality of life, HRQoL) a vizsgált személy értékelése arról, hogy milyen területen és mértékben gyakorol hatást életére a betegség és annak kezelése (Schipper 1983; Lipton et al. 2001/b). A HRQoL vizsgálata alkalmas az egyén pillanatnyi állapotának, valamint az állapotváltozás és a terápiás hatékonyság megítélésére. Felmérésekor figyelembe kell venni a páciens mozgásképességét, pszichés állapotát, elégedettségi szintjét, önellátási fokát, továbbá azt, hogy társadalmi szerepeit hogyan tudja betölteni, mennyi fájdalmat és szenvedést okoz a betegsége (Tarlov 1989; Ware 1991). Az elégedettségi szint meghatározói közé tartozik az önelfogadás, a másokkal való kapcsolat, az anyagi függetlenség, a személyes fejlődés, a környezet átalakításának a képessége és az életcél megléte (Ryff and Keyes 1995). A tanulmányok azt jelezték, hogy nem csak a migrénes roham (Solomon et al. 1993), hanem az ezt követő közvetlen időszak (Hasnoui et al. 2003) és a két fejfájás közötti periódus (Santanello et al. 1995; Lipton et al. 2000) is befolyásolja a betegek HRQoL-jét. Összehasonlítva más krónikus betegségekkel, kitűnt, hogy a migrén nagyobb mértékben befolyásolja a HRQoL-t, mint a depresszió, és sokkal kifejezettebben, mint a diabetes mellitus vagy a krónikus arthritis

(Dahlöf 1993). A triptánok (migrén roham ellenes szerek) hatását vizsgálva megállapították, hogy az azonnali és a 6 hónapon túli időszakban is kedvezően befolyásolták a HRQoL-t (Dahlöf et al. 1997; Santanello et al. 1997). Amerikai, európai és japán vizsgálatok egyértelműen jelzik, hogy a migrénes roham a betegek 3/4-ében csökkentette a páciensek szokványos aktivitását (Stewart et al. 1996; Michel et al. 1997). Kanadai felmérések szerint a migrénesek 1/3-a a roham során ágyynyugalmat igényel (Edmeads 1993). A betegek több, mint 70%-ának károsodik az interperszonális kapcsolata (Edmeads 1993). A migrénesek jelentős része véli úgy, hogy betegsége miatt van súrlódása a partnerével (50%), a gyermekével (52%), otthonában kevésbé törődik házastársával (60%) és gyermekével (59%). A betegeknek kicsivel több, mint 1/3-a (36%) állítja, hogy jobb társ lenne, ha nem szenvedne migrénben (Lipton et al. 2003).

1.9. Pathomechanizmus

A migrén pathomechanizmusa nem ismert, bár az elmúlt két évtized kutatási eredményei jelentős ismeretekkel gazdagították tudásunkat. A modern molekuláris és funkcionális vizsgálatok eredményei a korábbi vascularis (Willis 1664; Wolff 1938; Graham and Wolff 1938; Ray and Wolff 1940; Sacks 1992; Prusinski 1993) és neurogén (Liveing 1873; Gowers 1888) elméletek közötti merev határokat feloldották, és új közös, neurovascularis szemléletmód kialakítását eredményezték (Pietrobon and Striessnig 2003; Goadsby 2005/b; Edvinsson and Uddman 2005; Ho et al. 2010; Edvinsson et al. 2012; Pietrobon and Moskowitz 2013).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Célkitűzéseink a migrén kórfolyamatának feltárására irányultak. Azon nemzetközi klinikai és kísérletes gondolatkörhöz csatlakoztunk, mely a trigemino-vascularis rendszer aktivitását, szenzitizációját, a neuropeptidok szerepét és az agyi hiperexcitabilitást a migrén pathomechanizmusában lehetséges tényezőknek tekintette. Ezen hipotézisek további vizsgálatára a következő célokat tűztük ki:

2.1. Spontán migrénes rohamban észlelt, de korábban humánban fel nem tárt neuropeptid, receptor és receptor hírvivő ribonukleinsav (mRNS) megjelenésének vizsgálata a trigemino-vascularis rendszerben: a cranio-cervicalis ganglionokban [szenzoros: ganglion trigeminale (TRIG); parasympathicus: ganglion sphenopalatinum (SPG), ganglion oticum;

és sympathicus: ganglion cervicale superius (SCG)]; a trigemino-cervicalis komplexben (TCC) és a „migrén generátor-modulátorokban”.

Megvalósítás: 3.1.; 3.3.; 3.4.; 3.5.; 3.6. fejezetek.

2.2. Magyarázatot találni, modellt létrehozni a migrén krónicizálódásának a folyamatára.

Megvalósítás: 3.2. fejezet.

2.3. Választ kerestünk a migrénes betegek fejfájásrohamja során tapasztalt parasympathicus aktivációnak a hátterére.

Megvalósítás: 3.4. fejezet.

2.4. Klinikailag könnyen elérhető, a migrénes betegek corticalis hyperexcitabilitását tükröző biomarker meghatározása.

Megvalósítás: 3.7. fejezet.

2.5. Adatokat szolgáltatni a migrénes páciens vérlemezkéiben az eikozanoidok szintéziséről.

Megvalósítás: 3.8. fejezet.

2.6. Az aura nélküli migrénes betegek térbeli kontrasztérzékenységének meghatározása.

Megvalósítás: 3.9. fejezet.

2.7. Magyarázatot adni a migrénes betegekben a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) intravénás (iv.) adását követően kialakult migrénes rosszullét mechanizmusára.

Megvalósítás: 3.10. fejezet.

2.8. Követni a migrénes betegek vérplazmájában a PACAP-38 koncentráció változását a migrénes roham alatt és a fejfájásmentes periódusban.

Megvalósítás: 3.11. fejezet.

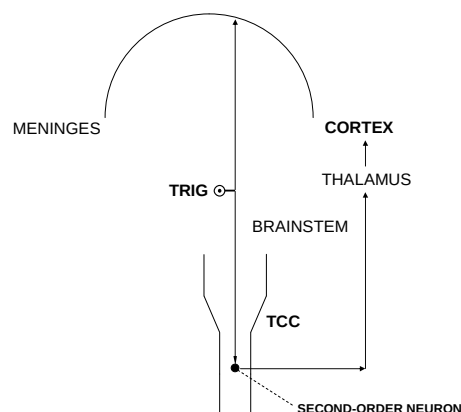
3. A CÉLKITŰZÉSEK IRÁNYÁBA VÉGZETT MUNKA

3.1. *Neuropeptid és receptor mRNS megoszlásának vizsgálata a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)*

3.1.1. Háttér

A migrénes betegek roham alatti fájdalomának pontos kialakulása nem ismert. Ray és Wolff, valamint Penfield és McNaughton patinás tanulmányaikban bizonyították, hogy a koponyaűrön belül csak a nagy cerebrális erek, a piális vasculatura, a nagy vénás sinusok, valamint a dura mater érzékenyek fájdalomingerekre (Wolff 1938; Penfield and McNaughton 1940; Ray and Wolff 1940). Ezen képletek az autonóm (sympathicus és parasympathicus) beidegzés mellett érző idegrostokkal, receptorokkal is ellátottak, így termikus, mechanikus és disztenziós ingerekre válaszolnak (Olesen et al. 2000). Az intrakraniális fájdalomérző

képletek érző beidegzése a TRIG neuronjaiból (Liu-Chen et al. 1984; Andres et al. 1987; Keller and Marfurt 1991; McNaughton 1938; Penfield and McNaughton 1940; Steiger and Meakin 1984; Steiger et al. 1982) és a felső cervicalis hátsó gyökökből (Arbab et al. 1986) ered, melyekhez igen csekély mértékben hozzájárulnak a n. vagus és a n. glossopharyngeus rostjai. A TRIG pseudounipoláris idegsejtjeinek perifériás nyúlványai a r. ophthalmicuson át idegzik be a koponyaűri képleteket. Számos adat állt már rendelkezésre a kísérleti állatok durális és intrakraniális érrendszerének érző beidegzéseiről és különböző neuropeptidekkel - mint a P-anyag (SP) (Edvinsson et al. 1981; 1983), a neurokinin A (Edvinsson et al. 1988) és a calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP) - kapcsolatban (Edvinsson 1985; Uddman et al. 1985; Edvinsson et al. 1987). Ismert volt az a tény, hogy a trigeminus neuralgiában szenvedő betegekben a TRIG elektromos koagulációját követően (Goadsby et al. 1988), valamint spontán migrénes rohamban megnőtt a craniális vénás kiáramlásban a CGRP koncentrációja (Goadsby et al. 1990). Moskowitz megalkotta a trigemino-vascularis elméletet, mely mintegy hidat képzett a cerebrális dura mater, a meningeális vasculatura, valamint az agytörzs között (Buzzi and Moskowitz 1992). A trigemino-vascularis rendszer meghatározó eleme a TRIG. A TRIG-ban elhelyezkedő elsődleges érző neuronok (pseudounipoláris) perifériás ágai idegzik be a durát és a meningeális vasculaturát. A centrális ágrendszer a másodlagos átkapcsoló érző neuronokkal szinaptizál a trigemino-cervicalis komplexben (TCC), mely magába foglalja a gerincvelői cervicalis 1-2 szegmentumok (C1-C2) hátsó szarvi régióit és a caudalis trigeminális magcsoport (TNC) ide lehúzóódó egységeit. Az információ innen a thalamusba, majd a szomatoszenzoros agykéregbe jut (Buzzi and Moskowitz 1992) **(1. ábra)**. Mindezen ismeretek ellenére, humánban kevés adattal rendelkezünk. Ezért célul tűztük ki, hogy a humán TRIG-ban megvizsgáljuk a trigemino-vascularis rendszer aktivációja során megjelent neuropeptidek és receptor mRNS megoszlását (Tajti et al. 1999/a; Hou et al. 2002, Hou et al. 2003/a; Uddman et al. 2004; Eftekhari et al. 2010).



1. ábra. A trigemino-vascularis rendszer vázlata

(hivatkozás: Buzzi and Moskowitz 1992; Tajti et al. 2011)

Rövidítések: TCC: trigemino-cervicalis komplex, TRIG: ganglion trigeminale

3.1.2. Anyag és módszer

Vizsgálataink során post-mortem humán TRIG-ből készült preparátumokon immunhisztokémiai, *in situ* hibridizáció és reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció (RT-PCR) technikákat alkalmaztunk. Részletes leírást lásd az 5.1. fejezetben.

3.1.3. Eredmények

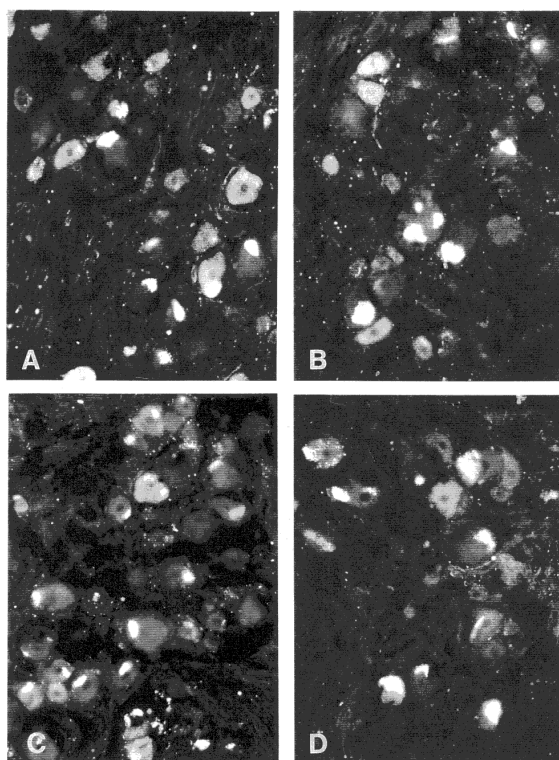
A TRIG-ban a neuropeptid és a receptor mRNS előfordulása.

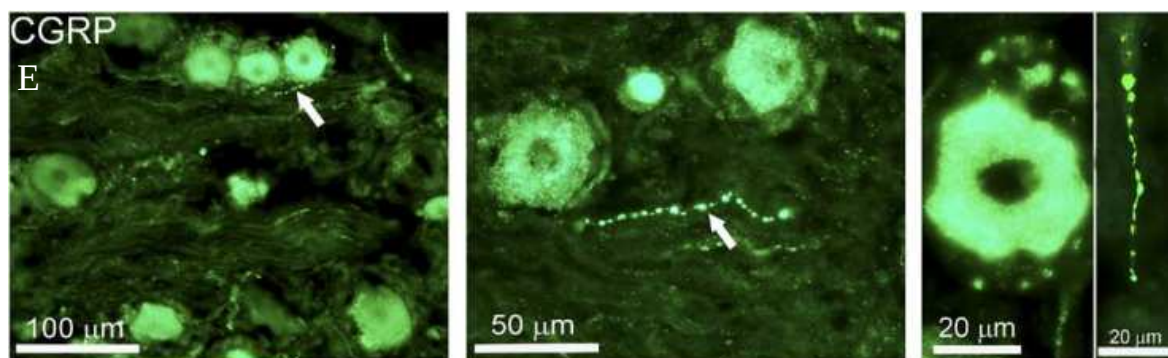
Immunhisztokémia

A CGRP immunreaktív (-ir) neuronok magas számban (45%) fordultak elő a TRIG mindegyik metszetében és homogénen oszlottak el az egész ganglionban (**2. ábra**). A CGRP receptor (CGRP-R) komponensei közül a calcitonin receptor-szerű receptor (CLR) a neuronok 37%-ában, míg a receptor aktivitást befolyásoló protein1 (RAMP1) a neuronok 36%-ában fejeződött ki (**3. ábra**). Mindkét komponens kimutatható volt a satellita glia sejtekben (SGC) is (**4. ábra**). Kisebb számban mutattak a neuronok SP (18%), nitrogén-oxid-szintetáz (NOS) (15%) és PACAP (20%) immunreaktivitást (**1. táblázat**). Többségében a CGRP- és a SP-ir neuronok kis- és közepes méretűek voltak. A ganglionban a neuropeptid Y C-terminális flanking peptidje (C-PON)-ir neuronokat nem lehetett megfigyelni.

A neuronok 44%-a 5-hydroxy-triptamin_{1D} (5-HT_{1D}) receptor-ir-t, 40%-a 5-HT_{1B} receptor-ir-t adott (**5. ábra**). Az 5-HT_{1D} receptor-ir neuronok 86%-a közepes, 9%-a nagy és 5%-a kicsiny méretű volt (**6. ábra**). A neuronok kis száma mutatott vanilloid receptor1 (VR₁)-ir-t (16%-a a teljes neuron számnak). A neuronok 70%-a nociceptin-ir volt (**7. ábra**). A nociceptin-ir sejtek 78%-a közepes (30-60 μ m), 14%-a kicsiny (<30 μ m) és 8%-a nagyméretű (>60 μ m) neuron

volt **(8. ábra)**. A sejttestek 60%-a hem-oxigenáz-2 (HO-2)-ir-t és 40%-a biliverdin reduktáz (BVR)-ir-t mutatott. A hem-oxigenáz-1 (HO-1) igen gyenge reakciót adott **(9. ábra)**. A HO-2-ir, valamint a BVR-ir sejtek 78%-a közepes nagyságú volt (30-60 μm). A perikarionban látható volt a narancssárga, autofluoreszcenciát adó lipofukszin jelenléte, mely jellemző a felnőtt humán idegszövetre és az életkor előrehaladtával egyre több sejtben jelenik meg. Kettős immunfestés alapján megállapítottuk, hogy igen kevés CGRP-ir neuron (kevesebb, mint 5%) mutatott NOS pozitivitást **(10. ábra)**. Továbbá a CGRP-ir neuronok 89%-a 5-HT_{1D} receptor-ir-t és 65%-a 5-HT_{1B} receptor-ir-t mutatott **(2. táblázat)**. A legtöbb 5-HT_{1D} receptor-ir (95%) és 5-HT_{1B} receptor-ir (94%) neuronok SP-ir-t is mutattak, és 83%-a az 5-HT_{1D} receptor-ir és 86%-a az 5-HT_{1B} receptor-ir sejteknek NOS enzimet is tartalmazott **(11. ábra; 12. ábra)**. A neuronok 16%-a VR₁-ir-t mutatott. A VR₁-ir sejtek 10%-a CGRP-ir, 8%-a SP-ir és 5%-a NOS-ir pozitív volt **(13. ábra)**. Kettős immunreakciók eredményei szerint a nociceptin-ir neuronok 61%-a CGRP, 54%-a SP, 50%-a NOS és 68%-a PACAP ko-lokalizációt mutattak **(14. ábra)**. A HO-2-ir neuronok 40%-a CGRP-del ko-lokalizált **(15. ábra)**, míg a BVR-ir sejtek 30%-a ko-lokalizálódott CGRP-del **(16. ábra)**.

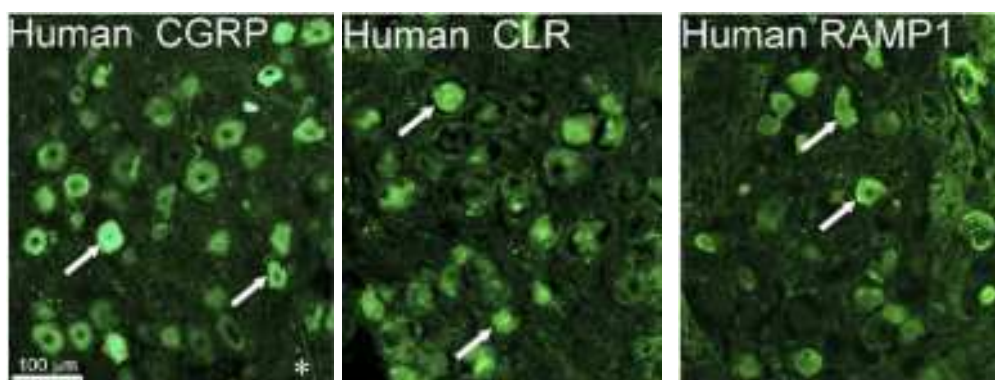




2. ábra (A, B, C, D, E). Immunfluoreszcens reakció a calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP) (A, E), a P-anyag (SP) (B), a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) (C) és a nitrogén-oxid-szintetáz (NOS) (D) megjelenítésére humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)

Számos idegsejttest mutat CGRP-ir-t az A és az E képeken (a nyíl CGRP-ir idegrostra mutat az E képen). A sejttestek a B képen SP-ir-t tartalmaznak. PACAP-ir sejttestek halmaza látható a C fénymikroszkópikus felvételen, míg a D fotón kevés számú NOS-t tartalmazó idegsejttest ábrázolódott. (250x-es nagyítás)

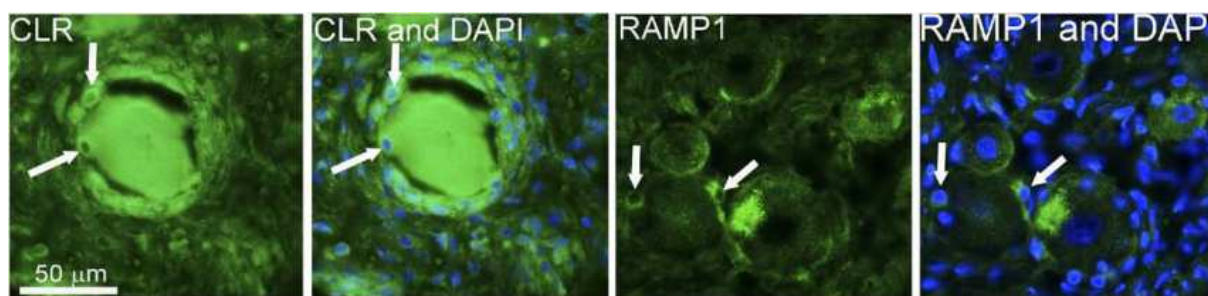
Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, ir: immunreaktivitás, NOS: nitrogén-oxid-szintetáz, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, SP: P-anyag, TRIG: ganglion trigeminale



3. ábra. A calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP), a calcitonin receptor-szerű receptor (CLR) és a receptor aktivitást befolyásoló protein1 (RAMP1) kifejeződése a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)

A CGRP elsősorban a kicsiny és a közepes méretű neuronokban, míg a CLR és a RAMP1 a nagy méretű neuronokban jelent meg a humán TRIG-ban (nyilak).

Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, CLR: calcitonin receptor-szerű receptor, RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1, TRIG: ganglion trigeminale



4. ábra. A calcitonin receptor-szerű receptor (CLR) és a receptor aktivitást befolyásoló protein1 (RAMP1) kifejeződése a satellita glia sejteken (SGC) a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)

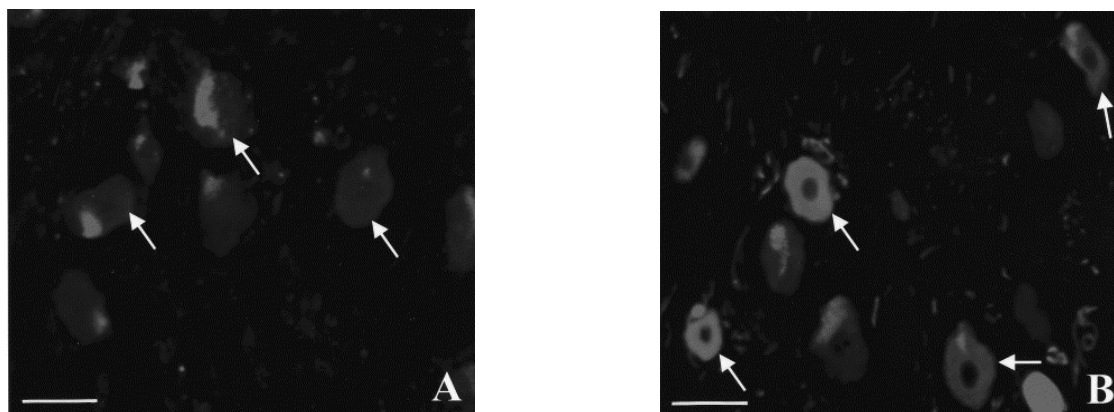
A satellita glia sejtek körbevették a neuronokat és CLR és RAMP1 kifejeződést mutattak (nyilak). A magfestés (DAPI) jelezte, hogy a receptor komponensek a satellita glia sejtek plazmájában találhatóak (nyilak).

Rövidítések: CLR: calcitonin receptor-szerű receptor, RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1, SGC: satellita glia sejt, TRIG: ganglion trigeminale

1. táblázat. A humán ganglion trigeminale-ban (TRIG) az immunreaktív neuronok százalékos megoszlása

Neuropeptidek és receptorok	Immunreaktív neuronok százalékos megoszlása (%)
CGRP	45
PACAP	20
SP	18
NOS	15
C-PON	0
5-HT _{1B} receptor	40
5-HT _{1D} receptor	44
VR ₁	16
Nociceptin	70
HO-2	60
BVR	40
CLR	37
RAMP1	36

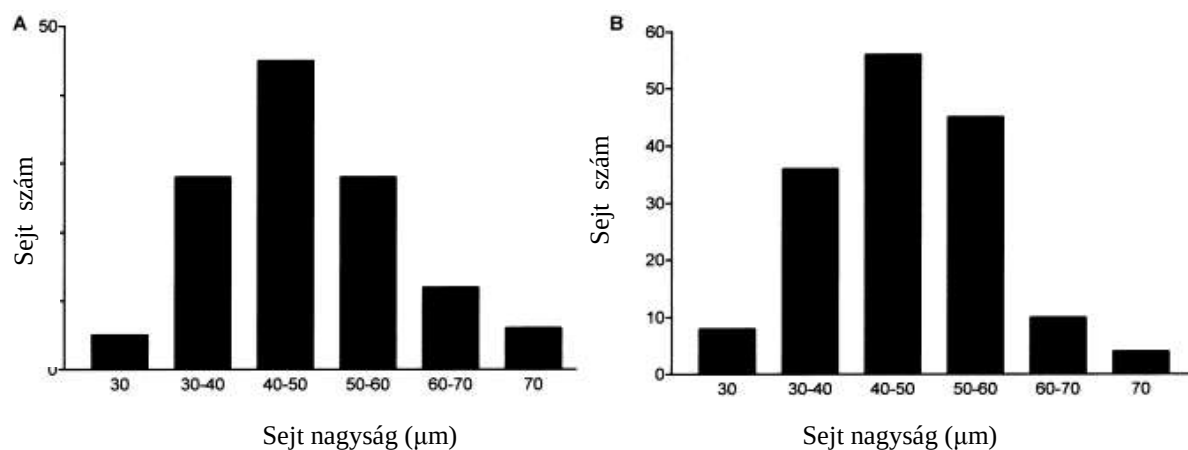
Rövidítések: BVR: biliverdin reduktáz, CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, CLR: calcitonin receptor-szerű receptor, C-PON: neuropeptid Y C-terminális flanking peptidje, HO-2: hem-oxigenáz-2, 5-HT_{1B}: 5-hydroxy-triptamin_{1B}, 5-HT_{1D}: 5-hydroxy-triptamin_{1D}, NOS: nitrogén-oxid-szintetáz, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1, SP: P-anyag, TRIG: ganglion trigeminale, VR₁: vanilloid receptor1



5. ábra (A, B). Immunfluoreszcens reakció az 5-hydroxy-triptamin_{1B} (5-HT_{1B}) és az 5-hydroxy-triptamin_{1D} (5-HT_{1D}) receptor immunreaktív (ir) sejtek kimutatására a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)

A nyilak az 5-HT_{1B}-ir (A) és az 5-HT_{1D}-ir (B) neuronokra mutatnak. A lipofukszin granulomoknak erőteljes autofluoreszcenciája is látható. (Kalibráció = 50 µm)

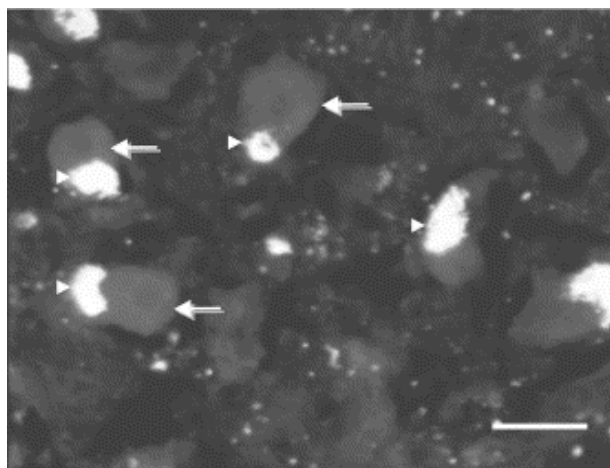
Rövidítések: 5-HT_{1B}: 5-hydroxy-triptamin_{1B}, 5-HT_{1D}: 5-hydroxy-triptamin_{1D}, ir: immunreaktív, TRIG: ganglion trigeminale



6. ábra (A, B). Az 5-hydroxy-triptamin_{1B/1D} (5-HT_{1B/1D}) receptor immunreaktív sejtek nagyságának mennyiségi meghatározása a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)

Az X-tengely mutatja a sejtek nagyságát μm-ben, az Y-tengely jelöli a sejtek számát. A sejtátmérőn a sejttagon átvezetett leghosszabb egyenest tekintettük. (A) 5-HT_{1B} receptor-ir sejtek, (B) 5-HT_{1D} receptor-ir sejtek. A sejt számot a hat páciensből készített metszetek összességéből kaptuk, mindegyik kísérlet azonos eredménye mellett.

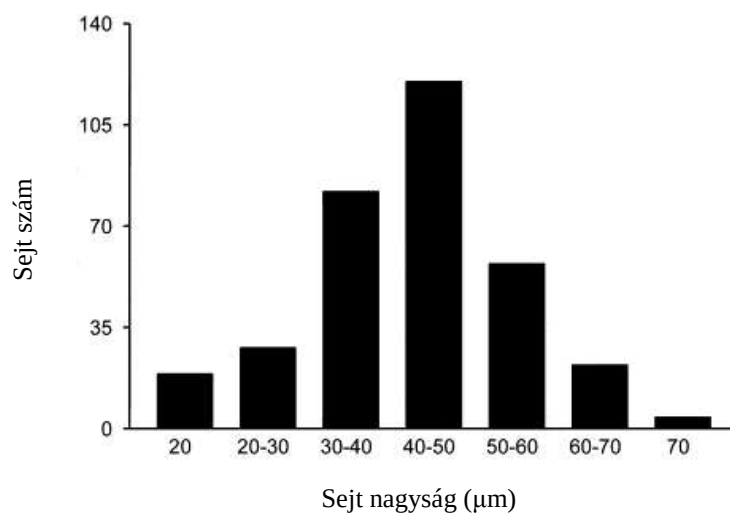
Rövidítések: 5-HT_{1B}: 5-hydroxy-triptamin_{1B}, 5-HT_{1D}: 5-hydroxy-triptamin_{1D}, ir: immunreaktív, TRIG: ganglion trigeminale



7. ábra. Immunfluoreszcens reakció a nociceptin kimutatására a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)

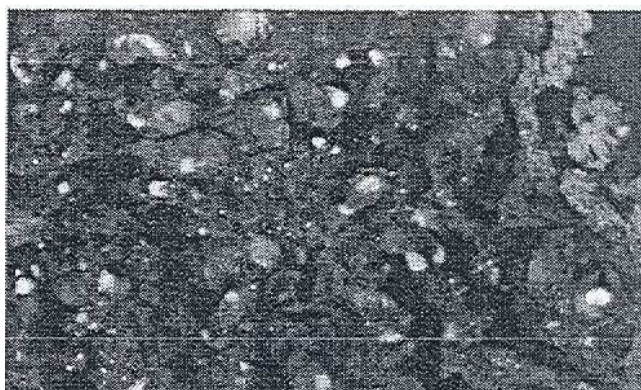
A nyilak jelzik a nociceptin-ir neuronokat a humán TRIG-ban. (Kalibráció = 50 μm)

Rövidítések: ir: immunreaktív, TRIG: ganglion trigeminale



8. ábra. A nociceptin immunreaktív sejtek nagyságának mennyiségi meghatározása a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)

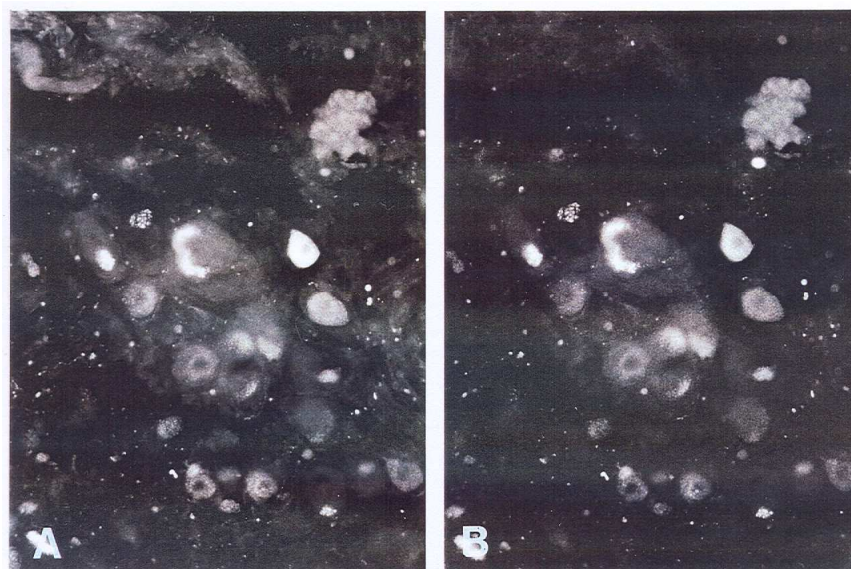
Az X-tengely mutatja a sejtek nagyságát μm -ben, az Y-tengely jelöli a sejtek számát. A sejtátmérőn a sejtmagon átvezetett leghosszabb egyenest tekintettük. A sejt számot a négy páciensből készített metszetek összességéből kaptuk, mindegyik kísérlet azonos eredménye mellett.



9. ábra. Immunfluoreszcens reakció a hem-oxigenáz-1 (HO-1) kimutatására a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)

Igen gyenge HO-1-ir látható a humán TRIG-ban.

Rövidítések: HO-1: hem-oxigenáz-1, ir: immunreaktív, TRIG: ganglion trigeminale



10. ábra (A, B). Kettős immunfestés a calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP) (A) és a nitrogén-oxid-szintetáz (NOS) (B) vonatkozásában a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)

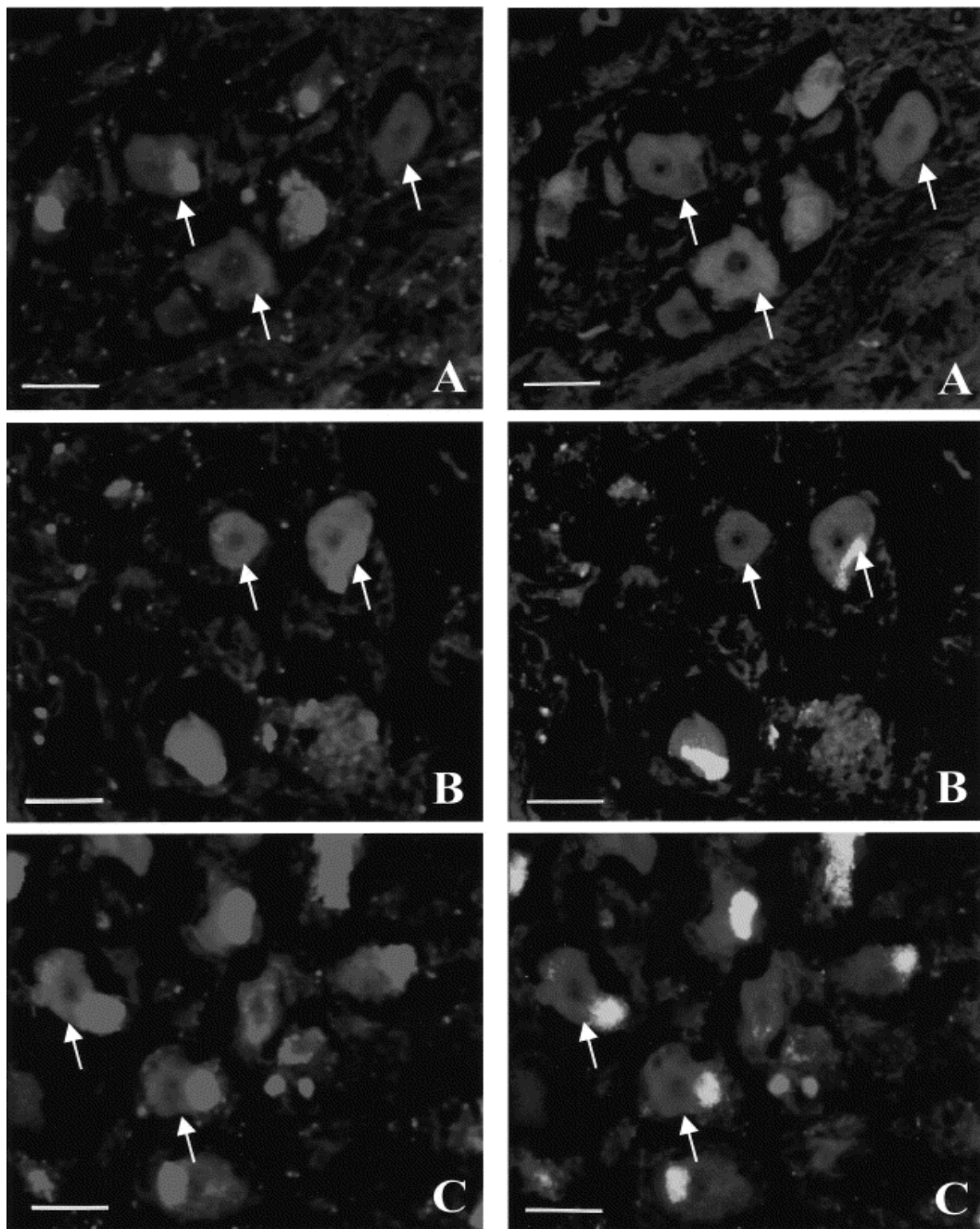
Az illusztráció mutatja a CGRP-ir idegsejttesteket, melyek NOS-t is tartalmaznak. (250x-es nagyítás).

Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, ir: immunreaktív, NOS: nitrogén-oxid-szintetáz, TRIG: ganglion trigeminale

2. táblázat. A humán ganglion trigeminale (TRIG) immunreaktív neuronjaiban neuropeptid és receptor ko-lokalizáció

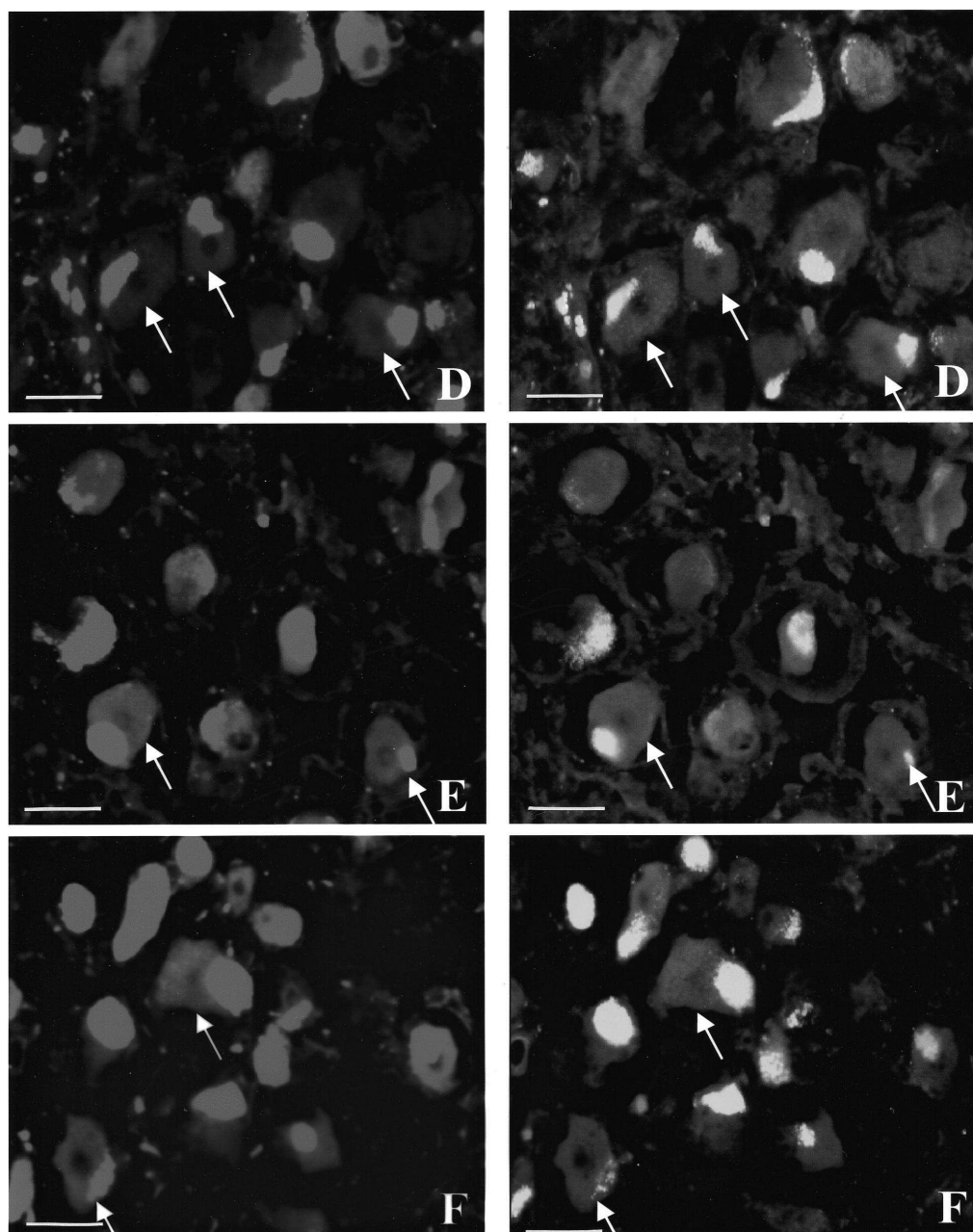
Neuropeptidek és receptorok	Ko-lokalizáció	Kettős immunreaktivitást adó neuronok százalékos aránya (%)
CGRP	5-HT _{1B} receptor	65
	5-HT _{1D} receptor	89
5-HT _{1B} receptor	SP	94
	NOS	86
5-HT _{1D} receptor	SP	95
	NOS	83
VR ₁	CGRP	10
	SP	8
	NOS	5
Nociceptin	CGRP	61
	SP	54
	NOS	50
HO-2	CGRP	40
BVR	CGRP	30

Rövidítések: BVR: biliverdin reduktáz, CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, HO-2: hem-oxigenáz, 5-HT_{1B}: 5-hydroxy-triptamin_{1B}, 5-HT_{1D}: 5-hydroxy-triptamin_{1D}, NOS: nitrogén-oxid-szintetáz, SP: P-anyag, TRIG: ganglion trigeminale, VR₁: vanilloid receptor1



11. ábra (A, B, C). Az 5-hidroxy-triptamin_{1B} (5-HT_{1B}) és az 5-hidroxy-triptamin_{1D} (5-HT_{1D}) receptoroknak a ko-lokalizációja a neuropeptidekkel és a nitrogén-oxid-szintetáz-zal (NOS) a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)

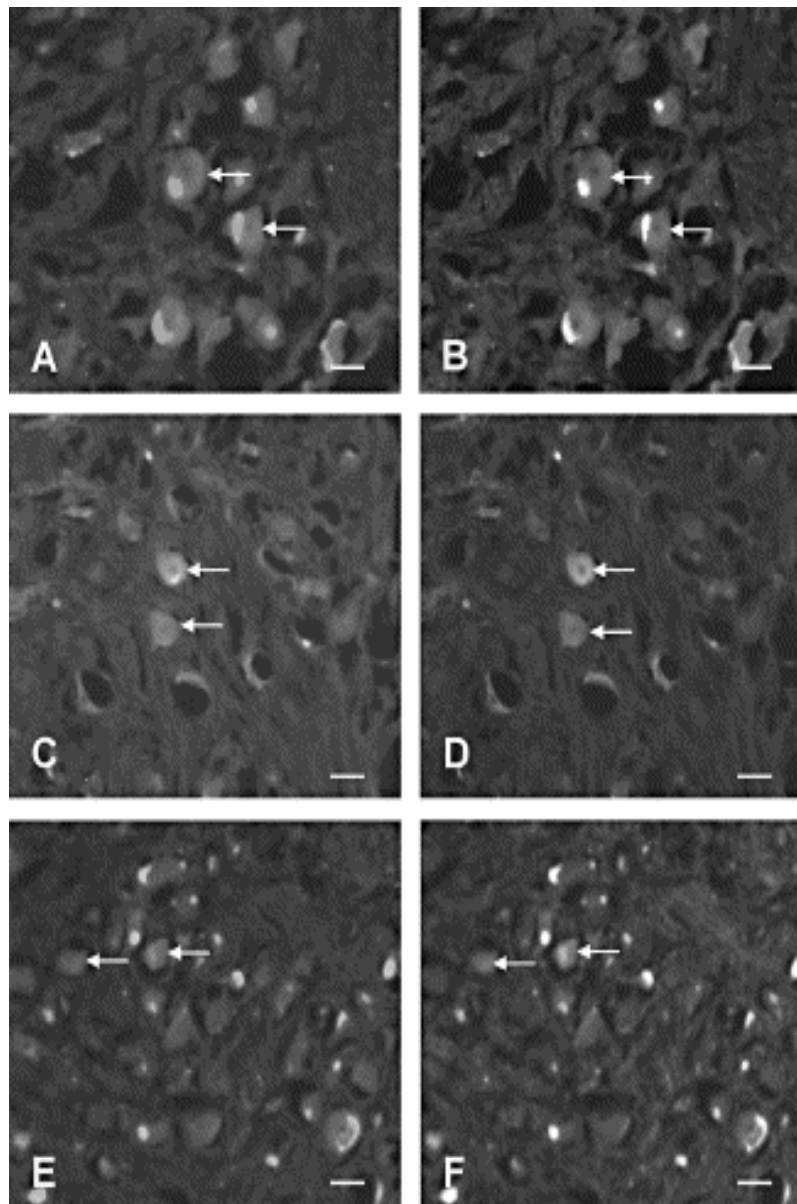
(A) az 5-HT_{1B} receptor ko-lokalizációja a CGRP-del; (B) az 5-HT_{1B} receptor ko-lokalizációja SP-gal; (C) az 5-HT_{1B} receptor ko-lokalizációja a NOS-zal. A nyilak 5-HT_{1B} receptor-ir sejteket jelölnek, melyek CGRP, SP vagy NOS-t tartalmaznak. (Kalibráció = 50 μm)
 Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, 5-HT_{1B}: 5-hidroxy-triptamin_{1B}, 5-HT_{1D}: 5-hidroxy-triptamin_{1D}, ir: immunreaktív, NOS: nitrogén-oxid-szintetáz, SP: P-anyag, TRIG: ganglion trigeminale



12. ábra (D, E, F). Az 5-hydroxy-triptamin_{1B} (5-HT_{1B}) és az 5-hydroxy-triptamin_{1D} (5-HT_{1D}) receptoroknak a ko-lokalizációja a neuropeptidekkel és a nitrogén-oxid-szintetáz-zal (NOS) a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)

(D) az 5-HT_{1D} receptor ko-lokalizációja CGRP-del; (E) az 5-HT_{1D} receptor ko-lokalizációja SP-gal; (F) az 5-HT_{1D} receptor ko-lokalizációja NOS-zal. A nyilak 5-HT_{1D} receptor-ir sejteket jelölnek, melyek CGRP, SP vagy NOS-t tartalmaznak. (Kalibráció = 50 µm)

Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, 5-HT_{1B}: 5-hydroxy-triptamin_{1B}, 5-HT_{1D}: 5-hydroxy-triptamin_{1D}, ir: immunreaktív, NOS: nitrogén-oxid-szintetáz, SP: P-anyag, TRIG: ganglion trigeminale

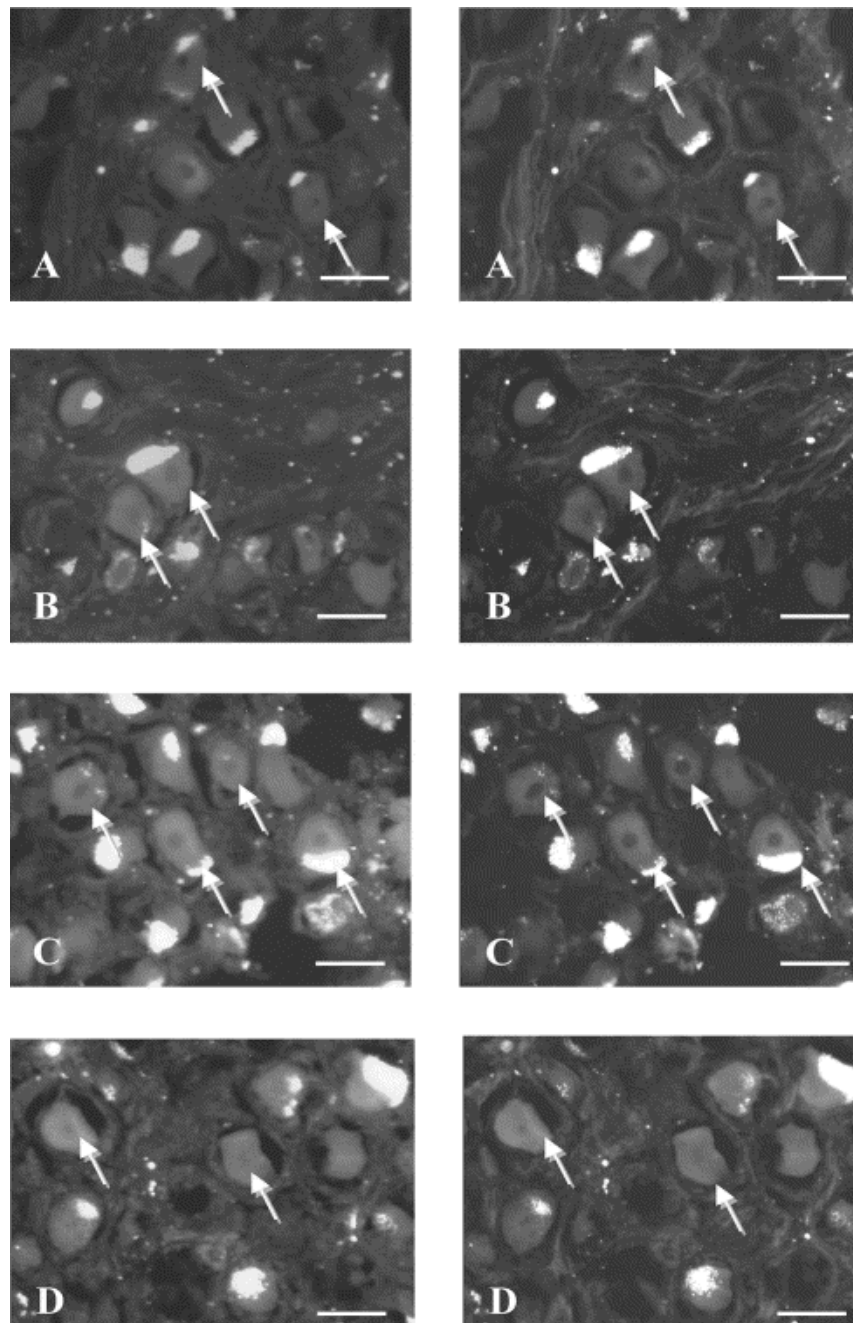


13. ábra (A, B, C, D, E F). Immunfluoreszcens reakció a vanilloid receptor1 (VR₁) kimutatására és ko-lokalizációjára a calcitonin génnel-rokon peptiddel (CGRP), P-anyaggal (SP) és a nitrogén-monoxid-szintetázzal (NOS) a humán ganglion trigeminaleban (TRIG)

A bal oldali sor mutatja a VR₁-ir neuronokat (nyíl), és a jobb oldali sorban lehet megfigyelni ugyanazon metszetekben a ko-lokalizációt. (A) a VR₁ ko-lokalizációja a CGRP-del (B); (C) a VR₁ ko-lokalizációja a SP-gal (D); (E) a VR₁ ko-lokalizációja a NOS-zal (F). A nyilak mutatják, ahol a VR₁ jelen van a sejtekben, melyek CGRP, SP és NOS tartalmúak.

(Kalibráció = 50 µm)

Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, NOS: nitrogén-oxid-szintetáz, SP: P-anyag, VR₁: vanilloid receptor1, TRIG: ganglion trigeminale

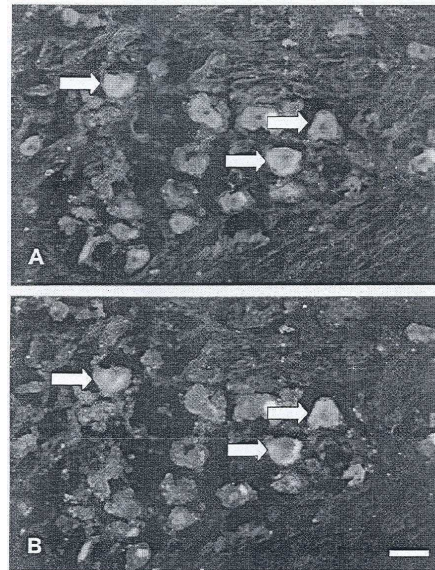


14. ábra (A, B, C, D). Kettős immunfestés a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)

A bal oldali sor mutatja a nociceptin – irt, még a jobb oldali sor a ko-lokalizációt: (A) a nociceptin ko-lokalizációja a CGRP-del; (B) a nociceptin ko-lokalizációja a SP-vel; (C) a nociceptin ko-lokalizációja a NOS-sal; (D) a nociceptin ko-lokalizációja a PACAP-del. A nyilak jelzik a nociceptin – ir sejteket, melyek CGRP, SP, NOS és PACAP tartalmúak.

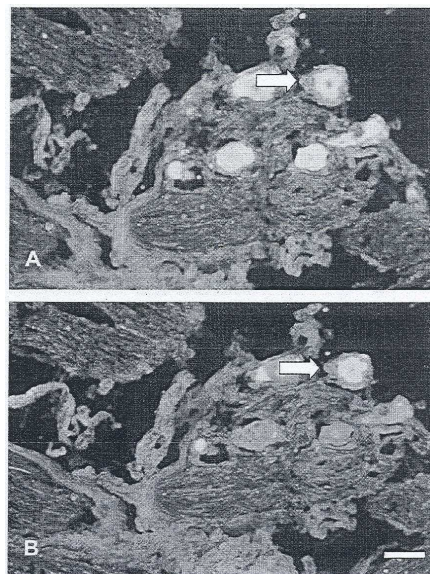
(Kalibráció = 50 μ m)

Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, ir: immunreaktivitás, NOS: nitrogén-oxid-szintetáz, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, SP: P-anyag, TRIG: ganglion trigeminale



15. ábra (A, B). Kettős immunfluoreszcens reakció a hem-oxigenáz-2 (HO-2) és a calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP) ko-lokalizációjára a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)

Jól megfigyelhető a HO-2 (A) ko-lokalizációja a CGRP-del (B) (nyilak). (Kalibráció: 50 μ m)
 Rövidítések: HO-2: hem-oxigenáz-2, CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, TRIG: ganglion trigeminale

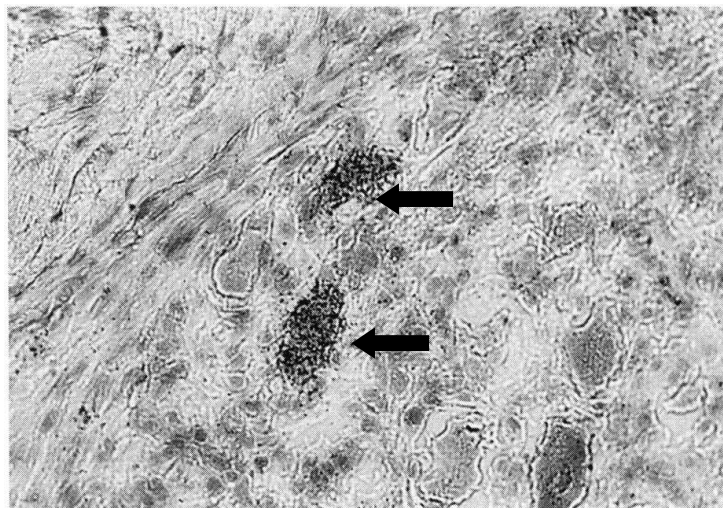


16. ábra (A, B). Kettős immunfluoreszcens reakció a biliverdin reduktáz (BVR) és a calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP) ko-lokalizációjára a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)

Jól megfigyelhető a BVR (A) ko-lokalizációja CGRP-del (B) (nyíl). (Kalibráció: 50 μ m)
 Rövidítések: BVR: biliverdin reduktáz, CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, TRIG: ganglion trigeminale

In situ hibridizáció

A TRIG sejtjeinek nagy hányadában, különösen a citoplazmában volt megfigyelhető a CGRP mRNS jelenléte. Ezek a sejtek kicsiny és közepes nagyságúak voltak és a neuronok egyharmadát képezték (**17. ábra**).



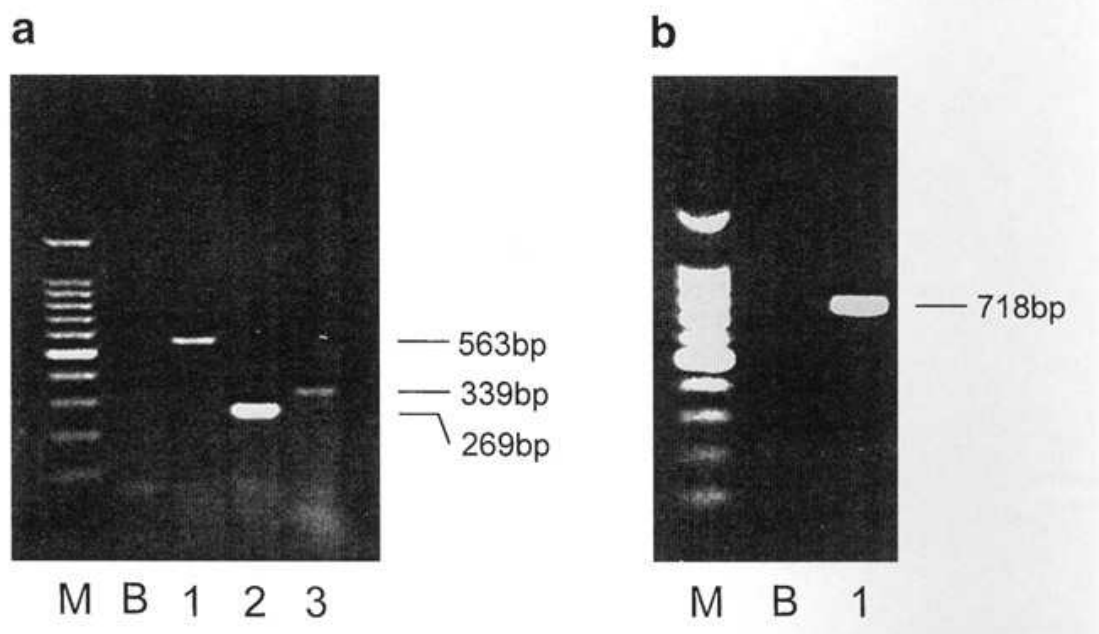
17. ábra. A humán ganglion trigeminale (TRIG) *in situ* hibridizációja

A sejttestek citoplazmájában megfigyelhető a CGRP mRNS reakciója (nyilak). (250x-es nagyítás)

Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, mRNS: hírvivő ribonukleinsav, TRIG: ganglion trigeminale

Receptor mRNS analízis (RT-PCR-val, agaróz gél elektroforézis)

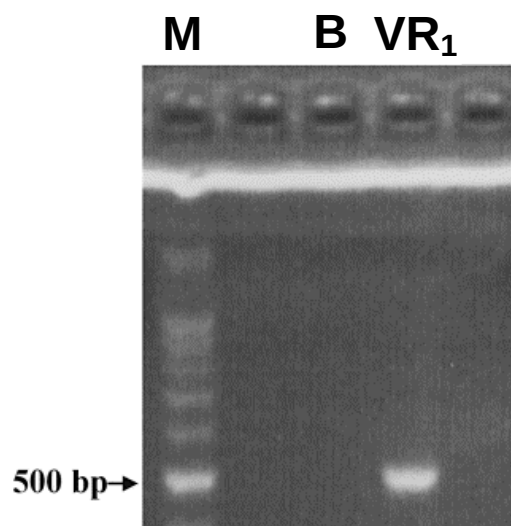
A PCR produktum gél elektroforézise egyetlen csíkot adott a várt régióban. Semmiféle jelet nem tapasztaltunk a negatív kontrollnál. A szekvencia analízis kimutatta, hogy nincs különbség a publikált szekvenciák között. Ezek alapján demonstráltuk humán neuropeptid Y Y₁ receptor (NPY Y₁) (563 bázispár, bp), VIP₁ (269 bp), CGRP₁ (339 bp), neuropeptid Y Y₂ receptor (NPY Y₂) (718 bp) (**18. ábra a, b**), VR₁ (504 bp) (**19. ábra**) és nociceptin (520 bp) (**20. ábra**) receptor mRNS jelenlétét az összes tanulmányozott humán TRIG-ban.



18. ábra (a, b). Neuropeptid Y Y₁, Y₂ (NPY Y₁, Y₂), vasoactiv intestinalis polipeptid₁ (VIP₁) és calcitonin génnel-rokon peptid₁ (CGRP₁) receptor mRNS analízis a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG)

Mindegyik vonal jelzi a végső RT-PCR terméket, mely 1 µg teljes cellaris RNS-ből lett képezve. Negatív kontrollként a reakcióban el lett hagyva a reverz transzkriptáz fázis, melyet a „B” oszlop jelöl. Promega 100 bp DNS (Promega, SDS, Svédország) volt futtatva a pontos molekuláris nagyság meghatározása céljából („M” oszlop). (a) Az NPY Y₁ (1. oszlop, 563 bp), a VIP₁ (2. oszlop, 269 bp), a CGRP₁ (3. oszlop, 339 bp). (b) Az NPY Y₂ (1. oszlop, 718 bp).

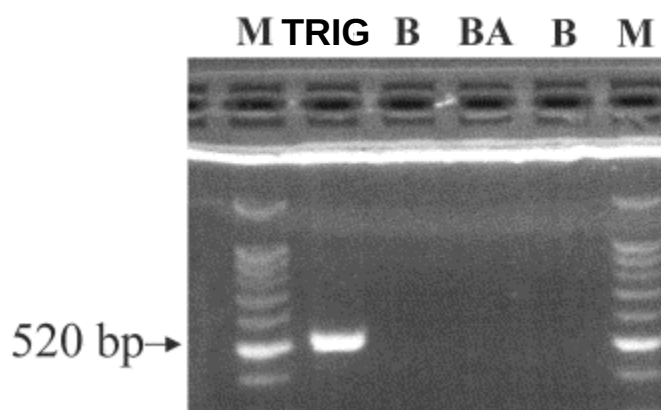
Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, DNS: deoxiribonukleinsav, mRNS: hírvivő ribonukleinsav, NPY Y₁: Neuropeptid Y Y₁ receptor, NPY Y₂: Neuropeptid Y Y₂ receptor, RT-PCR: reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció, TRIG: ganglion trigeminale



19. ábra. Capsaicin (vanilloid) receptor1 (VR₁) mRNA analízis a humán gaglion trigeminale-ban (TRIG)

Az RT-PCR termék gél elektroforézise demonstrálta a capsaicin receptor mRNA jelenlétét a humán TRIG-ban. Egy csík jelent meg a várt régióban (504 bp), mely detektálta a VR₁-t, míg nem kaptunk látható szignált a vak reakcióban (H₂O, „B” oszlop). Promega 100 bp DNS (Promega, SDS, Svédország) volt futtatva a pontos molekuláris nagyság meghatározása céljából („M” oszlop).

Rövidítések: mRNA: hírvivő ribonukleinsav, RT-PCR: reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció, reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció, TRIG: ganglion trigeminale, VR₁: capsaicin (vanilloid) receptor1



20. ábra. Nociceptin receptor mRNA analízis a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG) és az arteria basilarisban

Az RT-PCR termék gél elektroforézise demonstrálta a nociceptin receptor mRNA jelenlétét a humán ganglion trigeminale-ban (TRIG), míg nem mutatta jelét a humán arteria basilarisban (BA). Egy csík jelent meg a várt régióban (520 bp), míg nem kaptunk látható szignált a vak reakcióban (H₂O, „B” oszlop). Promega 100 bp DNS (Promega, SDS, Svédország) volt futtatva a pontos molekuláris nagyság meghatározása céljából („M” oszlop).

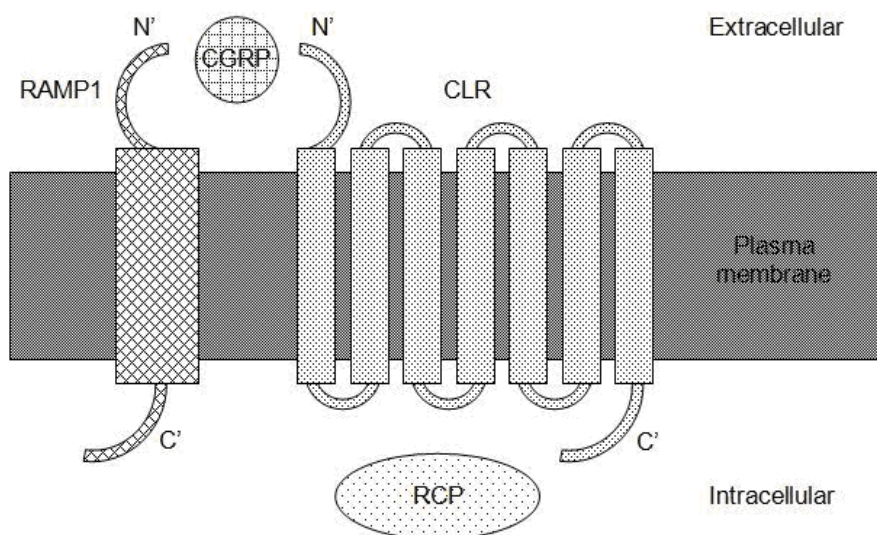
Rövidítések: BA: arteria basilaris, DNS: deoxiribonukleinsav, mRNA: hírvivő ribonukleinsav, RT-PCR: reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció, TRIG: ganglion trigeminale

3.1.4. Megfigyeléseink jelentősége

- Kimutattuk humán TRIG-ban a CGRP megoszlását és a CGRP receptorok (CGRP-R) jelenlétét. Megfigyeléseink esélyt jelentenek az új típusú migrén ellenes gyógyszerek (CGRP-R antagonisták, CGRP elleni antitest és CGRP-R elleni antitest) intraganglionáris hatására.

A CGRP 37 aminosavból álló peptid, melyet 1982-ben fedeztek fel (Amara et al. 1982). Ugyanarról, a calcitonin génről (11-es kromoszóma) alternatív íródik le – két elkülönülő mRNS kódolásával – és ennek megfelelően vagy calcitonin (hormon) vagy CGRP (neuropeptid) keletkezik (Amara et al. 1982; Rosenfeld et al. 1983). A CGRP elsősorban neuronális eredetű szövetekben, míg a calcitonin a glandula thyreoidea C-sejtjeiben expresszálódik (Rosenfeld et al. 1983; Rosenfeld et al. 1984), közöttük keresztreakció nem ismert (Dennis et al. 1991). Két endogén CGRP izoformot azonosítottak az α - és a β -CGRP-t (Amara et al. 1985). Az előbbi elsősorban az idegrendszerben, az utóbbi a gastrointestinalis traktusban fordul elő. Immunhisztokémiai vizsgálatok kísérleti állatokban kimutatták, hogy a CGRP a legáltalánosabban előforduló neuropeptid az érző neuronokban (Rosenfeld et al. 1983; Ju et al. 1987; Hökfelt et al. 2000). Vizsgálataink szerint a humán TRIG neuronjainak 40%-a CGRP-ir-t mutat. Ezen megállapítást megerősítettük *in situ* hibridizációval, mely kimutatta a CGRP mRNS-at tartalmazó idegsejtesteket (Tajti et al. 1999). A CGRP migrénben betöltött szerepének fontosságát a korábbiak mellett (a TRIG elektromos ingerlését követően, valamint spontán migrénes rohamban emelkedett CGRP koncentráció a véna juguláris internából nyert plazmában) azon megfigyelés is erősítette, hogy iv. CGRP adását követően migrénesekben (10 betegből 8-ban) aura nélküli migrénes roham alakult ki (Lassen et al. 2002). Szublingvális nitroglycerinnel (NTG) provokált migrén roham során a cubitális vénából vett plazmában emelkedett CGRP koncentrációt találtak (Juhász et al. 2003). A megnövekedett CGRP koncentráció a roham időtartamával és intenzitásával korrelációt mutatott (Juhász et al. 2003). Spontán migrénes rohamban a sumatriptan (Goadsby and Edvinsson 1993) vagy a rizatriptan (Stepien et al. 2003) adását követően az emelkedett CGRP koncentráció normalizálódott. NTG-nel kiváltott rohamban alkalmazott sumatriptan hatására a CGRP koncentráció csökkenés a fájdalom intenzitásának a mérséklődésével parallel következett be (Juhász et al. 2005). Napjainkban erőteljes innovatív gyógyszeripari és klinikai vizsgálatok folynak a CGRP elleni antitestek terápiás bevezetése céljából. A már lezajlott fázis I-es és fázis II-es vizsgálatok alapján hatékony migrén profilaktikus gyógyszerek körvonalazódnak (Bigal et al. 2014; Vécsei et al. 2014/a; Vécsei et al. 2015/a; Edvinsson 2015, Tajti et al. 2015/a; Karsan and Goadsby 2015). A CGRP hatását specifikus receptorokon keresztül fejti ki. Korábban a humán TRIG-ban (igen kevés esetszám) CGRP-R₁

mRNS jelenlétét demonstrálták (Edvinsson et al. 1997). Szisztematikusan végrehajtott vizsgálatainkban a humán TRIG-ban CGRP-R₁ mRNS jelenlétét igazoltuk (Tajti et al. 1999). Az „Internation Union of Pharmacology” (Nemzetközi Farmakológiai Egyesület) meghatározása alapján a CGRP-R₁ funkcionálisan három protein működéséből tevődik össze: (a) CLR, mely hét transzmembrán protein egységből áll és a ligandkötő helyet formálja a (b) RAMP1-gyel, mely a receptor specificitását adja, és a harmadik egység (c) a CGRP-R komponens protein (RCP), mely a receptor intracellularis jelútját biztosítja (McLatchie et al. 1998; Evans et al. 2000; Heroux et al. 2007; Hay et al. 2008) **(21. ábra)**. Megfigyeltük, hogy humánban a TRIG-ban a CLR/RAMP1 a nagyméretű neuronokban (37% CLR, 36% RAMP1 aktivitást adott) és a satellita gliasejtekben (SGC), valamint a ganglionon belüli erek simaizomrétegében helyezkedik el (Eftekari et al. 2010). A CGRP-R elleni ellenanyagok nagy molekulák, így nem vagy csak igen kis mértékben jutnak át hatékony koncentrációban a vér-agy gáton (Edvinsson 2015). A TRIG a vér-agy gáton kívül helyezkedik el, így a farmakon kedvező hatásából arra az újszerű tényre lehetett következtetni, hogy a TRIG, mint perifériás idegrendszeri támadáspont alapvető szerepet fog kapni a közeljövőben a migrén terápiájában (Edvinsson 2015). Továbbá magyarázatul szolgálhatnak eredményeink arra, hogy a gepántok (CGRP-R antagonisták) a migrén rohamellenes hatásukat miként tudják a központi idegrendszeren kívül, így a TRIG-ban elhelyezkedő receptorokon hatva kifejteni (Ho et al. 2010; Eftekari et al. 2015; Edvinsson 2015).



21. ábra. A funkcionális calcitonin génrel-rokon peptid (CGRP) receptor vázlata

(hivatkozás: Vécsei et al. 2015)

Rövidítések: CGRP: calcitonin génrel-rokon peptid, CLR: calciton receptor-szerű receptor, RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1, RCP: CGRP-R komponens protein

- Felhívtuk a figyelmet, hogy a PACAP humánban fellelhető a szenzoros TRIG-ban. A PACAP-et először 1989-ben izolálták juhok hypothalamusából (Miyata et al. 1989; Arimura 2007). Két biológiailag aktív formája ismert, a 38 (PACAP-38) és a 27 (PACAP-27, a C-végződésen csonkított) aminosavat tartalmazó vegyület (Miyata et al. 1990; Vaudry et al. 2009). A génje a 18-as kromoszóma rövid karjára lokalizálódik (Kimura et al. 1990). A PACAP gén, amit számos fajban klónoztak öt exont és négy intront tartalmaz. A humán PACAP-38 kódolása az ötös exonon történik (Hosoya et al. 1992). A PACAP az egyik tagja a VIP-secretin-glukagon-növekedési hormon felszabadító hormon (GHRH) neurohormon-peptid családnak (Christophe 1993; Harmor and Lutz 1994; Laburthe et al. 1996). A PACAP 68%-ban homológ a sertés VIP-del, de ezerszer erőteljesebben stimulálja az adenilát-cikláz aktivitását patkány hipofízis elülső lebenyének sejt kultúráiban (Arimura 1992; Arimura and Shioda 1995). A PACAP mindkét formája G-fehérje kapcsolt receptorokon keresztül fejti ki hatását: VPAC₁ (VIP receptor1 vagy PACAP receptor2) és VPAC₂ (VIP receptor2 vagy PACAP receptor3), valamint specifikus célpontja a PAC₁ (Laburthe et al. 2007; Vaudri et al. 2009; Schytz et al. 2010). *In situ* hibridizációs és immunhisztokémiai metodikákkal mind a szenzoros, mind a parasympathicus ganglionokban (Mulder et al. 1994; Mulder et al. 1995), a capsaicin érzékeny elsődleges érző afferensekben (C-rost) (Mulder et al. 1994), a thoracolumbalis gerincvelő intermediolaterális magcsoportjában (sympathicus preganglionaris neuronok) (Beaudet et al. 1996) a PACAP expressziója detektálható volt (Mulder et al. 1994; Mulder et al. 1995), mely arra a következtetésre vezetett, hogy a PACAP jelentős szerepet játszik, mint neuromodulátor a szenzoros és az autonóm idegrendszerben (Moller et al. 1993). A PACAP-ir idegrostok kimutathatók voltak a cerebrális erek környezetében (Uddman et al., 1993/a; Edvinsson et al. 2001). Demonstrálták, hogy dilatálja a cerebrális arteriákat (Uddman et al. 1993/a; Tong et al. 1993; Anzai et al. 1995) és növeli a cerebrális vérátáramlást (Seki et al. 1995/a; Seki et al. 1995/b). Tanulmányaink alapján a humán TRIG-ban a neuronok mintegy 20%-a mutatott PACAP-ir-t. Ekkor még csak feltételeztük, hogy a PACAP szerepet játszik a trigemino-vascularis rendszer aktivitásában. Ezt későbbi vizsgálataink igazolták (Markovics et al. 2012; Tuka et al. 2012; Tuka et al. 2013). Jelenleg a neuropeptidek közül a PACAP a CGRP-del osztozik az elsődlegességen a migrén kórfolyamatát és a fejfájás intenzitását befolyásoló tényezők között (Vécsei et al. 2014/b; Zagami et al. 2014).
- Megfigyeltük a sympathicus rendszerre jellegzetes NPY Y₁ és Y₂ receptorok, valamint a VIP receptor1 mRNS jelenlétét a TRIG-ban, mely felvetette az autonóm rendszer befolyását a szenzoros funkciókra.

A NPY 36 aminosavból álló peptid, melyet először sertés agyából izoláltak (Tatemoto et al. 1982). Mivel az N és C végződésén tyrosint tartalmaz (rövidítése Y), valamint utalva az idegrendszeri eredetre kapta elnevezését. Egy családba tartozik (Larhammar 1996) a pankréász polipeptiddel és a peptid YY-nal (Tatemoto and Mutt 1980). A NPY családba sorolt összes receptor (Y_1 - Y_6) G-proteinhez csatolt családkhoz tartozik (Blomquist and Herzog 1997). Az Y_1 és Y_2 receptorokat klónozták és számos fajból, így emberből is izolálták (Rose et al., 1995; Blomquist and Herzog, 1997). Eredetileg a NPY Y_1 receptort postsynapticusnak, míg az Y_2 receptort presynapticusan elhelyezkedőnek tekintették (Wahlestedt et al., 1986). A NPY jelentős szerepet játszik a cerebrális vérkeringés szabályozásában (Edvinsson et al. 1983; Edvinsson et al. 1987/a), az Y_1 és Y_2 receptorok útján. RT-PCR és *in situ* hibridizációs vizsgálatokkal kimutatták az Y_1 receptor jelenlétét humán agyi ereken és a funkcionális vizsgálatok utaltak Y_2 receptorokra is (Nilsson et al. 1996; Abounader et al. 1999). Nem találtak utalást az Y_3 , az Y_4 , az Y_5 és az Y_6 receptorok cerebrális ereken történő expressziójára (Abounader et al. 1999). Munkánk során mind az Y_1 , mind az Y_2 mRNS előfordulását figyeltük meg a humán TRIG-ban. A sympathicus rendszer befolyását mutatták ki a trigemino-vascularis rendszerre patkányban. Sympathectomiát követően a cerebrális erekben és a TRIG-ban emelkedett CGRP szintet mértek (Schon et al., 1985). Ezek alapján feltételezhető a NPY hatása a trigemino-vascularis rendszerre és ez egyben támogatja azt a feltételezést, hogy a szenzoros funkciókat a sympathicus rendszer modulálja.

A VIP 28 aminosavból álló peptid, melyet eredetileg sertés vékonybélből izolálták (Said and Mutt 1970; Said 1984). A VIP egyik tagja azon peptid-hormon családnak, melyhez tartozik még a szerkezeti hasonlóság miatt a PACAP, a peptid histidin izoleucin (PHI), a peptid histidin methionin (PHM), a glukagon, a secretin és a GHRH (Vaudry et al. 2000). A PHM a PHI humán megfelelője. Az első immunhisztokémiai vizsgálatokat, melyek kimutatták a VIP jelenlétét a cerebrális perivascularis idegrostokban (Larsson et al. 1976) funkcionális vizsgálatok sora követett, melyek igazolták, hogy a VIP mind a cerebrális, mind a perifériás artériákban dilatációt hozott létre (McCulloch et al. 1980; Wei et al. 1980; Wilson et al. 1981; Duckles and Said 1982; Lee et al. 1984). Macskában a TRIG elektromos ingerlését követően emelkedett cerebrális vérátáramlást figyeltek meg, a n. facialis egyik ágán a n. petrosus majoron át VIP szabadult fel, mely kiváltotta ezt a folyamatot (May and Goadsby 1999). Receptorai korábban VIP_1 és VIP_2 néven voltak ismertek. A jelenlegi nevezéktanban – a PACAP rokonság miatt – $VPAC_1$ és $VPAC_2$ elnevezést kapták (Harmar et al. 1998). A VIP/PACAP körhöz tartozik még a PAC_1 receptor, melynek a $PACAP_{3-38}$ és a $PACAP_{6-27}$ szelektív antagonistái (Harmar et al. 1998; Vaudry et al. 2000). Mindhárom receptor altípus

G-proteinhez kapcsolt és elsődlegesen az adenilát-cikláz aktivitását hozzák létre, továbbá befolyásolják a foszfoinozitol átalakulását a Ca^{2+} mobilizálást, és a K^{+} -ioncsatorna működését (Edvinsson and Krause 2002). A piális arteriolák simaizomsejtein VPAC_1 receptorokat mutattak ki, melyek a ciklikus adenosin-monofoszfát stimulációja útján hozzák létre a vazodilatációt (Zhang et al. 1991; Fahrenkrug et al. 2000). A VIP_1 receptor számos perifériás szövetben előfordul és felismerésre került a VIP és a PACAP hasonló affinitása a receptorhoz (Sreedharan et al. 1993). Munkánk során megfigyeltük a VIP_1 receptor mRNS jelenlétét a humán TRIG-ban. Ez különösen érdekes abból a szempontból, hogy VIP felszabadulását figyelték meg a nyálban és a vérkeringésben migrénes, cluster fejfájós és krónikus paroxizmális hemicraniás betegek fejfájás rohama során, feltételezhetően a szenzoros és a parasymphicus rendszer egymásra hatásaként (Goadsby and Edvinsson 1994; Goadsby and Edvinsson 1996; Bellamy et al. 2006).

3.2. *Neuropeptid és mRNS megoszlás vizsgálata patkány ganglion trigeminale (TRIG) szervkultúrájában. A migrén krónicizálódásának magyarázata*

3.2.1. Háttér

A migrénes betegek életvitelét nagymértékben megnehezíti, életminőségét rontja, ha a migrén krónicizálódik és létrejön a krónikus migrén (Autret et al. 2010; Lantéri-Minet et al. 2011). Krónikus migrén alatt azt értjük, ha egy hónap alatt a betegnek 15 fejfájása van, melyek közül legalább 8 migrénes jellegzetességeket mutat, és 3 egymást követő hónapban ez megismétlődik (Headache Classification Committee of the International Headache Society 2013). Ennek hátterében precipitáló tényezőként ismétlődő vagy hosszantartó stressz helyzeteket is megfigyeltek (Sauro and Becker 2009; Hedborg et al. 2011; Ashina et al. 2012). A stresszel terhelt életesemények bizonyítottan kiváltják és növelik a pro-inflammatoros cytokinek felszabadulását az érintett szervezetben (Dobbin et al. 1991; Maes et al. 1998; Hastrup et al. 2012). Az epizódikus fejfájás krónikussá válásának folyamata nem tisztázott, többek között felmerült a trigeminális neuronok plaszticitása és a pro-inflammatoros cytokinek szerepe is (Kristiansen and Edvinsson 2009; Kristiansen and Edvinsson 2010, Aurora et al. 2011). Migrénes gyermekekben fejfájásmentes periódusban a pro-inflammatoros cytokinokkal kapcsolatos vizsgálatok igazolták, hogy a vérplazmában a tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) koncentrációja emelkedett volt a kontroll csoporthoz képest (Bockowski et al. 2009). Továbbá azt tapasztalták, hogy a TNF- α , a szolubilis TNF- α 1 receptor és az interleukin-1 α (IL-1 α) szignifikánsan nagyobb értékeket mutatott az aurás migrénben, összehasonlítva az aura nélküli migrénesek csoportjával (Bockowski et al. 2009).

Más vizsgálatok a TNF- α és a IL-1 β emelkedését figyelték meg az aura nélküli migrénes betegek rohammentes időszakában (Covelli et al. 1990; Covelli et al. 1991; Kemper et al. 2001; Perini et al. 2005). Migrénes rohamban pedig az IL-10 koncentráció növekedést észleltek (Fidan et al. 2006). Krónikus migrénben szenvedő betegek agy-gerincvelői folyadékában (CSF) emelkedett TNF- α koncentrációt mértek (Rozen and Swidan 2007). Az érző neuronok igen fogékonyak a környezeti tényezőkre. Az alacsony kémhatás (pH) vagy a szerotonin, hisztamin, bradykinin keveréke („gyulladásos leves”) CGRP felszabadulást váltott ki a durában a trigeminális szenzoros idegrostokból állatkísérletek során (Ebersberger et al. 1999; Zimmermann et al. 2002). Szervtenyészetek esetén a szérumentes tápfolyadék nagyfokú stresszt jelentett a sejteknek (Jansen-Olesen 2005). Laboratóriumunk munkatársai által kifejlesztett metodikában a szérumentes tápoldat jelentette azt a környezeti stresszt, melyre a szervkultúrába vitt TRIG-ban inflammációs reakció keletkezett (Kristiansen and Edvinsson 2009). Célunk volt, jól megtartott morfológia mellett, stresszként jelentkező körülmények között vizsgálni a neuropeptid és mRNS expressziót és ennek hátterét a TRIG-ban (Kuris et al. 2007; Tajti et al. 2011).

3.2.2. Anyag és módszer

Vizsgálataink során patkány TRIG-t szervkultúrába vittünk, majd immunhisztokémiai, valós idejű kvantitatív PCR-t (RT-qPCR) és kép analízist használtunk. Részletes leírást lásd az 5.2. fejezetben.

3.2.3. Eredmények

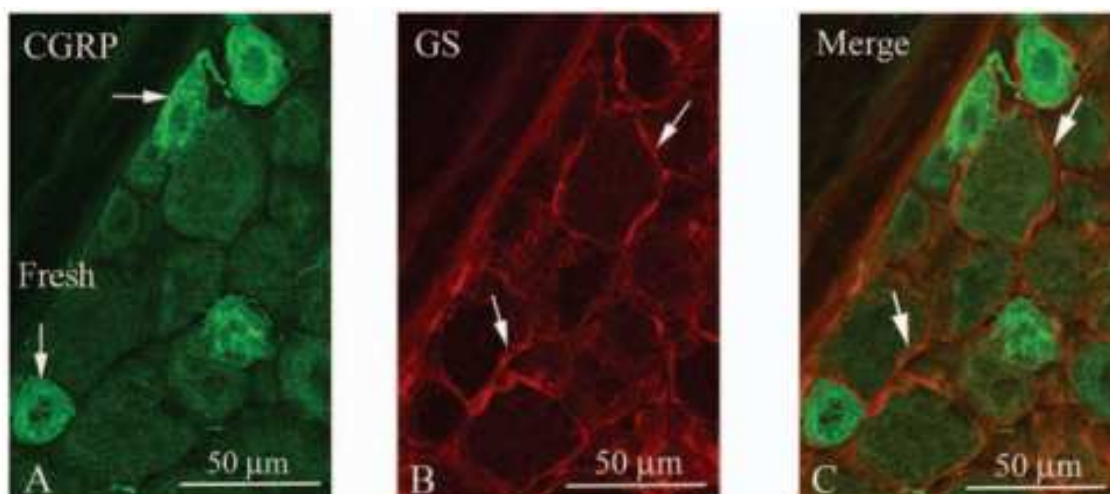
Immunhisztokémia

Nem inkubált patkány TRIG metszeteiben a kicsiny és a közepes nagyságú neuronok mutattak CGRP-ir-t (**22. ábra A, B, C**), míg a nagyméretű neuronokban RAMP1-ir-t lehetett megfigyelni (**23. ábra A**). A SGC-ek a CGRP-ir-t és a RAMP1-ir-t tekintve negatívak voltak, ugyanakkor pro-calcitonin (pro-CT)-ir-t adtak (**24. ábra A, B, C**).

A szervkultúrába vitt (szérummentes Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM) TRIG-metszeteiben a képletek anatómiailag jól megőrződtek. A CGRP-ir sejtek száma 24 és 48 órás inkubációt követően statisztikailag szignifikáns módon növekedett a kultúrába nem vittekhez képest. A 24 órás inkubációt követően 49%-kal ($p < 0.05$), míg a 48 óra elteltével 72%-kal ($p < 0.01$) növekedett a CGRP-ir neuronok száma (**25. ábra**). A SP-ir neuronok száma nem változott az inkubációt követően és a SGC-ek sem mutattak SP-ir aktivitást (**26. ábra**). A szervkultúrában a neuronok felerősödött CGRP-ir-t és RAMP1-ir-t mutattak (**27. ábra A, B**) (**28. ábra**). A SGC-ekben CGRP-ir (**29. ábra G, H**) és RAMP1-ir jelent meg (**30. ábra C**). A szervkultúrában 2 órával az inkubációt követően egyre erősödő foszforilált extracelluláris szignál-szabályzott kináz 1 és 2 (pERK1/2) aktivitást figyeltünk meg mind a neuronokban, mind a SGC-ekben. A pERK1/2 és a CGRP ko-lokalizációt mutatott a SGC-ekben és a neuronokban az inkubációt követően (**31. ábra A, B, C, D, E, F**). Specifikus mitogén-aktivált protein (MAP) kináz/ERK kináz (MEK)/ERK1/2 útvonal gátló (UO126) erőteljesen csökkentette a felerősödött pERK1/2 és a CGRP-ir aktivitást a SGC-ekben és a neuronokban egyaránt 48 órás inkubációt követően (**32. ábra A, B, C, D, E**).

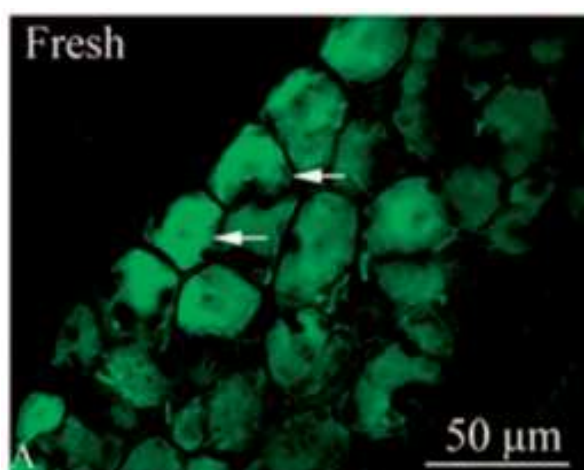
Valós idejű kvantitatív PCR

A szervkultúrába vitt patkány TRIG-ban az UO126 csökkentette a CGRP mRNS expresszióját 24 órás inkubációt figyelembe véve (**33. ábra**).



22. ábra (A, B, C). A szervkultúrába nem vitt patkány ganglion trigeminale (TRIG) metszetein calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP) és glutamin szintetáz (GS) immunreaktivitás

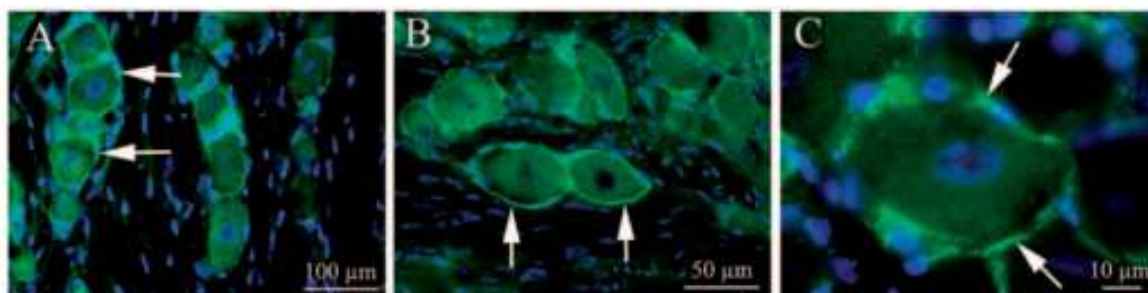
A szervkultúrába nem vitt (fresh) patkány TRIG-ban számos CGRP-ir neuront lehetett megfigyelni (nyilak, A). Az SGC-ek szorosan körülveszik a neuronokat, GS-zal lettek azonosítva (nyilak, B). A GS nem lokalizálódott a CGRP-del az SGC-ben (nyilak, C). Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, GS: glutamin szintetáz, ir: immunreaktivitás, SGC: satellita glia sejt, TRIG: ganglion trigeminale



23. ábra (A). Az inkubáció mentes patkány ganglion trigeminale-ban (TRIG) a receptor aktivitást befolyásoló protein1 (RAMP1) immunreaktivitás megjelenése

A szervkultúrába nem vitt, nem inkubált (fresh) TRIG-ban a neuronokban lehetett megfigyelni RAMP1-ir-t (nyilak).

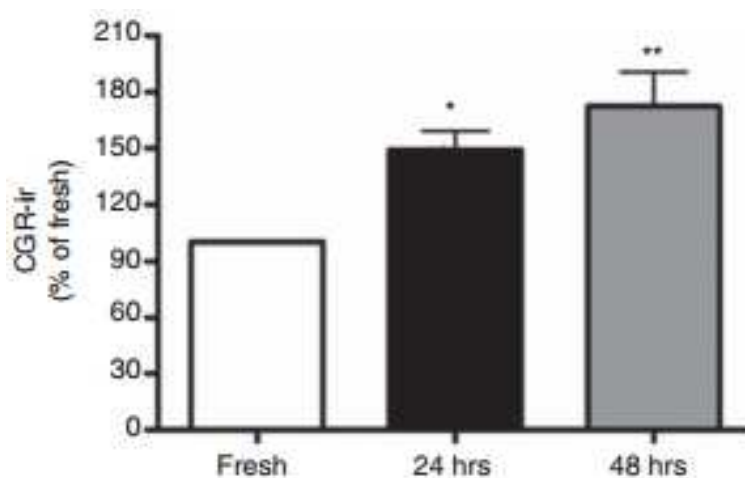
Rövidítések: ir: immunreaktivitás, RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1, TRIG: ganglion trigeminale



24. ábra (A, B, C). A szervkultúrába nem vitt ganglion trigeminale-ban (TRIG) a satellita glia sejtek (SGC) pro-calcitonin (pro-CT) immunreaktivitása

Nem inkubált (fresh) TRIG-ban a pro-CT a SGC-ekben megjelenik (nyilak, A, B), a magfestés (DAPI) alapján a pro-CT a SGC-tek cytoplasmájába lokalizálódik (nyilak, C).

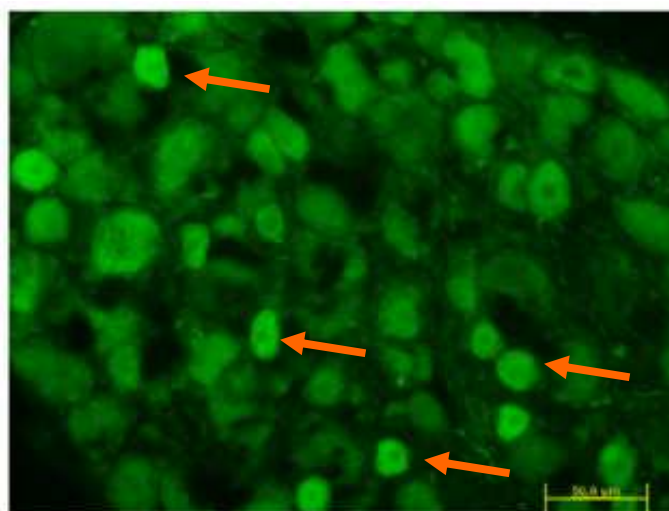
Rövidítések: DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole, pro-CT: pro-calcitonin, SGC: satellita glia sejt, TRIG: ganglion trigeminale



25. ábra. A nem inkubált (fresh) és a tenyészetbe vitt ganglion trigeminale-ban (TRIG) a calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP) immunreaktív neuronok összevetése

A szervkultúrában az inkubációs idő növekedésével párhuzamban emelkedett a CGRP-ir neuronok száma. Az adatokat az átlag és az átlag szórása (standard $\pm$ error of mean) megadásával tüntettük fel. N=5. Nem-parametrikus Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

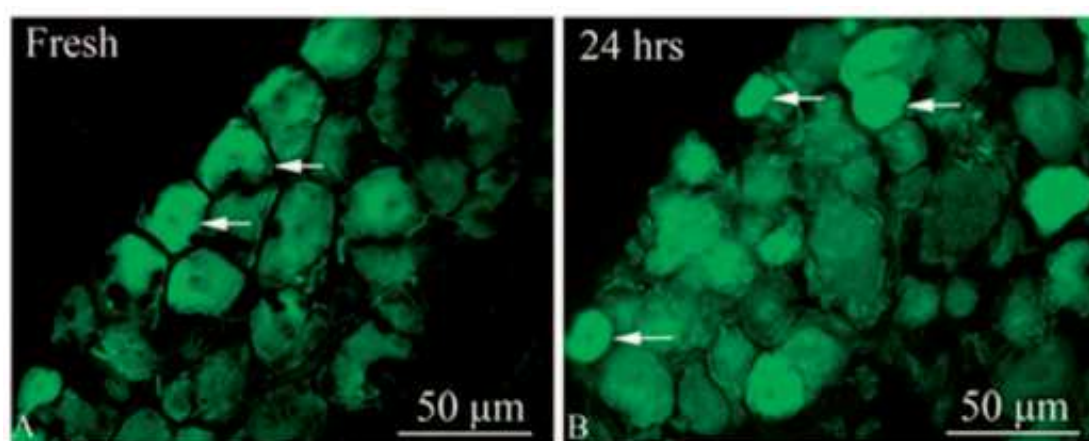
Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, ir: immunreaktivitás



26. ábra. A szervtenyészetbe vitt patkány ganglion trigeminale-ban (TRIG) a P-anyag (SP) immunreaktivitása

A szervtenyészetbe vitt patkány TRIG-ban csak a neuronok mutattak SP-ir-t (nyilak), az SGC-ek nem adtak SP-ir-t. (Kalibráció = 50 μ m)

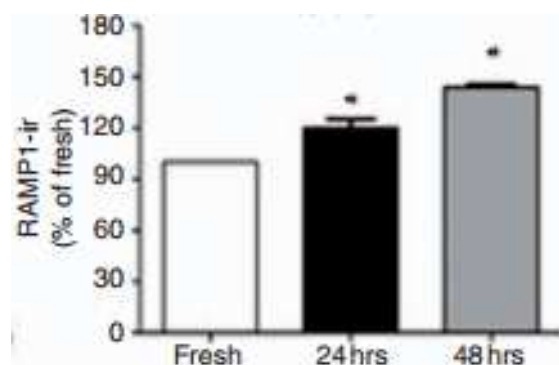
Rövidítés: ir: immunreaktivitás, SGC: satellita glia sejt, SP: P-anyag, TRIG: ganglion trigeminale



27. ábra (A, B). Az inkubáció mentes és a szervkultúrába vitt patkány ganglion trigeminale-ban (TRIG) a neuronok receptor aktivitást befolyásoló protein1 (RAMP1) immunreaktivitása

A neuronokban, a nem inkubált (fresh) TRIG-ban megjelenő RAMP1-ir (nyilak, A), a 24 órás kultúrát követően felerősödött (nyilak, B).

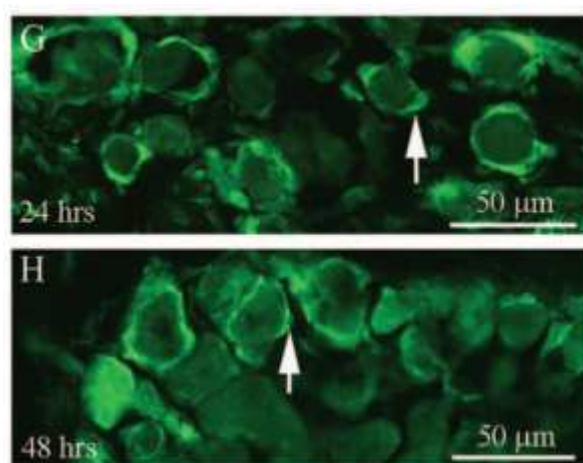
Rövidítés: ir: immunreaktivitás, RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein-1, TRIG: ganglion trigeminale



28. ábra. A szervkultúrába vitt patkány ganglion trigeminale-ban (TRIG) a neuronokban felerősödő receptor aktivitást befolyásoló protein1 (RAMP1) immunreaktivitás változása

A szervtenyészetben a TRIG-ban 24 órás (hrs) inkubációt követően felerősödött a RAMP1-ir expresszió a neuronokban. Az adatokat az átlag és az átlag szórása ($\pm$ standard error of the mean) megadásával tüntettük fel. Nem-parametrikus Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk $*p < 0.05$.

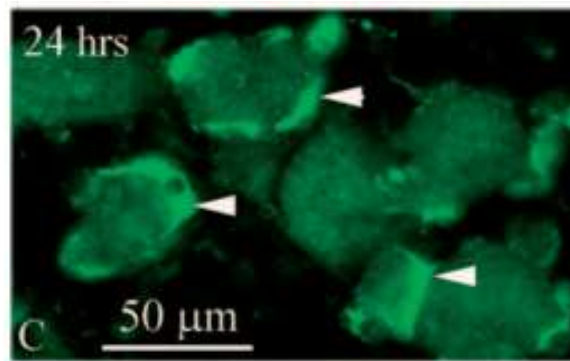
Rövidítések: ir: immunreaktivitás, RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1, TRIG: ganglion trigeminale



29. ábra (G, H). A szervkultúrába vitt patkány ganglion trigeminale-ban (TRIG) a satelita glia sejtek (SGC) calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP) immunreaktivitása

A szervkultúrába vitt patkány TRIG-ban az SGC-ekben a CGRP-ir volt megfigyelhető a 24 és a 48 órás inkubációt követően.

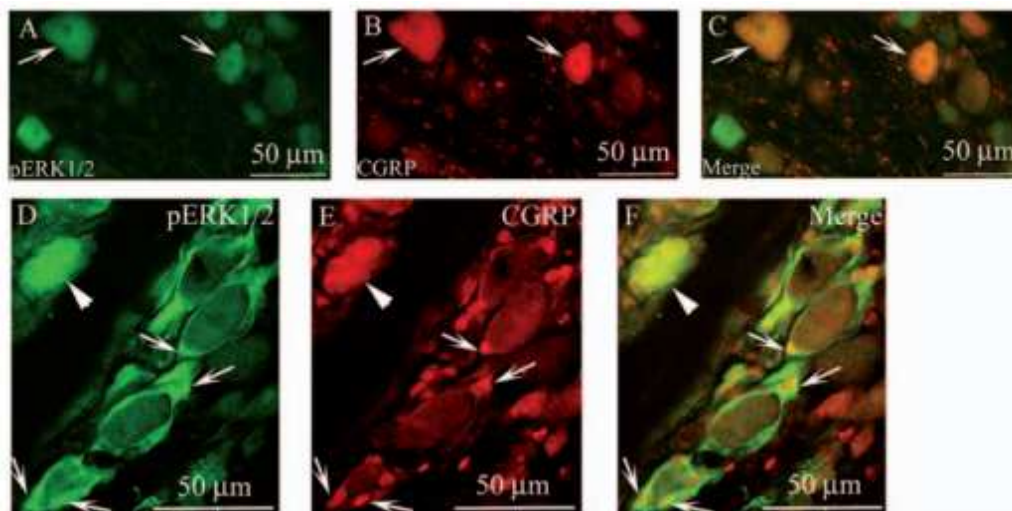
Rövidítés: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, ir: immunreaktivitás, SGC: satelita glia sejt, TRIG: ganglion trigeminale



30. ábra (C). A szervkultúrába vitt patkány ganglion trigeminale-ban (TRIG) a satellita glia sejtek (SGC) receptor aktivitást befolyásoló protein1 (RAMP1) immunreaktivitása

A szervkultúrába vitt patkány TRIG-ban inkubációt követően az SGC-ben megjelent a RAMP1-ir.

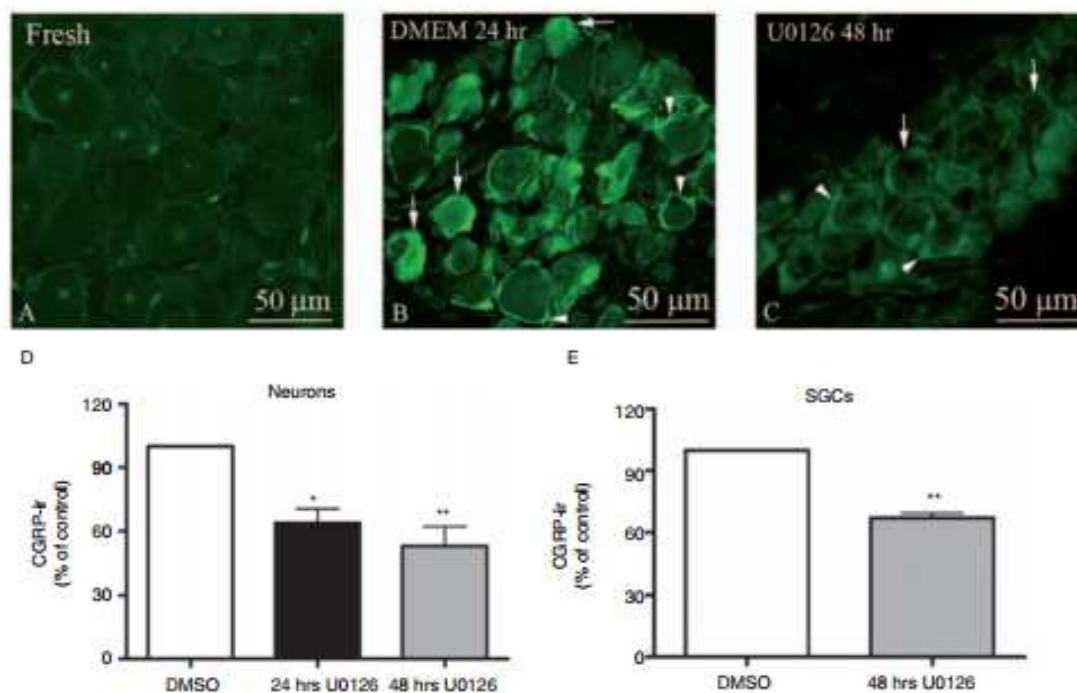
Rövidítések: ir: immunreaktivitás, RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1, SGC: satellita glia sejt, TRIG: ganglion trigeminale



31. ábra (A, B, C, D, E, F). Az inkubáció mentes és a szervkultúrába vitt patkány ganglion trigeminale-ban (TRIG) foszforilált extracellularis szignál-szabályzott kináz 1 és 2 (pERK1/2) és a calcitonin génnel-rokon peptid megejelzése

Kettős immunfestéssel a pERK1/2 és a CGRP ko-lokalizációt lehetett megfigyelni a nem inkubált TRIG-ban a neuronokban (nyíl, A-C). Inkubálást (48 óra) követően mind a SGC-ekben (nyílak), mind a neuronokban (nyílhegyek) a pERK1/2 és a CGRP ko-lokalizációját lehetett észlelni (D-F).

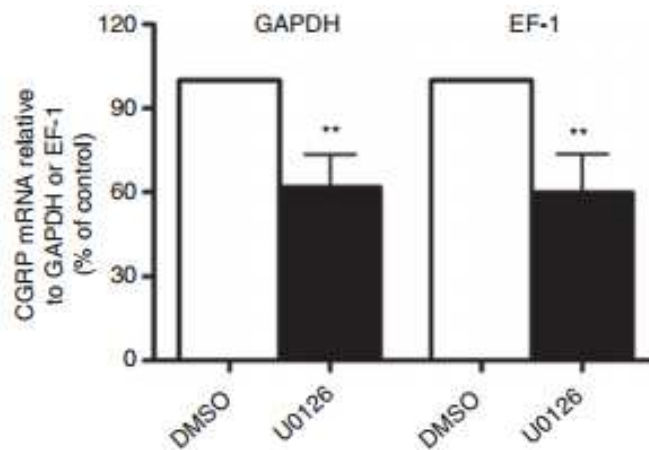
Rövidítés: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, pERK1/2: foszforilált extracellularis szignál-szabályzott kináz 1 és 2, SGC: satellita glia sejt, TRIG: ganglion trigeminale



32. ábra (A, B, C, D, E). A szervkultúrába vitt patkány ganglion trigeminale-ban (TRIG) a mitogén aktivált protein kináz/extracelluláris szignál regulált kináz 1 és 2 (MEK1/2) inhibitor (UO126) hatása a foszforilált extracelluláris szignál regulált kináz 1 és 2 (pERK1/2)-immunreaktivására

A pERK1/2 festődés a nem inkubált TRIG-ban (A). Erőteljes pERK1/2-ir volt megfigyelhető a 24 órás (hr) inkubálást követően a SGC-ekben (nyílhegyek, B) és a neuronokban (nyíl, B). Az UO126 inhibitorral történt inkubáció után a pERK1/2 aktivitás a SGC-ben (nyílhegy, C) és a neuronokban (nyíl, C) egyaránt lecsökkent, a 48 órás időtartamot figyelembe véve. Az UO126 csökkentette a CGRP-ir megjelenést a neuronokban 24 óra (hrs) és 48 óra (hrs) múlva, míg az SGC-ben 48 óra (hrs) elteltével (D). Az adatokat az átlag és az átlag szórása ($\pm$ standard error of the mean) megadásával tüntettük fel. $N=5$. Nem-parametrikus Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk $**p<0.01$.

Rövidítések: CGRP: calcitonin génrel-rokon peptid, ir: immunreaktivitás, MEK1/2: MAP kináz/ERK kináz 1/2, pERK1/2: foszforilált extracelluláris szignál regulált kináz 1 és 2, SGC: satellita glia sejt, TRIG: ganglion trigeminale



33. ábra. A szervkultúrába vitt patkány ganglion trigeminale-ban (TRIG) a MEK/ERK1/2 inhibítor (UO126) hatása a calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP) mRNS kifejeződésére

Az UO126 csökkentette a CGRP mRNS expresszióját a GAPDH-hoz és az EF-1-hez viszonyítva a TRIG 24 órás kultúrájában. Az adatokat átlag és az átlag szórása ($\pm$ standard error of the mean) megadásával tüntettük fel. N=6. Nem-parametrikus Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk $**p < 0.01$.

Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, EF-1: elongációs faktor-1, GAPDH: glyceraldehyd 3-foszfát dehydrogenáz, MEK1/2: MAP kináz/ERK kináz 1/2, TRIG: ganglion trigeminale

3.2.4. Megfigyeléseink jelentősége

- Vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy a TRIG szérummentes szervkultúrája, jó anatómiai viszonyok mellett, lehetővé tette a neuronok és a SGC egyidejű funkcionális tanulmányozását. A pro-inflammatoros cytokin, a TNF- α és az IL-ok képesek a MAPK rendszer aktiválására és a CGRP transzkripció felerősítésére (Barbin et al. 2001; Hou et al. 2003/b; Bowen et al. 2006). A TRIG-n belüli (intraganglionaris) neuron-glia egymásrahatás során feltételezhetően a neuronokból felszabaduló CGRP stimulálja a SGC-eket, melyek pro-inflammatoros cytokineket bocsátanak a környezetükbe. A cytokinek pedig aktiválják a neuronokat, melyek újra visszahatnak a gliasejtekre (Pietrobon and Moskowitz 2013; Vollbracht and Rapoport 2014). Ez a folyamat része lehet a migrénes rohamok gyakori visszatérésének, a krónikus migrén kialakulásának. A kialakított model lehetőséget ad a glia modulátorok tesztelésére, melyek új terápiás lehetőséget jelenthetnek a krónikus migrénes betegek kezelésében (Vollbracht and Rapoport 2013; Vollbracht and Rapoport 2014).
- Vizsgálatainkkal elsőként mutattuk be, hogy a TRIG szérummentes szervkultúrájában az ERK1/2 rendszer aktiválódott. A neuronokban, valamint a SGC-ekben kimutatott fokozott CGRP megjelenésben a MEK/ERK1/2 rendszernek szerepe van. Ez a felismerésünk új

terápiás célként jelöli meg a trigeminális intraganglionaris ERK1/2 gátlását az újtípusú migrén ellenes vegyületek kifejlesztésben.

3.3. *Neuropeptid és receptor mRNS megoszlásának vizsgálata a humán ganglion cervicale superius-ban (SCG)*

3.3.1. Háttér

A sympathicus idegrendszerből származó rostok a SCG-on át idegzik be a cerebrális vasculaturát (Nielsen and Owman 1967). Az a. basilaris és az a. vertebralis ágait a ganglion stellatumból eredő rostok is ellátják (Arbab et al. 1988). A corticális felszín kicsiny piális noradrenalin (NA)-tartalmú idegi elemei a locus ceruleusból (LC) és/vagy a hypothalamusból származnak (Duverger et al. 1987; Owman and Edvinsson 1977). A sympathicus rendszer transzmitterei a NA (Edvinsson et al. 1976), a NPY (Edvinsson et al. 1983) és az adenosin trifoszfát (ATP) (Edvinsson 1996; Edvinsson et al. 1993). A rendszer aktivációja vasoconstrictiót, a cerebrovascularis autoreguláció megváltozását, az intrakraniális nyomás-, a cerebrális térfogat- és a CSF termelés változását idézi elő (Edvinsson and Krause 2002). A fenti reakciók elsősorban NA és NPY hatásaként következnek be (Raichle et al. 1975; Hartman et al. 1980; Goadsby et al. 1982; Edvinsson et al. 1983; Edvinsson et al. 1984; Goadsby et al. 1989). Humán tekintetben igen kevés immunhisztokémiai vizsgálata történt a SCG-nak. Ezen munkákból felkeltették érdeklődésünket Baffi és munkatársainak eredményei, akik a humán SCG-ban a parasympathicus marker, a VIP jelenlétét igazolták (Baffi et al. 1992). Különös tekintettel arra, hogy korábbi TRIG-ben végzett vizsgálataink mind VIP₁, mind NPY Y₁ és NPY Y₂ receptorok jelenlétére utaltak (Tajti et al. 1999/a) és ismert volt, hogy egyes migrénes páciensek fejfájásos rohama során az autonóm rendszer aktivitását tükröző klinikai tünetek is megjelentek (Goadsby et al. 1990), így felmerült az SCG vizsgálatának a szükségessége. Tovább erősítette szándékunkat az a megfigyelés, hogy aurával járó fiatal migrénes betegek vérplazmájában roham alatt emelkedett NPY koncentrációt találtak, míg fejfájásmentes időszakban ez csökkent (Gallai et al. 1994). Ugyanakkor migrénes roham során suboccipitalisan nyert CSF elemzése nem változó NPY koncentrációt mutatott (Vécsei et al. 1992). Ezért célul tűztük ki a SCG feltérképezését sympathicus és parasympathicus rendszerre jellemző neuropeptidek és receptoraik irányába (Tajti et al. 1999/b).

3.3.2. Anyag és módszer

Vizsgálataink során post-mortem humán SCG-ból készült preparátumokon immunhisztokémiai és RT-PCR technikákat alkalmaztunk. Részletes leírást lásd az 5.1. fejezetben.

3.3.3. Eredmények

Neuropeptid és receptor mRNS előfordulása a humán SCG-ban.

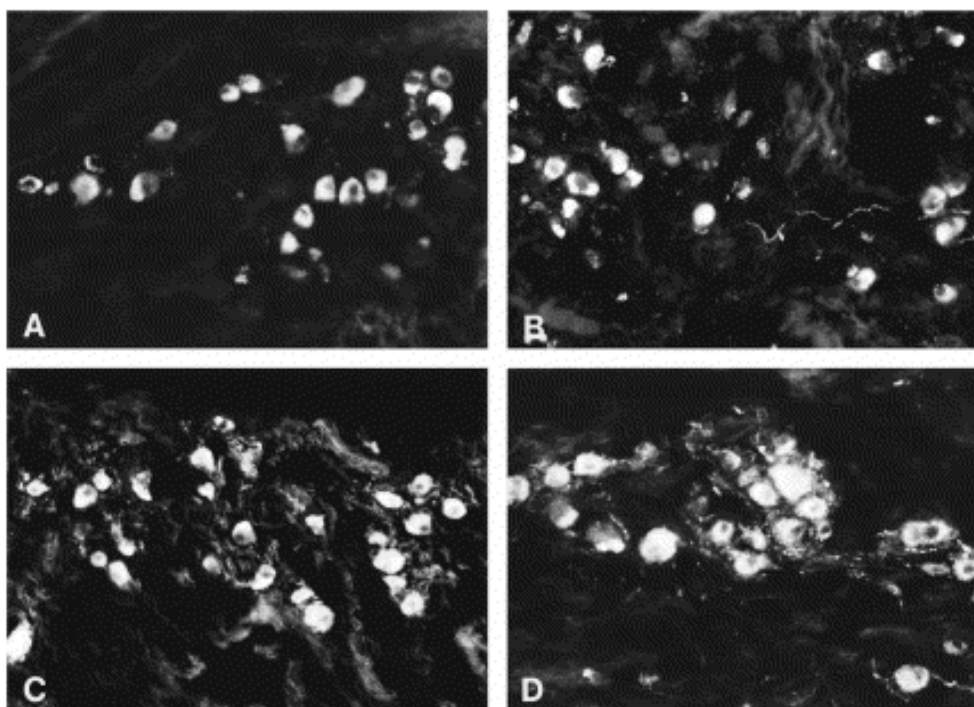
Immunhisztokémia

A SCG neuronjainak 80%-a NPY-ir-t, 75%-a vesicula monoamin transzporter (VMAT)-ir-t, 75%-a tyrozin hydroxyláz (TH)-ir-t, 3%-a VIP-ir-t mutatott, míg NOS-ir, CGRP-ir és SP-ir nem voltak megfigyelhetők. A sejtestek 40%-a HO-2-ir-t adott. A NPY-ir neuronok mindegyike TH-ir volt, míg a TH-ir sejtek 50%-a adott NPY-ir-t (**3. táblázat**) (**34. ábra A, B, C, D**).

3. táblázat. A humán ganglion cervicale superius (SCG) immunreaktív neuronjainak százalékos megoszlása

Neuropeptid	Immunreaktív neuronok százalékos megoszlása (%)
NPY (C-PON)	80
VMAT	75
TH	75
HO-2	40
VIP	3
NOS	0
CGRP	0
SP	0

Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, C-PON: neuropeptid Y C-terminális flanking peptidje, HO-2: hem-oxygenáz-2, NOS: nitrogén-oxid-szintetáz, NPY: neuropeptid Y, SCG: ganglion cervicale superius, SP: P-anyag, TH: tyrozin hydroxyláz, VIP: vasoactiv intestinalis polipeptid, VMAT: vesicula monoamin transzporter



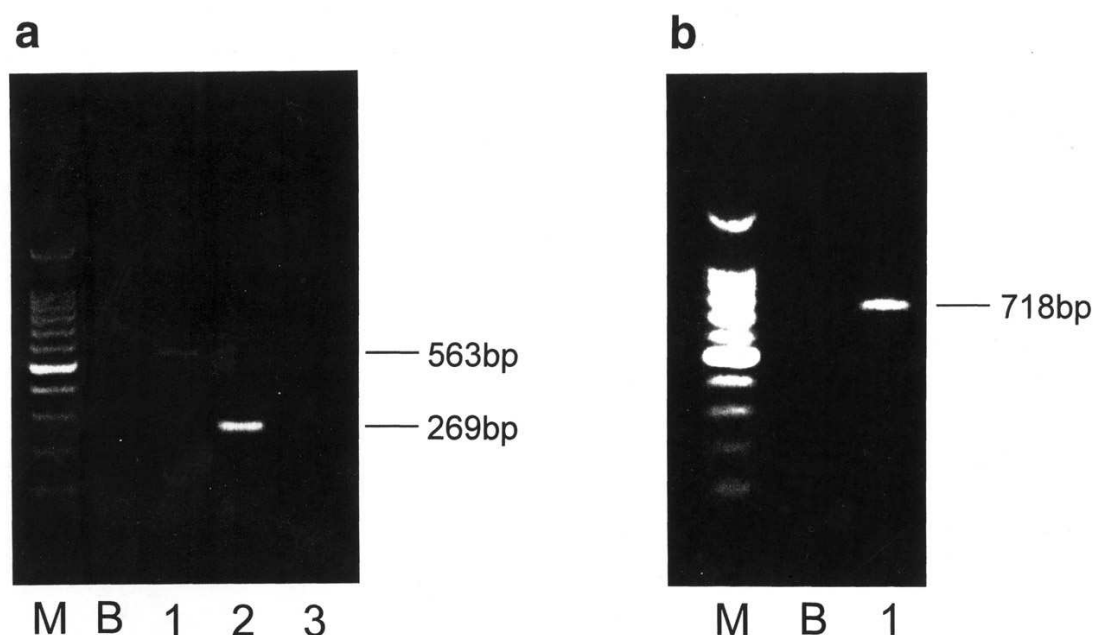
34. ábra (A, B, C, D). Az Immunfluoreszcens reakciók vesicula monoamin transzporter (VMAT) tyrozin hydroxyláz (TH), vasoactiv intestinalis polipeptid (VIP), neuropeptid Y C-terminális flanking peptidje (C-PON) a humán ganglion cervicale superiusban (SCG)

Számos sejttest mutatott VMAT- (A)-ir-t és, TH (C) -ir-t, jóval kevesebb számban mutattak a sejtek VIP (B) -ir-t. C-PON-ir sejttestek és varicosus idegrostok láthatók a (D) képen (250x-es nagyítás).

Rövidítések: C-PON: neuropeptid Y C-terminális flanking peptidje, SCG: ganglion cervicale superius, TH: tyrozin hydroxyláz, VIP: vasoactiv intestinalis polipeptid, VMAT: vesicula monoamin transzporter

Receptor mRNS analízis (RT-PCR, agaróz gél elektroforézis)

A SCG RT-PCR termékének agaróz gél elektroforézise alapján NPY Y_1 (563 bp), NPY Y_2 (718 bp) és VPAC₁ (269 bp) receptor mRNS jelenléte volt kimutatható, míg CGRP₁ receptor mRNS nem volt detektálható (35. ábra a, b).



35. ábra (a, b). Neuropeptid receptor a neuropeptid Y Y₁ (NPY Y₁), a neuropeptid Y Y₂ (NPY Y₂) és VPAC₁ mRNS analízis a humán ganglion cervicale superiusban (SCG)

Az RT-PCR termék gél elektroforézise jelezte a humán NPY Y₁ (1. oszlop, 563 bp) és a VPAC₁ (2. oszlop, 269 bp) jelenlétét, míg a CGRP₁ receptorra utaló szignált nem találtunk a SCG-ban (3. oszlop) (a). A humán NPY Y₂ receptor (1. oszlop, 718 bp) (b) jelenléte is megfigyelhető volt. Negatív kontrollként, amikor a reverz transzkriptáz fázis el lett hagyva, amplifikációs produktum nem jelent meg („B” oszlop). Promega 100 bp DNS (Promega, SDS, Svédország) volt futtatva a pontos molekuláris nagyság meghatározása céljából („M” oszlop).

Rövidítések: mRNS: hírvivő ribonukleinsav, NPY Y₁: neuropeptid Y Y₁ receptor, NPY Y₂: neuropeptid Y Y₂ receptor, SCG: ganglion cervicale superius, VPAC₁: VIP₁ vagy PACAP₂ receptor

3.3.4. Megfigyeléseink jelentősége

- Eredményeink támogatták azon megfigyeléseket, miszerint az életkor változása és a NPY-ir neuronok előfordulásának gyakorisága a SCG-ban függ a speciéstől. Patkányban az életkor növekedésével az SCG-ban a NPY tartalmú neuronoknak szelektív csökkenését állapították meg (Burnstock 1990). Vizsgálataink során idős elhunyt személyekből származó SCG sejteket vizsgáltunk, melyekben gazdag NPY-ir-t találtunk, ez egybeesik Jarvi és Peltó-Huikko korábbi megfigyeléseivel (Jarvi and Peltó-Huikko 1990). Patkányban a cerebrális ereket ellátó idegrostokban a VIP- és a CGRP aktivitás párhuzamosan növekedett az életkorral (Burnstock 1990). Humánban az a. cerebri mediát ellátó idegrostokban az életkor előrehaladtával csökken a NPY-, VIP-, SP- és CGRP-ir (Edvinsson et al. 1987/c).

- Vizsgálataink során NPY Y_1 és NPY Y_2 receptor mRNS előfordulását írtuk le humán SCG-ban. A sympathicus idegvégződéseken a NPY ko-lokalizálódik a NA-nal a nagy „dense-core” vezikulumokban és magas frekvenciájú intermittáló idegingerlésre felszabadul (Lundberg et al. 1986). A nyugalmi periódusban csak kicsiny mértékű a NPY felszabadulása, a sympathicus vazokonstrikció nagymértékben az adrenerg receptor aktivációtól függ, ugyanakkor erőteljes sympathicus aktivitásnál a NPY hozzájárulása prominenssé válik (Lundberg et al., 1986). A NA és a NPY számos hatással rendelkezik az erekben a sympathicus neuroeffektor junctionokban. Vazokonstrikciót okoznak, valamint azzal, hogy prejunctionálisan gátolják a NA felszabadulást a NPY Y_2 és az adrenerg receptorok útján, így befolyásolják a neurotransmitter felhasználást (Wahlestedt and Reis 1993). A NPY keringésre kifejtett hatását legalább két receptor fajtán át fejteti ki: az Y_1 alcsoport feltételezhetően a fő posztjunctionális receptorféleség a sympathicus vascularis neuroeffektor junctionokban, és megtalálták mind a vascularis simaizom- mind az endothel sejtekben, ahol mediálja a NPY kiváltotta perifériás vascularis rezisztencia növelését. Az Y_2 receptor főként pre-synapticusan helyezkedik el, de szintén megfigyelték posztjunctionális megjelenését is (Wahlestedt and Reis, 1993).
- A sympathicus rendszer meghatározó elemében, a SCG-ban, a parasympathicus marker a VIP neuronális megjelenését és a VIP₁ receptor mRNS jelenlétét igazoltuk. Ez felvetette az autonóm egységek egymásra hatásának a lehetőségét.

A nyálban az α -amiláz jelenléte indirekt jele a sympathico-adrenomedullaris rendszer működésének. Az α -amiláz koncentrációja migrénes rohamban alacsonyabb, közvetlenül rohamot követően viszont magasabb volt, mint a kontroll csoportban, a fájdalommentes időszakban pedig megegyezett a kontrolléval. Ezen eredmények és a fejfájásroham során a CSF-ban észlelt NPY-ir emelkedés (64%-kal magasabb a kontroll csoporthoz képest) a sympathicus rendszer aktivitásának dinamikus változását igazolta migrénben (Bugdayci et al. 2010).

3.4. *Neuropeptid és receptor mRNS megoszlásának vizsgálata humán ganglion sphenopalatinum-ban (SPG) és humán ganglion oticumban. A migrénes betegek fejfájásrohamai során tapasztalt parasymphathicus rendszeri aktiváció magyarázata*

3.4.1. Háttér

A vizsgált régióban a parasymphathicus idegrendszer a nucleus salivatorius superior (SSN) sejtestjeiből indulva éri el a SPG-ot, a ganglion oticumot, valamint számos fajban az artéria carotis interna mentén elhelyezkedő microganglionokat (Edvinsson et al. 1989; Gibbins et al. 1984; Suzuki et al. 1988). A rendszer klasszikus neurotranszmitterei az acetilkolin (Ach) (Edvinsson et al. 1976), valamint a vazodilatatív hatású neuropeptidek: a VIP (Edvinsson et al. 1976), a PHI (Edvinsson et al. 1985) és a PHM (Edvinsson et al. 1985). Kimutatták továbbá a PACAP-nak (Uddman et al. 1993/a), a heloderminnek és a helospectinnek (Uddman et al. 1993/b) a jelenlétét is. A kísérleti állatokból származó adatokkal szemben meglepően kevés információt leltünk fel a humán craniális parasymphathicus ganglionok neuropeptid tartalmával kapcsolatban. Tovább fokozta érdeklődésünket az a tény, hogy macskában a sinus sagittalis superior (SSS) ingerlését (perifériás stimulációja a TRIG neuronális elemeinek) követően igen markáns (300%-os) VIP koncentráció emelkedést figyeltek meg a vena jugularis externából származó vérplazmában (Zagami et al. 1990). Migrénes betegek spontán rohamai alatt viszont csak azon páciensekben jött létre VIP koncentráció emelkedés (vena jugularis externa), akiknél klinikailag parasymphathicus tüneteket (arckipirulás, orrdugulás, orrfolyás) észleltek (Goadsby et al. 1990). Ezen – ma már klasszikusnak számító – tanulmányban közölt megfigyelések ellenére a craniális autonóm tünetek megjelenését hosszú évekig nem a migrénhez, hanem a trigeminális autonóm fejfájásokhoz kötötték. Az utóbbi években azonban számos migrénes betegnél craniális autonóm tünetek kialakulását írták le a rohamok alatt. A vizsgálatok során az adott évben érvényben lévő, az IHS által közölt Fejfájások Nemzetközi Klasszifikációját használták, továbbá craniális autonóm tünetként a conjunctivális belövelltséget, az orrdugulást, az orrfolyást, a könnyezést, a szemhéj duzzanatot, valamint a ptózist tekintették. A craniális autonóm tünetek prevalenciájáról migrénesei körében több átfogó tanulmány született. A legelső Barbanti és munkatársai 2002-ben közölték, akik a római La Sapienza Egyetem Neurológiai Klinika Fejfájás Centrumában gondozás alatt álló 177 migrénes (147 nő, 30 férfi) beteget vizsgálták. A betegek 45,8%-ában, 81 esetben (71 nő, 10 férfi) írtak le unilaterális autonóm tüneteket (Barbanti et al. 2002). Obermann és munkatársai 2007-ben a Német Fejfájás Konzorcium epidemiológiai felmérése keretében a német populációra vonatkoztatták eredményeiket, miszerint 841 migrénes (589 nő, 252 férfi) beteg 26,9%-a, azaz 226-an (157 nő, 69 férfi) számoltak be féloldali parasymphathicus tünetek megjelenéséről migrénes

rohamok alatt (Obermann et al. 2007). Ugyanebben az évben egy indiai tanulmány a pszichiátriai járóbeteg ellátásban 78 migrénes beteget vizsgált, akik 73,1%-ánál (57 esetben) írtak le craniális autonóm tüneteket, amelyek közül 25 esetben (43,9%) azok unilaterálisan jelentkeztek (Gupta and Bhatia 2007). Lai és munkatársai Tajvanon 786 migrénes beteget észleltek, akiknek 56%-a jelzett parasympathicus tüneteket rohamok kapcsán (Lai et al. 2009). Az USA-ban Pennsylvániában végzett felmérésbe Rozen 117 migrénes (96 nő, 21 férfi) beteget vont be, közülük 62-en, azaz 52%-uk számolt be autonóm tünetek megjelenéséről (Rozen 2011). Végül 2013-ban Guven és munkatársai Törökországban, a Diskapi Yildirim Beyazit Kórház Neurológiai Osztályán gondozott 186 migrénes (167 nő, 19 férfi) beteg 41,4%-ánál (77 esetben) tapasztaltak féloldali craniális vegetatív tüneteket (Guyen et al. 2013). Gelfand és munkatársai által a 18 év alattiak körében végzett felmérés alapján a gyermekek és serdülők 62%-a panaszkodott craniális autonóm tüneteket migrénes rohamaik alatt (Gelfand et al. 2013).

A klinikai megfigyelések alapján migrénes roham során a betegek 27-46%-ában jelentkezett egyoldali, míg 52-73%-ukban kétoldali parasympathicus tünet. Ezen részletezett klinikai megfigyelések arra utaltak, hogy a szenzoros trigeminális rendszer és a parasympathicus ganglionok között funkcionális kapcsolat van. A fenti megfigyelésektől vezérelve, ezért a fő craniális parasympathicus ganglionok, azaz a SPG és a ganglion oticum feltérképezését (neuropeptid, receptor) határoztuk meg humánban célkitűzéseink között. Továbbá választ kerestünk a migrénes betegek fejfájásroham során tapasztalt parasympathicus rendszeri aktiváció hátterére (Uddman et al. 1999/a; Csáti et al. 2012/a; Csáti et al. 2012/b).

3.4.2. Anyag és módszer

Vizsgálataink során post-mortem humán SPG-ből és ganglion oticumból készült preparátumokon immunhisztokémiai és RT-PCR technikákat alkalmaztunk. Részletes leírást lásd az 5.1. és az 5.3. fejezetekben.

3.4.3. Eredmények

A humán SPG-ban és a ganglion oticumban a neuropeptid, receptor és receptor mRNS előfordulása

Immunhisztokémia

Mindkét ganglionban nagyszámú neuron mutatott VIP- (90%), NOS- (80%) és PACAP (60%)-ir-t és számos sejt adott HO-2-ir-t. Az immunreaktív neuronok egyenletesen oszlottak meg a ganglion területén. Nem volt megfigyelhető CGRP-ir és C-PON-ir neuron (**4. táblázat; 36. ábra A, B, C; 37. ábra A, B, C**). A SPG-ban a VIP-ir, a NOS-ir és a PACAP-ir neuronok mellett VIP-ir és PACAP-ir idegrostokat tudtunk megfigyelni, míg NOS-ir rostokat nem

találtunk (38. ábra a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o; 5. táblázat). A SGC-ek nem adtak VIP-ir-t és PACAP-ir-t. Kettős festéssel VIP/NOS, PACAP/NOS, PACAP/Vimentin ko-lokalizációt demonstráltunk. A PAC₁, a VPAC₁ és a VPAC₂ megjelenítése során a SPG-ban a SGC-ek mutattak PAC₁-ir-t és VPAC₁-ir-t. Az idegrostok VPAC₁-ir-t és VPAC₂-ir-t mutattak (39. ábra a, b, c, d, e, f, g, h, i). Továbbá a SPG-ban CGRP-ir idegrostokat figyeltünk meg a neuronok közelében. CLR-ir-t találtunk a SGC-ekben és az idegrostokban, de a neuronokban nem. RAMP1-ir-t számos neuron és SGC mutatott. Kettős festéssel a neuronokban nem tapasztaltunk CGRP/CLR vagy CGRP/RAMP1 ko-lokalizációt (40. ábra a, b, c, d, e, f; 41. ábra a, b; 42. ábra a, b, c, d, e; 43. ábra a, b, c).

4. táblázat. A humán ganglion sphenopalatinum (SPG) immunreaktív neuronjainak százalékos megoszlása

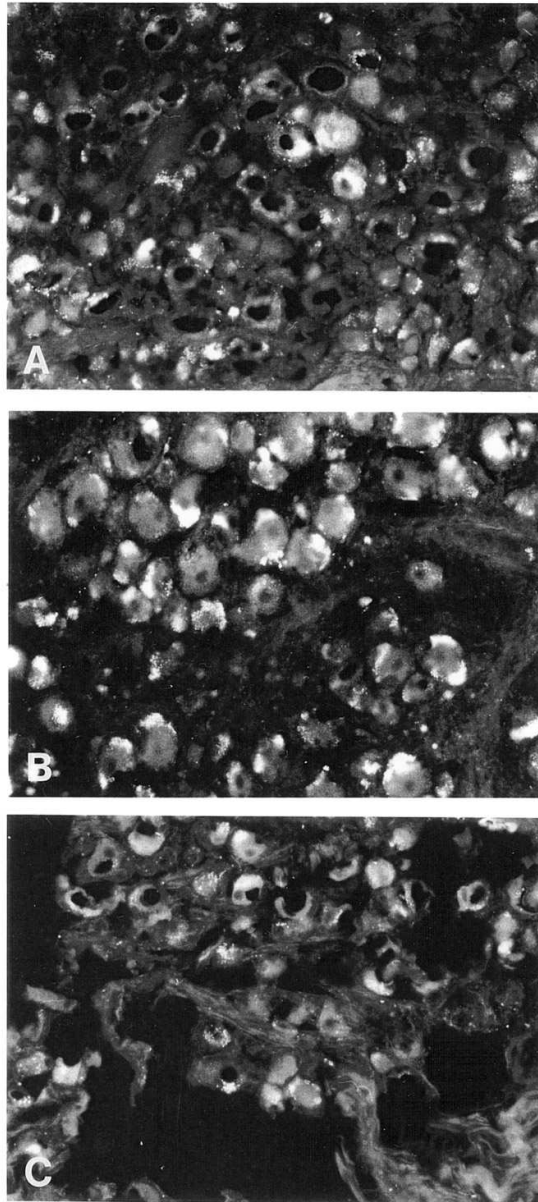
Neuropeptid	Immunreaktív neuronok százalékos megoszlása (%)
VIP	90
NOS	80
PACAP	60
CGRP	0
NPY (C-PON)	0

Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, C-PON: neuropeptid Y C-terminális flanking peptidje, NOS: nitrogén oxid szintáz, NPY: neuropeptid Y, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, VIP: vasoactiv intestinalis polipeptid

5. táblázat. A humán ganglion sphenopalatinumban (SPG) neuropeptid és receptor megjelenése

Neuropeptid/receptor	Neuron	Satellita glia sejt (SGC)	Idegrost
PACAP	+	-	+
VIP	+	-	+
NOS	+	-	-
PAC1	-	+	-
VPAC ₁	-	+	+
VPAC ₂	-	-	+
CGRP	-	-	+
CLR	-	+	+
RAMP1	+	+	-

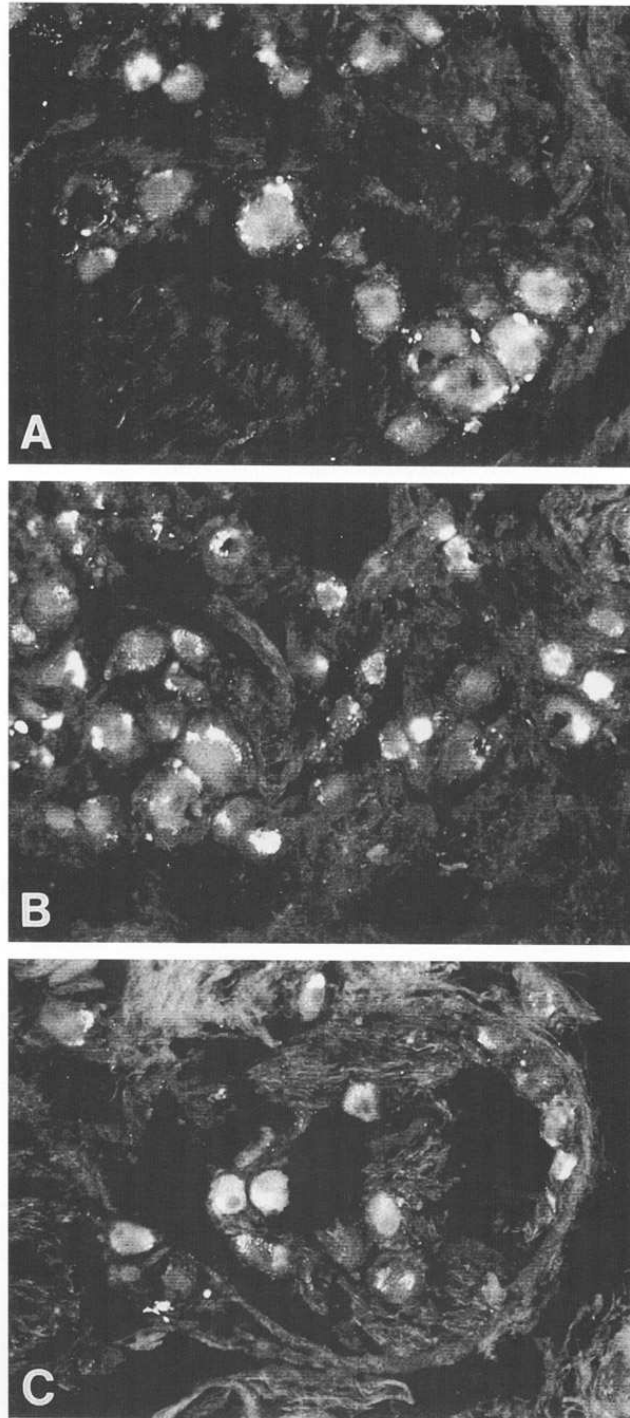
Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, CLR: calcitonin receptor-szerű receptor, NOS: nitrogén oxid szintáz, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, PAC1: PACAP receptor1, RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein-1, SGC: satellita glia sejt, VIP: vasoactiv intestinalis polipeptid, VPAC₁: VIP₁ vagy PACAP₂ receptor, VPAC₂: VIP₂ vagy PACAP₃ receptor



36. ábra (A, B, C). Immunfluoreszcens reakciók - a vasoactiv intestinalis polipeptid (VIP), a nitrogén-oxid-szintetáz (NOS) és a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) – a humán ganglion sphenopalatinumban (SPG)

Az idegsejtek gazdagon tartalmaztak VIP- (A), NOS- (B) és PACAP (C) -ir-t (250x-es nagyítás).

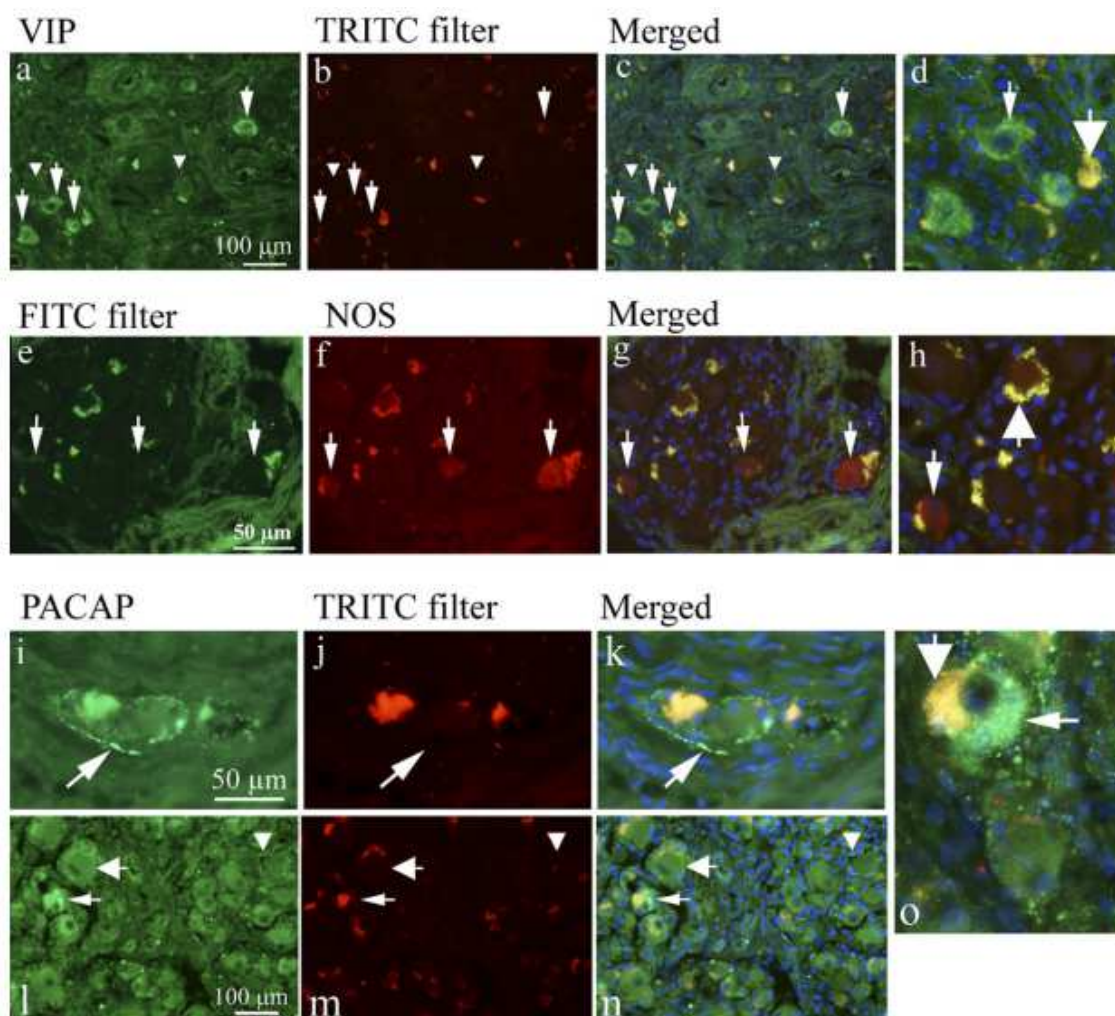
Rövidítések: NOS: nitrogén-oxid-szintetáz, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, SPG: ganglion sphenopalatinum, VIP: vasoactiv intestinalis polipeptid



37. ábra (A, B, C). Immunfluoreszcens reakciók - a vasoactiv intestinalis polipeptid (VIP), a nitrogén-oxid-szintetáz (NOS) és a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) – a humán ganglion oticumban

Számos sejtestet mutatott VIP- (A), NOS- (B) és PACAP (C) -ir-t (250x-es nagyítás).

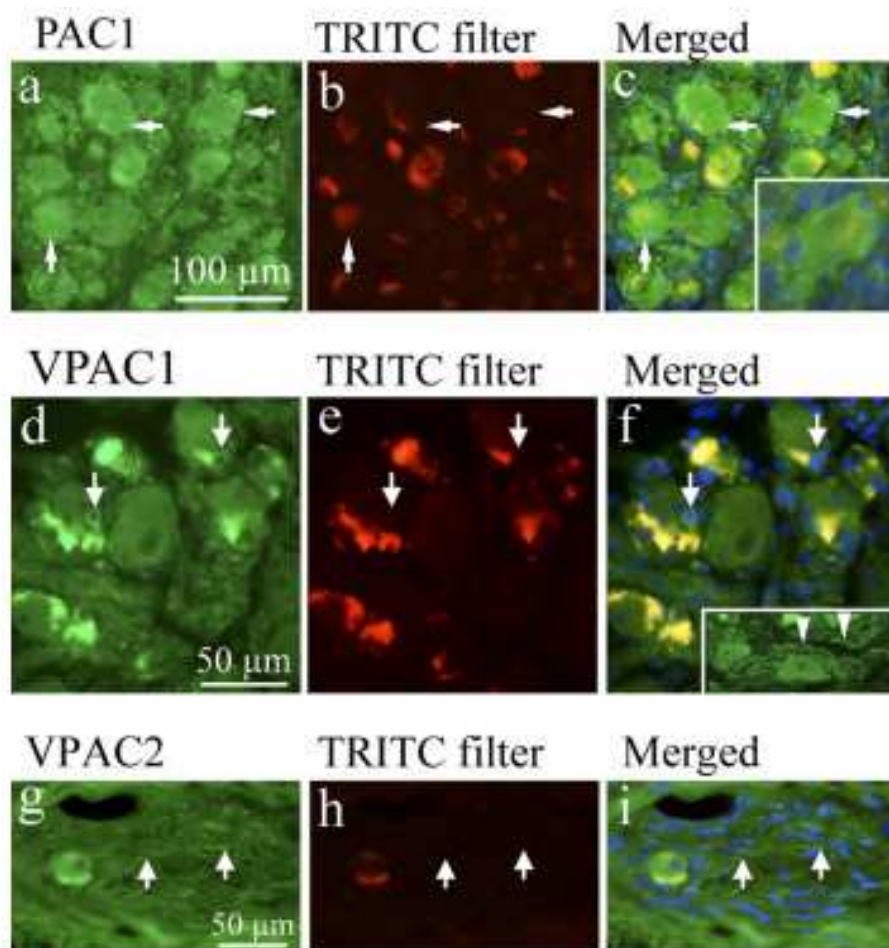
Rövidítések: NOS: nitrogén-oxid-szintetáz, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, VIP: vasoactiv intestinalis polipeptid



38. ábra (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o). A humán ganglion sphenopalatinumban (SPG) a vasoaktiv intestinalis polipeptid (VIP), a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) és a nitrogén-oxid-szintetáz (NOS) immunreaktivitás feltérképezése

A másodlagos ellenanyagoknak megfelelően a TRITC vagy a FITC filtert használtuk és ez megkönnyítette a lipofuszin elkülönítését is. A VIP-ir neuronok (nyilak), valamint idegrostok (nyílhegyek) figyelhetők meg szemcseszerű festődéssel (a-d). A lipofuszin narancssárga színben tűnt fel (vastag nyíl, d). A NOS-ir sejtek (nyilak) egynemű festődést mutattak, a NOS-ir idegrost nem volt felismerhető a metszeten (e-h). A vastag nyíl a lipofuszt jelzi (h). A PACAP-ir idegrostok (nyíl) granuális, míg a neuronok (vékony nyilak) egyneműbb festődést adtak (i-k). A neuronális festődés gyakran a sejtfelszínhez vagy ahhoz közel helyezkedett el (kis vastag nyilak). Nagy nagyítás mellett látható a PACAP-ir pozitív sejt (vékony nyíl), míg a vastag nyíl a lipofuszinra mutat (o).

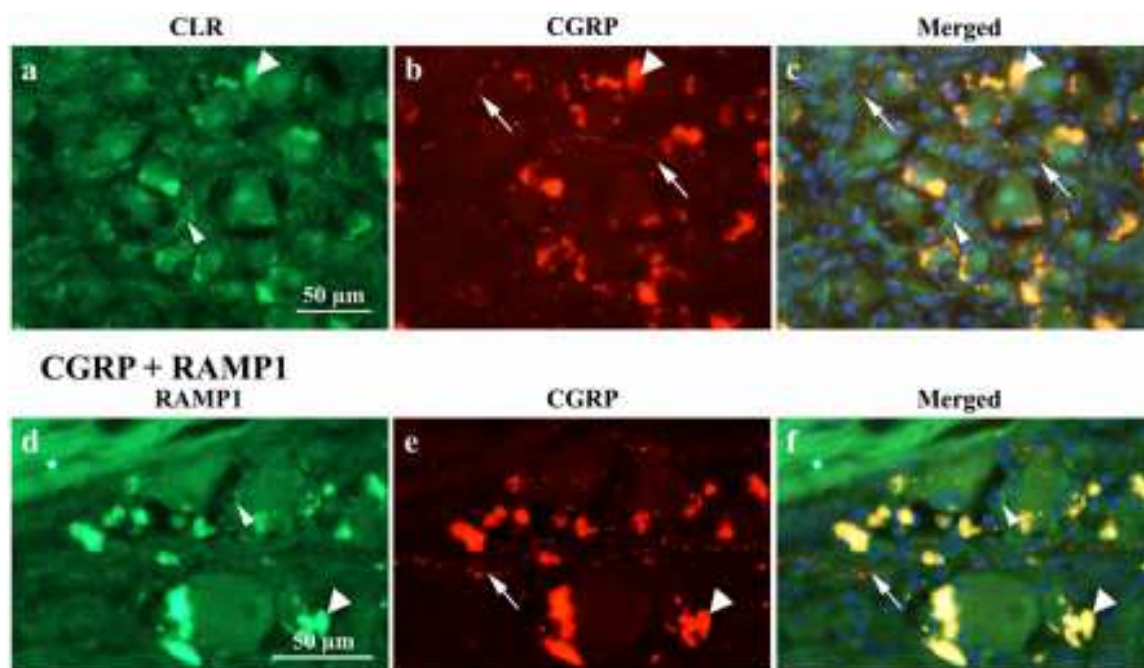
Rövidítések: FITC: fluorescein izothiocyánát, ir: immunreaktivitás, NOS: nitrogén-oxid- szintetáz, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, TRITC: tetramethylrhodamin izothiocyánát, VIP: vasoaktiv intestinalis polipeptid



39. ábra (a, b, c, d, e, f, g, h, i). Humán ganglion sphenopalatinumban (SPG) a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid receptor1 (PAC₁), a vasoactiv intestinalis polipeptid (VIP) a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid receptor1 (VPAC₁) és a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid receptor2 (VPAC₂) megoszlása

A humán SPG-ban PAC1-ir-t találtunk a SGC-ekben (nyilak, a-c). A beillesztett fotón, nagy nagyítás mellett jól látható a PACAP-ir SGC-tel körülvevett, beburkolt neuron. A SPG-ban VPAC1-ir SGC-eket is megfigyeltünk (nyilak, d-f). A beillesztett képen VPAC1-ir idegrostok láthatóak (nyílhegyek). Nyílhegyek mutatnak a VPAC2-ir rostokra (g-i).

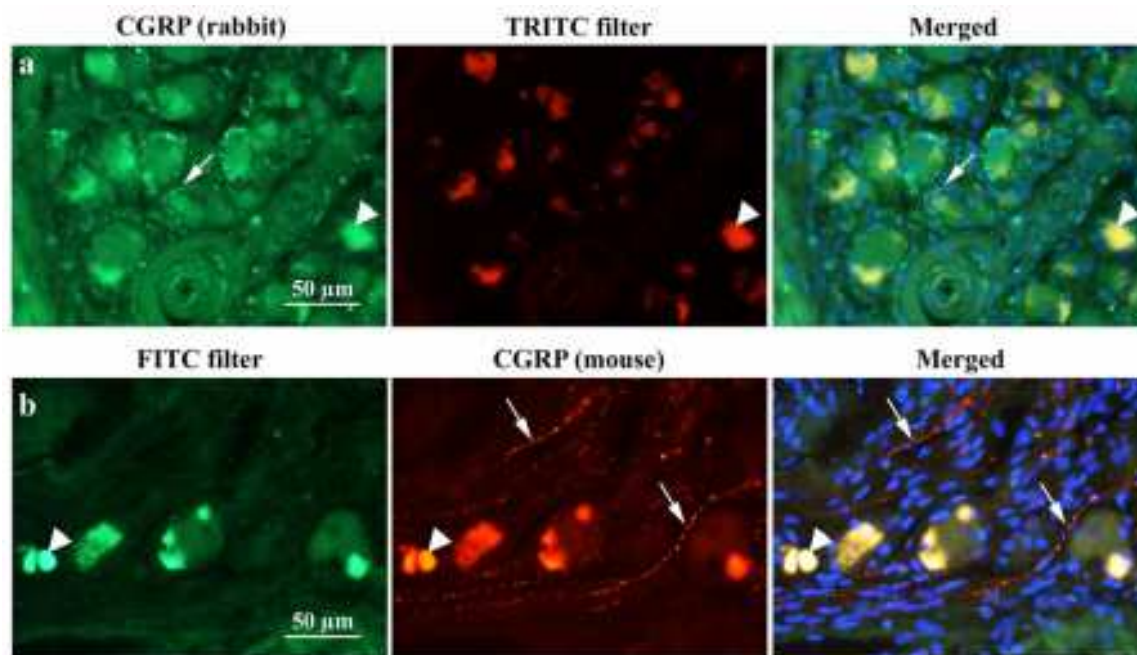
Rövidítések: ir: immunreaktivitás, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, SGC: satellita glia sejt, SPG: ganglion sphenopalatinum, TRITC: tetramethylrhodamin, VPAC₁: VIP₁ vagy PACAP₂ receptor, VPAC₂: VIP₂ vagy PACAP₃ receptor



40. ábra (a, b, c, d, e, f). Kettős festés a calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP)/calcitonin receptor-szerű receptor (CLR) és a calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP)/receptor aktivitást befolyásoló protein1 (RAMP1) vonatkozásában a humán ganglion sphenopalatinumban (SPG)

CGRP/CLR (a-c) és CGRP/RAMP1 (d-f) kettős festés figyelhető meg. Nem találtunk kollokalizációt a CGRP és CLR vagy RAMP1 esetében. CLR-ir SGC-ek (vékony nyílhegyek) voltak fellelhetők (a). RAMP1-ir SGC-ek (vékony nyílhegyek) voltak láthatók (d). CGRP-ir idegreostokat (nyílhegyek) lehetett mefigyelni (b, e). A lipofukszin (vastag nyílhegyek) TRITC és FITC filterrel különítettük el.

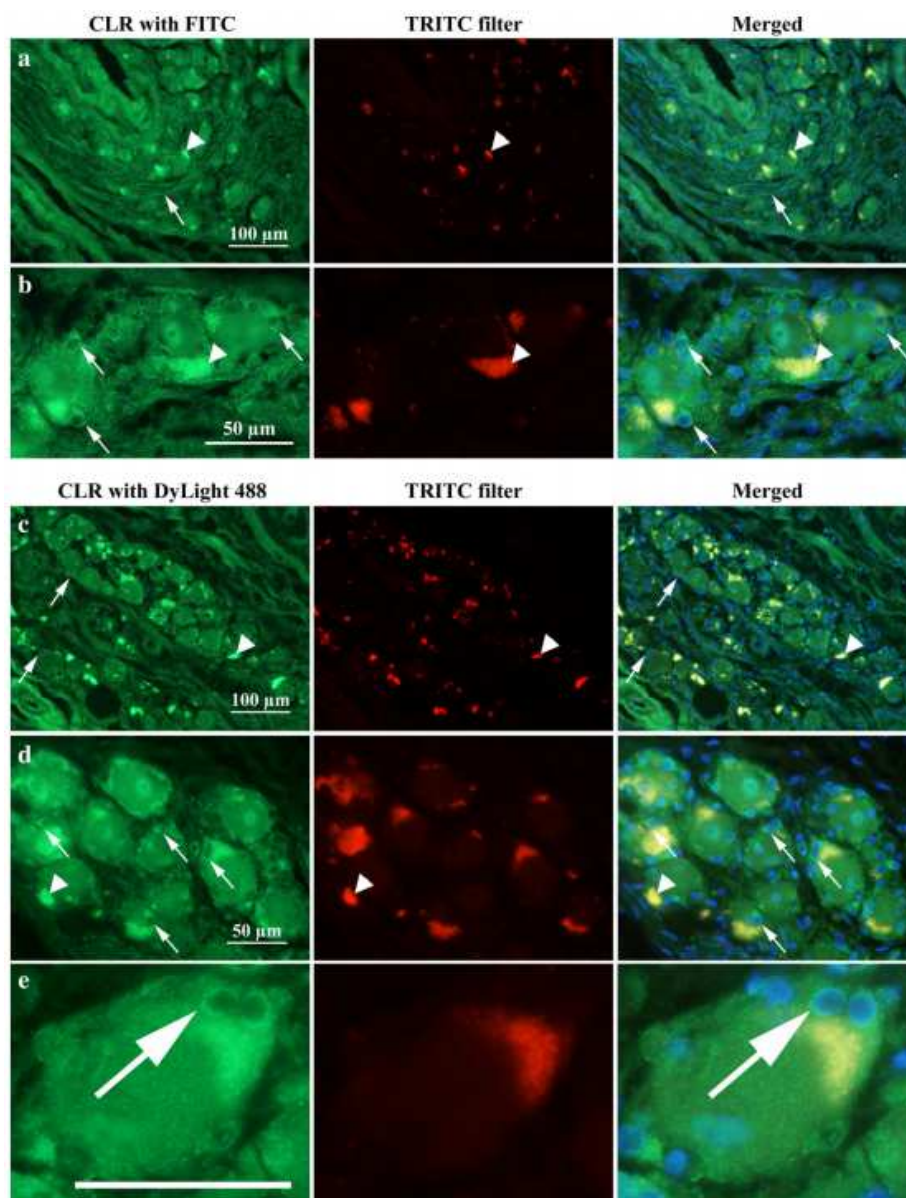
Rövidítések: CLR: calcitonin receptor-szerű receptor, CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, FITC: fluorescein izothiocyánát, ir: immunreaktivitás, RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1, SGC: satellita glia sejt, SPG: ganglion sphenopalatinum, TRITC: tetramethylrhodamin



41. ábra (a, b). A calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP) megjelenése humán ganglion sphenopalatinumban (SPG)

Néhány CGRP-ir idegrostot (nyilak) találtunk CGRP nyúl-elleni primer antitestet használva (a). Jóval több CGRP-ir idegrostot (nyilak) tudtunk megfigyelni CGRP egér-elleni ellenanyag használatakor (b). Mindkét ellenanyag esetében szemcseszerű ir-t kaptunk. Nem találtunk CGRP-ir neuronokat. A montage-ban mind a TRITC és mind a FITC szűrőt használtuk, hogy a lipofuksint (nyílhegyek) jól elkülönítsük az antitest-ir-től.

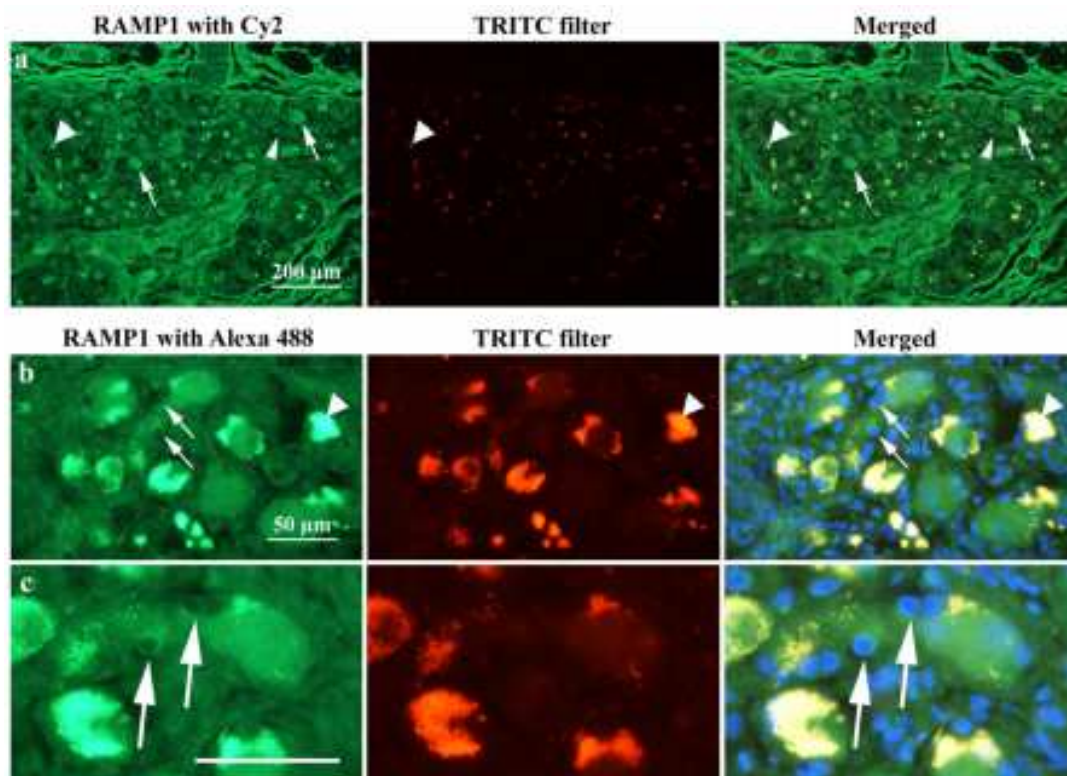
Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, FITC: fluorescein izothiocyánát, ir: immunreaktivitás, SPG: ganglion sphenopalatinum, TRITC: tetramethylrhodamin



42. ábra (a, b, c, d, e). Calcitonin receptor-szerű receptor (CLR) immunreaktivitás a humán ganglion sphenopalatinumban (SPG)

A CLR-ir egynemű festődést adott az idegrostokban (nyilak), melyeket FITC-tal jelölt másodlagos ellenanyaggal tettünk láthatóvá (a). Néhány CLR-ir SGC-et (nyilak) figyelhattunk meg FITC-tal jelölt másodlagos ellenanyag használatakor (b). Kis és nagy nagyítás mellett látható a CLR-ir DyLight 488-cal jelölt másodlagos ellenanyagot használva. A DyLight 488 felfedte a CLR-ir SGC-ek (nyilak) jelenlétét, de a rostok nem voltak láthatóak. Nem találtunk CLR-ir neuronokat sem. Az autofluorescens lipofukszin (nyílhegyek) FITC és TRITC filterek használatával különítettünk el.

Rövidítések: CLR: calcitonin receptor-szerű receptor, FITC: fluorescein izothiocyanát, ir: immunreaktivitás, SGC: satellita glia sejt, SPG: ganglion sphenopalatinum, TRITC: tetramethylrhodamin



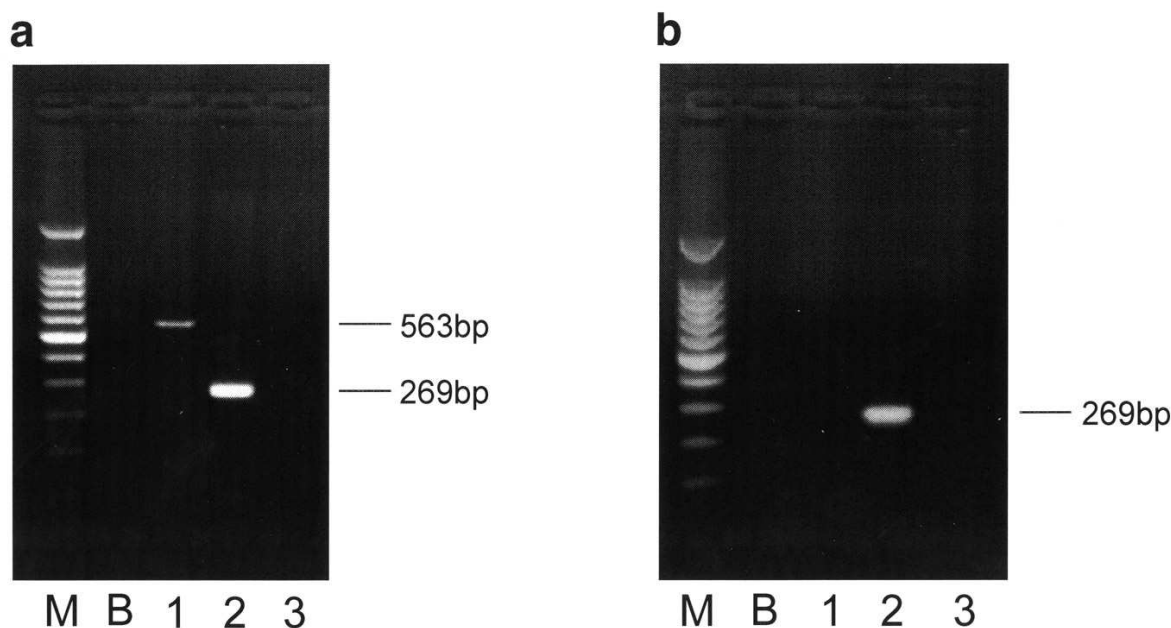
43. ábra (a, b, c). Receptor aktivitást befolyásoló protein1 (RAMP1) immunreaktivitás a humán ganglion sphenopalatinumban (SPG)

A Cy2-vel jelölt másodlagos ellenanyag használatával nagy és közepes méretű RAMP1-ir neuronokat (nyilak) figyeltünk meg (a). A vékony nyílhegyek a negatív neuronokra mutatnak. Az Alexa 488 használatával RAMP1-ir SGC-eket (nyilak) demonstráltunk (b, c). A vastag nyílhegyek a lipofukszinra mutatnak, TRITC és FITC filtert használtunk.

Rövidítések: FITC: fluorescein izothiocyánát, ir: immunreaktivitás, RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1, SGC: satellita glia sejt, SPG: ganglion sphenopalatinum, TRITC: tetramethylrhodamin

Receptor mRNS analízis (RT-PCR, agaróz gél elektroforézis)

A SPG RT-PCR termékének agaróz gél elektroforézise alapján NPY Y_1 (563 bp) és VIP₁ (269 bp) receptor mRNS jelenléte volt kimutatható. Nem lehetett megfigyelni CGRP₁ receptorra utaló jelzéseket. A ganglion oticumban VIP₁ (269 bp) receptor szignálja látható volt, míg CGRP₁ és NPY Y_1 receptorok előfordulását nem lehetett valószínűsíteni. (44. ábra a, b).



44. ábra (a, b). Neuropeptid receptor - neuropeptid Y Y₁ (NPY Y₁) és vasoactiv intestinalis polipeptid1 (VIP₁) - mRNS analízis a humán ganglion sphenopalatinumban (SPG) és a humán ganglion oticumban

Az RT-PCR termék gél elektroforézise jelezte a humán NPY Y₁ (1. oszlop, 563 bp), a VIP₁ (2. oszlop, 269 bp) jelenlétét a SPG-ban (a) és a humán VIP₁ receptor (2. oszlop, 269 bp) megjelenését ganglion oticumban (b). Promega 100 bp DNS (Promega, SDS, Svédország) volt futtatva a pontos molekuláris nagyság meghatározása céljából („M” oszlop). Nem kaptunk látható jelet a vak reakcióban (H₂O, „B” oszlop).

Rövidítések: mRNS: hírvivő ribonukleinsav, NPY Y₁: neuropeptid Y Y₁ receptor, SPG: ganglion sphenopalatinumban, VIP₁: vasoactiv intestinalis polipeptid receptor1

3.4.4. Megfigyeléseink jelentősége

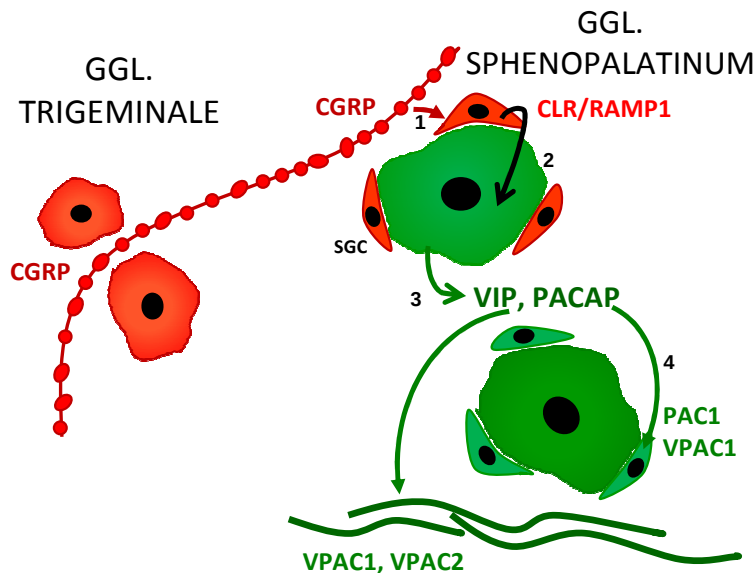
- Mindkét parasympathicus ganglionban nagyszámú (90%) neuron mutatott VIP-ir-t. A VIP hatását G-proteinhez kötött receptorokon (VIP₁ (VPAC₁) és VIP₂ (VPAC₂) fejt ki (Dickson and Finlayson 2009, Couvineau and Laburthe 2012). A VIP a parasympathicus rendszer markere és igen erős vasoaktív hatással befolyásolja a cranio-cervicalis érhálózatot (Edvinsson and Uddman 2005). Klinikai vizsgálatok szerint emelkedett VIP koncentrációt mértek mind a krónikus, mind az epizódikus migrénes betegekben fejfájásmentes periódusban a kontrollhoz képest (Cernuda-Morollon et al. 2014). Krónikus migrénben az onabotulinumtoxin-A (OBOT-A) alkalmazása igen hatékony terápiás forma (Dodick et al. 2010). Az OBOT-A-ra jól reagáló (a fejfájásrohamok számának csökkenése) és a nem vagy kevésbé reagáló páciensek esetében a VIP potenciális prediktorként mutatkozott (Cernuda-

Morolon et al. 2014). Spontán migrénes rohamban, a rizatriptan (5-HT_{1B/1D} receptor agonista) adását követően statisztikailag szignifikáns módon csökkent a VIP koncentrációja a vérplazmában a vena jugularis externában (Sarchielli et al. 2006). Nyálban interiktálisan a VIP koncentráció emelkedett a migrénes betegekben a kontrollhoz képest, míg sumatriptan (5-HT_{1B/1D} receptor agonista) alkalmazását követően csökkent (Bellamy et al. 2006). Újkeletű megfigyelések szerint krónikus migrénben interiktálisan a betegek perifériás vérplazmájában kétszeresére emelkedett VIP koncentrációt mértek a kontrollhoz viszonyítva (Cernuda-Morollón et al. 2015). Korábbi vizsgálat során VIP infúziót követően erőteljes dilatációját figyelték meg az artéria temporalis superficialisnak, de a páciensek egyikében sem alakult ki migrénes roham (Rahmann et al. 2008). A közelmúltban tett megfigyelések szerint az aura nélküli migrénes nőkben a VIP infúzió csak az extrakraniális erekben váltott ki markáns vazodilatációt és csak a betegek 18%-ában jött létre migrén-szerű fejfájás (Amin et al. 2014). A fentiek alapján megállapítható, hogy a VIP igen erőteljes vazodilatátor, azonban migrénes rohamot iniciáló hatása még kérdéses.

- A parasympathicus SPG-ban VIP₁ (parasympathicus) és NPY Y₁ (sympathicus) receptor mRNS-t figyeltünk meg. Kísérleti állatokban egyes szövetekben, sympathectomiát követően NPY túlszabályozást („upregulatio”) figyeltek meg parasympathicus eredetű, cholinerg rostokban (Björklund et al. 1985). Az általunk megfigyelt NPY Y₁ receptor mRNS jelenléte magyarázhatja az előbb említett válasz genetikai hátterét.
- Vizsgálataink során a SPG-ban CGRP-ir idegrostokat, CLR/RAMP1 receptor komponenseket, PAC1 és VPAC1 receptorokat figyeltünk meg a SGC-ekben. A SPG-ban fellelhető CGRP-ir rostok feltételezett trigeminális eredetéről a következő állatkísérletes eredmények állnak rendelkezésünkre. Egy holland iskola torna-peroxidáz konjugált búzacsíra agglutinin jelöléssel igazolta az átvágott SPG idegrostjainak eredetét a ponsban elhelyezkedő nucleus lacrimalisban, a mindkét oldali SCG-ban és az ipszilaterális TRIG-ban (Ten Tusscher et al. 1990). Továbbá, a TRIG-ba injektált Phaseolus vulgaris-leucoagglutininrel végzett anterográd pályakövetéses vizsgálat bizonyítékkul szolgált arra, hogy a patkány SPG szinaptikusan innervált a TRIG maxillaris és ophthalmicus ágaiból származó szenzoros idegrostok által. Ugyanezen kísérlet során számos CGRP-ir idegrost jelenlétét is kimutatták a SPG-ban (Beckers et al. 1991). Suzuki és munkatársai patkányokban retrográd axon festést végeztek True Blue-val, valamint átvágták a SPG és a TRIG ophthalmicus és maxillaris ágai közötti kapcsolatot. Mindkét esetben a CGRP megjelenését is vizsgálták. A pályakövetéses vizsgálat során True Blue-t injektáltak a SPG-ba, egy hét elteltével a jelölőanyag akkumulálódását tapasztalták az ipszilaterális TRIG-ban,

a ganglion oticumban, a ganglion geniculiban, a SCG-ban és az artéria carotis interna körüli ganglionokban. A True Blue-val jelölt sejtek többsége a trigeminális ganglion maxillaris ágában jelent meg. A trigeminális és az artéria carotis interna körüli ganglionokban a jelölt sejtek CGRP-ir pozitivitást is mutattak. Két héttel a SPG és a TRIG n. maxillaris közötti rostok átvágását követően az azonos oldali SPG-ban a normál körülményekhez képest jelentősen kevesebb CGRP-ir idegrostot mutattak ki. Továbbá két héttel a n. pterygoideus átvágását követően a vastag idegrostok száma is csökkent. Mindkét kapcsolat egyidejű átvágásakor az idegrostok nem mutattak CGRP festődést. Ezen eredmények alapján a SPG-ban kimutatott CGRP-ir idegrostok eredetét tekintve az alábbi lehetőségek merültek fel: (1) a trigeminális vagy faciális idegrostok rövid axon-kollaterálisai; (2) a n. trigeminus vagy n. faciális szenzoros neuronjainak közeléből eredő hosszú axon-kollaterálisai; (3) olyan, az agytörzsi sejttestekből eredő efferens idegrostok, amelyek a n. trigeminus vagy a n. faciális rostjaival futnak együtt; (4) a craniális ganglionokból eredő efferens CGRP-tartalmú idegrostok, amelyek a n. pterygoideuson keresztül futnak (Suzuki et al. 1989). Elfogadva a SPG-ban a CGRP-ir rostok trigeminális eredetét, megfigyeléseink alapján a következő feltételezéseket tehetjük, melyek magyarázatát adhatják a migrénes betegek fejfájásrohamai során tapasztalt parasympathicus klinikai tüneteknek:

1. A TRIG neuronjaiból axontranszport segítségével CGRP jut a SPG-ba és ott aktiválja a SGC-eken lévő CGRP-R-okat.
2. Az aktivált SGC-ek stimulálják a SPG-ban lévő neuronokat.
3. A hiperaktív sphenopalatinális neuronokból neuropeptidok (VIP, PACAP) jutnak részben az intraganglionáris környezetbe, részben a craniális keringésbe.
4. A VIP és a PACAP a SPG-ban lévő SGC-ek PAC₁ és VPAC₁ receptoraira kötődve azok aktivitását hozzák létre **(45. ábra)**.



45. ábra. A szenzoros ganglion trigeminale-ból (TRIG) felszabaduló neuropeptidek lehetséges aktiváló hatása a parasympathicus ganglion sphenopalatinumra (SPG)

Rövidítések: CGRP: calcitonin-génrel rokon peptid, CLR: calcitonin receptor-szerű receptor, PAC₁: PACAP receptor1, PACAP: hipofízis adenliát-cikláz aktiváló polipeptid, RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1, SGC: satelita glia sejt, VIP: vasoactiv intestinalis polipeptid, VPAC₁: VIP₁ vagy PACAP₂ receptor, VPAC₂: VIP₂ vagy PACAP₃ receptor

3.5. *Neuropeptid megoszlás vizsgálata a humán trigemino-cervicalis komplexben (TCC)*

3.5.1. Hátér

A Moskowitz-féle trigemino-vascularis rendszer központi ágát a TRIG-ből a TCC-be jutó rostok jelentik (Buzzi and Moskowitz 1992) (**1. ábra**). Laboratóriumunkban végzett korábbi vizsgálataink szerint, a TRIG elektromos ingerlését követően patkányban a korai onkogén (c-fos és c-jun) kifejeződését figyeltük meg a gerincvelői Rexed-féle I-es és II-es laminában a TCC-ben (Knyihár-Csillik et al. 1997, Knyihár-Csillik et al. 2000). Hasonló megfigyeléseket tettek a TRIG, a SSS és az artéria meningeá media elektromos stimulációját követően majomban és macskában (Kaube et al. 1993/a; Goadsby and Hoskin, 1997; Hoskin et al. 1999/a), valamint a subarachnoidealis térbe juttatott vér segítségével kiváltott meningeális izgalom következtében (Nozaki et al. 1992). Az artéria meningeá media ingerlését követően a TNC-ban bilaterálisan c-fos expressziót figyeltek meg macskában és majomban (Hoskin et al. 1999/b). Ezen felül a SSS stimulációját követően a TNC-ban fokozott metabolikus aktivitást detektáltak (Goadsby et al. 1991). Saját és más laborok kis rágcsálókban végzett vizsgálatai jelezték, hogy a TRIG elektromos ingerlését követően, az ingerelt ganglionnal ipsilaterálisan a TNC-ban a SP-ir és a CGRP-ir csökkent (Knyihár-Csillik et al. 1998; Samsam et al. 1999).

Korábbi munkánkban a humán TRIG-ban feltérképeztük a spontán migrénes roham alatt a craniális vénás kiáramlásban megjelenő neuropeptidek (Goadsby et al. 1990) megoszlását (Tajti et al. 1999/a). Kérdésként fogalmazódott meg ezen peptidek megjelenése a humán TCC-ben, és ezért kezdeményeztük vizsgálatainkat (Uddman et al. 2002).

3.5.2. Anyag és módszer

Vizsgálataink során post-mortem humán TCC-ből készült preparátumokon immunhisztokémiai technikát alkalmaztunk. Részletes leírást lásd az 5.1. fejezetben.

3.5.3. Eredmények

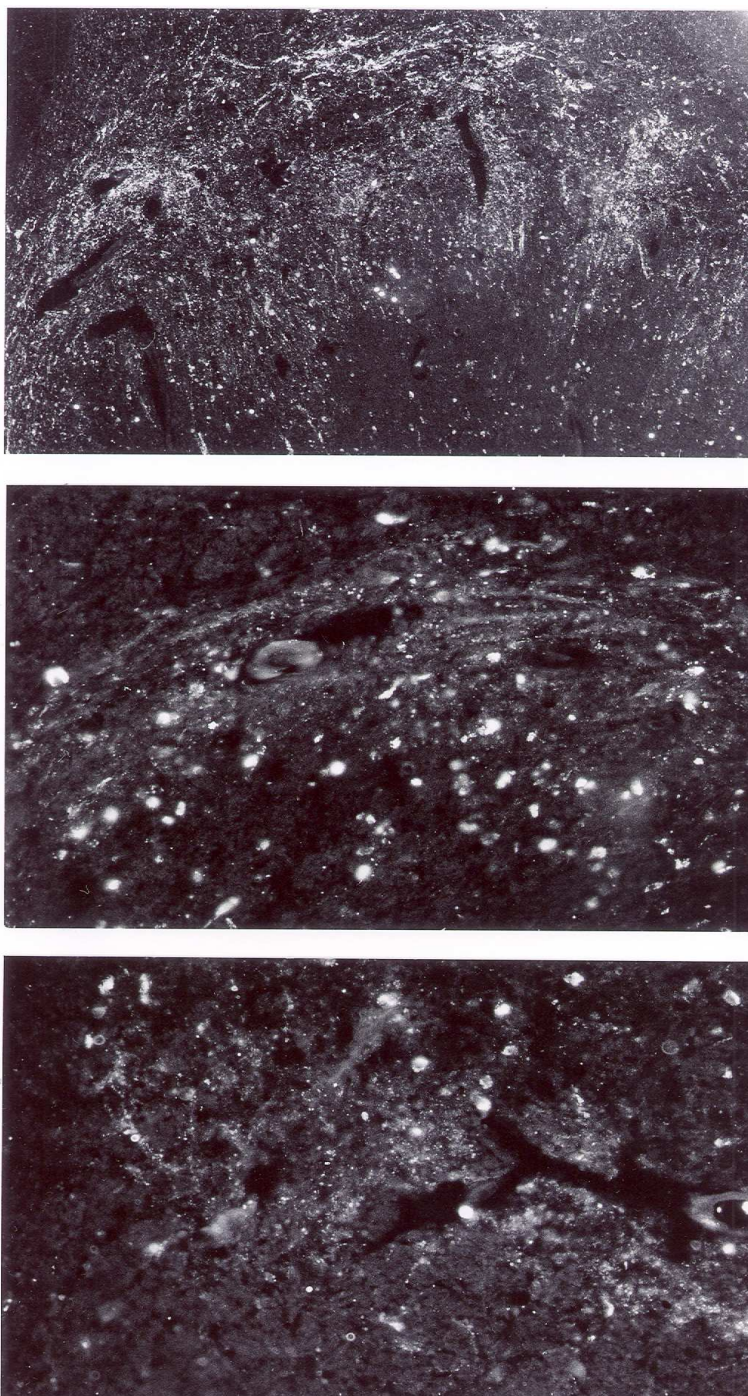
A humán TCC-ben a neuropeptidek megoszlása

Immunhisztokémia

SP-ir: SP-ir idegrostok gazdag hálózatát lehetett megfigyelni a TNC marginális, valamint a substantia gelatinosa régiójában, továbbá a gerincvelői C1-C2 szegmentumban, a Rexed-féle I-es és II-es laminában és a Lissauer-kötegben **(46. ábra; 47. ábra)**.

CGRP-ir: Közepesen gazdag CGRP-ir rostok kötegeit lehetett demonstrálni a TNC marginális és substantia gelatinosa állományában. CGRP-ir sejtek nem voltak kimutathatóak. A C1-C2 szelvényekben szintén csak immunpozitív rostok jelentek meg a Rexed-féle I-II-es laminában. A Lissauer-köteg a C2 szintben számos CGRP-ir rostot tartalmazott **(46. ábra; 47. ábra)**.

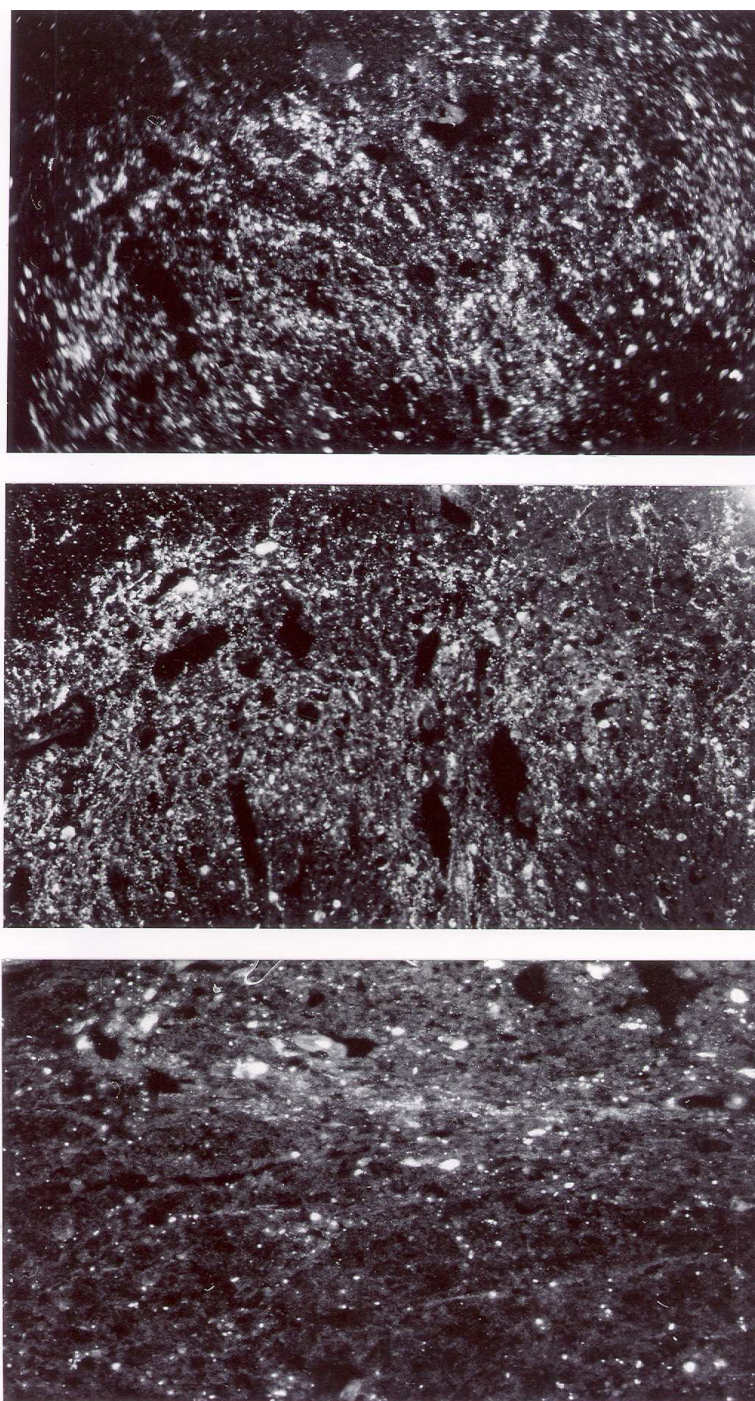
PACAP-ir: Közepes számú PACAP-ir idegrostot lehetett megfigyelni a TNC marginális és substantia gelatinosa állományában. A C1-C2 szegmentumban a Rexed-féle I-es és -II-es laminában és a Lissauer-kötegben elvétve voltak láthatóak PACAP-ir idegrostok **(46. ábra; 47. ábra)**. Nem lehetett kimutatni VIP-ir és NOS-ir tartalmú rostokat vagy sejteket a TNC-ben és a C1-C2 régióban **(6. táblázat)**.



46. ábra. A P-anyag (SP), a calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP) és a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) immunreaktivitás a humán caudalis trigeminális magcsoportban (TNC)

Számos SP-ir idegrost (felső) (150x-es nagyítás), közepesen gazdag hálózata a CGRP-ir idegrostoknak (közép) (250x-es nagyítás) és közepesen gazdag PACAP-ir idegrostok (alul) (250x-es nagyítás) láthatóak a TNC-ban.

Rövidítések: ir: immunreaktivitás, SP: P-anyag, CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, TNC: caudalis trigeminális magcsoport



47. ábra. A P-anyag (SP), a calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP) és a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) immunreaktivitás a humán cervicalis gerincvelői 1 szegmentum (C1) szintjében

Gazdag arborizációja figyelhető meg az SP-ir idegrostoknak (felső) (250x-es nagyítás) és a CGRP-ir idegrostoknak (középső) (250x-es nagyítás), és közepesen gazdag PACAP-ir idegrost arborizáció figyelhető meg (alsó) (275x-es nagyítás).

Rövidítések: C1: cervicalis gerincvelői 1 szegmentum, ir: immunreaktivitás, SP: P-anyag, CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid

6. táblázat. A humán caudalis trigeminális magcsoportban (TNC) és a cervicalis gerincvelői 1-2 szegmentum (C1-C2) régiójában az immunreakciók sematikus reprezentációja

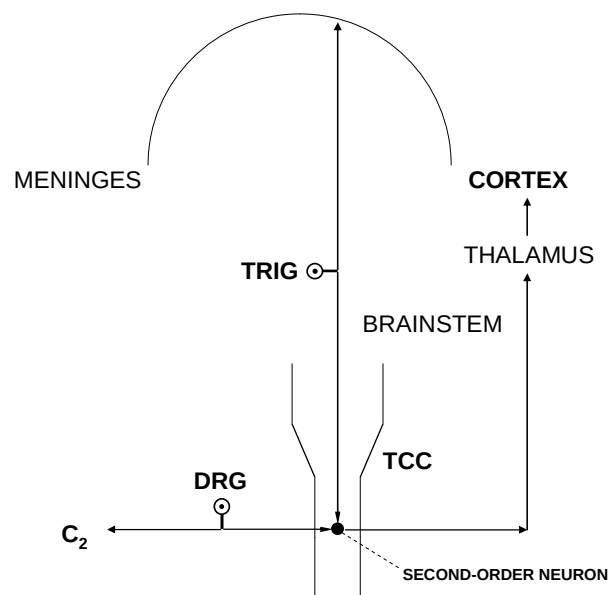
Ellenanyag	Immunreakció		
	TNC	C1	C2
SP	+++	+++	+++
PACAP	++	+	+
CGRP	++	++	++
VIP	-	-	-
NOS	-	-	-
Negatív kontroll	-	-	-

Jelölés: - nincs immunreakció, + gyenge, ++ közepes, +++ dús immunfestődés

Rövidítések: C1-C2: cervicalis gerincvelői 1-2 szegmentum, CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, NOS: nitrogén-oxid-szintetáz, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, SP: P-anyag, TNC: caudalis trigeminális magcsoport, VIP: vasoactiv intestinalis polipeptid

3.5.4. Megfigyeléseink jelentősége

- Vizsgálataink során dús SP-ir, közepes CGRP-ir és PACAP-ir rostsűrűséget figyeltünk meg, ugyanakkor NOS-ir és VIP-ir rostokat nem találtunk a humán TCC-ben. Eredményeink megerősítették azon korábbi megfigyeléseket, miszerint a humán TCC-nek igen gazdag a szenzoros beidegzése (Del Fiaccio et al. 1984.; Jakab et al. 1990; Rikard-Bell et al. 1990; Quartu et al. 1992).
- Munkánk során leírt CGRP-ir idegrostoknak a jelentőségét az adja, hogy morfológiai hátterét bizonyítják a CGRP által befolyásolt nociceptív folyamat továbbjutásának a TCC-ből a thalamus felé. Az elmúlt évtizedek megfigyelései igazolták, hogy Kerr és Olafson (Kerr and Olafson 1961) sejtései valósak, miszerint a TCC-ben a másodlagos átkapcsoló nociceptív neuronokkal nem csak a TRIG durát ellátó neuronjainak centrális végződése szinaptizálnak, hanem a C2 spinális gyök is (Bartsch and Goadsby 2002; Bartsch and Goadsby 2003; Piovesan et al. 2003; Bartsch and Goadsby 2005), melynek perifériás ágát a n. occipitalis major (GON) képezi (Becser et al. 1998; Poletti 1991) **(48. ábra)**.



48. ábra. A trigemino-vascularis rendszer és a gerincvelői cervicalis 2 szegmentum (C2) kapcsolatának vázlata (hivatkozás: Tajti et al. 2012)

Rövidítések: C₂: cervicalis gerincvelői 2 szegmentum, DRG: hátsó gyöki ganglion, TCC: trigemino-cervicalis komplex, TRIG: ganglion trigeminale

Bizonyítást nyert, hogy a CGRP erősíti a glutamaterg neurotranszmissziót a gerincvelő hátsó szarvában (Gu and Yu 2007). A glutamát e tekintetben elsősorban az α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propionsav (AMPA) és a kainát receptorokon keresztül hat a hátsó szarvi másodlagos átkapcsoló neuronokon (Ho et al. 2010). CGRP receptor antagonistával (CGRP₈₋₃₇) gátolni lehetett a CGRP-del felerősített AMPA közvetített másodlagos neuronális hatást (Ebersberger et al. 2000). Továbbá a CGRP aktiválja a gerincvelői „wide dynamic range” (WDR) neuronokat és befolyásolja a centrális szenzitizáció kialakulását (Yu et al. 2002). Bizonyítást nyert, hogy a kapszaicin által kiváltott, és így felszabadított CGRP, valamint a közvetlenül a szövetfürdőbe helyezett CGRP megszüntette az átkapcsoló másodlagos neuronok excitabilitását az agytörzsi szeletekben a TNC-ban (Meng et al. 2009). A CGRP-nek a szerepére utalnak azon *in vivo* mikroiontoforézissel végzett megfigyelések (WDR és a nociceptív specifikus átkapcsoló neuronok), melyek szerint a TCC-ben a nem-preszinaptikus CGRP-R-okat a CGRP-R blokkolóval gátolni lehetett (Storer et al. 2004). A trigemino-vascularis rendszer centrális régióiban kifejtett hatására mutattak - bár nem közvetlenül - azon eredmények, melyek szerint a szisztémásan alkalmazott CGRP nem váltotta ki a durális afferensek szenzitizációját (Levy et al. 2005). Továbbá a durális afferensek stimulációját követően a TNC-ban kialakult neuronális aktivitást a CGRP-R antagonisták csökkentették

(Fischer et al. 2005). A klinikumban, a migrénes pácienseknél a fejfájással azonos oldali arcbőrön és hajas fejbőrön kialakuló allodynia jelzi a másodlagos átkapcsoló neuronok centrális szenzitizációját a TCC-ben (Burnstein et al. 2000/a; Burnstein et al. 2000/b; Burnstein and Jakubowski 2002; Bartsch and Goadsby 2005; Goadsby 2005; Moskowitz 2008). Az allodynia olyan érzészavar, melynek során a nem fájdalmas stimulusra is fájdalmat jelez a beteg (pl. az adott bőrterület finom tapintására fájdalmat érez) (Goadsby 2005; Moskowitz 2008). Felmérések szerint a migrénes betegek 53.5%-ában jött létre allodynia, melynek 85%-a a fejre (skalp, arc, nyak, fül) lokalizálódott (Mathew et al. 2004; Dodick and Silberstein 2006). A migrénesekben a centrális szenzitizáció további klinikai jele a perikraniális izmok fájdalmas feszülése a migrénes roham során, mely a GON és a másodlagos átkapcsoló neuronok funkcionális kapcsolatán alapszik (Burnstein et al. 2000; Goadsby 2005/b; Bartsch and Goadsby 2003).

3.6. *Neuropeptid megoszlás vizsgálata a humán agytörzs egyes magcsoportjaiban („migrén generátor-modulátor”), a raphe magcsoportban (NR), a locus ceruleusban (LC) és a periaqueductalis szürkeállományban (PAG)*

3.6.1. Háttér

A migrén diagnózisát a fejfájás jellege és a kísérő klinikai tünetek együttesen adják (Headache Classification Committee of the International Headache Society 2013). A migrénes roham során a féloldali görcsös, lüktető fájdalom mellett jelentkező hányinger, hányás, fény- és hangérzékenység (foto- és fonofóbia) háttérében agytörzsi központok aktivitását vélték (Lance et al. 1983; Lance et al. 1990; Davidoff 1995; Silberstein et al. 1998). Korai megfigyelések szerint humánban a PAG elektromos ingerlése analgéziát okozott (Hosobuchi et al. 1977). Ugyanakkor krónikusan beültetett elektródával történő ingerlés során (ventrolaterális PAG) 175 daganatos beteg közül 15 egyénben migrén-szerű fejfájás alakult ki, bár ezt megelőzően hasonló panaszuk nem volt (Raskin et al. 1987). Ezt a megállapítást más beteganyagon, más szerzők is megerősítették (Velooso et al. 1998). Az agytörzs működését célzó elektrofiziológiai vizsgálatok („blink reflex”) a hídban és a laterális nyúltvelőben a poliszinaptikus reflex válaszok szuppresszióját igazolták migrénes fejfájásroham során (Kimura 1983; Bánk et al. 1992; Avramidis et al. 1998). Az 1990-es évek elején már elérhető volt a nagy felbontású pozitron emissziós tomográfia (PET), mely vizsgálattal spontán migrénes roham alatt megnövekedett regionális cerebrális vérátáramlást mutattak ki az agytörzs rostrális régiójában (Weiller et al. 1995). A képalkotó vizsgálatok szerint elsősorban a PAG, a LC és a nucleus raphe magnus (NRM) mutatott aktivitást, mely sumatriptan (5-HT_{1B/1D} receptor agonista) adását követően is fennmaradt, bár a fejfájás

megszűnt (Weiler et al. 1995). Ezért „migrén generátoroknak” nevezték el a fenti agytörzsi magcsoportokat. Ezen időszakban végzett kontrollált gyógyszerhatékonysági klinikai vizsgálatok eredményei arra utaltak, hogy a lipofil, a vér-agy gáton jól áthaladó triptánok az agytörzset elérve csökkentették a visszatérő migrénes rohamok számát (Schoenen 1997; Goadsby 1998). A migrén-specifikus agytörzsi magcsoportok és a neuropeptidek szerepéről kevés adat állt rendelkezésre. Ezért érdeklődésünket kielégítendően fogtunk hozzá a PAG, a LC és a NRM neuropeptid megoszlásának a feltérképezéséhez humánban (Tajti et al. 2001).

3.6.2. Anyag és módszer

Vizsgálataink során post-mortem humán agytörzsi magcsoportokból (NRM, LC, PAG) készült preparátumokon immunhisztokémiai technikát alkalmaztunk. Részletes leírást lásd az 5.1. fejezetben.

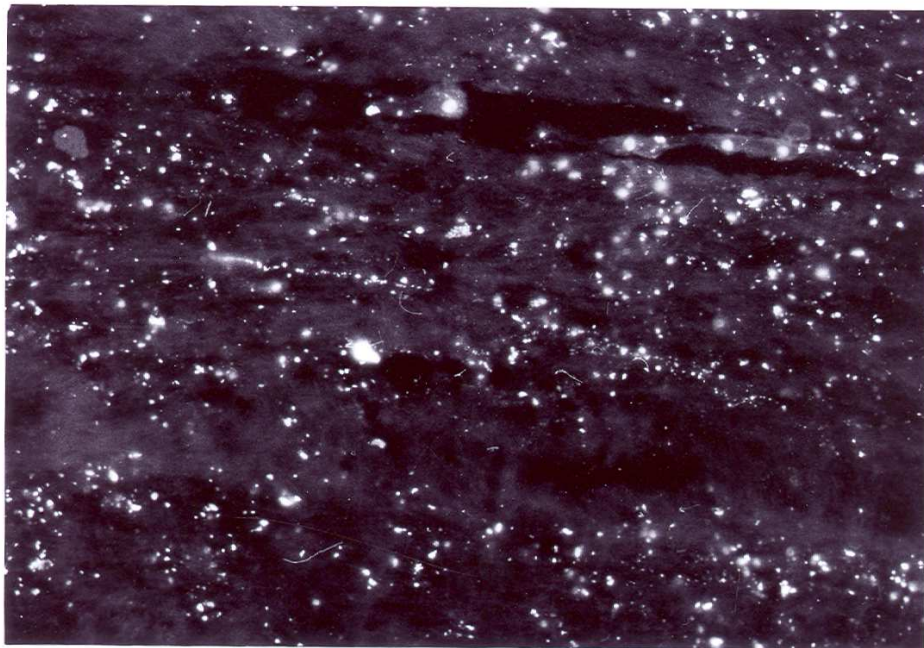
3.6.3. Eredmények

Immunhisztokémia

NRM: nagyszámú SP-ir és kevés gyengén festődő VIP-ir idegrostot lehetett megfigyelni. CGRP-ir, PACAP-ir rostokat vagy SP-ir, VIP-ir sejteket nem lehetett kimutatni **(49. ábra)**.

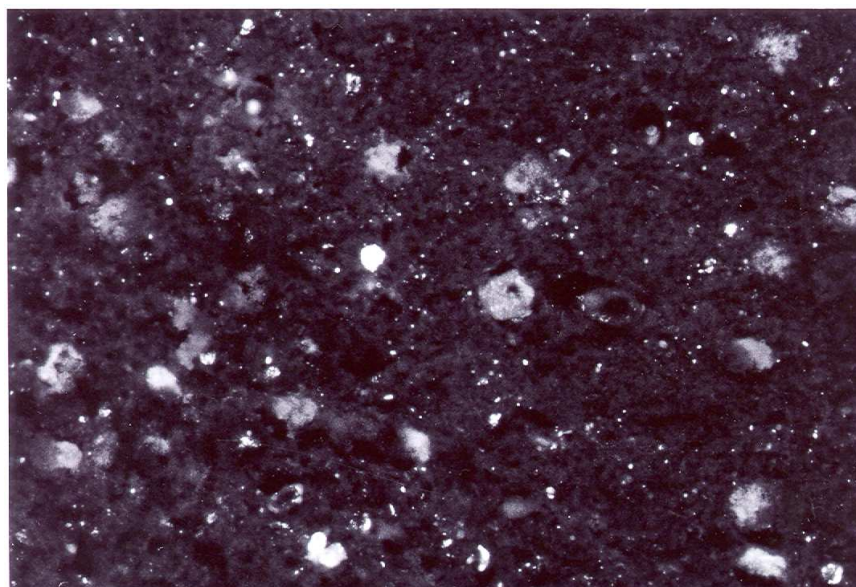
LC: a CGRP-ir neuronok igen magas arányban (80%) jelentek meg és egyenletesen oszlottak el. A neuronok 40%-a PACAP-ir-t mutatott **(50. ábra)**. VIP-ir idegsejteket nem lehetett detektálni. Dúsan festődő, nagyszámú SP-ir rostot lehetett demonstrálni. A sejtek nagy számban VMAT-ir-t és C-PON-ir-t mutattak. Kettős immunfestéssel igazolható volt, hogy az összes VMAT-t és C-PON-t tartalmazó neuron CGRP-ir-t is adott **(51. ábra A, B, C, D)**.

PAG: gazdag SP-ir rosthálózat, kevés PACAP-ir és VIP-ir idegrost volt látható. CGRP-ir idegrostokat vagy sejteket nem lehetett demonstrálni **(52. ábra A, B; 7. táblázat)**.



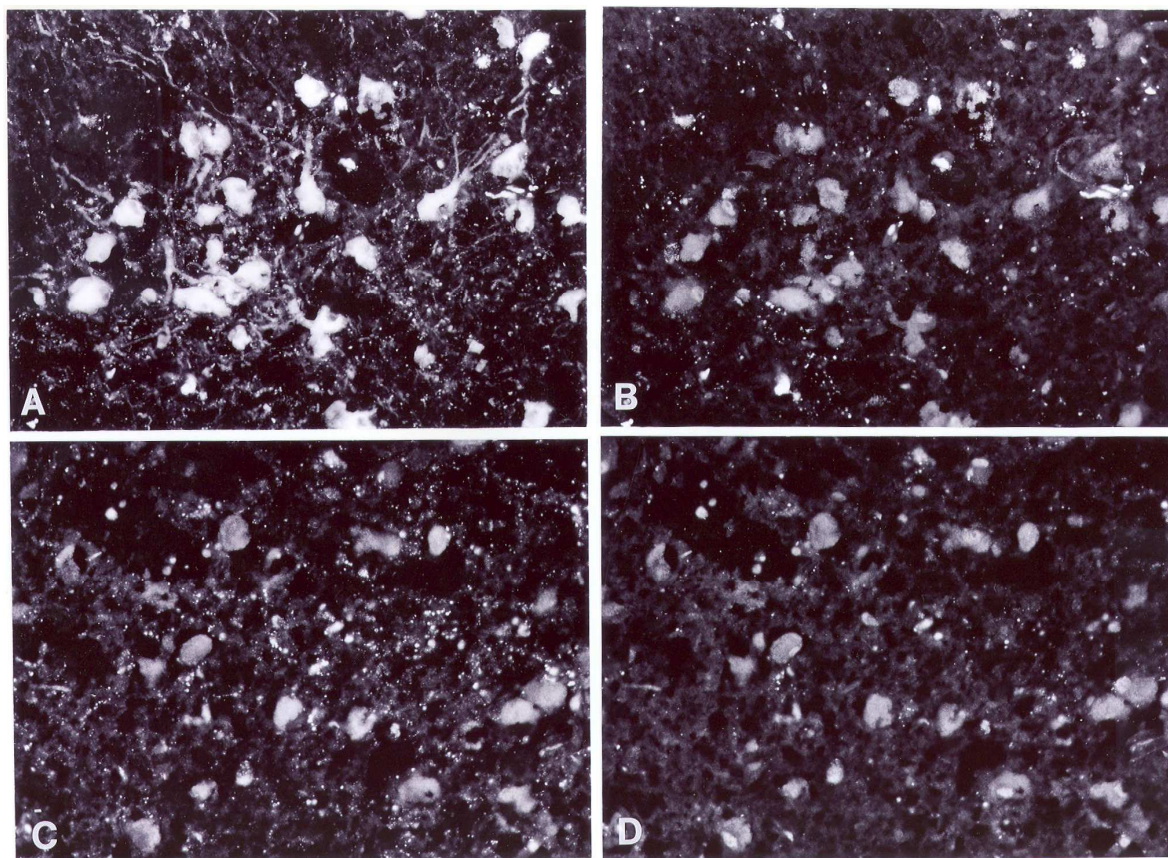
49. ábra. P-anyag (SP) immunreaktivitás a humán nucleus raphe magnusban (NRM)

A finom varikozitású SP-ir rostok gazdag hálózata volt megfigyelhető a NRM-ban.
Rövidítések: ir: immunreaktivitás, NRM: nucleus raphe magnus, SP: P-anyag



50. ábra. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) immunreaktivitás a humán locus ceruleusban (LC)

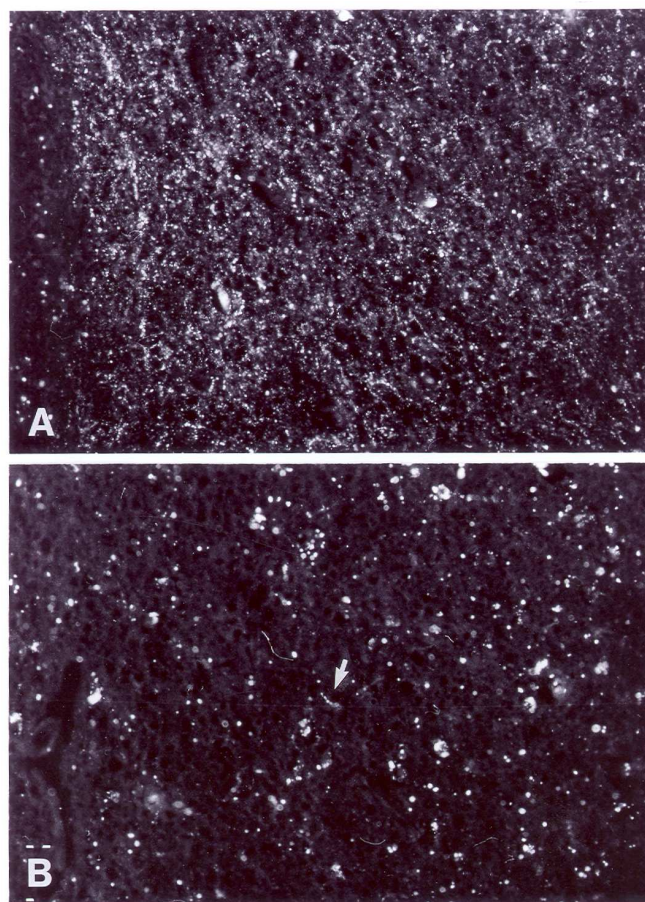
PACAP-ir idegsejttestek voltak megfigyelhetők a LC-ban.
Rövidítések: ir: immunreaktivitás, LC: locus ceruleus, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid



51. ábra (A, B, C, D). Immunreaktivitás a humán locus ceruleus (LC) metszeteiben

Kettős immunfestése a VMAT (A), a CGRP (B), a C-PON (C) és a CGRP (D) vonatkozásában mutatta a jelenlétét a CGRP-ir sejteknek, melyek VMAT-t és C-PON-t is tartalmaztak.

Rövidítések: ir: immunreaktivitás, CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, C-PON: neuropeptid Y C-terminalis flanking peptidje, LC: locus ceruleus, VMAT: vesicula monoamin transzporter



52. ábra (A, B). A P-anyag (SP) és a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) immunreaktivitás a humán periaqueductalis szürkeállományban (PAG)

Gazdag arborizációja volt megfigyelhető a SP-ir rostoknak a PAG-ban (A), ugyanakkor csak elvétve voltak fellelhetők a PACAP-ir rostok (nyíl) (B).

Rövidítések: ir: immunreaktivitás, PAG: periaqueductalis szürkeállomány, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, SP: P-anyag

7. táblázat. Neuropeptidek megoszlása a humán agytörzsi magcsoportokban: nucleus raphe magnus (NRM), locus ceruleus (LC), periaqueductalis szürkeállomány (PAG)

Neuropeptid	NRM	LC	PAG
CGRP	-	sejtek 80%-a	-
SP	rostok +++	rostok +++	rostok +++
PACAP	-	sejtek 40%-a	rostok +
VIP	rostok +	-	rostok +

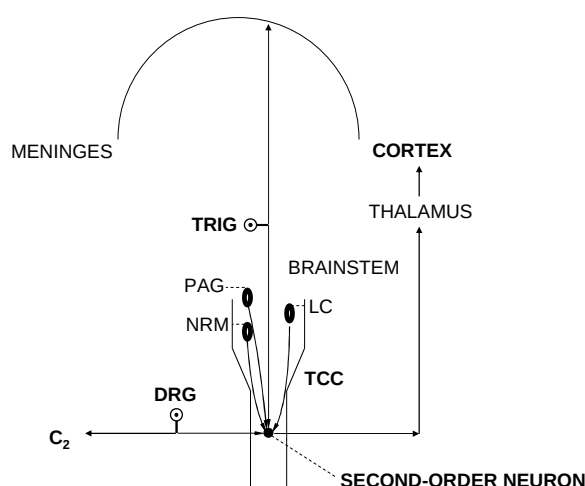
Beosztás: - nincs rost, + kevés, ++ közepes, +++ számos rost

Rövidítések: CGRP: calcitonin génrel-rokon peptid, LC: locus ceruleus, NRM: nucleus raphe magnus, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, PAG: periaqueductalis szürkeállomány, SP: P-anyag, VIP: vasoactiv intestinalis polipeptid

3.6.4. Megfigyeléseink jelentősége

- A NRM-ban nagyszámú SP-ir idegrostot figyeltünk meg. A KIR egyik legnagyobb szerotonerg központja a raphe magcsoport. A migrénben tapasztalt szerotonerg funkciózavar a mai napig teljességében nem feltárt folyamat (Schoenen 2014; Sakai et al. 2014). Fejfájásmentes periódusban emelkedett szerotonin transzporter hozzáférhetőséget tapasztaltak (Schuh-Hofer et al. 2007). Kellemetlen szaganyagokkal kiváltott migrénes roham során PET vizsgálattal a NR-ban megnövekedett 5-HT_{1A} receptor elérhetőséget kaptak (Demarquay et al. 2011). Állatkísérletes vizsgálatainkból kitűnt, hogy a TRIG elektromos ingerlését követően kialakult NRM aktivitást nem a TNC, hanem a thalamus és a cortex befolyásolta (Bohár et al. 2013). Ugyanakkor az NRM adja a fő leszálló fájdalom moduláló rostrendszerét a gerincvelői hátsó szarvi képleteknek (Bohár et al. 2013). A nyúltvelő gazdag SP-ir neuronokban (Halliday et al. 1988). A SP interakcióban van a katekolaminerg és a szerotonerg rendszerrel. A migrén egyik komorbid tényezője a depresszió (Lipton and Silberstein 1994). A migrénesekben 2.2-szer több a depressziósok aránya, mint a normál populációban (Antonoci et al. 2011). A depresszió kialakulása és a szerotonerg rendszer között szoros összefüggés van (Owens and Nemeroff 1994). Depressziós betegek vérplazmájában és CSF-ában emelkedett SP koncentrációt mértek (Rimon and Le Greves 1984; Herpfer and Lieb 2003). Fiatal egészséges egyéneknél SP infúzió adását követően alvászavar és a hangulati élet megváltozása, deprimáltság alakult ki (Lieb and Ahlvers 2002). A SP kötőhelye a neurokinin-1 (NK-1) receptor. Kettősvak, placebo-kontrollált, randomizált klinikai vizsgálatok szerint a NK-1 receptor antagonisták (lanepitant, vofopitant, fosaprepitant) orális vagy iv. bevitel mellett, aurás vagy aura nélküli migrénes betegekben, akut vagy preventív terápiában hatástalanok voltak (Goldstein et al. 1997; May and Goadsby 2001; Munoz and Covenas 2014). Ugyanakkor depresszióban egyes NK-1 receptor blokkolók kedvezően befolyásolták a hangulati életet, sőt antiemetikus hatással is rendelkeztek, ezért felmerült a lehetősége annak, hogy a migrén rohamterápiájában adjuvánsként bevezetésre kerüljenek (Rupniak and Kramer 1999; Rupniak 2002/a; Rupniak 2002/b).
- Tudomásunk szerint, immunhisztokémiai vizsgálatokkal elsőként mutattunk ki PACAP-ir neuronokat a humán LC-ban. Palkovits és munkatársai radioimmunoassay (RIA) vizsgálattal bizonyították a PACAP jelenlétét az LC-ban (Palkovits et al. 1995). A LC-ban a neuronok 40%-a PACAP-ir-t adott. A KIR-ben a LC a fő forrása a NA-nek, innen származik az agy noradrenerg innervációjának 96%-a (Amaral and Sinnamon 1977; Afridi et al. 2005/a). A LC

aktivitása nagymértékben befolyásolja az ipsilaterális corticális és meningeális vasculatura tónusát (Lancet et al. 1983). Bizonyítást nyert, hogy a LC-ból noradrenerg, a PAG-ból szerotonerg rostok jutnak a TNC-be (Palkovits and Jacobowitz 1974; Basbaum et al. 1978; Lovick and Walstencroft 1983; Cropper et al. 1984). Ezen anatómiai megfigyelések azt jelzik, hogy a fájdalom transzmisszióját a trigeminovascularis rendszerben és különösen a TNC-ben - mely kulcs régiója az elsődleges fejfájásoknak - nagymértékben befolyásolják az LC adrenerg és az NRM és a PAG szerotonerg projekciói (Davidoff 1995; Edvinsson and Goadsby, 1998) (**53. ábra**). A fájdalom továbbításában ezen rostok feltehetően kapu-kontroll szerepet játszanak a bejövő fájdalomszignálok modulálásával és csökkentik ezen jelzéseket a KIR-ben (Fields and Basbaum, 1994). A PACAP dilatálja a cerebrális artériákat (Uddman et al. 1993/a; Anzai et al. 1995) és képes növelni a cerebrális vérátáramlást (Seki et al. 1995/a; Seki et al. 1995/b). Nagy specifitású PACAP-27 kötőhelyek előfordulását radioligand kötődési vizsgálatok demonstrálták a humán agytörzsben (Suda et al. 1991). RIA vizsgálatok nagy koncentrációjú PACAP jelenlétét mutatták ki a PAG-ban (Palkovits et al. 1995). Vizsgálatainkban megfigyeltük, hogy az LC-ban a neuronok nagy százaléka PACAP-ir-t mutatott, ugyanakkor alig találtunk PACAP-ir rostokat a PAG-ban. A LC-ban jelentős számú CGRP-ir neuronokat is megfigyeltünk. Más kutatócsoport RIA vizsgálatokkal erőteljes CGRP-ir jelenlétet igazolt a humán LC-ban (Tiller-Borcich et al. 1988). Tehát a PACAP és a CGRP előfordulása a noradrenerg neuronokban azt jelzi, hogy a PACAP-nek jelentős szabályzó szerepe van a szenzoros és az autonóm idegrendszerben. Ezen felül a LC és a PAG feltehetően befolyásolják a trigemino-vascularis rendszert neuromodulátor hatásuk alapján.



53. ábra. A trigemino-vascularis rendszer, a cervicalis gerincvelői 2 szegmentum (C₂) és az agytörzsi magcsoportok kapcsolatának vázlata (hivatkozás: Tajti et al. 2012)

Rövidítések: C2: cervicalis gerincvelői 2 szegmentum, DRG: hátsó gyöki ganglion, LC: locus ceruleus, NRM: nucleus raphe magnus, PAG: periaqueductalis szürkeállomány, TCC: trigemino-cervicalis komplex, TRIG: ganglion trigeminale

Újkeletű funkcionális mágneses rezonanciás képalkotó (fMRI) vizsgálatok eredményei szerint az agytörzsi régiók aktivitása csak migrénes rohamban volt megfigyelhető, míg preiktálisan nem (Stankiewicz et al. 2011). Tehát ezen agytörzsi magcsoportok elsősorban modulátorai a migrénes fejfájásnak, résztvesznek a centrális szenzitizáció és a fájdalom kontrollálásában (Pietrobon and Moskowitz 2013).

3.7. Klinikailag könnyen elérhető, a migrénes betegek cerebrális hiperexcitabilitását tükröző biomarkerek (nyálban lévő aminosavak) meghatározása

3.7.1. Háttér

Biomarker alatt a biológiai funkciók mérhető indikátorát értjük. Gyakran alkalmazzák a betegségek prognosztikájának meghatározására vagy a kifejlődéséhez vezető rizikótenyezők értékeléseként (Kimberly 2012). Vizsgálatainkat az motiválta, hogy az 1990-es években jelentek meg az első, főként elektrofiziológiai adatok, melyek arra utaltak, hogy a migrénes betegekben cerebrális hiperexcitabilitás alakul ki. Az elektrofiziológiai vizsgálatoknak az adta az alapját, hogy a hiperexcitabilitást karakterizálni lehetett azzal, hogy különböző szenzoros ingerekre egyre növekvő választ kaptak. Az első megfigyelés, a vizuális kiváltott válasz (VEP) tanulmányozása során írt le eltéréseket migrénben (Gawel et al. 1983). Megnövekedett P100 hullám amplitudót figyeltek meg, mely korrelált az alacsony szérumban magnézium ion (Mg^{2+}) koncentrációval (Aloisi et al. 1997). Aurás migrénesekben a megnövekedett P100 amplitudók az aura-tünetekkel ellenoldalon mutattak szignifikáns különbséget (Shibata et al. 1997). Ezzel összhangban, a migrénesekben, a kontrollhoz képest auditoros stimulusokra megnövekedett corticális válaszokat kaptak (Wang et al. 1996). Transzkranialis mágneses ingerlés (TMS) során alacsony foszfén kialakulási küszöböt tapasztaltak aurával járó migrénben, mely az occipitalis cortex hiperexcitabilitását tükrözte (Aurora et al. 1988). Egy másik érdekes jelenség a habituációs deficit, melyet szintén felismertek migrénesekben (Maertens de Noordhout et al. 1986). Habituációs deficit alatt azt értjük, amikor az ismételt szenzoros stimulusokra a normál körülmények között jelentkező válaszok csökkenése elmarad. Az első megfigyelést a migrénesekben a megnövekedett kontingens negatív variáció amplitudó jelezte (Maertens de Noordhout et al. 1986). VEP vizsgálatokkal megnövekedett N_1 - P_1 és N_1 - P_2 amplitudókat tapasztaltak szemben az egészséges egyéneknél megfigyelt amplitudó csökkenéssel (Schoenen et al. 1995). Érdekes részét képezi a migrén

kórfolyamatának az aura tüneteinek a kialakulása. Elsőként Lashley vetette fel, hogy az aura jelenségeket 3 mm/órával propagálódó corticális neuronális zavar okozhatja (Lashley 1941). A CSD jelenségét, mint az aura hátterében zajló elektrofiziológiai folyamatot Leao figyelte meg először (Leao 1944). A CSD alatt az erőteljes neuronális és gliális depolarizáció lassan tovaterjedő hullámát értjük, melyet (spontán vagy kiváltott) electroencephalographiás aktivitás csökkenés, nagymértékben megnövekedett extracellularis kálium ion (K^+) koncentráció és haemodinamikai változások (kezdetben hyperaemia, majd oligaemia) kísérik (Tajti et al. 2011; Pietrobon and Moskowitz 2013). Migrénes betegekben az occipitalis cortex hiperexcitabilitását határozták meg, mint a CSD kialakulásának legfőbb tényezőjét (Cao et al. 1999). Biokémiai eltérések is a migrénesekben kialakult hiperexcitabilitásra utaltak. Nagyenergiájú foszfátkötések detektálására alkalmas a ^{31}P mágneses rezonanciás spectroscopia (^{31}P -MRS). Ezen eljárással migrénes betegek agyában károsodott foszfát energia metabolizmust igazoltak roham alatt (Welch et al. 1989). A csökkent foszfokreatin és inorganikus foszfát arány is a celluláris energia csökkenésére utalt (Sacquegnia et al. 1992). Továbbá csökkent energia metabolizmust, mitochondrialis funkciózavart jelzett azon megfigyelés, miszerint a migrénesek agyában a csökkent foszfokreatin tartalommal egyidejűleg magas adenosin-difoszfát (ADP) koncentrációt mértek és ugyanezen betegek vázizomzatában a fizikai aktivitást követően csökkent a foszfokreatin visszaalakulása (Montagna et al. 1994/a; Montagna et al. 1994/b). Hasonló eltéréseket (a páciensek occipitalis lebenyében csökkent foszfokreatin koncentrációt és ehhez csatlakozó emelkedett ADP értéket, a m. gastrocnemiusban fizikai erő kifejtését követően csökkent foszfokreatin újraépülést) figyeltek meg FHM-ben is, mely generalizált energiaháztartás zavart jelzett (Uncini et al. 1995). A migrénes roham során mért alacsony cerebrális Mg^{2+} koncentráció is a károsodott energia metabolizmusra utalt (Ramadan et al. 1989). A migrénesekben kialakult cerebrális hiperexcitabilitást jeleztek a különböző testnedvekben mért eltérések is. A nyálban és a vérplazmában interiktálisan csökkent Mg^{2+} koncentrációt tapasztaltak egészségesekhez képest, mely rohamban további csökkenést mutatott (Gallai et al. 1992; Sarchielli et al. 1992). Aurás és aura nélküli migrénesek fejfájásrohamában a CSF-ban emelkedett glutaminsav (Glu) koncentrációt mértek (Martinez et al. 1993). Továbbá a vérplazmában és a vérlemezkékben is emelkedett Glu koncentrációt észleltek a kontroll csoportokhoz képest (Ferrari et al. 1990; D'Andrea et al. 1991, Conanzi et al. 1995). Más vizsgálatok a plazmában emelkedett koncentrációban találták a glicin (Gly), a cystein és a homocystein megjelenését (Alam et al. 1998). Az elektrofiziológiai és biokémiai vizsgálatok eredményeitől meggyőzve, célunk volt egy klinikailag könnyen elérhető, a migrénes betegek

cerebrális hyperexcitábilis állapotát tükröző biomarker meghatározása. Célunk eléréséhez a migrénes betegek nyálának aminosav elemzését választottuk (Rajda et al. 1999).

3.7.2. Anyag és módszer

Vizsgálataink során aurával járó és aura nélküli migrénes betegek fejfájásmentes szakaszában gyűjtött nyálmintákban az aminosavak meghatározása reverz fázisú – magasnyomású folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) történt, egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva. Részletes leírást lásd az 5.1. fejezetben.

3.7.3. Eredmények

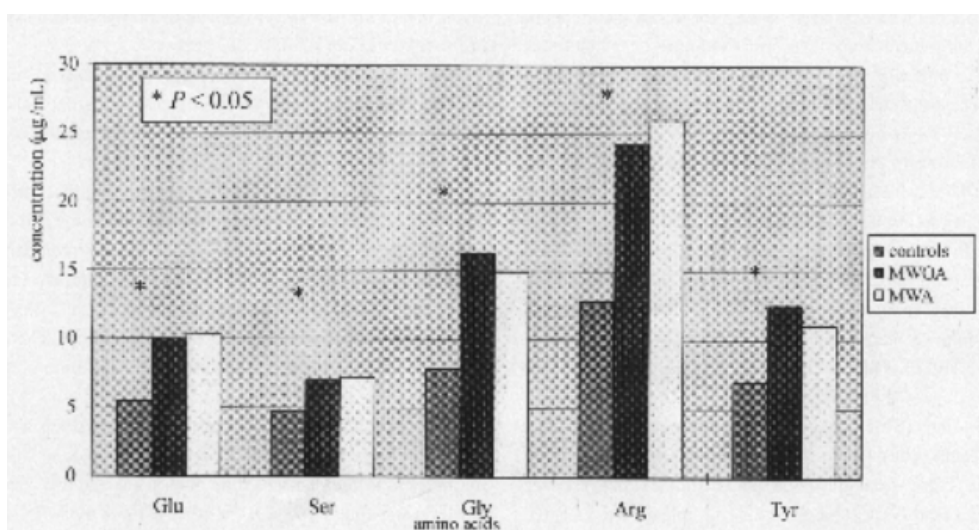
Az aura nélküli migrénes betegek nyálában a fejfájásmentes periódusban a Glu, a szerin (Ser), a Gly, az arginin (Arg) és a tyrozin (Tyr) koncentrációja statisztikailag szignifikáns módon növekedett az egészséges kontrollhoz viszonyítva (**8. táblázat; 54.ábra**).

8. táblázat. A migrénes betegek nyálában az aminosav koncentráció változása az intervallum periódusban a kontrollhoz viszonyítva

Aminosav	Aura nélküli migrén	Aurás migrén	Kontroll
	Aminosav koncentráció (ug/mL ± S.E.)	Aminosav koncentráció (ug/mL ± S.E.)	Aminosav koncentráció (ug/mL ± S.E.)
Glu	9.94 ± 1.76	10.38 ± 2.69	5.43 ± 1.07
Ser	7.01 ± 10.3	7.23. ± 1.76	4.72 ± 0.79
Gly	16.30 ± 3.06	14.96 ± 6.79	7.90 ± 1.44
Arg	24.30 ± 6.35	26.07 ± 5.95	12.85 ± 2.56
Tyr	12.53 ± 1.64	11.12 ± 2.35	7.00 ± 1.02

Az adatokat az átlag és az átlag szórása (± standard error) megadásával tünettük fel.

Rövidítések: Arg: arginin, Glu: glutaminsav Gly: glycine, S.E.: standard error, Ser: szerin, Tyr: tyrozin



54. ábra. A migrénes betegek nyálában az aminosav koncentráció változása intervallum periódusban a kontrollhoz képest (grafikus megjelenítés)

A Glu, a Ser, a Gly, az Arg és a Tyr koncentrációja statisztikailag szignifikánsan emelkedett ($p < 0.05$) az aura nélküli migrénesek nyálában (MWOA) a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A Kruskal-Wallis teszt szignifikáns aminosav koncentráció emelkedést igazolt a migrénesek nyálában. A páronkénti összehasonlításhoz Dunn-féle módszert használtunk, amely a Glu, a Ser, a Gly, az Arg és a Tyr koncentráció szignifikáns emelkedését mutatta az aura nélküli migrénesek nyálában, a kontroll csoporthoz képest. Nem találtunk szignifikáns különbséget az aminosavak koncentrációjában az aura nélküli és az aurával járó migrénesek között.

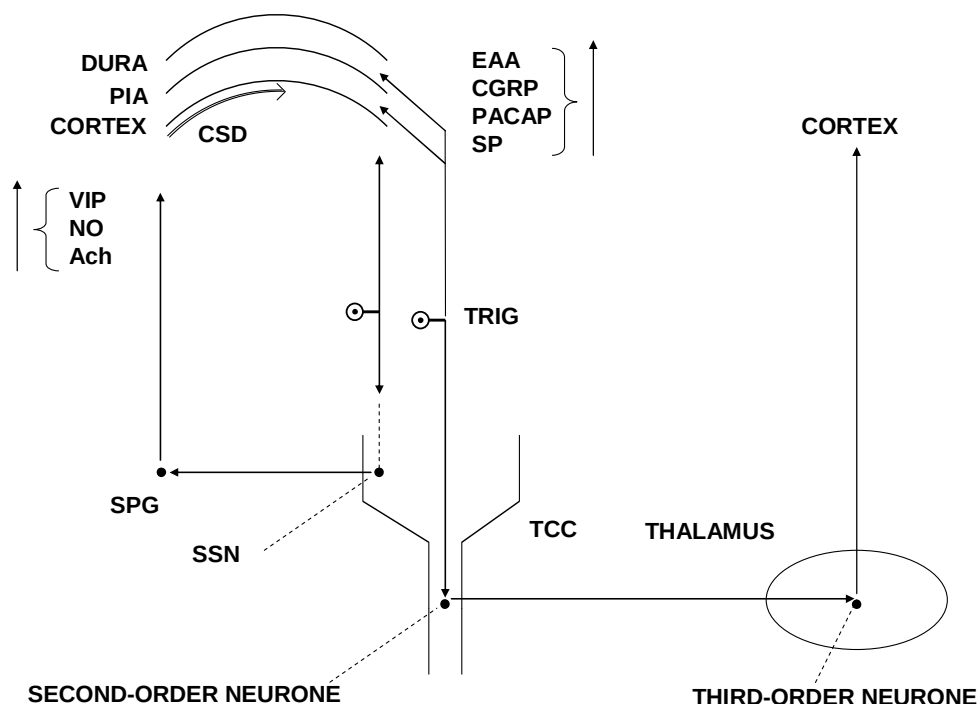
Rövidítések: Arg: arginin, Glu: glutaminsav Gly: glicin, MWA: aurás migrén, MWOA: aura nélküli migrén, Ser: szerin, Tyr: tirozin

3.7.4. Megfigyeléseink jelentősége

Vizsgálatainkban a migrénes betegek nyálában az intervallum periódusban az excitatoros aminosavak (EAA) (Glu, Ser, Gly, Arg és Tyr) emelkedett koncentrációját figyeltük meg. A nyál, mint testfolyadék alkalmas a migrénesek cerebrális hiperexcitabilitásával kapcsolatos markerek megfigyelésére.

Vizsgálatainkhoz a testnedvek közül azért a nyálát választottuk, mert a betegektől nem invazív módon, könnyen nyerhető, és a körülmények standardizálhatóak. A nyál stabil folyadék, a proteingazdag étel elfogyasztása után a posztprandiális időszakban is csak nagyon alacsony koncentrációbeli különbségeket figyeltek meg az aminosavakkal kapcsolatban a plazmához és a vizelethez viszonyítva. Táplálkozás hiányában nem találtak szignifikáns különbséget a nyálban az aminosav koncentráció tekintetében. Számos adat arra utalt, hogy a nyál összetétele nem követte a diurnális változásokat (Brand et al. 1997). A nyál igen közeli kapcsolatban van a trigeminális idegvégződésekkkel, melyek beidegzik a bucca mucosáját (n. buccalis, szenzoros ideg) és a nagy nyálmirigyet, a parotist (n. mandibularis secreto-motoros rostjai). A parotis autonóm beidegzése a nucleus salivatorius inferiorból (n.

glossopharyngeus parasympathicus magcsoportja), míg a submandibularis és sublingualis nyálmirigyek autonóm ellátása a SSN-ből (n. facialis parasympathicus magcsoportja) származik. Az agytörzsben a trigeminális izgalom a TCC-ből eljuthat a n. faciális parasympathicus magcsoportjába, a SSN-ba. Ezt az útvonalat nevezzük trigemino-faciális reflexnek (Goadsby and Lance 1988; Pietrobon and Moskowitz 2013). Az agytörzsi parasympathicus magcsoportok a SPG-ot és a ganglion oticumot innerválják, melyek ezt követően a perifériás célszervekben váltanak ki parasympathicus izgalmi állapotot (miosis, ptosis, könnyezés, orrfolyás, orrdugulás, kötőhártya belöveltség), valamint VIP, NO és Ach felszabadulást a meningeális efferensekből (55. ábra).

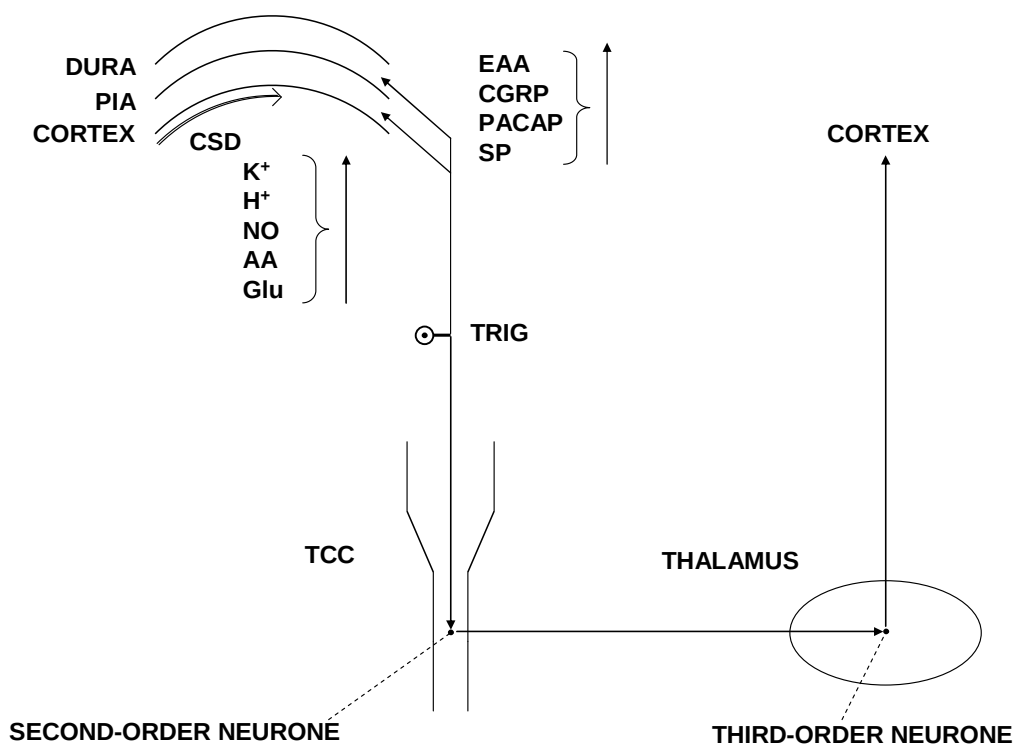


55. ábra. A trigemino-vascularis rendszer és a parasympathicus rendszer kapcsolata

(hivatkozás: Tajti et al. 2012; Pietrobon and Moskowitz 2013)

Rövidítések: Ach: acetilkolin, CGRP: calcitonin génrel-rokon peptid, CSD: tovaterjedő kérgi gátlás, EAA: excitatoros aminosav, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, NO: nitrogén-monoxid, SP: P-anyag, SPG: ganglion sphenopalatinum, SSN: nucleus salivatorius superior, TCC: trigemino-cervicalis komplex, TRIG: ganglion trigeminale, VIP: vasoactiv intestinalis polipeptid

A CSD hatására K^+ , hidrogén ion (H^+), nitrogén-monoxid (NO), arachidonsav (AA) és Glu szabadul fel, melyek aktiválják a meningeális (dura, pia) nociceptorokat. Az aktivált meningeális trigeminális érzőidegvégződésekből vasoactiv neuropeptidek (CGRP, PACAP, SP) és EAA-ak szabadulnak fel, melyek neurogén inflammációt (vasodilatatio, plasma protein extravasatio) és a trigeminális afferensek perifériás szenzitizációját váltják ki (Bolay et al. 2002; Pietrobon and Moskowitz 2013) (56. ábra).



56. ábra. A trigemino-vascularis rendszer és a tovaterjedő kérgi gátlás (CSD) kapcsolata

(hivatkozás: Tajti et al. 2012; Pietrobon and Moskowitz 2013)

Rövidítések: AA: arachidonsav, CGRP: calcitonin génrel-rokon peptid, CSD: tovaterjedő kérgi gátlás, EAA: excitatoros aminosav, Glu: glutaminsav, H^+ : hidrogén ion, K^+ : kálium ion, NO: nitrogén-monoxid, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, SP: P-anyag, SPG: ganglion sphenopalatinum, SSN: nucleus salivatorius superior, TCC: trigemino-cervicalis komplex, TRIG: ganglion trigeminale

Klinikailag a perifériás szenzitizációt jelzi a migrénes roham során a betegekben kialakuló intrakraniális hiperszenzitivitás és a fejfájás lüktető jellege. Az intrakraniális hiperszenzitivitás következtében erősödik fel a páciensek fejfájása fizikai erőfelfejtés (pl. futás, felfelé történő lépcsőzés) vagy akár köhögés során (Burstein et al. 2000/b; Burstein et al. 2002; Olesen et al. 2009). A migrénes roham során a fejfájás lüktető jellegét az adja, hogy a szenzitizálódott meningeális nociceptorok túlérzékenyvé váltak az artériás pulzáció keltette

és a CSF által továbbított ritmusosan hullámzó intrakraniális nyomásváltozásra (Burstein et al. 2000/b; Burstein et al. 2002; Olesen et al. 2009).

A centrális szenzitizáció létrejötte a TCC-ben a másodlagos átkapcsoló neuronok közreműködésével zajlik. A folyamatban a CGRP és - feltételezhetően - a PACAP mellett elsősorban a CGRP által facilitált Glu-nak van szerepe (Messlinger et al. 2011; Messlinger et al. 2012). Vizsgálataink alapján a migréneseek nyálában észlelt EAA koncentráció emelkedés – különösen a Glu – biomarkere lehet a migrénese betegek cerebrális hiperexcitabilitás állapotának.

3.8. Az eikozanoid szintézis vizsgálata fájdalommentes periódusban lévő migrénese nők vérlemezkéiben

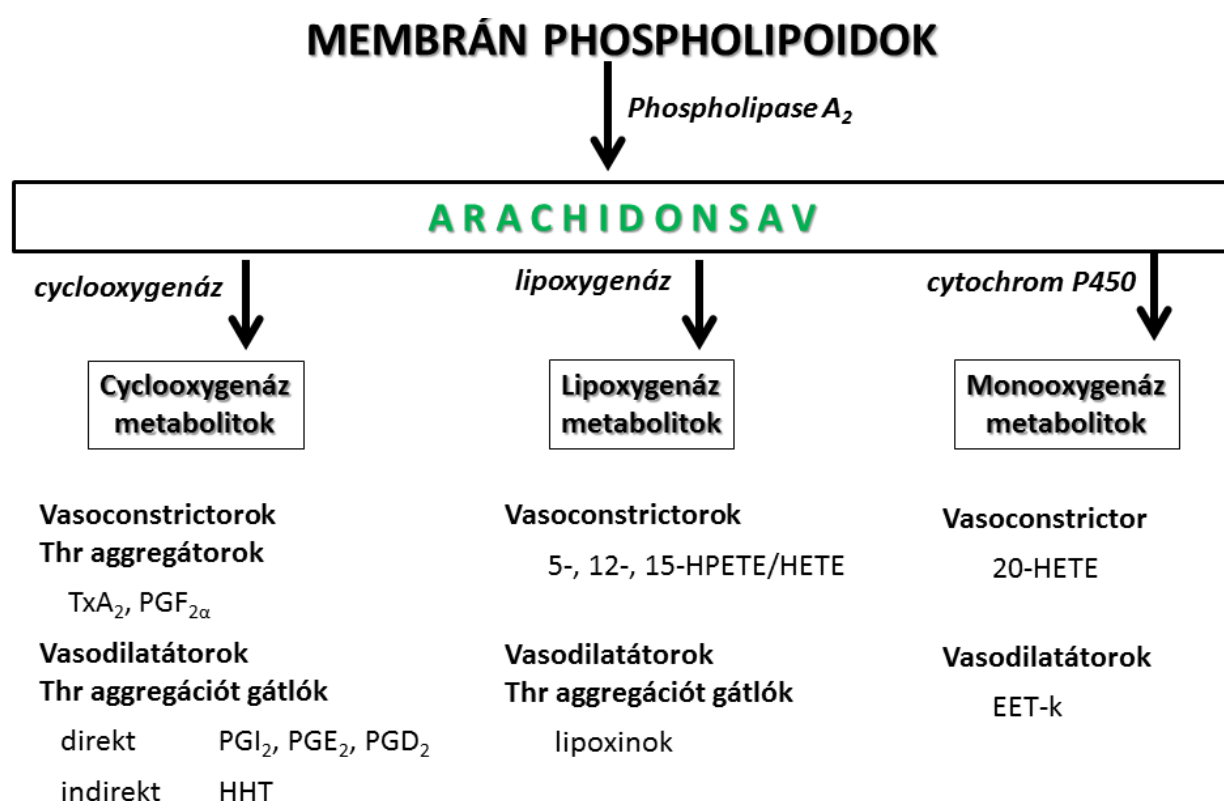
3.8.1. Háttér

A migrén pathomechanizmusának tanulmányozása során felmerült a thrombocyták morfológiai és működésbeli változásának, valamint genetikai eltérésének kóroki szerepe (D' Andrea et al. 1995; Crassard et al. 2001; Hershey et al. 2004). A thrombocytákat a szerotonerg neuronok modelljének tartják, magas szerotonin tartalmuk, valamint biokémiai és metabolikus folyamataik hasonlósága miatt (Da Prada et al. 1988; Malmgren and Hasselmark 1988). A migrénese betegek fájdalommentes periódusában fokozott spontán szerotonin-, ADP- és adrenalin indukálta thrombocytá aggregációt figyeltek meg (Kovács et al. 1990; Appenzeller 1991; Puig-Parellada et al. 1993). A vérlemezkék fő arachidonsav (AA) metabolitjának, a thromboxánnak emelkedett plazma szintjét is kimutatták az intervallum periódusban lévő migréneseeknél (Kitano et al. 1994).

Az eikozanoidok az AA metabolitok összefoglaló neve. A vérlemezkék működését számos eikozanoid, még a saját maguk által termelt is képes autokrin módon szabályozni (Parantainen and Vapaatalo 1988; Puig-Parellada et al. 1993). A membrán foszfolipidekből foszfolipáz hatására felszabaduló AA három fő útvonalon, a cyclooxygenáz (CO) (Smith et al. 1996), a lipoxigenáz (LO) ((Ford-Hutchinson et al. 1994; Prigge et al. 1997) és a cytochrom P-450 monooxygenáz (Capdevila et al. 1995; Capdevila et al. 2000) hatására metabolizálódik.

A cyclooxygenáz út termékei a prostaglandinok ($\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 , PGD_2), a prostacyclin (PGI_2) és a thromboxán A_2 (TxA_2) (Cignard and Vargaftig 1988; Lipton et al. 1988). A lipoxigenáz út az 5-, 12-, 15-hydroperoxy-eikozatetraénsavak (5-, 12-, 15-HPETE), a hydroxy-eikozatetraénsavak (HETE), a leukotriének (LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 , LTE_4), és a lipoxinok keletkezéséhez vezet. A cytochrom P-450 monooxygenáz út termékei a 20-HETE és az epoxyeikozatriénsavak (5-, 6-EET).

Az eikozanoidok vasoaktív és vérlemezke aktivációt befolyásoló hatással egyaránt rendelkeznek. A cyclooxygenáz termékek közül a PGI_2 , PGD_2 , PGE_2 direkt, míg a 12-HHT indirekt módon (az endotheliális PGI_2 szintézis fokozásával) fejt ki értágító és thrombocyta aggregációt gátló hatást (Sadowitz et al. 1987.) A TxA_2 és a $\text{PGF}_{2\alpha}$ viszont vasoconstrictor és vérlemezke aggregációt fokozó lipid mediátor. A lipoxigenáz úton képződő metabolitok közül a HPETE és a HETE thrombocyta aggregáció gátló (Coene et al. 1986; Aharony et al. 1982; Lagarde et al. 2010). A 12-, 15-HPETE/HETE, a leukotriének és a 20-HETE vasoconstriktiót, míg a lipoxinok és az 5-,6-EET vasodilatációt idéznek elő (57. ábra).



57. ábra. Arachidonsav kaszkád

Az eikozanoidok migrénben betöltött szerepére utalnak azon vizsgálatok is, melyek során migrénes betegeknek adott vasodilatátor prostaglandin infúzió rohamot provokált, amit NSAID előkezelés kivédett (Vapaatalo 1994).

Célunk volt az interictális periódusban levő migrénes betegek vérlemezkéinek eikozanoid szintézisének vizsgálata (Mezei et al. 2000).

3.8.2. Anyag és módszer

Intervallum periódusban levő migrénes nőbetegek vérlemezkéi által $1\text{-}^{14}\text{C}$ arachidonsavból szintetizált eikozanoidokat túlnyomósos vékonyréteg kromatográfiával szeparáltuk, és mennyiségüket folyadék szcintillációs módszerrel határoztuk meg. Részletes leírást lásd az 5.1. fejezetben.

3.8.3. Eredmények

Fájdalommentes periódusban levő migrénes nők vérlemezkéi által szintetizált eicosaidjainak összmenyisége (az AA-kaszád lipoxigenáz és cyclooxygenáz úton képződött termékeinek összege) 14 %-kal kevesebb volt, mint az egészséges önkénteseké, de e különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak ($P=0,057$) (**9. táblázat**). Hasonló mértékű, megközelítőleg 18 %-os csökkenés volt megfigyelhető a migrénes páciensek vérlemezkéinek lipoxigenáz produktumainak összmenyiségében ($P=0,056$) a kontrollhoz képest, míg a cyclooxygenáz úton képződött metabolitok összmenyisége nem különbözött a két csoportban.

9. táblázat. Arachidonsav (AA) metabolitok képződése migrénes és egészséges egyének vérlemezkéiben

Termék	Egészséges egyének (DPM $\pm$ S.E.)	Migrénesek (DPM $\pm$ S.E.)
Total (DPM)	118659 $\pm$ 6588	100032 $\pm$ 6389
LO (DPM)	88927 $\pm$ 5782	72906 $\pm$ 5312
CO (DPM)	29731 $\pm$ 2708	27125 $\pm$ 1772

Az eredmények az átlagokat, és az átlagok szórását (S.E./standard error) mutatják. ($n=10$) Az értékek az $1\text{-}^{14}\text{C}$ arachidonsavból cyclooxygenáz (CO), illetve lipoxigenáz (LO) úton keletkezett radioaktív termékeinek az összmenyiségét mutatják DPM-ben (CO = $\text{PGF}_{2\alpha}$ + PGE_2 + PGD_2 + 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ / PGI_2 stabil metabolitja + 12-HHT + TxB_2 / TxA_2 stabil metabolitja; LO = 12-HPETE+12-HETE). Total = a CO és LO úton képződött termékek összege. Statisztikailag szignifikáns különbséget nem észleltünk ($P>0,05$). DPM a percenkénti bomlást mutatja.

Rövidítések: CO: cyclooxygenáz, DPM: bomlás per perc, LO: lipoxigenáz, S.E.: standard error

Az antiaggregációs és vasodilatációs hatással rendelkező cyclooxygenáz termékek közül a PGD_2 és a prostacyclin (PGI_2 , melynek stabil metabolitja a 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$) szignifikánsan kisebb mennyiségben szintetizálódott a migrénesek thrombocytaiban (87% és 77%), mint az egészségesekben. Migrénes nők thrombocytaiban a 12-HHT (ami endogén stimulátora az

endotheliális PGI₂ szintézisnek) képződése a kontroll csoport 65 %-ra csökkent. A TxB₂ szintézise (ami a TxA₂ stabil metabolitja) a migrénes és egészséges önkéntesek vérlemezkéiben nem különbözött szignifikánsan (**10. táblázat**).

10. táblázat. A migrénesek és az egészséges egyének cyclooxygenáz úton képződött termékei a vérlemezkékben

Termék	Egészséges egyének (DPM ± S.E.)	Migrénesek (DPM ± S.E.)
6-keto-PGF _{1α} (DPM)	1407±65	1082±67**
PGF _{2α} (DPM)	1635±145	1446±122
PGE ₂ (DPM)	1965±170	1606±187
TxB ₂ (DPM)	16483±2512	16925±1520
PGD ₂ (DPM)	3140±107	2733±153*
12-HHT (DPM)	5100±303	3331±292***

Az eredmények az átlagokat, és az átlagok szórását (S.E./standard error) prezentálják. (n=10)
Az értékek az 1-¹⁴Carachidonsavból cyclooxygenáz (CO) úton keletkezett metabolitok radioaktivitását mutatják DPM-ben. DPM a percenkénti bomlást mutatja.

PGF_{2α}: proszttaglandin F_{2α}; PGE₂: proszttaglandin E₂; PGD₂: prostaglandin D₂

6-keto-PGF_{1α}: PGI₂ stabil metabolitja; 12-HHT: 12-hydroxyheptadecatriénsav; TxB₂/ stabil metabolitja a TxA₂-nek: thromboxán B₂ Statisztikai szignifikancia: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Rövidítések: DPM: bomlás per perc, PGD₂: proszttaglandin D₂, PGE₂: proszttaglandin E₂, 6-keto-PGF_{1α}: 6-keto-proszttaglandin F_{1α} (a prostacyclin stabil metabolitja), PGF_{2α}: proszttaglandin F_{2α}, 12-HHT: 12-hydroxy-heptadecatriénsav, S.E.: standard error, TxB₂: thromboxan B₂

3.8.4. Megfigyeléseink jelentősége

Vizsgálatainkban különbséget találtunk a fájdalommentes periódusban lévő migrénes nöbetegek és az egészséges önkéntes kontrollok nem stimulált thrombocytainak eikozanoid szintézise között. A migrénes betegek vérlemezkéiben kisebb mennyiségű thrombocytá aggregációgátló cyclooxygenáz termék (PGD₂, PGI₂, 12-HHT) keletkezett, a TxA₂ mennyisége viszont nem mutatott jelentős eltérést. A thrombocyták szerepének értékelése a migrén pathomechanizmusában évtizedek óta a tudományos értekezések tárgyát képezi (Hanington et al. 1981). Számos vizsgálat fokozott vérlemezke aktivációt és aggregabilitást mutatott ki a rohamban és a fájdalommentes szakaszban egyaránt (Tietjen and Khubchandani 2015). Klinikai vizsgálatok szerint a thrombocytá aktiváló faktor megnövekedett koncentrációban volt jelen az aura nélküli migrénesekben rohamban a véna jugularis externából nyert vérben (Sarchielli et al. 2004). Az összecsapódott thrombocyták

inflammációt, corticális ischaemiát, ennek következtében CSD-ot generálhatnak (Tietjen and Khubchandani 2009; Tietjen and Khubchandani 2015). A CSD és a migrénes aura közötti összefüggés igen kifejezett (Pietrobon and Moskowitz 2013). Ezért különösen figyelemreméltó az a tanulmány, amely azt jelezte, hogy az aspirin, mint migrén profilaktikum - elsősorban az aurával járó migrénben - hatékony, szemben az aura nélküli migrénnel (Savi et al. 2013). Ugyanakkor igazolták, hogy a migrénesek (nagyraest nők, 88%) között 24%-ban (thrombocyttakkal kapcsolatos) aspirin rezisztencia volt jelen, összehasonlítva a kontroll csoporttal (Jesurum et al. 2012). Érdekes megfigyelés az, hogy számos, migrénes rohamot provokáló tényező, mint az ösztrogén, a katekolaminok, egyes ételek és üdítőitalok tartósító és ízesítő anyagai (glutamat - ízfokozó, tyramin - tartósítóanyag) egyben erőteljesen fokozzák a thrombocytták aggregábilítását (Borgdorff and Tangelder 2012). A thrombocytták aggregációja és aktivációja alapvető folyamat az artériás thrombogenezisben az ischaemiás stroke létrejöttében (Marquardt et al. 2002; Ruggeri 2002; Htun et al. 2006; Schmalbach et al. 2015). Epidemiológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a migrén önálló rizikótényezője az ischaemiás stroke-nak, elsősorban a 45 évnél fiatalabb nőkben, magas frekvenciával megjelenő aurával járó migrén esetén (Kurth et al. 2009; Bigal et al. 2010). Tovább növeli a stroke esélyét, ha a migrénes nő dohányzik és hormonális fogamzásgátlót alkalmaz (Schurks et al. 2009). Egy átfogó kohort vizsgálat során 63575 migrénest és 76936 migrénben nem szenvedő egyént követtek 33-35 hónapon át. Eredményként azt tapasztalták, hogy a migrénesek között 2.5-szer nagyobb volt a rizikója az ischaemiás stroke előfordulásának mint a nem migrénes csoportban (Hall et al. 2004; Harriott and Barrett 2015). Adataink a migrénes betegek thrombocyttáinak megváltozott eikozanoid szintézisére, a megnövekedett thrombocyta aggregábilításra utaltak, melyek felvetik a vérlemezke - CSD és a migrén - ischaemiás stroke közötti szoros kapcsolat lehetőségét.

3.9. *Az aura nélküli migrénes betegek térbeli kontrasztérzékenysége*

3.9.1. Hátér

A látó rendszer eltérései gyakoriak migrénben. Különösen az aurával járó formában gyakran alakul ki homályos látás, homonim hemianopsia, scotoma vagy fotofóbia (Chronicle and Mulleners 1996, Schoenen 1998). Ezen eltérések jelzik a vizuális retino-corticalis rendszer szerepét a migrén pathomechanizmusában. Megválaszolatlan kérdés volt azonban, hogy a parvo - és magnocelluláris pályarendszer együttes vagy elkülönült funkciózavaráról van-e szó (Coleston et al. 1994, Khalil 1991). Általánosan elfogadott, hogy a parvocellularis rendszer elsősorban a magas térbeli frekvenciák (SF) és alacsony időbeli frekvenciák (TF), míg a

magnocellularis pályák az alacsony SF és magas TF információkat továbbítják (Shapley 1982, Merigan and Maunsell 1993). Ismert vizsgáló módszer a scotopiás teszt, mellyel emberben a magnocellularis pályarendszer működését lehet megítélni (Lee et al. 1997, Scheffrin et al. 1999). Ezen tények és kérdések ismeretében elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk és összehasonlítjuk az aura nélküli migrénes betegekben a fotópiás és scotopiás térbeli kontrasztérzékenységi funkciókat. Azon célból, hogy növeljük vizsgálataink érzékenységét, mind a statikus, mind a dinamikus kontrasztérzékenységi funkciókat megvizsgáltuk (Benedek et al. 2002).

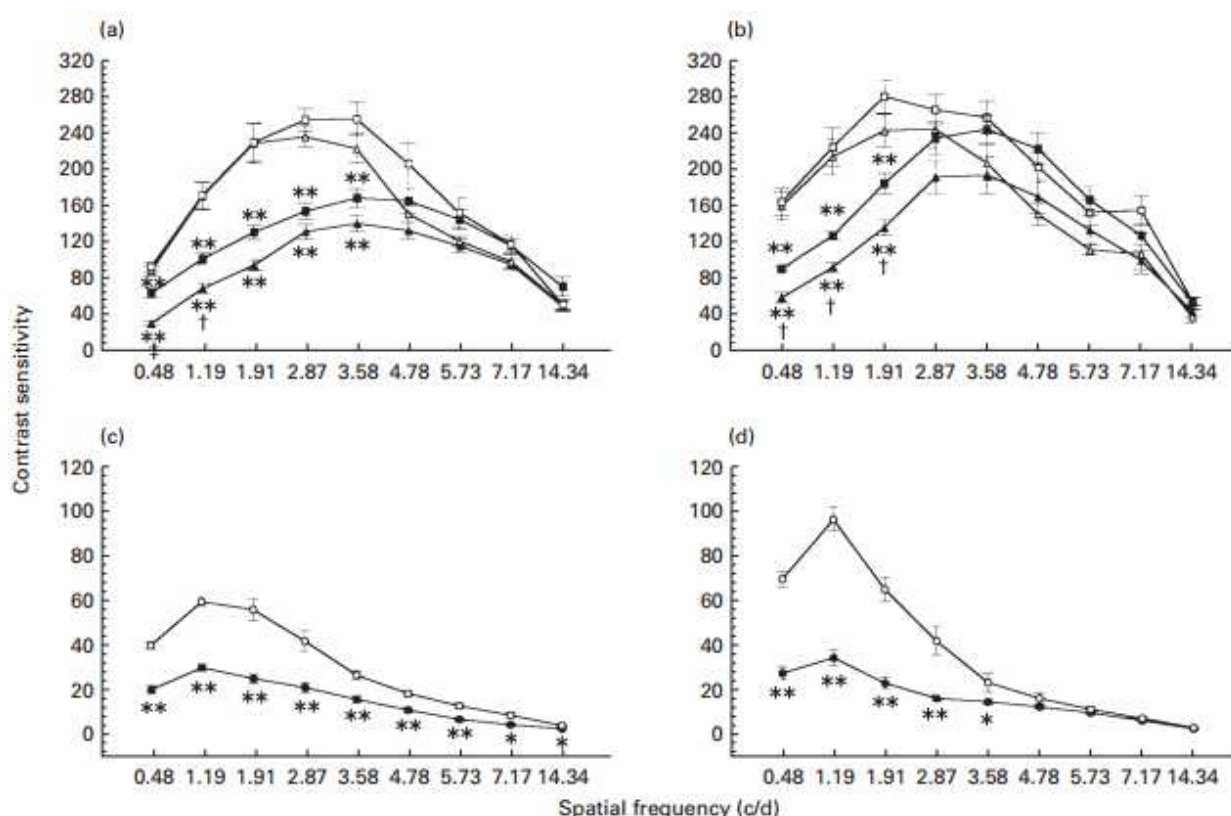
3.9.2. Anyag és módszer

Monocularis statikus és dinamikus kontrasztérzékenységet kilenc térbeli frekvencián határoztuk meg komputeres vizsgálat segítségével. Részletes leírást lásd az 5.4. fejezetben.

3.9.3. Eredmények

Vizsgálataink eredményei szerint az aura nélküli migrénes betegekben, a rohammentes időszakban a kontrollhoz képest statisztikailag szignifikánsan csökkent a térbeli kontrasztérzékenység (**58. ábra**). A csökkenés legerőteljesebben az alacsony SF esetén volt megfigyelhető, különösen scotopias körülmények közötti mérések esetén. A kontrasztérzékenységben szignifikáns különbséget találtunk fotópiás statikus körülmények esetén a diagnózist ($F[3,40]=25.01$, $P<0.001$), a frekvenciát ($F[8,320]=138.1$, $P<0.001$) és az interakciókat tekintve ($F[24,320]=10.4$, $P<0.001$) (**58. ábra a**). Szintén szignifikáns eltérés mutatkozott a kontrasztérzékenység vonatkozásában fotópiás dinamikus felállás során a diagnózist ($F[3,42]=8.85$, $P<0.001$), a frekvenciát ($F[8,336]=102.7$, $P<0.001$) és az interakciókat ($F[24,336]=6.84$, $P<0.001$) tekintve (**58. ábra b**). A „post hoc” összevetés szignifikáns különbséget adott a migrénes és a kontroll értékek között mindkét szemben az öt legmagasabb SF esetében fotópiás statikus szituációban és a három legalacsonyabb frekvencia sávban dinamikus feltételek során. Az ANOVA analízis alapján statikus kontrasztérzékenység scotopias feltételek esetén szignifikáns különbséget mutatott a diagnózist ($F[1,23]=87.2$, $P<0.001$), a frekvenciát ($F[8,184]=149.3$, $P<0.001$) és az interakciókat ($F[8,184]=20.2$, $P<0.001$) figyelembevételével (**58. ábra c**). Végül szignifikáns eltérést találtunk a kontrasztérzékenységben scotopias körülmények esetén a diagnózist ($F[1,23]=92.3$, $P<0.001$) a frekvenciát ($F[8,184]=16.04$, $P<0.001$) és az interakciókat ($F[8,184]=45.6$, $P<0.001$) tekintve (**58. ábra d**). A „post hoc” analízis szerint a dinamikus scotopias kontrasztérzékenység értékei szignifikánsan különböztek a kontroll személyek és a páciensek között az öt legalacsonyabb SF esetében. Ezzel ellentétben a statikus scotopias kontrasztérzékenység értékei statisztikailag szignifikánsan különböztek az összes SF-ben. Az

interocularis kontrasztérzékenység értékeit, fotópiás körülmények között a négy legalacsonyabb frekvenciasávban számoltuk. Az ANOVA analízis a statikus kontrasztérzékenység értékeiben szignifikáns különbséget mutatott a diagnózis ($F[1,20]=21.0$, $P<0.001$) vonatkozásában, de nem talált szignifikanciát sem a frekvenciát, sem az interakciókat tekintve. Dinamikus feltételek esetén a kontrasztérzékenységben szignifikancia mutatkozott a diagnózis ($F[1,21]=9.37$, $P<0.001$) és a frekvencia ($F[3,63]=3.2$, $P<0.005$) esetében, míg nem volt szignifikáns különbség az interakciókat tekintve.



58. ábra (a, b, c, d). Térbeli kontrasztérzékenységi funkciók az aura nélküli migrénesekben és a kontroll egyénekben

Fotópiás kontrasztérzékenység - statikus stimuláció (a).

Fotópiás kontrasztérzékenység - dinamikus módszer (b).

Kontroll személyek: nyitott (üres) szimbólumok (a, b). Migrénesek: kitöltött szimbólumok (a, b). ■, □: legérzékenyebb szem, ▲, △: legkevésbé érzékeny szem (a, b).

Scotopiás kontrasztérzékenység - statikus stimuláció (c).

Scotopiás kontrasztérzékenység - dinamikus módszer (d).

Kontroll személyek: ○ (c, d), migrénesek: ● (c, d).

* és ** jelöli a szignifikáns különbséget a kontrollok megfelelő szeméhez képest a 0.005 és a 0.001 valószínűségi szinteken.

† és ‡ jelölik a szignifikánsan interocularis kontrasztérzékenység különbséget a 0.05 és a 0.001 valószínűségi szinteken. Az értékek az átlag ± S.E.M. lettek megadva.

3.9.4. Megfigyeléseink jelentősége

- Eredményeink szerint az aura nélküli migrénes betegekben a térbeli kontrasztérzékenység statisztikailag szignifikánsan különbözött a kontroll egészséges egyénekhez képest. Különösen szembetűnő volt az eltérés az alacsony SF esetében, mely a magnocelluláris pályarendszer zavarára utalt. Megfigyeléseink támogatják azon feltételezéseket, miszerint az aura nélküli migrénesekben a parallel vizuális pályarendszerek aszimmetrikus működészavara alakul ki. Hasonló eltérésekről számoltak be aurával járó migrénesekben (McKendrick et al. 2001, Khalil 1991).

Scotopiás körülmények között a kontraszt szenzitivitás folyamatában a retinában a magnocelluláris sejtek (Kaplan and Shapley 1986), a dorsolateralis nucleus geniculatus (Derrington and Lennie 1984, Hicks et al. 1983) és a 4C réteg sejtjei vesznek részt (Hawken and Parker 1984) humánban (van Meeteren and Vos 1972).

Klinikailag elfogadott, hogy a magnocellularis rendszer sérülését követően károsodik a scotopiás látás folyamata (Drum et al. 1986, Wolf and Arden 1996).

Méréseink alapján a kontrasztérzékenység csökkenése az aura nélküli migrénes betegekben elsősorban scotopiás körülmények között alakult ki, mely a magnocellularis rendszer funkcionális károsodására utalt.

3.10. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) centrális és perifériás immunreaktivitás változása a trigemino-vascularis rendszer kémiai és elektromos ingerlése során patkányban

3.10.1. Háttér

A trigemino-vascularis rendszer vizsgálata során humán autopsziás mintákban kimutattuk a PACAP jelenlétét. Felhívtuk a figyelmet arra, hogy a TRIG-ban a PACAP a neuronok 20%-ában megtalálható (Tajti et al. 1999/a). Láttuk azt, hogy a TRIG-ban a nociceptin-ir idegsejtek 68%-a PACAP ko-lokalizációt adott (Ho et al. 2003). A TNC-ban és a gerincvelői C₁-C₂ magasságban történt megfigyeléseink szerint PACAP-ir idegrostok voltak jelen (Uddman et al. 2002). A specifikus agytörzsi magcsoportok („migrén generátor-modulátor”) közül a LC-ban PACAP-ir neuronokat, míg a PAG-ban PACAP-ir idegrostokat figyeltünk meg (Tajti et al. 2001). Más kutatócsoport is kimutatta humánban a LC-ban és a PAG-ban a PACAP kifejeződését (Palkovits et al. 1995). Ezenfelül a humán SPG-ban a neuronok 60%-a adott PACAP-ir-t (Uddman et al. 1999/a), míg a SGC-ekben PAC₁ és VPAC₁, az idegrostokban VPAC₁ és VPAC₂ receptorokat mutattunk ki (Csáti et al. 2012/a). Ezen adataink már felvetették a PACAP és a trigemino-vascularis rendszer egymásra hatásának a lehetőségét.

Schytz és munkatársai 2009-ben úttörő klinikai vizsgálatot hajtottak végre a PACAP-38 iv. adásával migrénes betegek részére (Schytz et al. 2009). A PACAP iv. bevitelét követően az egészséges egyéneknél szokványos fejfájás alakult ki, míg az aura nélküli migrénes betegekben késleltetett (átlagosan 6 órával a PACAP beadását követően) migrén-szerű fejfájásroham jött létre (Schytz et al. 2009). A jelenség pontos hátterét azonban ez a tanulmány nem tárta fel. Ugyanakkor ismert volt számunkra Zagami és munkacsoportjának preklinikai megfigyelése, miszerint macskában a SSS ingerlését követően a craniális vénás kiáramlásban megnövekedett a PACAP koncentrációja (Zagami et al. 1995). Ezért célul tűztük ki a trigemino-vascularis rendszer aktivációja során a PACAP megjelenésének részletes elemzését (Tuka et al. 2012).

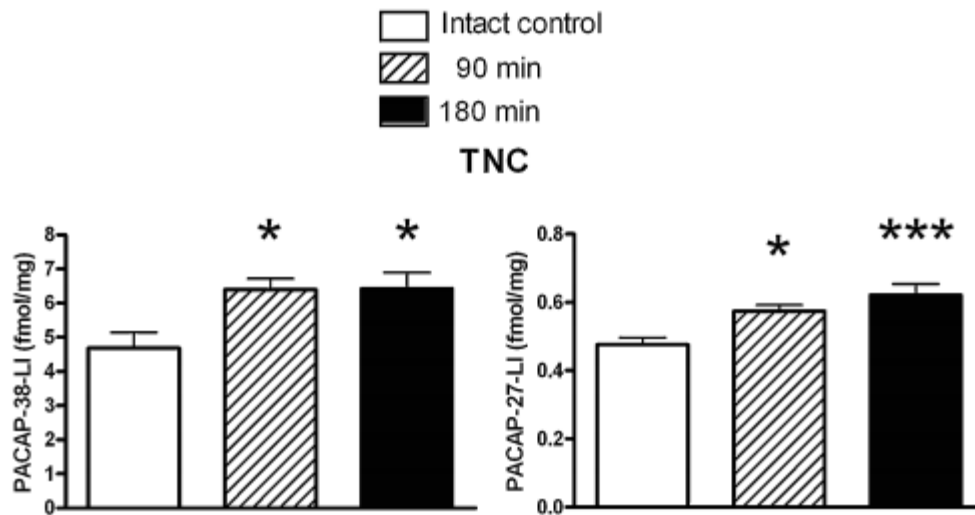
3.10.2. Anyag és módszer

Patkányban a trigemino-vascularis rendszer aktivációját kémiai úton (intraperitonealis-ip. NTG adása) és elektromos ingerléssel (TRIG ingerlés, 10 Hz, 1mA, 30 perc) hoztuk létre. Ezt követően meghatároztuk a PACAP-27-ir-t és a PACAP-38-ir-t az idő függvényében a CSF-ban, a vénás vérplazmában, a TRIG-ban, a TNC-ban és a felső nyaki (C₃-C₄) gerincvelői szegmentumokban RIA és tömegspektrometria (MS) segítségével. Részletes leírást lásd az 5.5. fejezetben.

3.10.3. Eredmények

A kémiai stimulust (NTG alkalmazása) követően (90 és 180 perc) a TNC-ban a PACAP-27-ir és a PACAP-38-ir statisztikailag szignifikáns módon növekedett **(59. ábra)**. A C₃-C₄ gerincvelői régióban és a TRIG-ban nem volt változás. A vérplazmában a PACAP-38-ir nem mutatott jelentős változást.

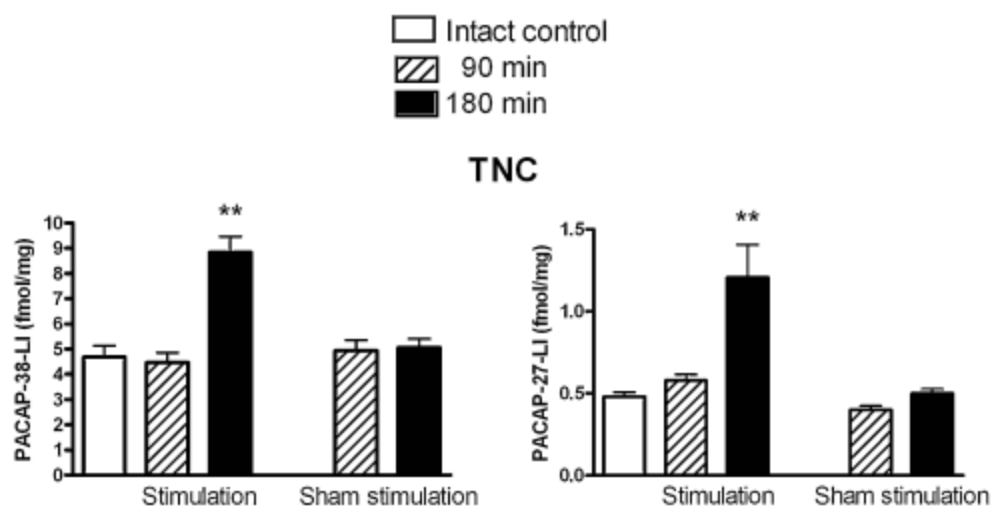
Az elektromos TRIG ingerlést követően (180 perc) a TNC-ban a PACAP-27-ir és a PACAP-38-ir statisztikailag szignifikánsan emelkedett **(60. ábra)**. A vérplazmában a PACAP-38-ir a stimulációt követően (90 és 180 perc) emelkedést mutatott **(61. ábra)**. A C₃-C₄ gerincvelői régióban és a TRIG-ban nem volt változás. A CSF-ban a PACAP egyik formáját sem tudtuk detektálni.



59. ábra. Kémiai ingerlést követően a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-27/38-immunreaktivitás (PACAP-27/38-ir) a caudalis trigeminális magcsoportban (TNC) patkányban

A PACAP-27/38-ir a TNC-ban NTG (10 mg/kg ip.) adását követően 90 és 180 perc múlva RIA meghatározással. Kontrollként nem stimulált (intakt) állat szolgált. Mindegyik oszlopon az $n=11-28$ állat eredményeit, átlag + S.E.M. formában ábrázoltuk. Az adatokat egyutas varianciaanalízissel (ANOVA) és Tukey's *post-hoc* teszttel elemeztük. A szignifikancia szintet $p<0.05$ esetében állapítottuk meg. * $p<0.05$, *** $p<0.001$ vs. intakt kontroll.

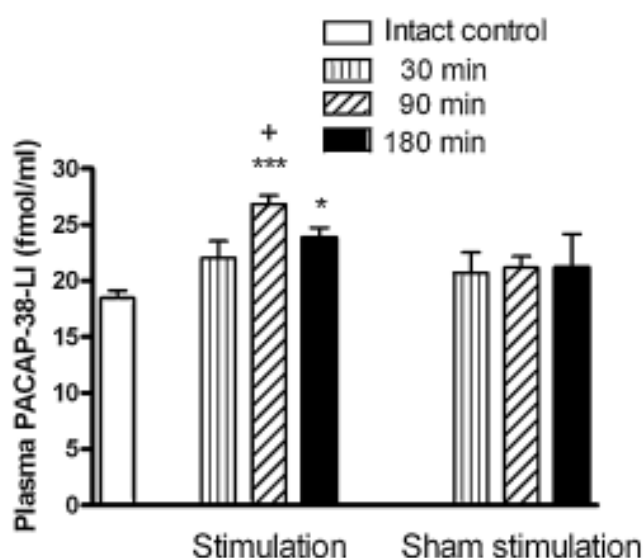
Rövidítések: LI=ir: immunreaktivitás, min: perc, NTG: nitroglycerin, PACAP-27/38: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-27/38, RIA: radioimmunoassay, S.E.M.: standard error of the mean, TNC: caudalis trigeminális magcsoport, vs.: versus



60. ábra. A ganglion trigeminale (TRIG) elektromos ingerlését követően a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-27/38-immunreaktivitás (PACAP-27/38-ir) a caudalis trigeminális magcsoportban (TNC) patkányban

A TRIG elektromos ingerlését követően (90 és 180 perc) a PACAP-27/38-ir a TNC-ban RIA meghatározással. Kontrollként nem stimulált (intakt) és álstimulált (sham) csoportot használtunk. Mindegyik oszlopon az $n=11-20$ állat eredményeit, átlag + S.E.M. formában ábrázoltuk. Az adatokat egyutas varianciaanalízissel (ANOVA) és Tukey's *post-hoc* teszttel elemeztük, $^{**}p<0.01$ vs. intakt kontroll.

Rövidítések: LI=ir: immunreaktivitás, min: perc, PACAP-27/38: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-27/38, RIA: radioimmunoassay, S.E.M.: standard error of the mean, TNC: caudalis trigeminális magcsoport, TRIG: ganglion trigeminale, vs.: versus



61. ábra. A ganglion trigeminale (TRIG) elektromos ingerlését követően patkányban a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-38-immunreaktivitás (PACAP-38-ir) a plazmában

A PACAP-38-ir RIA-vel lett meghatározva 30, 90 és 180 perc múlva a TRIG elektromos ingerlését követően a plazmában, patkányban. Kontrollként a nem ingerelt (intakt) és az álingerelt (sham) csoport szolgált. Mindegyik oszlopon az $n=11-20$ állat eredményeit, átlag + S.E.M. formában ábrázoltuk. Az adatokat egyutas varianciaanalízissel (ANOVA) és Tukey's *post-hoc* teszttel elemeztük, * $p<0.05$, *** $p<0.001$ vs. intakt kontroll; * $p<0.05$ vs. álingerelt csoport, 30, 90 és 180 percet figyelembe véve.

Rövidítések: LI=ir: immunreaktivitás, min: perc, PACAP-38: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-38, RIA: radioimmunoassay, S.E.M.: standard error of the mean, TRIG: ganglion trigeminale, vs.: versus

3.10.4. Megfigyeléseink jelentősége

- Elsőként számoltunk be arról, hogy a trigemino-vascularis rendszer kísérletesen létrehozott aktivációja során a PACAP-27/38 koncentrációja a TNC-ban specifikusan emelkedett az idő függvényében. A Schytz-féle munkacsoport koppenhágai eredményeinek lényegét, azaz a migrénes betegekben a PACAP iv. hatását követően késleltetetten kialakult aura nélküli migrénes roham magyarázatát adta, az általunk a trigemino-vascularis rendszer aktivációja során a TNC-ban tapasztalt PACAP koncentráció növekedés. Eredményeink a PACAP által a TNC-ban kiváltott centrális szenzitizációra és a nociceptív transzmisszió folyamatának a befolyásolására utaltak, melyek indokolták a késleltetett fejfájás kialakulásának a hátterét. Kiterjesztett munkacsoportunk (Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna laboratóriuma) megfigyelése szerint az ip. adott PACAP-38 erőteljes photophóbiát, meningeális vazodilatációt és a TNC-ban az átkapcsoló másodrendű neuronok aktivitását jelző c-fos-ir sejtek számának növekedését észleltük a vad-típusú, de nem a PACAP-

génhiányos egerekben (Markovics et al. 2012). Ezen eredményeink is igazolták a PACAP-nek a TNC-ra és a meningeális vasculatúra kifejtett hatását.

- A TRIG elektromos ingerlését követően tapasztaltuk a PACAP-38 koncentráció növekedését a vérplazmában. Ez arra utalt, hogy a trigemino-vascularis rendszer izgalma során a TRIG pseudounipolaris neuronjainak mindkét (perifériás és centrális) ágrendszerén át PACAP kiáramlás történt. Adatainkat későbbi klinikai vizsgálatok is igazolták. Migrénes betegek spontán fejfájásrohamában emelkedett PACAP-38 plazma koncentrációt mértünk (Tuka et al. 2013). Más kutatócsoport pedig igazolta a kiáramló PACAP koncentráció és a fejfájás intenzitása közötti összefüggést (Zagami et al. 2014).

3.11. A migrénes betegek vérplazmájában a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-38-immunreaktivitás (PACAP-38-ir) változása a migrénes rohamban és a fejfájásmentes időszakban

3.11.1. Háttér

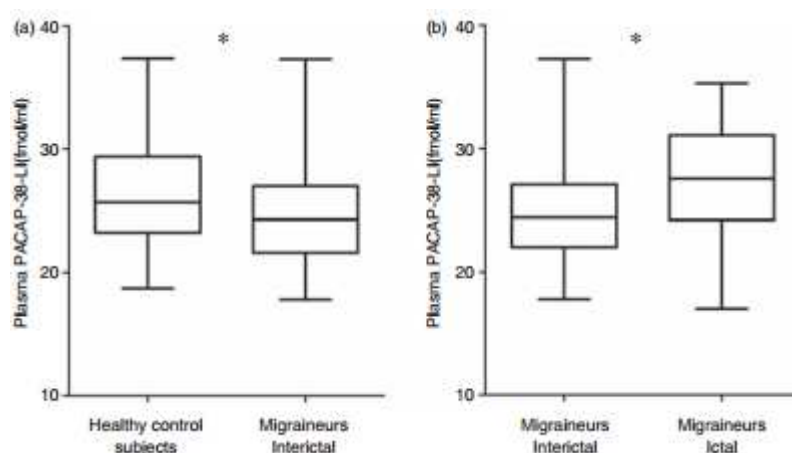
Az a tény, hogy a migrénes páciensekbe iv. adott PACAP-38 késleltetett aura nélküli migrénes rohamot provokált, erőteljesen felvetette a PACAP-38 szerepét a migrén kórfolyamatában (Schytz et al. 2009). Továbbá laboratóriumunk és más kutatócsoportok által tett preklinikai megfigyelések szerint a trigemino-vascularis rendszer kémiai vagy elektromos stimulációját követően a vénás plazmában és a TNC-ban megnövekedett a PACAP-38 koncentrációja, mely jelezte a trigemino-vascularis rendszer és a PACAP-38 közötti funkcionális kapcsolatot (Zagami et al. 1995; Tuka et al. 2012). Nem álltak rendelkezésre azonban olyan klinikai adatok, melyek az endogén PACAP szintet követték volna nyomon a migrénes betegekben, spontán jelentkező migrénes roham során, illetve a fejfájásmentes időszakban. Ezért célul tűztük ki a migrénes betegekben a PACAP-38 koncentráció meghatározását a vérplazmában iktálisan és interiktálisan, részben „önkontrollos”, részben egészséges egyének kontroll csoportjához viszonyítva (Tuka et al. 2013).

3.11.2. Anyag és módszer

Vizsgálataink során PACAP-38-ir-t és CGRP-ir-t mértünk migrénes betegek vérplazma mintáiban spontán migrénes rohamban és fejfájásmentes időszakban „önkontroll” során, illetve egészséges kontroll egyénekhez hasonlítva. Megfigyeltük a betegség klinikai paramétereinek és a plazma PACAP-38, valamint CGRP koncentráció változásainak összefüggéseit. Munkánk során RIA módszert alkalmaztunk. Részletes leírást lásd az 5.6. fejezetben.

3.11.3. Eredmények

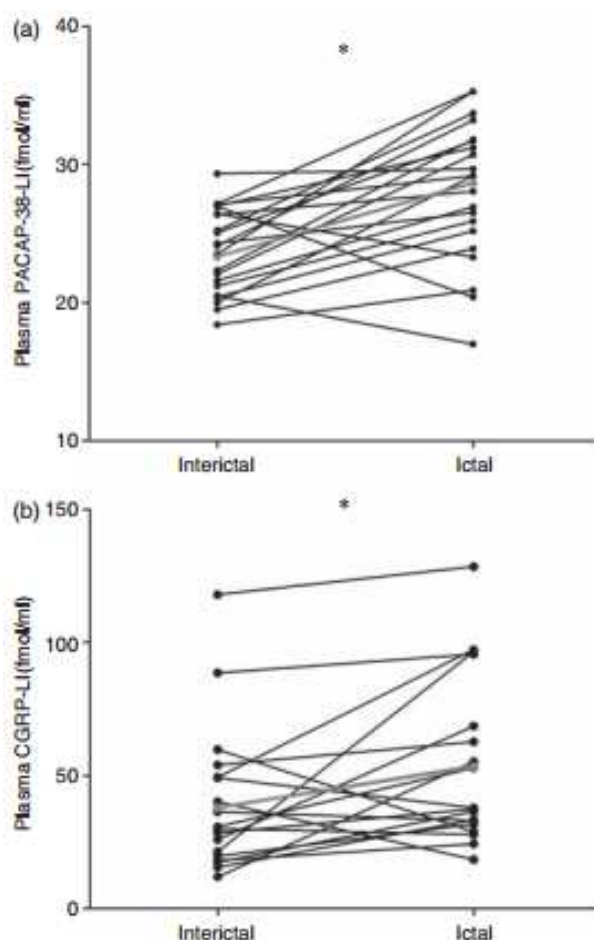
Szignifikánsan alacsonyabb plazma PACAP-38 koncentrációt mértünk migrénesek fejfájásmentes periódusában az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva, mely jelentősen megemelkedett a migrénes roham idején **(62. ábra)**. A migrénes betegek „önkontrollos” vizsgálata során statisztikailag szignifikánsan magasabb plazma PACAP-38-ir-t és CGRP-ir-t detektáltunk spontán migrénes rohamban az interiktális periódushoz képest **(63. ábra)**. Az alacsonyabb interiktális plazma PACAP-38-ir negatív korrelációt mutatott a betegség fennállásának az időtartamával **(64. ábra)**.



62. ábra (a, b). A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-38-immunreaktivitás (PACAP-38-ir) változása a migrénesek interiktális és iktális periódusából származó palzmamintákban, az egészséges alanyokkal összehasonlítva

Az oszlopok jelzik a PACAP-38-ir-t (fmol/ml, RIA) (átlag $\pm$ S.D., minimum és maximum értékek) az egészséges kontrollok csoportjában (n=40) és a migrénesek interiktális (n=80) periódusában. Szignifikánsan csökkent PACAP-38-ir volt megfigyelhető a kontroll vs. az interiktális migrénes csoport között. (Student-féle páratlan t-teszt, $p < 0.011$) (a). Az önkontrollos 21 beteg adatait a 63. ábrán tüntettük fel, ezek kivételével az interiktális (n=59) vs. az iktális (n=28) csoportok összehasonlítása alapján szignifikánsan magasabb PACAP-38-ir-t lehetett megfigyelni a spontán migrénes roham során. (Student-féle páratlan t-teszt, $p < 0.009$) (b).

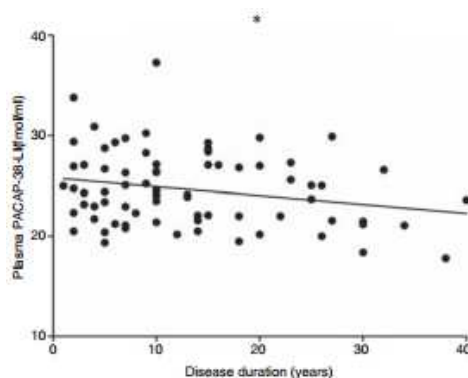
Rövidítések: LI=ir: immunreaktivitás, PACAP-38: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-38, S.D.: standard deviáció, RIA: radioimmunoassay, vs.: versus.



63. ábra (a, b). A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-38 (PACAP-38) és a calcitonin génnel-rokon peptid (CGRP) koncentrációk a migrénes rohamok idején (iktális fázis) a rohammentes (interiktális) periódushoz képest, az „önkontrollós” betegek plazmamintáiban

A pontok (•) jelzik a betegek egyéni adatait (n=21). Szignifikánsan jelentkező különbséget lehetett megfigyelni az interiktális és az iktális fázis között a PACAP-38-ir (fmol/ml, RIA) tekintetében (Student-féle páros t-teszt, $p < 0.001$) (a). A CGRP-ir (fmol/ml, RIA) vizsgálata során szignifikánsan jelentkező különbséget lehetett detektálni az interiktális és az iktális fázis között (Wilcoxon-teszt, $p < 0.035$) (b).

Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, LI=ir: immunreaktivitás, PACAP-38: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-38, RIA: radioimmunoassay.



64. ábra. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-38 (PACAP-38) interiktálisan mért plazma koncentrációja és a migrén fennállásának időtartama közötti kapcsolat

A migrénes betegekben az iktális plazma PACAP-38-ir (fmol/ml, RIA) kapcsolatban van a migrén fennállásának az időtartamával ($n=87$). Az interiktális PACAP-38-ir enyhe negatív korrelációt mutatott a betegség fennállásának az időtartamával ($p<0.044$). $R=0.231$.

Rövidítések: LI=ir: immunreaktivitás, PACAP-38: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-38, RIA: radioimmunoassay.

3.11.4. Megfigyeléseink jelentősége

- Elsőként szolgáltatunk adatokat és tártunk fel összefüggést a migrénes betegek vérplazmájában kialakult PACAP-38 koncentráció változás és a migrén fázisai (iktális, interiktális) között. A spontán migrénes fejfájásroham során a betegek vérplazmájában megnövekedett PACAP-38 koncentrációt tapasztaltunk. Vizsgálatainkat követően eredményeinket más munkacsoport is megerősítette, sőt jelezték, hogy a fejfájás intenzitása összefügg a PACAP-38 koncentrációjával (Zagami et al. 2014). Preklinikai vizsgálataink felvetése szerint a craniális vénás elfolyásban megnövekedett PACAP koncentráció a trigemino-vascularis rendszerből, annak izgalmi állapotából és a cranio-cervicalis ganglionok (TRIG, SPG) egymásra hatásából eredt (Tajti et al. 1999/a; Uddman et al. 1999/a; Tajti et al. 2001; Uddman et al. 2002; Hou et al. 2003; Csáti et al. 2012/a; Markovics et al. 2012, Tuka et al. 2012; Edvinsson 2013; Vécsei et al. 2014/b; Tajti et al. 2015/a; Tajti et al. 2015/b). Tekintve a molekula nagy tömegét, valószínűsíthető, hogy a trigemino-vascularis rendszer perifériás ágán át jut a PACAP a keringésbe (Edvinsson 2013; Grände et al. 2013). A rendelkezésünkre álló humán adatok szerint, migrénes roham során a PACAP-38, mind perifériás vascularis, mind centrális neuronális hatással rendelkezik (Amin et al. 2012; Syed et al. 2012; Tajti et al. 2015/b). Továbbá ismert a neurogén inflammációt és a durálisan elhelyezkedő hízósejtekben degranulációt kiváltó tulajdonsága (Baun et al. 2012). Klinikai vizsgálatok jól látható módon tisztázták, hogy migrénes betegekben az iv. adott VIP, bár erőteljes vazodilatációt produkált, de nem okozott migrénes rohamot, míg a PACAP-38 a

vazodilatáció mellett súlyos migrénes fejfájásrohamot váltott ki (Rahmann et al. 2008; Schytz et al. 2009). Ezen adatokból következik, hogy a PACAP elsősorban a PAC₁ receptoron keresztül fejti ki hatását a migrén iniciálásával kapcsolatban. Mágneses rezonanciás angiographia (MRA) vizsgálatok szerint a PACAP-38 által kiváltott fejfájás során, az artéria meningeá media ágrendszerének a dilatációja volt megfigyelhető (Amin et al. 2012). Újkeletű, a VIP és a PACAP-38 iv. adását 24 órán át követő vizsgálatok szerint, a PACAP-38 elsősorban az extracraniális erek vazodilatációját váltotta ki migrénesekben (Amin et al. 2014). A PACAP-nek jól ismert az erőteljes vazodilatációt kiváltó hatása a cerebrális és a durális artériákban, mind a kis rágcshalókban, mind humánban (Boni et al. 2009; Baun et al. 2011; Grände et al. 2013). A vascularis kutatások arra mutattak, hogy a VIP/PACAP receptorok (VPAC₁, VPAC₂ és PAC₁) jelen vannak a craniális artériákon, melyeken keresztül a PACAP kifejtheti vazodilatációs hatását (Knutsson and Edvinsson 2002; Chan et al. 2011; Grände et al. 2013). Az eddigi adatok alapján a meningeális vasculatura dilatációja a PAC₁ és VPAC₂ receptorok, míg a cerebrális artériák válasza a VPAC₁ receptorok aktivitásán át valósul meg (Syed et al. 2012; Tajti et al. 2015/b). A PACAP által okozott durális mastocytá degranuláció és a neurogén inflammáció hozzájárul a trigemino-vascularis rendszerben a perifériás szenzitizáció kialakulásához (Tajti et al. 2015/b). A PACAP-38 centrális hatására (a TCC-ben az átkapcsoló neuronok PACAP-38 által kiváltott centrális szenzitizációjára) a következő megfigyelések utalnak: a) a PACAP-38 iv. adását követően a migrénes betegekben késleltetetten alakult ki a migrénes roham (Schytz et al. 2009), b) preklinikai vizsgálati eredményeink szerint a trigemino-vascularis rendszer stimulációját követően az idő függvényében a TNC-ben megnövekedett a PACAP-38 koncentrációja (Tuka et al. 2012). A fenti eredmények lehetőséget nyújtanak új típusú, a PAC₁ receptorra ható migrén ellenes szerek kifejlesztésére (Tajti et al. 2014; Tajti et al. 2015/c; Vécsei et al. 2015/b).

4. ÖSSZEGZÉS (ÚJ EREDMÉNYEK, MEGÁLLAPÍTÁSOK)

A migrén pathomechanizmusa teljességében nem ismert. Munkánk a migrén kórfolyamatának a feltárására irányult. Azon nemzetközi klinikai és kísérletes gondolatkörhöz csatlakoztunk, mely a trigemino-vascularis rendszer aktivitását, szenzitizációját, a neuropeptidek szerepét és az agyi hiperexcitabilitást a migrén pathomechanizmusában lehetséges tényezőkné tekintette.

- A trigemino-vascularis rendszer központi eleme a TRIG. Az elsők között hívtuk fel a figyelmet a humán TRIG-ban a CGRP-R jelenlétére. Ez alapot adott napjaink megújult szemléletmódú terápiás céljának meghatározására migrénben és ehhez új típusú gyógyszerinnovációra (CGRP-R antagonisták, CGRP és CGRP-R ellenes antitestek).
- A migrén krónicizálódásának folyamata nem feltárt. A TRIG-ban zajló intraganglionáris szignalizációs rendszer elemzésével a krónikus migrén modelljét dolgoztuk ki.
- A humán cranio-cervicalis ganglionok (SCG, SPG, ganglion oticum, TRIG) elemzésével új adatokat szolgáltatunk a spontán migrénes rohamban a craniális vénás kifolyásban megjelent neuropeptidek és receptoraik megoszlásáról, az autonóm egységek egymásrahatásának az esélyéről.
- Lehetséges magyarázatát adtuk a migrénes roham során tapasztalt a fejfájást kísérő parasympathicus tünetek hátterének.
- A trigemino-vascularis rendszer központi elemeinek (TCC, „migrén generátor-modulátor”) vizsgálatai nyomán felhívtuk a figyelmet arra, hogy a humán TCC-ben igen jelentős a SP-ir, a CGRP-ir és a PACAP-ir idegrostok arborizációja. Ez lehetőséget teremt a neuropeptidek aktív részvételére a centrális szenzitizáció folyamatában, és így a betegekben a fejfájásroham során gyakran létrejövő allodynia kialakulásában.
- A humán „migrén generátor-modulátorok” elemzése során rámutattunk, hogy a fő szerotonerg központban, a NRM-ban igen dús a SP-ir rosthálózat, mely egyik magyarázata lehet a migrén – depresszió ko-morbiditás létrejöttének. A humán LC-ban immunhisztokémiai vizsgáló módszerrel az elsők között mutattunk ki PACAP-ir neuronokat és nagy számban CGRP-ir idegsejtesteket. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy a LC a PACAP és a CGRP által befolyásolja a TCC-ben a trigemino-vascularis rendszer aktivitását a migrénes rohamban.

- Tudományos igényként kerestük a migrén kórfolyamatához kapcsolható, a migrénes betegekből könnyen nyerhető biomarker meghatározását. Ezirányú vizsgálataink eredményeiként a migrénes betegek nyálmintáiban megjelenő EAA-akat, elsősorban a Glu-ot a migrénes betegek hiperexcitabilitását tükröző biomarkernek véljük.
- A migrénes páciensek vérlemezke eikozanoid rendszerének elemzése nyomán úgy tartjuk, hogy a megnövekedett thrombocyta aggregabilitás az egyik lényeges eleme a vérlemezke – CSD és a migrén – ischaemiás stroke közötti szoros kapcsolatnak.
- Térbeli kontrasztérzékenységi vizsgálataink szerint, az aura nélküli migrénes betegekben a magnocelluláris pályarendszer zavara alakult ki.
- A közelmúlt preklinikai megfigyelései szerint a CGRP mellett a PACAP is egyre hangsúlyosabb szerepet kapott a migrén kórfolyamatában. Munkánk során háttér elemzését adtuk a migrénes betegekben az iv. adott PACAP-38 által kiváltott késleltetett aura nélküli migrénes roham mechanizmusának. Továbbá elsőként szolgáltatunk adatokat és tártunk fel összefüggést a migrénes betegek vérplazmájában kialakult PACAP-38 koncentráció változás és a migrén iktális és interiktális fázisai között.

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

5. ANYAG ÉS MÓDSZER (RÉSZLETES)

5.1. Anyag és módszer a 3.1.2.; 3.3.2.; 3.4.2.; 3.5.2.; 3.6.2.; 3.7.2.; 3.8.2. fejezetekhez

5.1.1. Anyaggyűjtés

5.1.1.1. Post-mortem anyaggyűjtés

Az érző- és autonóm ganglionok, az agytörzsi magcsoportok, a gerincvelői C1-C2 régió és az agyi erek autopszia során lettek eltávolítva felnőtt cadaverből a Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvos- és Gyógyszerésztudományi Centrum, Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásetikai Bizottsága engedélyei alapján. (Az engedélyek számai: 6/96; 6/98; 129/99.) Az agyi erek a halál beálltát követően 24-32 órával, a többi szövet 24 órán belül lett kiemelve (**11. táblázat**). A disszekcióra került, elhalálozott páciensek egyike sem szenvedett központi idegrendszeri megbetegedésben.

11. táblázat. Az autopsziás vizsgálatok összesítése

Kimetszett anyag	Esetszám		Átlagéletkor (év)	Post-mortem időtartam (óra)
	Férfi	Nő		
Ganglion trigeminale (CGRP, SP, PACAP, NOS, C-PON, HO-1, HO-2, CLR, RAMP1)	12	9	74,8	24 (24-36 CLR, RAMP1)
Ganglion sphenopalatinum (VIP, NOS, PACAP, C-PON, CGRP)	6	4	67,5	24
Ganglion oticum (VIP, NOS, PACAP, C-PON, CGRP)	6	4	67,5	24
Ganglion cervicale superius (C-PON, VMAT, DBH, TH, VIP, SP, CGRP, NOS)	8	3	75,0	24
Ganglion trigeminale (5-HT _{1B/1D})	2	4	72,2	24
Ganglion trigeminale (capsaicin)	3	3	49,0	24
Ganglion trigeminale (nociceptin)	4	3	66,0	24
Agytörzs (LC, NRM, PAG)	3	2	63,0	24
Caudalis trigeminális magcsoport (TNC)	4	2	58,5	24
Gerincvelő (C1-C2)	4	2	58,5	24

Rövidítések: C1-C2: cervicalis gerincvelői 1-2 szegmentum, CGRP: calcitonin génrel-rokon peptid, CLR: calcitonin receptor-szerű receptor, C-PON: neuropeptid Y C-terminális flanking peptidje, DBH: dopamin-béta-hydroxyláz, HO-1: hem-oxigenáz-1, HO-2: hem-oxigenáz-2, 5-HT_{1B}: 5-hydroxy-triptamin_{1B}, 5-HT_{1D}: 5-hydroxy-triptamin_{1D}, LC: locus ceruleus, NOS: nitrogén-oxid-szintetáz, NRM: nucleus raphe magnus, PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, PAG: periaqueductalis szürkeállomány, RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1, SP: P-anyag, TH: tirozin hydroxyláz, TNC: caudalis trigeminális magcsoport, VIP: vasoaktiv intestinalis polipeptid, VMAT: vesicula monoamin transzporter

5.1.1.2. *In vivo* anyaggyűjtés, betegbeválasztás

5.1.1.2.1. Nyálminták vétele

A Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Neurológiai Klinika Fejfájás Ambulanciáján gondozott migrénes betegektől nyertük a nyálmintákat. Nem stimulált, teljes-nyál gyűjtése történt reggel 10 és délután 2 óra között (**12. táblázat**). A vizsgált személyek kényelmes pozícióban karosszékben ültek, nyitott szemmel. Közvetlenül a beavatkozás előtt minden vizsgált páciens deionizált vízzel szájöblítést végzett, ezt követően 5 percen át minimalizálta szájmozgását. A szájfénéken összegyűjtött nyálat 2 ml-es műanyag csőbe (Eppendorf, Sarsted) csorgatták 60 másodpercenként. A mintákat azonnal +4 °C-on 3000 g-vel 15 percig centrifugáltuk és a supernatant -80 °C-on tároltuk. A nyál gyűjtése és a minta -80 °C-on történő elhelyezése között kb. 20 perc telt el. A kizárási feltételek között szerepelt a 2 évnél rövidebb betegségstartam, a 2 hétnél kevesebb gyógyszermentes időszak, a terhesség, a szoptatás, a migrénen kívül bármilyen egyéb betegség és az alacsony együttműködési készség. Minden kiválasztott páciensnek neurológiai és belszervi fizikális vizsgálata és cubitalis vénás vérminta klinikai-kémiai laboratóriumi ellenőrzése történt. A kontroll csoport 20 egészséges, gyógyszermentes személyből állt (átlagéletkor 31±9 év). A munka a SZTE Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásait Bizottság engedélye alapján történt.

12. táblázat. A nyálmintákat szolgáltató betegcsoportok adatai

Betegcsoport	Esetszám	Átlagéletkor (év)	Betegség időtartama (év)	Átlagos havi rohamszám
Aura nélküli migrén	23	40±13	11±8	3
Aurával járó migrén	14	34±14	7±5	3

5.1.1.2.2. Vérlemezék nyérése

A Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Neurológiai Klinika Fejfájás Ambulanciáján kezelt 10 migrénes (az IHS kritériumának megfelelően, IHS 1988; 5 aurával járó, 5 aura nélküli) nőbetegtől (életkor: 25-55 év) nyertünk vénás vért. A betegek gyógyszermentesek voltak, sem fájdalomcsillapítót, sem hormonális fogamzásgátlót nem szedtek. Fájdalommentes időszakban (10 vagy ennél több nap telt el az utolsó migrénes rohamtól), azonos menstruációs ciklusban, a follicularis fázisban történt a vérvétel. A kontroll csoport tagjai (10 fő) egészséges, gyógyszermentes személyek voltak, akiknek életkoruk és vércsoportjuk megegyezett a betegcsoporttal és vizsgálatuk a follicularis szakban zajlott. A vérvétel cubitalis vénából történt és 1:2 foszfát pufferrel volt hígítva (pH 7,4), mely tartalmazott EDTA-t (5,8 mM) és glucose-t (5,55 mM). A thrombocyták centrifugálással

voltak izolálva és a kontamináló vörösvérsejteket hyposmoticus ammonium kloriddal lizáltuk (Mezei et al. 1997). A thrombocytaikat végül reszuszpendáltuk serum-mentes szövetkultúrában Médiüm 199-ben (10^8 thrombocyta/ml). Munkánkat az 1964-es Helsinki deklarációnak megfelelően folytattuk a SZTE Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásaitikai Bizottság engedélye alapján. A tanulmányban résztvevő minden személy felvilágosítást kapott és a beleegyező nyilatkozatot aláírásával ellátta.

5.1.2. Módszerek

5.1.2.1. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a kórboncolás során nyert szöveteket fixáló folyadékba (2% paraformaldehyd, 0,2% pikrin sav, 0,1 mol/l foszfát puffer, pH 7,2) merítettük egy éjszakán át. Fixálást követően többszörösen mostuk az anyagokat Tyrode-féle (10%-os sucroz) oldatban. Szárazjéggel történt fagyasztás után -70 °C-on tároltuk a szöveteket. Kriosztátban (Reichter) metszettük (10 μ m vastag) és előkezelt (Superfrost Plus, Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) üveg tárgylemezekre vettük fel metszeteinket.

Indirekt-Immunfluoreszcens módszert használtunk,

a ganglion trigeminalében a CGRP (nyúl 1:1280; tengerimalac, 1:800; 1:1280), az SP (1:400), a NOS (1:2560), a PACAP-27 (1:1280), a C-PON (1:1280), az 5-HT_{1B} receptor (1:200), az 5-HT_{1D} receptor (1:100), a nociceptin (1:100), a VR₁ (1:400), a HO-1 (1:100, 1:500, 1:1000), a HO-2 (1:100, 1:500, 1:1000), a BVR (1:100, 1:500, 1:1000), a ganglion sphenopalatinumban, a ganglion oticumban a VIP (1:640), a NOS (1:2560), a PACAP-27 (1:640), a C-PON (1:1280), a CGRP (nyúl, 1:1280), a HO-1 (1:100, 1:500, 1:1000), a HO-2 (1:100, 1:500, 1:1000), a BVR (1:100, 1:500, 1:1000), a ganglion cervicale superiusban a C-PON (1:1280), a VMAT (1:1280), a dopamin-béta-hydroxyláz (DBH) (1:320), a TH (1:320), a VIP (1:640), az SP (1:320), a CGRP (nyúl 1:1280), a NOS (1:2560), a HO-1 (1:100, 1:500, 1:1000), a HO-2 (1:100, 1:500, 1:1000), a BVR (1:100, 1:500, 1:1000), az agytörzsi magcsoportokban a CGRP (1:2000), az SP (1:800), a PACAP-27 (1:800), a VIP (1:3000), a VMAT (1:1280), a C-PON (1:1280), a TNC-ben és a C1-C2 régióban a CGRP (1:2000), a PACAP-38 (1:800), az SP (1:800), a VIP (1:3000), a NOS (1:1000) kimutatására (a használt elsődleges ellenanyagokat és jellemzőiket a **13. táblázatban** foglaltuk össze).

Módszerünk során a metszeteket egy éjen át inkubáltuk az elsődleges ellenanyagokkal nedves kamrában $+4$ °C-on. Az antigén ellenanyag komplexek helyeit fluorescein izothiocyánnal (FITC - nyúl IgG ellen sertésben termelt antitest, 1:80, 1:100, DAKO, Koppenhága, Dánia) vagy tetramethyl rhodamin izothiocyánnal (TRITC - tengerimalac IgG ellen kecskében termelt antitest, 1:80, 1:100, DAKO, Koppenhága, Dánia vagy kecske IgG ellen számban

termelt TRITC-cel jelölt ellenanyag 1:100, Chemicon, Svédország) jelölt másodlagos ellenanyagok segítségével mutattuk ki, 1 órán át tartó szobahőn történő inkubálást követően.

A CLR és a RAMP1 esetében: FITC (kecske) - nyúl-elleni, 1:100, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA és Alexa 488 (szamár) kecske elleni 1:400 Invitrogen, La Jolla, CA, USA, anyagokat használtunk, DAPI-t tartalmazó Vectashield médiummal együtt. A metszeteket fény- és epifluorescens mikroszkóppal vizsgáltuk (Nikon 80i, Tokyo, Japan), melyekhez Nikon DS-2 MV kamerát használtunk. Adobe Photoshop CS3 (v.8.0., Adobe Systems, Mountain View, CA, USA) rendszert vettünk igénybe a festődések vizualizálására.

13. táblázat. Az elsődleges ellenanyagok jellemzői

Antigén	Ellenanyagot termelő állatfaj	Hígítás	Előállító cég
CGRP	Nyúl	1:800 1:1280 1:2000 1:1600	Euro-Diagnostica (Malmö, Svédország) Europroxima, Arnhem, The Netherlands
CGRP	Tengerimalac	1:800 1:1200 1:1280	Euro-Diagnostica (Malmö, Svédország)
CGRP	Egér	1:100	Abcam, UK
SP	Nyúl	1:400 1:800	Euro-Diagnostica (Malmö, Svédország)
SP	Nyúl	1:320	P.C. Emson MRC (Cambridge, UK)
SP	Tengerimalac	1:1000	Euro-Diagnostica (Malmö, Svédország)
NOS	Nyúl	1:1000 1:2560	Euro-Diagnostica (Malmö, Svédország)
NOS	Tengerimalac	1:2560	Euro-Diagnostica (Malmö, Svédország)
PACAP-27	Nyúl	1:640 1:1280	Dr. Akira Arimura (Belle Chasse, LA, USA)
PACAP-38	Nyúl	1:800	Euro-Diagnostica (Malmö, Svédország)
C-PON	Nyúl	1:1280	CRB (Cambridge, UK)
VIP	Nyúl	1:640 1:3000	Euro-Diagnostica (Malmö, Svédország)
VMAT	Nyúl	1:1280	Euro-Diagnostica (Malmö, Svédország)
DBH	Nyúl	1:320	Euro-Diagnostica (Malmö, Svédország)
TH	Nyúl	1:320	Pel-Freeze Biologicals (Rogers, Arkansas, USA)
5-HT _{1B} receptor	Nyúl	1:200	Merck Sharp & Dohme (UK)
5-HT _{1D} receptor	Nyúl	1:100	Merck Sharp & Dohme (UK)
Nociceptin	Kecske	1:100	SDS (Stockholm, Svédország)
VR ₁	Nyúl	1:400	Chemicon (Stockholm, Svédország)
HO-1 (OSA-100)	Nyúl	1:1000	Stressgen Biotech, (Victoria, Alberta, Kanada)
HO-2 (OSA-200)	Nyúl	1:500	Stressgen Biotech, (Victoria, Alberta, Kanada)
BVR	Nyúl	1:100	Stressgen Biotech, (Victoria, Alberta, Kanada)
CLR (3152)	Nyúl	1:500	Merck & Co., Inc
RAMP1 (844)	Kecske	1:100	Merck & Co., Inc

Rövidítések: BVR: biliverdin reduktáz, CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, CLR: calcitonin receptor-szerű receptor, C-PON: neuropeptid Y C-terminális flanking peptidje, DBH: dopamin-béta-hydroxláz, HO-1: hem-oxigenáz-1, HO-2: hem-oxigenáz-2, 5-HT_{1B}: 5-hydroxy-triptamin_{1B}, 5-HT_{1D}: 5-hydroxy-triptamin_{1D}, LC: locus ceruleus, NOS: nitrogén-oxid-szintetáz, NRM: nucleus raphe magnus, PACAP-27: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-27, PACAP-38: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-38, RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1, SP: P-anyag, TH: tyrozin hydroxyláz, TNC: caudalis trigaminális magcsoport, VIP: vasoactiv intestinalis polipeptid, VMAT: vesicula monoamin transzporter, VR₁: vanilloid receptor1

Az 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} receptorok immuncitokémiai vizsgálatakor indirekt Immunfluoreszcens technikát használtunk. A metszeteket először 30 percen át szobahőmérsékleten 5%-os normál sertés szérumban, majd ezt követően 3 napon át +4 °C-on nedves kamrában inkubáltuk az elsődleges ellenanyagokkal: 5-HT_{1B} receptor (nyúlban termelt, 1:200, Merck Sharp & Dohme, Egyesült Királyság), 5-HT_{1D} receptor (nyúlban termelt, 1:100, Merck Sharp & Dohme, Egyesült Királyság), CGRP (tengerimalacban termelt, 1:1200, Euro-Diagnostica, Svédország). Az antigén ellenanyag komplexek helyeit nyúl IgG ellen sertésben termelt FITC-cel (1:80, Sigma St. Louis, MO, USA) vagy tengerimalac IgG ellen kecskében termelt TRITC-cel (1:80, DAKO, Koppenhága, Dánia) konjugált másodlagos ellenanyagokkal mutattuk ki.

A CGRP és a NOS ko-lokalizációjának a vizsgálatára kettős Immunfluoreszcens technikát alkalmaztunk. A metszeteket primer ellenanyaggal inkubáltuk (nyúlban termelt CGRP 1:1280, tengerimalacban termelt NOS 1:2560) +4 °C-on nedves kamrában egy éjen át. A másodlagos ellenanyag: nyúl IgG ellen sertésben termelt FITC-cel (1:80, Sigma St. Louis, MO, USA) jelölt, valamint tengerimalac IgG ellen kecskében termelt TRITC-cel (1:80, DAKO, Koppenhága, Dánia) jelölt ellenanyag volt, melyekkel nedves kamrában szobahőn 45 percig végeztük a reakciót. A mikroszkóp filterjeinek (Leica filter N°K3-FITC, N°21-TRITC) elmozdításával a FITC-cel és TRITC-cel jelölt másodlagos ellenanyagokat lehetett lokalizálni egy és ugyanazon metszeten.

Az 5-HT_{1B} és az 5-HT_{1D} receptorok és a CGRP, az SP, valamint a NOS ko-lokalizációjának vizsgálatakor az elsődleges ellenanyagokkal: 5-HT_{1B} receptor (nyúlban termelt, 1:200, Merck Sharp & Dohme, Egyesült Királyság), 5-HT_{1D} receptor (nyúlban termelt, 1:100, Merck Sharp & Dohme, Egyesült Királyság), CGRP (tengerimalacban termelt, 1:1200, Euro-Diagnostica, Svédország), SP (tengerimalacban termelt, 1:1000, Euro-Diagnostica, Svédország), NOS (tengerimalacban termelt, 1:2560, Euro-Diagnostica, Svédország) három napon át inkubáltuk a metszeteket +4 °C-on nedves kamrában. PBS-ben történt mosást követően, 45 percen át nedves kamrában, szobahőmérsékleten nyúl vagy tengerimalac IgG ellen termelt másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk, melyek TRITC-cel vagy FITC-cel voltak jelölve (nyúl IgG ellen

kecskében termelt TRITC-cel jelölt ellenanyag 1:400, DAKO, Koppenhága, Dánia; tengerimalac IgG ellen kecskében termelt FITC-cel jelölt ellenanyag 1:80, Sigma St. Louis, MO, USA). A metszeteket glycerol/PBS (2:1) oldattal fedtük és krómfluoreszens filterek segítségével vizsgáltuk. A mikroszkóp filterjeinek elmozdításával (Leica filter család N°K3-FITC, N°21-TRITC) a TRITC-cel és FITC-cel konjugált másodlagos ellenanyagokat ugyanazon metszeten tudtuk vizsgálni.

A VR₁, a CGRP, az SP és a NOS ko-lokalizációjának vizsgálatakor kettős Immunfluoreszcens technikát alkalmaztunk. A metszeteket az elsődleges ellenanyagokkal három napig inkubáltuk nedves kamrában +4 °C-on: VR₁ receptor (nyúlban termelt 1:400, Chemicon, Svédország), CGRP (tengerimalacban termelt 1:1200, Euro-Diagnostica, Svédország), SP (tengerimalacban termelt 1:1000, Euro-Diagnostica, Svédország), NOS (tengerimalacban termelt 1:2560, Euro-Diagnostica, Svédország). Ezt követően PBS-ben mosást alkalmaztunk, majd 45 percen át nedves kamrában, szobahőmérsékleten nyúl vagy tengerimalac IgG ellen termelt ellenanyaggal inkubáltuk, melyek TRITC-cel vagy FITC-cel voltak jelölve (nyúl IgG ellen kecskében termelt TRITC-cel jelölt ellenanyag 1:400, DAKO, Koppenhága, Dánia; tengerimalac IgG ellen kecskében termelt FITC-cel jelölt ellenanyag 1:80, Sigma St. Louis, MO, USA). A metszeteket glycerol/PBS (2:1) oldattal fedtük és krómfluoreszens filterek segítségével vizsgáltuk. A mikroszkóp filterjeinek elmozdításával (Leica filter család N°K3-FITC, N°21-TRITC) a TRITC-cel és FITC-cel konjugált másodlagos ellenanyagokat ugyanazon metszeten tudtuk vizsgálni.

A nociceptin, a CGRP, az SP, a NOS és a PACAP ko-lokalizációjának vizsgálatához kettős Immunfluoreszcens technikát alkalmaztunk. A metszeteket az elsődleges ellenanyagokkal három napig inkubáltuk nedves kamrában +4 °C-on: nociceptin (kecskében termelt 1:100, SDS, Svédország), CGRP (nyúlban termelt 1:1280, Euro-Diagnostica, Svédország), SP (nyúlban termelt 1:400, Euro-Diagnostica, Svédország), NOS (nyúlban termelt 1:2560, Euro-Diagnostica, Svédország), PACAP (nyúlban termelt 1:1280, Euro-Diagnostica, Svédország). Ezt követően PBS-ben mosást alkalmaztunk, majd 45 percen át nedves kamrában, szobahőmérsékleten nyúl vagy kecske IgG ellen termelt ellenanyaggal inkubáltuk, melyek TRITC-cel vagy FITC-cel voltak jelölve (kecske IgG ellen számban termelt TRITC-cel jelölt ellenanyag 1:100, Chemicon, Svédország; nyúl IgG ellen sertében termelt FITC-cel jelölt ellenanyag 1:80, DAKO, Koppenhága, Dánia). A metszeteket glycerol/PBS (2:1) oldattal fedtük és krómfluoreszens filterek segítségével vizsgáltuk. A mikroszkóp filterjeinek elmozdításával (Leica filter család N°K3-FITC, N°21-TRITC) a TRITC-cel és FITC-cel konjugált másodlagos ellenanyagokat ugyanazon metszeten tudtuk vizsgálni.

A HO-2 és a BVR-nak a CGRP-vel való ko-lokalizációjának vizsgálatára kettős Immunfluoreszcens technikát alkalmaztunk. Az elsődleges ellenanyagokkal (1:500 HO-2, nyúl; 1:100 BVR, nyúl; 1:800 CGRP, tengerimalac) inkubáltuk a metszeteket, majd tengerimalac IgG ellen kecskében termelt FITC-cel (1:80, Sigma St. Louis, MO, USA) vagy nyúl IgG ellen kecskében termelt TRITC-cel (1:100, DAKO, Koppenhága, Dánia) jelölt ellenanyagokat használtunk. A mikroszkóp filterjeinek (Leica filter család N°K3-FITC, N°21-TRITC) elmozdításával a TRITC-cel és FITC-cel konjugált másodlagos ellenanyagokat ugyanazon metszeten tudtuk vizsgálni.

Kontroll vizsgálatainkban az elsődleges ellenanyagok felhelyezését elhagytuk a metodikai lépések közül. Az ellenanyag specificitásának vizsgálatakor a használt ellenanyaggal, antigénnel, illetve a peptidekkel előinkubáció történt (10-100 µg szintetikus peptid per ml hígított antiszérum). Az ellenanyag egyéb peptidekkel való esetleges keresztreakciója is meg lett vizsgálva (10-100 µg peptid per ml hígított antiszérum), de keresztreakciót nem tapasztaltunk. Azonban további más peptidekkel vagy esetleges aminosav sequentiákkal történő keresztreakció nem zárható ki teljes biztonsággal, ezért a reakció végtermék megjelölésekor az „immunreaktív-szerű” kifejezés a megfelelőbb. Mennyiségi analízisre minden esetben 10 komplett metszetet használtunk fel, minden egyes neurotranszmitter esetében. Azokat a sejteket tekintettük immunpozitívnak, melyeknek a sejtmagjuk tisztán láthatóak voltak. A sejtek nagyságának meghatározásakor Scion Image software felhasználásával történt, a sejtmaggal rendelkező sejtek legnagyobb átmérőjének alapján.

5.1.2.2. *In situ* hibridizáció

A CGRP mRNS-sének celluláris meghatározását *in situ* hibridizációval végeztük oligodeoxyribonucleotid próba segítségével. A CGRP próba (DuPont NEN, Egyesült Királyság) 30 antisens bázispárt tartalmazott, mely megfelelt a patkány α -CGRP 3839-3868-as bázispárjainak és nem mutatott azonosságot a calcitoninnal, a sziget amyloid polipeptiddel vagy az adrenomedullin sequentiákkal. A próba 3-as végét 35 S-dATP-vel jelöltük, terminal transferázt (DuPont NEN, Egyesült Királyság) használva úgy, hogy a specifikus aktivitás kb. 2×10^9 CPM / µg legyen, majd ezt követően az anyagot Chroma Spin TM-10 (Clontech, Intermedica, Stockholm, Svédország) oszlopon tisztítottuk. Az *in situ* hibridizációra felhasznált szöveteket a dissectiot követően azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd -80 °C-on tároltuk a kriosztátban történt metszésig (10 µm). A friss fagyasztott metszeteket gyorsan szobahőre melegítettük és 4 %-os paraformaldehyddel fixáltuk. A hibridizációt megelőzően a metszeteket acetiláltuk 0.1 M triethanolaminban oldott 0.25 %-os esetsav anhydriddel, dehidráltuk és kloroformmal tisztítottuk. A hibridizáció előtt

dithiothreoitolt adtunk a hibridizációs pufferhez 0.1 M-os végkoncentrációban. A hibridizációs puffer tartalma volt 50 %-os formamid, 4x nátrium citrát (SSC, 1x SSC=0.15 M NaCl, 0.015 M nátrium citrát), 1x Denhardt-féle oldat (0.02 %-os polyvinylpyrrolidon, 0.02 % Ficoll, 0.02 % marha szérum albumin), 10 % dextrán szulfát, 0.24 µg/µl élesztő tRNS, 0.5 µg/µl lazac sperma DNS, 1 % szarkozil és 17 mM Na₂HPO₄. A hibridizációs puffert adtunk mindegyik tárgylemezhez, melyen 2 metszet volt. A metszeteket parafilmmel fedtük a párolgás megakadályozása céljából. A hibridizáció egy éjen át folyt nedves kamrában +37 °C-on, megközelítően 1 pmol/ml próba koncentráció mellett. A hibridizációt követően a metszeteket standard SSC-vel mostuk (1x SSC=0.15 M NaCl, 0.015 M nátrium citrát, 4x 15 perc, 55 °C+1x 30 perc szobahő). Ezt követően a metszeteket Ilford K5-ös film emulzióba mártottuk (Ilford Scientific Product, Egyesült Királyság) és Kodak D-19-ben hívtuk (Kodak-Pathe, Franciaország). Kontrollként a hibridizációt RNase (45 µg/ml, Sigma) 30 perces 37 °C-on történő inkubálásával is elvégeztük. Egyéb kontrollként százszoros mennyiségű jelöletlen próbát is adtunk a hibridizációs pufferhez, vagy a metszeteket nem komplementer próbával hibridizáltuk.

5.1.2.3. RT-PCR vizsgálatok

5.1.2.3.1. Totál RNS izolálás

A szövetmintákat folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk, majd a sejtekből totál RNS-t extraháltunk TRIzol reagens segítségével (Gibco BRL, Paisly, Skócia). Szobahőmérsékleten 1 ml TRIzol reagensben homogenizáltuk a fagyasztott mintát homogenizátor segítségével (Polytron Kinematica, Model PT 1200, Labora, Svédország). A homogenizátumokat kloroformmal elkevertük, majd 15 percig 4 °C-on 12.000x g-vel centrifugáltuk. Az RNS-t tartalmazó vizes fázist egy új csőbe helyeztük, majd izopropanol hozzáadásával precipitáltuk. A mintákat 10 percig szobahőn inkubáltuk, majd 4 °C-on 10 percig 12.000xg-vel centrifugáltuk. Az RNS pelletet 70 %-os jéghideg etanollal mostuk, levegőn szárítottuk, majd visszaoldottuk 10 µl diethyl-pyrocabonáttal (DEPC) kezelt vízbe, és felhasználásig –20 °C-on tároltuk. Az RNS mennyiségét és tisztaságát spektrofotométerlással állapítottuk meg (DU64 spektrofotométer, Beckman, Fullerton, CA, USA) az OD₂₆₀₋₂₈₀>1.6 arányt tekintve tisztának. A korábban leírtak szerint (Edvinsson et al. 1997), a maradék DNS eltávolításához dupla csöveket használtunk, melyek egyikébe 1 µg DNase (Gibco BRL) kezelt totál mRNS-t mértünk.

5.1.2.3.2. Polimeráz láncreakció (PCR)

A közölt humán szekvenciák alapján a NPY Y₁, Y₂, CGRP₁, VIP₁, ORL₁, VR₁ receptorokra specifikus primereket terveztünk.

NPY Y ₁ (563 bp)	forward: 5'-ATCAATTCTTGGTGTCTCTG reverse: 5'-TAGGCGTATATATATCTTGAAGT
NPY Y ₂ (718 bp)	forward: 5'-CTGCTCCCATCATCTTGCT reverse: 5'-TCGGCTGTCAATGTCAAC
CGRP ₁ (339 bp)	forward: 5'-TCTGGTTCTCTTGCCTTTTTTTAT reverse: 5'-GTCCATGTTCTGTTGCTTGCTG
VIP ₁ (269 bp)	forward: 5'-TCCGTGGTGGTCTGGGTGAATA reverse: 5'-GTGTTGGTGAAGTAGGTGATGG
ORL ₁ (520 bp)	forward: 5'-GTGGTAGTGGCTGTGTTTCGT reverse: 5'-CTAATGCTTTGACCTGTCCC
VR ₁ (504 bp)	forward: 5'-GGTGCTTCAGGGTGGACGA reverse: 5'-GGGGACAGTGACGGTTGGA

Az RT-PCR-t GeneAmp RNA PCR kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) segítségével végeztük DNS Thermal cycler gépben (Perkin-Elmer). Az első cDNS szálát 20 µl térfogatban szintetizáltuk 1 µg DNase I kezelt totál RNS-ből, primerként random hexamereket használva. A szintetizált cDNS-ből 5 µl-t kivéve Amplitaq (Perkin-Elmer) termotabil enzim felhasználásával 50 µl végtérfogatú amplifikációt végeztünk. A következő amprifikációs profilt használtuk: 2 perc 95 °C 1 ciklus – 1 perc 95 °C, 1 perc olvadási hőmérséklet, 1 perc 72 °C 35 ciklus – 7 perc 72 °C. Az olvadási hőmérséklet a különböző receptorokra: 61 °C (NPY Y₁), 54 °C (NPY Y₂), 63 °C (CGRP₁) és 57°C (VIP₁). Az ORL₁ és a VR₁ receptoroknál a következő programot használtuk:

5 perc 95 °C 1 ciklus – 1 perc 95 °C, 30 másodperc 59 °C , 30 másodperc 72 °C 35 ciklus – 7 perc 72 °C.

A termékeket restriktációs analízissel, illetve DNS szekvenálással azonosítottuk, valamint minden kísérlethez tartozott egy reverz transzkriptáz helyett vizet tartalmazó vakpróba. Minden kísérletet minden egyes páciensen elvégeztünk.

5.1.2.3.3. PCR termékek analízise

Minden egyes PCR termékből 10 µl-t futtattunk 1.5 %-os agaros gélen 0.5x TBE pufferben, majd a gélét ethidium bromiddal (1 µg/ml) festettük és UV-boksz-ban fotóztuk 667-es Polaroid filmet használva.

5.1.2.4. Folyadékkromatográfiás vizsgálatok

A 16 aminosav: a glutaminsav (Glu), a szerin (Ser), a glicin (Gly), az arginin (Arg), a tirozin (Tyr), a metionin (Met), a triptofan (Trp), a treonin (Thr), a valin (Val), az aszparaginsav (Asp), az izoleucin (Ile), a leucin (Leu), a fenilalanin (Phe), a glutamin (Gln), az aszparagin (Asn), a hisztidin (His) koncentrációjának meghatározása reverz fázisú folyadék kromatográfiás (RP-HPLC) vizsgálattal történt.

A nyálminták szabad aminosav tartalmát Bartók és mtsai közleménye alapján HP 1090 Series II típusú folyadékkromatográfval határoztuk meg, amely készülék ún. DR5 biner oldószerszállító rendszerrel, automata mintaadagolóval, oszloptermosztáttal és programozható fluoreszcens detektorral volt felszerelve. Automatikus kétlépéses származékképzési reakciót alkalmaztunk az o-ftáldialdehid/3-merkaptopropionsav és a 9-fluorenil-metil-kloroformát reagensok felhasználásával a primer- ill. a szekunder aminocsoportot tartalmazó aminosavak származékképzéséhez. A származékképzett aminosavakat fordított fázisú HPLC oszlopon (Hypersil ODS, 200 x 2.1 mm x 5 m) kétkomponensű grádiens felhasználásával 0,45 ml/perc áramlási sebességgel választottuk el. Az A oldószer 0,018 M n trium-acet t volt 0,02% v/v)trietilamin (pH 7,2),s 0,3% tetrahidrofurán kiegészítéssel. A B oldószer acetonitril/metilalkohol/0,1 M nátrium-acetát volt (pH 7,2) 2/2/1 (v/v) arányban keverve. A gerjesztési (Ex) és emissziós (Em) hullámhosszak a primer és szekunder aminocsoportot tartalmazó aminosavaknál Ex 340 nm, Em 450 nm ill. Ex 264 nm és Em 313 nm voltak. A minőségi és mennyiségi kiértékelést külső standard módszerrel végeztük.

Kruskal-Wallis tesztet, valamint a csoportok összehasonlítására nem-parametrikus Mann-Whitney U tesztet használtunk. Az eredményeket az átlag és $\pm$ standard hibával adtuk meg (standard error).

5.1.2.5. Az eikozanoidok analízise

A stimulálatlan vérlemezkéket (10^8 sejt/ml) 37 °C-on, 5 percig előinkubáltuk a jelölésként használt [$1\text{-}^{14}\text{C}$] arachidonsav (7,7 kBq=0,172 pmol minden egyes mintához) hozzáadása előtt. Az arachidonsav metabolitok képződését a 10 perces inkubálást követően a pH csökkentésével állítottuk le. Az extrakciót követően az eikozanoidok szeparálását magasnyomású vékonyréteg kromatográfiával végeztük (MIM Labor, Magyarország) és a mennyiségi meghatározásuk folyadék szintillációs módszerrel történt (TRI-CARB 2100TR,

Canberra Packard, USA) (Mezei et al. 1997). A radioaktív jelölt arachidonsav ($R_f=0,94$) metabolitokat jelölt és nem-jelölt autentikus standardokkal azonosítottuk, pl.: 6-keto-PGF 1_α ($R_f=0,19$), PGF 2_α ($R_f=0,29$), PGE 2 ($R_f=0,48$), PGD 2 ($R_f=0,58$), TxB 2 ($R_f=0,39$), 12-HHT ($R_f=0,69$) és 12-HETE ($R_f=0,79$), ánizsaldehyd reagenssel történt detektálással (Kiefer et al. 1975.). A statisztikai analízishez Student t-tesztet alkalmaztunk Windows (6.1.2. verzió) SPSS segítségével.

5.2. Anyag és módszer a 3.2.2. fejezethez

5.2.1. Anyaggyűjtés

Felnőtt, hím, (300–400 g testtömeg közötti) Sprague-Dawley patkányokat CO $_2$ komában elaltattunk, majd a trigeminális ganglionokat a szervkultúra (n=25) vagy kontroll (n=15) kísérletek számára kipreparáltuk. A kísérleteket a svédországi Lundi Tudományegyetem Állatkísérleteket Felügyelő Etikai Bizottsága engedélyezte (M161-07). A trigeminális ganglionokat rostrocaudálisan három részre vágtuk (3–4 mm) jéghideg foszfát-pufferelt sóoldatban (phosphate-buffered saline; PBS), majd a szövetrészeket penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 mg/mL) és amphotericin B (25 mg/mL) tartalmú, Dulbecco szerint módosított Eagle-féle médiumba helyeztük (DMEM). A részeket ezek után 48 órán át, 37°C hőmérsékleten, 5% CO $_2$ -tartalmú párasított levegőn inkubáltuk. A kísérletek egy részében a trigeminális ganglionokat exogén CGRP-vel (105 M) (Sigma-Aldrich, Németország) inkubáltuk DMEM-ben két órán keresztül, ezeket friss (nem tenyésztett) trigeminális metszetekkel hasonlítottuk össze. Mind az inkubált, mind a friss ganglionokat egy éjszakára 2%-os paraformaldehid és 0,2%-os pikrinsav tartalmú, 0,1 mol/L foszfát puffer alapú fixáló oldatba helyeztük (pH 7,2). Fixálást követően a mintákat 10% szukróz tartalmú Tyrode oldatba mártottuk, izopentánban gyorsfagyasztottuk és –80°C-on tároltuk.

5.2.2. Módszerek

5.2.2.1. Intracelluláris szignáltranszdukciós vizsgálatok

A kísérletek egy részében különböző MAP kináz inhibitorokat adtunk a tápoldathoz: a MEK1/2 inhibitor U0126 (105 M), ennek inaktív analógja U0124 (105 M), a p38 inhibitor SB203580 (105 M) vagy a JNK inhibitor SP600125 (105 M) került a tápoldatba (mind Sigma, St. Louis, MO, USA) (n=12). A kontrollként használt trigeminális ganglionokat megegyező ideig, megegyező térfogatú (1 mL/mL) DMSO oldószerben inkubáltuk (n=12). Hat állatot használtunk kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakciós vizsgálatokhoz (quantitative real-

time polymerase chain reaction; qPCR) és öt állatot használtunk fel csoportonként immunhisztokémiai vizsgálatok céljából.

5.2.2.2. Valós idejű kvantitatív PCR

A valós idejű PCR kísérletekhez a trigeminális ganglionokat lefagyasztottuk és -80°C -on tároltuk a vizsgálat elvégzéséig. A CGRP mRNS expresszió szintjeit a tenyésztés megkezdésétől számított és U0126 (105 M, n=6), SB203580 (105 M, n=6) vagy SP600125 (105 M, n=6) MAP kináz inhibitorok vagy DMSO oldószer (n=6 csoportonként) jelenlétében eltöltött 24 illetve 48 órát követően kvantifikáltuk. Az RNS állományt izoláltuk és reverz transzkripcióval cDNS-sé írtuk át 40 μl végtérfogatban, GeneAmp reverz transzkripció kit (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) segítségével, egy Perkin-Elmer 2400 PCR készülékben, 42°C -on, 90 percig. Minden reakcióhoz 1 mg RNS-t használtunk. A valós idejű qPCR-t GeneAmp SYBR Green PCR kit segítségével végeztük el (Perkin-Elmer, Applied Biosystems) egy GeneAmp 7300 szekvenciadetektáló rendszerben (Perkin-Elmer, Applied Biosystems). A fent leírt szintetizált cDNS szolgált templátként. Minden kísérlethez használtunk egy templát nélküli negatív kontrollt is. A PCR reakció 50 μl térfogatban zajlott. A reakciót 50°C hőmérsékleten kezdtük el 2 percen át, majd 10 percen át 95°C hőmérsékleten folytattuk, ezt követően 40 PCR ciklus következett 15 másodpercig tartó 95°C és 1 percen át tartó 60°C hőmérsékletekkel. A specifikus PCR termékek azonosítására a valós idejű PCR-t követően disszociációs görbéket készítettünk. A patkány CGRP-specifikus primereket a következőképpen terveztük meg:

CGRP előre: 5' -GAGGCAGCTACAAGGTTTCAGG -3'

vissza: 5' - AGGTGTTGGTGCTGGACACA-3'

Referenciagéneknek a glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) és az elongációs faktor-1 (EF-1) háztartási géneket használtuk ebben a vizsgálatban, mivel ezek a sejtekben folyamatosan és állandó mennyiségben expresszálódnak. A patkány GAPDH és EF-1 primereket a következőképpen terveztük meg:

GAPDH előre: 5' -GGCCTTCCGTGTTCTACC -3'

vissza: 5' - CGGCATGTCAGATCCACAAC -3'

EF-1 előre: 5' -GCAAGCCCATGTGTGTTGAA-3'

vissza: 5' - TGATGACACCCACAGCAACTG-3'

Az összes primert a Primer Express 2.0 szoftver (Perkin-Elmer, Applied Biosystems) segítségével terveztük meg és a TAG Copenhagen A/S (Denmark) rendszer segítségével szintetizáltuk.

5.2.2.3. Az SGC-k izolálása az RT-PCR reakcióhoz

A friss vagy szervkultúráként tenyésztett trigeminális ganglionokat az mRNS fixálásához RNAlater[®] reagensbe helyeztük, 24 órán át, 4°C hőmérsékleten. Ezt követően a ganglionokat apró darabokra szeleteltük és kollagenáz D (0,6 mg/ml; Sigma, St. Louis, MO, USA), papain (1 IU/ml; Sigma) és diszpáz (2,4 mg/ml; Sigma) tartalmú Hanks-féle kiegyenlített sóoldatba (pH 7.4) helyeztük (Kuris et al. 2007). A 40 percen át tartó 37°C hőmérsékleten végzett inkubációt követően a szövetet sejtszuszpenzióvá diszpergáltuk egy 100 mm pórusméretű hálón történő áteresztés valamint 5 percen át tartó enyhe centrifugálás (2000 x g) révén. A sejtszuszpenzió gliában gazdag frakcióját grádienscentrifugálással választottuk el és preparáltuk (Babitch et al. 1973). A grádiensből közvetlen nyert 300-400 ml-es mintákat használtuk fel a fentebb leírt RNS izoláláshoz és PCR vizsgálatokhoz.

5.2.2.4. Immunhisztokémia

A patkányból származó fagyasztott trigeminális ganglionokat kriosztátban lemetszettük (10 mm), Superfrost Plus bevont tárgylemezre vittük fel (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Németország) és 15 percen keresztül 0,25% Triton X tartalmú PBS-ben (PBS-T, Chemicon, Svédország) rehidráltuk. A metszeteket ezt követően egy órán keresztül előinkubáltuk szobahőmérsékleten 5% normál szérum tartalmú blokkoló oldatban (ugyanabból a fajból származott, mint a másodlagos antitest). Ezt követően a metszeteket 4°C-on, nedves kamrában, 16-18 órán keresztül összehoztuk az elsődleges antiszérummal (**14. táblázat**) PBS-T-ben. A metszeteket 3x10 percig áztattuk PBS-T-ben, majd ezt követte a másodlagos antitestekkel történő inkubálás (**15. táblázat**) egy-két órán át, szobahőmérsékleten, sötétben. Emellett, kettős jelölést is alkalmaztunk kétféle elsődleges antitest (CGRP és glutamin szintetáz [GS], CGRP és pERK1/2, vagy CGRP és receptor aktivitás modifikáló protein [RAMP1]) majd másodlagos antitestek használatával.

Ezt követően a metszeteket 3 x 15 percre szobahőmérsékletű PBS-T-be merítettük, és rögzítő közeggel (Crystal Mound, SigmaAldrich, München, Németország) vagy Vectashielddel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) rögzítettük. Néhány metszet esetében 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, magfestés) tartalmú közeget használtunk. További három patkányból trigeminális ganglionjait 4% paraformaldehidbe helyeztük 2-4 óra időtartamra, majd ezt követően a mintákat emelkedő koncentrációjú szukróz tartalmú Sörensen-féle foszfát pufferbe (pH 7,2) helyeztük, (30% ovalbumint és 3% zselatint tartalmazó) zselatinos közegbe ágyaztuk és kriosztátban lemetszettük (12 µm). A metszeteket ezt követően a fentebb leírt módon kezeltük az immunhisztokémiai vizsgálatok számára, pro-CT ellenes elsődleges antitestek felhasználásával (**14. táblázat**).

A mintákat epifluoreszcens mikroszkóp használatával elemeztük. A ko-lokalizációt különálló digitális képek szuperponálásával vizsgáltuk. Az elsődleges antitest kihagyásával hoztunk létre negatív kontrollokat.

5.2.2.5. Képanalízis

A fluoreszcenciát megfelelő hullámhosszokon detektáltuk és 1392 x 1040 pixel nagyságú képeket készítettünk 40x-es nagyítású objektívvel. A fluoreszcencia intenzitást ImageJ 1.37v szoftverrel elemeztük (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). A fluoreszcenciát öt különböző területen mértük le minden szövetmintában (vak módszerrel), minden egyes mérés önkényes mértékegységben meghatározott átlagértékét használva. A kontrollok értékeit 100%-nak vettük.

5.2.2.6. Számítások és statisztika

A valós idejű qPCR kísérletekhez az adatokat a komparatív küszöbciklus (cycle threshold, CT) módszerrel elemeztük. A mintákban lévő CGRP mRNS mennyiségének értékeléséhez szimultán GAPDH és EF-1 mRNS szint-meghatározás történt. A CGRP mRNS mennyiségét egy adott mintában a GAPDH vagy EF-1 mennyiségéhez viszonyítva határoztuk meg a $X_0/R_0=2^{CtR-CtX}$ képlet használatával, ahol az X_0 =a CGRP mRNS eredeti mennyisége, R_0 =a GAPDH vagy EF-1 mRNS eredeti mennyisége, a CtR a GAPDH vagy EF-1 referenciához tartozó CT érték, és a CtX a CGRP mRNS-hez tartozó CT érték.

A statisztikai analízist a GraphPad 5.0 szoftver használatával végeztük el (GraphPad, La Jolla, CA, USA) és a nem parametrikus Mann-Whitney U tesztet alkalmaztuk. A $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak. Az adatokat az átlag és az átlag szórása (standard error of mean; SEM) megadásával tüntettük fel.

14. táblázat. Az immunhisztokémiai eljárásokhoz használt elsődleges antitestek részletes adatai

Név, termékkód	Gazdaszervezet	Hígítás	Detektálás	Forrás
CGRP, no. 1221	Nyúl, poliklonális	1 : 15,000	Patkány CGRP	Euro-Diagnostica AB, Malmö, Svédország
RAMP-1, sc-11379	Nyúl, poliklonális	1 : 80	A teljes hosszúságú RAMP1 fehérjét reprezentáló 1–148 humán aminosavak	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA
Phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204) (pERK1/2), #5120	Egér, monoklonális	1 : 50	A p44 és p42 MAPK azon módosulatainak endogén szintjei, amelyeknél az ERK1 kettősen foszforilált a Thr202 és Tyr204 aminosavaknál vagy egyszeresen foszforilált a Thr202 aminosavnál	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
p44/42 MAPK – tERK1/2, #4695	Nyúl, monoklonális	1 : 50	Az össz p44/42 MAPK (ERK1/ERK2) fehérje endogén szintjei	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) – pp38, #4631	Nyúl, monoklonális	1 : 50	A p38 MAPK azon módosulatának endogén szintjei, melyben a fehérje kettősen foszforilált a Thr180 és a Tyr182 aminosavaknál	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) – pJNK, #925	Nyúl, poliklonális	1 : 100	A p46 és p54 SAPK/JNK fehérje azon módosulatának endogén szintjei, melyben a fehérje kettősen foszforilált a Thr183 és a Tyr185 aminosavaknál	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
GS, mAB302	Egér, monoklonális	1 : 150	Bárány és kecske gliális sejtek	Chemicon International, Temecula, CA, USA
Pro-calcitonin, ab 53897	Nyúl, poliklonális	1 : 500	A humán pro-calcitonin 69–82 aminosavainak megfelelő pro-calcitonin	Abcam, Cambridge, UK

A SP kimutatásánál tengerimalacban termelt, 1:800-as hígításban (Euro Diagnostica, AB, Sweden) vagy nyúlban termelt, 1:400-as hígításban (Euro Diagnostica, AB, Sweden) elsődleges antitesteket használtunk.

Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, MAPK: mitogén aktivált protein kináz RAMP: receptor aktivitás befolyásoló protein, ERK: extracelluláris szignál-regulált kináz pERK: foszforilált ERK, tERK: totál ERK, SAPK: stressz-aktivált protein kináz, JNK: C-Jun-N-terminális protein kináz, pJNK: foszforilált JNK, GS: glutamin szintetáz

15. táblázat. Az immunhisztokémiai eljárásokhoz használt másodlagos antitestek

Konjugát és gazdaszervezet	Célszervezet	Hígítás	Forrás
Fluoreszcein-izotiocianát (kecske)	Nyúl	1 : 100	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
Fluoreszcein-izotiocianát (sertés)	Nyúl	1 : 100	DAKO, Denmark
Fluoreszcein-izotiocianát (kecske)	Tengerimalac	1 : 80	DAKO, Denmark
Texas Vörös (szamár)	Egér	1 : 100	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Texas Vörös (szamár)	Nyúl	1 : 100	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Karbocianin 2-jelölt - Cy2 (szamár)	Nyúl	1 : 200	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Alexa 488 (szamár)	Nyúl	1 : 400	Invitrogen, La Jolla, CA, USA
Cy3 (szamár)	Nyúl	1 : 400	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA

5.3. Anyag és módszer a 3.4.2. fejezethez

5.3.1. Anyaggyűjtés

5.3.1.1. Post-mortem anyaggyűjtés

Kísérleteinkhez boncolás során nyert humán (n=5) SPG-okat használtunk követve az érvényben lévő etikai engedélyek (engedély szám: 6/1996; 13/12/2010) irányelveit. A humán alanyok átlagéletkora 78,3 év volt. A halál oka minden esetben szíveredetű volt, egyik alany sem szenvedett központi idegrendszeri megbetegedésben.

A ganglionokat a halál beálltát követő 48 órán belül az Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Pathológiai Intézetben távolítottuk el. A fixáláshoz 2%-os paraformaldehid és 0,2%-os pikrinsav keverékét tartalmazó foszfát puffert (PBS; pH=7,2) alkalmaztunk. A fixálást követően a humán mintákat 10% szukróz tartalmú Tyrode oldatban mostuk, majd Tissue Tek-be (Sakura Finetek, Európa) ágyazva -80°C-on, fagyasztva tároltuk. A minták előkészítését követően 10 µm vastagságú kriometszeteket készítettünk.

5.3.2. Módszerek

5.3.2.1. Hematoxinilín-Eozin festés

A tájékozódás és a szövet állapotának vizsgálata céljából Hematoxinilín-Eozin (Sigma-Aldrich, MO, USA) festést alkalmaztunk, standard protokollt használva (4 perc hematoxinilín, vízben öblítés, 30 másodperc eozin).

5.3.2.2. Immunhisztokémia

A humán SPG-ban a VIP, PACAP, NOS, a VIP és PACAP közös receptorok (VPAC1, VPAC2), a PACAP receptor (PAC1), a CGRP és a CGRP receptor komponensek (CLR, RAMP1) immunhisztokémiai vizsgálata céljából indirekt immunfluoreszcens technikát használtunk, továbbá kettősfestéseket is alkalmaztunk az egyes neurotranszmitterek lokalizációjának feltárása céljából.

A felolvasztást követően a metszeteket 0,25%-os Triton X-et tartalmazó PBS-ben (PBS-T, Chemicon, Svédország) mostuk 2x15 percig. Ezt követően a metszeteket nedves kamrában, 4°C-on, 16-18 órán keresztül az elsődleges antitesteket (az antitestek részletes adatait lásd az **14. táblázatban**) tartalmazó PBS-T-vel fedtük le, majd 2x15 percen keresztül mostuk. A másodlagos antitestekkel (2. táblázat) sötétben, szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül inkubáltuk a metszeteket. A kettősfestéseket ugyanezen protokoll két egymást követő használatával végeztük. Végül a metszeteket szobahőmérsékleten 3x10 percig PBS-T-ben mostuk és a lefedéshez glycerolt (Sigma-Aldrich, MO, USA), vagy 4',6-diamino-2-phenylindole-t (DAPI, nucleus festés) tartalmazó Vectashield-et (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) használtunk. Az elsődleges antitestek elhagyásával negatív kontrollokat alkalmaztunk.

5.3.2.3. Képfeldolgozás

A metszetek vizsgálatát és a felvételek elkészítését fény- és epifluoreszcens mikroszkóppal végeztük (Nikon 80i, Tokyo, Japan). A kettősfestések láthatóvá tételéhez Adobe Photoshop CS3-at (v.8.0, Adobe Systems, Mountain View, CA, USA) alkalmaztunk.

16. táblázat. Immunhisztokémiához használt elsődleges antitestek

Név	Termékkód	Gazda	Hígítás	Forgalmazó
VIP (M19)	sc-7841	kecske	1:100	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA
VPAC ₁ (H-130)	sc-30019	nyúl	1:150	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA
VPAC ₂ (H-50)	Sc-30020	nyúl	1:150	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA
PACAP-38	T-4473	nyúl	1:500	Peninsula Laboratories, LLC, San Carlos, CA, USA
PAC ₁	ab28670	nyúl	1:800	Abcam, Cambridge Science Park, Cambridge, UK
bNOS	N2280	egér	1:2500	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
GS	MAB302	egér	1:150	Chemicon International, Temecula, CA, USA
GFAP	Z0334	nyúl	1:1500	Dako, Copenhagen, Denmark
CGRP	B47-1	nyúl	1:800	Europroxima, Arnhem, The Netherlands
CGRP	ab81887	egér	1:100	Abcam; Cambridge, UK
RAMP1	844	kecske	1:100	Merck & Co., Inc
CLR	3152	nyúl	1:800	Merck & Co., Inc

Rövidítések: CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid, CLR: calcitonin receptor-szerű receptor, GFAP: , Glial fibrillary acidic protein, GS: glutamin szintetáz, NOS: nitrogén-oxid-szintetáz, PAC₁: PACAP1 receptor, PACAP-38: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid-38, RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1, VIP: vasoactiv intestinalis polipeptid, VMAT: vesicula monoamin transzporter, VPAC₁: VIP₁ vagy PACAP₂ receptor, VPAC₂: VIP₂ vagy PACAP₃ receptor

17. táblázat. Immunhisztokémiához használt másodlagos antitestek

Konjugátum és gazda	Ellenanyag	Hígítás	Forgalmazó
FITC (kecske)	anti- nyúl	1:100	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
FITC (szamár)	anti- nyúl	1:100	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Alexa 488 (szamár)	anti- kecske	1:400	Invitrogen, La Jolla, CA, USA
Texas-Red (szamár)	anti- egér	1:200	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Texas-Red (szamár)	anti- nyúl	1:200	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
DyLight 549 (szamár)	anti- egér	1:200	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
DyLight 488 (szamár)	anti- nyúl	1:200	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Cy2 (szamár)	anti- kecske	1:100	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA

Rövidítés: FITC: fluorescein izothiocyanát

5.4. Anyag és módszer a 3.9.2. fejezethez

5.4.1. Anyaggyűjtés

5.4.1.1. Betegek beválasztása

A vizsgálatba 15 aura nélküli migrénben szenvedő beteget vontunk be. A visus minden esetben 1,0 volt. Az életkor terjedelme 18-53 év, a medián életkor 31 év volt. A panaszok fennállásának időtartama 1 és 25 év között volt, 10 éves mediánértékkel. A fejfájásos epizódok gyakorisága havi egy és évi három közötti intervallumban volt. A betegeket a Nemzetközi Fejfájás Társaság (International Headache Society) kritériumrendszere alapján diagnosztizáltuk (Headache Classification Committee of the International Headache Society 1988). Minden alany részletes neuroophthalmológiai kivizsgáláson esett át, melynek részét képezte a fizikális vizsgálat, CT vizsgálat, szérumbiológiai diagnosztika, ophthalmoscopy és látótérvizsgálat. Csak olyan betegek kerülhettek be a vizsgálatba, akiknél semmilyen egyéb neurológiai vagy szemészeti betegség nem igazolódott. Az intraocularis nyomás szintjét minden betegnél rutinszerűen meghatároztuk, mely minden esetben 16 Hgmm alatt volt. Két esetben a szinuszoidális fázisváltásos rácsmintázat (sinusoidally reversing grating) akut fejfájást okozott, Shepherd és mtsai. leírásának megfelelően (Shepherd A.J. 2000). Ezeket a betegeket szintén kizártuk a vizsgálatból. Hasonlóképpen, azokat a betegeket, akiknek a vizsgálatot megelőző vagy azt követő két héten belül aura nélküli migrénes rohama zajlott, kizártuk a vizsgálatból. A kontrollcsoport 15 életkor szerint egyeztetett önkéntes, jó visussal rendelkező, neurológiai szempontból tünetmentes illetve primer fejfájásban nem szenvedő nőből állt.

5.4.2. Módszerek

5.4.2.1. A kontrasztérzékenység vizsgálata

Monocularis statikus és dinamikus kontrasztérzékenységet kilenc térbeli frekvencián (spatial frequency, SF) határoztuk meg (0,5; 1,2; 1,9; 2,9; 3,6; 4,8; 5,7; 7,2; 14,3 ciklus/fok) egy komputeres vizsgálat segítségével (Venus, NeuroScientific Corporation, USA). Az ingerek luminanciakontraszt által definiált horizontális rácsmintázatok voltak szinuszoidális luminanciaprofillal. A dinamikus vizsgálatához 4 Hz frekvenciával fázisváltást alkalmaztunk. A kijelző 13°x13° látószög alatt látszott egyméteres távolságból. A képernyő luminanciája a fotópikus körülmények között 17, szkotopikus körülmények között 0,17 cd/m² volt. A legmagasabb kontraszt 70,7% volt. Fotópikus körülmények közt mindkét szemet teszteltük, azonban szkotopikus körülmények között csak a jobb szemet. A kontrasztküszöb meghatározásához a kezdeti kontrasztot 15 db-el az átlagos normálérték fölé állítottuk be. Minden résztvevő képes volt detektálni azt a szubmaximális kontrasztszintet. Ezt követően a

kontrasztszintet 5 másodpercenként 3 dB-lel csökkentettük, amíg az alanyok nem jelezték, hogy már nem látják tovább az ingert (leszálló módszer). A betegek szóval jelezték, ha változást éreztek a kontrasztérzékelésben. Mind a statikus, mind a dinamikus vizsgálatban a kontrasztot ezt követően 15 db-lel a leszálló módszerrel mért küszöbérték alá állítottuk, majd a kontrasztot 5 másodpercenként 3 dB-lel emeltük ingerközti intervallum nélkül, míg az alanyok nem jelezték, hogy észlelik az ingert (felszálló módszer). A teljes eljárást ötször ismételtük meg, hogy átlagos kontrasztküszöböt nyerjünk, amelyet SF-ben (térbeli frekvencia) fejeztünk ki. A kontrasztérzékenységet a kontrasztküszöb reciprokaként definiáltuk (Shepherd A.J. 2000). A leszálló és a felszálló módszerek, a tesztelt térbeli frekvenciák és a statikus versus dinamikus vizsgálatok sorrendisége véletlenszerű volt az alanyok között. Nem minden beteg hajtott végre minden vizsgálatot. Néhány ritka esetben a vizsgálatokat túl korán konkludáltuk. Ez megjelenik az eltérő szabadsági fok értékekben. A statisztikai kiértékelés ANOVA és post hoc elemzés révén történt (többszörös összehasonlítás miatt Newman-Keuls próbával), a STATISTICA program segítségével.

5.5. *Anyag és módszer a 3.10.2. fejezethez*

5.5.1. Anyaggyűjtés

5.5.1.1. Felhasznált állatok

Mindkét nemhez tartozó fiatal felnőtt Sprague-Dawley patkányt (n=59, 8-12 hét, 250-350 g) használtunk fel kísérleteinkben: 28 a NTG-indukálta aktivációs modellben, 20 a TRIG elektromos stimuláció (ES) modellben és 11 szolgált intakt állatként a kontroll csoportban. Az állatokat laboratóriumi körülmények között (24-25 °C, kb. 80 % páratartalom) neveltük és tartottuk a Szegedi Tudományegyetem Orvostudományi Kar Neurológiai Klinika Laboratóriumi Állatházában. Az állatoknak korlátlan élelem (standard patkány táp) és csapvíz hozzáférést biztosítottunk 12 órás napszaki ingadozás mellett.

Minden állatkísérletet a Magyar Parlament 1998/XXVIII. az állatok védelméről és kíméletéről szóló törvény, valamint a 243/1988. az állatkísérletek végzéséről szóló kormányrendelet irányelvei alapján végeztünk. Munkánk során a Nemzetközi Fájdalom Társaság (Zimmermann 1983) és az Európai Közösségek Tanácsának (86/609/ECC) ajánlásait is figyelembe vettük. Kutatásainkat az Állatkísérletek Etikai Kódexével összhangban, a Szegedi Orvostudományi Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával végeztük.

5.5.2. Módszerek

5.5.2.1. A trigemino-vascularis rendszer kémiai stimulációja

Három csoportot vontunk be a NTG-indukálta kémiai aktivációs vizsgálatokba. Az első csoportban 11 állatot intaktnak hagytunk. A másik két csoportban 14 állat/csoport kapott egyszerű ip. NTG injekciót (Nitrolingual Pumpspray, Pohl-Boskamp GmbH, Németország) 10 mg/kg dózisban (0.13 ml/100 g-7.68 mg/ml törzsoldat) a trigemino-vascularis rendszer kémiai stimulációjának érdekében. A vérvétel előtt az állatokat elaltattuk ip. adagolt 4 %-os klorál-hidrát oldattal (10 ml/kg), mely stabil, mély anaesthesia-t biztosított az egész kísérlet ideje alatt. A vérvétel azonnal követte az altatást az intakt állatoknál, míg a többi csoportban a NTG adását követő 90. és 180. percben vettünk vért az állatoktól az altatást követően. Előzetes kísérletekben 15 és 30 perc elteltével is vettünk mintákat (az adatok feltüntetése csak a vérplazma esetén), de mivel nem tapasztaltunk PACAP-38-ir változást ezen időpontokban, ezért ezeket a vizsgálatokat felfüggesztettük. A vérmintát (5 ml/állat) a jobb véna cava craniálisból vettük jéghideg, EDTA-t (12 mg) és proteáz inhibitor aprotinint (Trazylol 1200IU) tartalmazó csőbe. A mintákat 4 °C-ra tettük a vérplazma szeparálásáig (centrifugálással- 3000 rpm 10 perc 4°C). A vérvétel előtt kb. 150 µl/állat CSF mintát vettünk a sub occipitalis ciszternából, majd kipreparáltuk a különböző migrén-kapcsolt struktúrákat (TNC, TRIG, C₃-C₄) a 90. vagy 180. percben. A mintákat -80 °C-on tároltuk a PACAP-38-ir RIA módszeres méréséig és a peptid MS meghatározásáig.

5.5.2.2. A trigemino-vascularis rendszer elektromos stimulációja

5 csoportot alakítottunk ki ezekben a kísérletekben: 11 patkányt nem stimuláltunk, a 2. és 3. csoportokban 5-5 állatot követtünk nyomon az álingerlést követő 90-180 percre, egyenként. A 4. és 5. csoportokban szintén 5-5 állatot vizsgáltunk a TRIG elektromos ingerlését követő 90-180 perc múlva. Korábbi kísérletekben a 30. percben is vettünk mintát (vérplazma esetén feltüntetve), de PACAP-38-ir változás hiánya végett, azokat nem folytattuk. Először az állatokat elaltattuk ip. adagolt 4 %-os klorál-hidrát oldattal (10 ml/kg), és az altatást fenn is tartottuk az egész kísérlet ideje alatt.

Ezután szeterotaxiás készülékbe helyeztük az állatokat és rögzítettük a fejüket. A skalp eltávolítása után, a bregmától kimértük a jobb oldali TRIG helyét a készülék mikromanupulátoraival a Watson-Paxinos-féle Rat Brain Atlas (antero-posterior: 3,2 mm; medio-lateral: 2,9 mm) alapján. Ezen a ponton a koponya átfúrását követően, stimuláló makroelektródát vezettünk az agyba, a TRIG eléréséig. A gangliont a következő paraméterek szerint ingereltük: 30 min időtartam; stimulációs arány: 10 pps x 1; időtartama: 5 ms x 1; áram (mA%): 20 x 5 mA = 1 mA. Az álingerlés esetében az elektródát a fent leírtak szerint

helyeztük és pozícionáltunk a ganglionba, de áramot nem alkalmaztunk. A vérmintákat, a liquort és az idegszöveteket a fent leírtak szerint preparáltunk, tároltuk és analizáltuk.

5.5.2.3. A vérplazma, az agyfolydék (CSF) és a szövetek PACAP-38-ir-ának meghatározása radioimmunoassay (RIA) módszerrel

A plazma és a liquor PACAP-38 koncentrációját egy specifikus és szenzitív RIA technikával határoztuk meg (Jakab et al. 2004). A nyúlban termeltetett szintetikus peptidet ("88111-3" PACAP-38 antiszérum) glutáraldehiddel vagy karbodiimiddel konjugáltuk BSA-hoz vagy thiroglobulinhoz. Az antitest nagy specifitását és C-terminális érzékenységét keresztreakciós tanulmányokkal igazolták; nem találtak keresztreakciót sem a PACAP-27-tel, sem más neuropeptidekkel. A vérminták centrifugálása után (2000 rpm 10 min 4°C) a peptidet kivontuk a plazmából abszolút alkohol (3 térfogat) hozzáadásával. Kicsapás és a második centrifugálás (2000 rpm 10 min 4°C) után, a RIA meghatározás előtt a mintákat nitrogén-áramlás alatt megszárítottuk és újrasszuszpendáltuk 300 µl mérő pufferben, hogy egy 10x nagyobb koncentrációt érjünk el a RIA művelethez (Jakab et al. 2004; Németh et al. 2006).

Az egyes régiók (TRIG, TNC és C₃-C₄ gerincvelő szegmentumok) tömegét megmértük és 1 ml jéghideg bi-desztillált vízben kézi műszerrel homogenizáltuk. A homogenizátumot lecentrifugáltuk (10.000 rpm 10 min), majd újabb 10 min centrifugálás után (12.000 rpm) a felülúszó 70 µl mintáját használtuk RIA mérésre.

Mono-¹²⁵I-nyomjelzővel jelölt, valamint szintetikus peptideket használtunk RIA standardként 0-1000 fmol/ml tartományban. A mérést 1 ml 0.05 mol/l (pH 7.4) foszfát puffer, 0.1 mol/l nátrium-klorid, 0.25 % (w/v) BSA és 0.05 % (w/v) nátrium azidot tartalmazó oldat segítségével végeztük. Az antiszérumot (100 µl, 1:10000 hígításban), a RIA nyomjelzőt (100 µl 5000 cpm/cső) valamint a standard és az ismeretlen mintákat (100 µl) polipropilén csövekbe mértük a pufferrel. 4°C-on 48-72 h inkubáció után az antitset-kötött peptidet szeparáltuk 100 µl szeparáló oldat hozzáadásával (10 g szén, 1 g dextrán és 0.5 g közönséges zsírmentes tejpor, 100 ml desztillált vízben). Centrifugálást követően (3000 rpm 15 min 4 °C) a csöveket óvatosan leöntöttük és a kicsapódások radioaktivitását gamma számlálóval mértük (Gamma, type: NZ310). Az ismeretlen minták PACAP-38 koncentrációját kalibrációs görbéről olvastuk le.

5.5.2.4. PACAP-38 vizsgálata patkány vérplazmában és agy-gerincvelői folyadékban (CSF) tömegspektrometriás (MS) méréssel

A PACAP-38 azonosítását patkány vérplazma és liquor mintákból – összehasonlítva a standard PACAP-38 oldatokkal – mátrix-segített lézer deszorpció/ionizáció „repülési-idő” (MALDI TOF) tömegspektrometriás mérésekkel végeztük. Meghatároztuk a PACAP-38 Na⁺

addukt „quasi-molekuláris” ionját (MW: 4558.7) és a PACAP-27-et (MW: 3147.6) vagy ennek a $[M+Na]^+$ -ját. A PACAP-27/38 standard vizes oldatát és a vizsgált mintákat a cél plate-re töltöttük (MTP 384 masszív target T, Bruker Daltonics, Bremen, Germany), összekeverve minden oldat 1 μ l-ét a telített mátrix oldat ugyanannyi térfogatával (minden nap frissen készítve, feloldva α -ciano-4-hidroxicinnamic savat (CHCA) acetonitrilben /0.1% TFA (1/2, v/v) (Helyes et al. 2007). A liquor mintákat kiséztük és tisztítottuk 0.1% TFA oldat használatával, ZipTip₁₈ pipetta hegyekkel (Millipore Kft., Hungary). A tisztított fehérjéket és peptideket az adszorbensről leoldottuk közvetlenül a MALDI cél platre 3 μ l acetonitril/0.1% TFA (50/50, v/v) oldattal, összekeverve a fent említett telített mátrix oldat 1 μ l-ével.

Az ionokat késleltetett extrakciós körülmények között gyorsítottuk (200 ns) pozitív ionmódozatban 20.00 kV gyorsító feszültséggel, és minden spektrumot lineáris módban detektáltunk. Az eszközök 337 nm pulzáló nitrogén lézert használtak (MNL-205MC modell; LTB Lasertechnik Berlin GmbH., Berlin, Germany). Minden esetben végeztünk külső kalibrálást Bruker Peptide Calibration Standard-et használva (#206195 Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A fehérje tömegeket az 1000-8000 m/z tartományban vártuk. 300 egymást követő lézerlövésből alakítottuk ki az összes spektrumot tartalmazó adathalmazt. Az eszközt Bruker FlexControl 2.4 szoftverrel kontrolláltuk, a színekértékelésére pedig a Bruker FlexAnalysis 2.4 szoftvert használtuk.

5.5.2.5. Statisztikai elemzés

Az ábrákon 11-28 állat adatainak átlagát + az átlagtól való standard eltérést mutatjuk. Statisztikai elemzést egy-utas ANOVA-val végeztünk, melyet Tukey's *post-hoc* teszt követett. Minden esetben a $p < 0.05$ -t választottuk szignifikánsnak.

5.6. Anyag és módszer a 3.11.2. fejezethez

5.6.1. Anyaggyűjtés

5.6.1.1. Perifériás vénás vérgyűjtés (migrénes betegek, egészséges kontrollok)

Tanulmányunkba 87 migrénes beteget (aurás és aura nélküli) és 40 egészséges kontroll, korban egyeztetett alanyt válogattunk be. A migréneseket a Nemzetközi Fejfájás Társaság (IHS) 2004-es irányelvei alapján klasszifikáltuk (Headache Classification Committee of the International Headache Society). A betegség jellemzőinek (időtartam, rohamfrekvencia, allodínia, a fájdalom súlyossága, menstruációs ciklus hatása, egyéb, nem-migrénes, krónikus fájdalom megléte, depresszió jelei) feltérképezése és a csoportok homogenizálása céljából részletes kérdőívet vettünk fel a páciensekről. A kontroll csoport egészséges önkéntesei, kezelést igénylő fejfájást nem panasztak.

A beavatkozások során – melyeket a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Etikai Bizottsága engedélyezett (engedély szám: 87/2009) – vérmintát gyűjtöttünk migrénes betegektől roham alatt és/vagy rohammentes periódusban. A vérvételeket megelőzően megkötéseket nem tettünk (étel/ital-fogyasztás, dohányzás, stb. megengedett volt), kivéve a gyógyszeres rohamterápia, vérvételig történő halasztására vonatkozóan. Ennek eredményeként, 80 interiktális és 28 iktális időszakból gyűjtöttünk mintát, illetve 21 migrénestől mindkét periódusban meg tudtuk határozni a vér peptid tartalmát. A kontroll személyek esetében egyszeri vérvétel történt. A vérmintákat (6 ml/alany) nyugalomban, ülő pozícióban a vena cubitalis-ból nyertük és gyűjtöttük véralvadásgátlót (EDTA, 12 mg) és proteáz gátlót (aprotinin, Gordox, 1200 IU) tartalmazó jéghideg vérvételi csövekbe. A mintákat 4 °C-on tartottuk, majd centrifugáltuk (2000 rpm, 10 min, 4°C). A plazma mintákat –80 °C-on tároltuk a PACAP-38-ir és CGRP-ir RIA módszerrel történő méréséig.

5.6.2. Módszerek

5.6.2.1. RIA mérések és adatgyűjtés

A plazma PACAP-38- és CGRP-ir-t, korábban kifejlesztett specifikus és szenzitív RIA módszerrel detektáltuk (Jakab et al. 2004). A nyúlban termeltetett antiszérumok nagy specificitását és C-terminális érzékenységét keresztreakciós mérésekkel igazolták. Az ismeretlen minták peptid koncentrációit kalibrációs görbe alapján határoztuk meg.

5.6.2.2. Statisztikai analízis

Néhány kivételtől eltekintve, az eredményeket átlag $\pm$ SD formában ábrázoltuk. Az adatok normalitását a Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk. A csoportok összehasonlítását Student-féle páratlan és páros t-tesztekkel, valamint nonparametrikus, Wilcoxon-teszttel végeztük, SPSS 17.0. statisztikai program segítségével. A menstruációs ciklus, a krónikus fájdalom és a PACAP-38 koncentrációk összefüggéseit multivariancia próbákkal vizsgáltuk (ismételt méréses ANOVA). Az eredményeket $p < 0.05$ esetében fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abounader, R., Elhusseiny, A. Cohen, Z. Expression of neuropeptide Y receptors mRNA and protein in human brain vessels and cerebromicrovascular cells in culture. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19:155-163, 1999.
2. Adams, F. The exact works of Aretaeus, the Cappadocian. London, The Sydenham Society, 1856.
3. Adler, C.S., Adler, S.M., Friedman, A.P. A historical perspective on psychiatric thinking about headache. In: *Psychiatric aspects of headache*. Eds.: Adler, C.S., Adler, S.M., Packard, R.C., Baltimore, Williams and Wilkins, pp. 126-232, 1987.
4. Afridi, S., Giffin, N.J., Kaube, H., Friston, K.J., Ward, N.S., Frackowiak, R.S.J., Goadsby, P.J. A positron emission tomographic study in spontaneous migraine. *Arch. Neurol.* 62:1270-1275, 2005/a.
5. Aharony, D., Smith, J.B., Silver, M.J. Regulation of arachidonate-induced platelet aggregation by the lipoxygenase product, 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 718:193-200, 1982.
6. Ahmed, S.A.M., Reid, E., Cooke, A. Familial hemiplegic migraine in the west of Scotland: a clinical and genetic study of seven families. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 61:616-620, 1996.
7. Alam, Z., Coombes, N., Waring, R.H., Williams, A.C., Steventon, G.B. Plasma levels of neuroexcitatory amino acids in patients with migraine or tension headache. *J. Neurol. Sci.* 156:102-106, 1998.
8. Aloisi, P., Marrelli, A., Porto, C., Tozzi, E., Cerone, G. Visual evoked potentials and serum magnesium levels in juvenile migraine patients. *Headache* 37:383-385, 1997.
9. Amara, S.G., Arriza, J.L., Leff, S.E., Swanson, L.W., Evans, R.M., Rosenfeld, M.G. Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science* 229:1094-1097, 1985.
10. Amara, S.G., Jonas, V., Rosenfeld, M.G., Ong, E.S., Evans, R.M. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polipeptide products. *Nature* 298:240-244, 1982.
11. Amaral, D.G. Sinnamon H.M. The locus coeruleus: neurobiology of a central noradrenergic nucleus. *Prog. Neurobiol.* 9:147-196; 1977.
12. Amin, F.M., Asghar, M.S., Guo, S. Headache and prolonged dilatation of the middle meningeal artery by PACAP38 in healthy volunteers. *Cephalalgia* 32:140-149, 2012.
13. Amin, F.M., Hougaard, A., Schytz, H.W., Asghar, M.S., Lundholm, E., Parvaiz, A.I., de Koning, P.J., Andersen, M.R., Larsson, H.B., Fahrekrug, J., Olesen, J., Ashina, M. Investigation of the pathophysiological mechanisms of migraine attacks induced by pituitary adenylate cyclase-activating polipeptide-38. *Brain* 137:779-794, 2014.
14. Andlin-Sobocki, P., Jonsson, B., Wittchen, H.U., Olesen, J. Cost of disorders of the brain in Europe. *Eur. J. Neurol.* 12:1-27, 2005.
15. Andres, K.H., During, M., Muszynski, K., Schmidt, R.F. Nerve fibers and their terminals of the dura mater encephali of the rat. *Anat. Embryol.* 175:289-301, 1987.
16. Antonaci, F., Nappi, G., Galli, F., Manzoni, G.C., Calabresi, P., Costa, A. Migraine and psychiatric comorbidity: a review of clinical findings. *J. Headache Pain* 12:115-125, 2011.
17. Anzai, M., Suzuki, Y., Takayasu, M. Vasorelaxant effect of PACAP-27 on canine cerebral arteries and rat intracerebral arterioles. *Eur. J. Pharmacol.* 285:173-179, 1995.
18. Appenzeller, O. Pathogenesis of migraine. *Med. Clin. North. Am.* 75:763-789, 1991.
19. Arbab, M.A., Wiklund, L., Delgado, T., Svendgaard, N.A. Stellate ganglion innervation of the vertebro-basilar arterial system demonstrated in the rat with anterograde and retrograde WGA-HRP tracing. *Brain Res.* 445:175-180, 1988.

20. Arbab, M.A., Wiklund, L., Svendgaard, N.A. Origin and distribution of cerebral vascular innervation from superior cervical, trigeminal and spinal ganglia investigated with retrograde and anterograde WGA-HRP tracing in the rat. *Neuroscience* 19:695-708, 1986.
21. Arimura, A. PACAP: the road to discovery. *Peptides* 28:1617-1619, 2007.
22. Arimura, A. Pituitary adenylate cyclase activating polipeptide (PACAP): discovery and current status of research. *Regul. Pept.* 37:287-303, 1992.
23. Arimura, A., Shioda, S. Pituitary adenylate cyclase activating polipeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interactions. *Front. Neuroendocrinol.* 16: 53-58, 1995.
24. Ashina, S., Serrano, D., Lipton, R.B. Depression and risk of transformation of episodic to chronic migraine. *J. Headache Pain* 13:615-624, 2012.
25. Aurora, S.K., Ahmad, B.K., Welch, K.M., Bhardhwaj, P., Ramadan, N.M. Transcranial magnetic stimulation confirms hyperexcitability of occipital cortex in migraine. *Neurology* 50:1111-1114, 1998.
26. Aurora, S.K., Kulthia, A., Barrodale, P.M. Mechanism of chronic migraine. *Curr. Pain Headache Rep.* 15:57-63, 2011.
27. Autret, A., Roux, S., Rimbaux-Lepage, S., Valade, D., Debiais, S. West Migraine Study Group. Psychopathology and quality of life burden in chronic daily headache: influence of migraine symptoms. *J. Headache Pain* 11:247-253, 2010.
28. Avramidis, T.G., Podikoglu, D.G., Anastosopoulos, I.E., Koutroumanidis, M.A., Papadimitriou, A.L. Blink reflex in migraine and tension-type headache. *Headache* 38:691-696, 1998.
29. Babitch, J.A. The effects of tetraphenylboron on the isolation of neuronal and glial cells from guinea-pig brain. *J. Neurochem.* 20:853-858, 1973.
30. Baffi, J., Gorcs, T., Slowik, F., Horvath, M., Lekka, N., Pasztor, E., Palkovits, M. Neuropeptides in the human superior cervical ganglion. *Brain Res.* 570:272-278, 1992.
31. Barabanti, P., Fabbrini, G., Pesare, M., Vanacore, N., Cerbo, R. Unilateral cranial autonomic symptoms in migraine. *Cephalalgia* 22:256-259, 2002.
32. Barbin, G., Roisin, M.P., Zalc B. Tumor necrosis factor alpha activates the phosphorylation of ERK, SAPK/JNK, and P38 kinase in primary cultures of neurons. *Neurochem. Res.* 26:106-112, 2001.
33. Bartsch, T., Goadsby, P.J. Stimulation of the greater occipital nerve induces increased central excitability of dural afferent input. *Brain* 125:1496-1509, 2002.
34. Bartsch, T., Goadsby, P.J. Increased responses in trigeminocervical nociceptive neurons to cervical input after stimulation of the dura mater. *Brain* 126:1801-1813, 2003.
35. Bartsch, T., Goadsby, P.J. Anatomy and physiology of pain referral patterns in primary and cervicogenic headache disorders. *Headache Currents* 2:42-48, 2005.
36. Basbaum, A.I., Clanton, C.H., Fields, H.L. Three bulbospinal pathways from the rostral medulla of the cat: an autoradiographic study of pain-modulating systems. *J. Comp. Neurol.* 178:209-224, 1978.
37. Bánk, J., Bense, E., Király, C. The blink reflex in migraine. *Cephalalgia* 12:289-292, 1992.
38. Bánk, J., Márta, M. Hungarian migraine epidemiology. *Headache* 40:164-169, 2000.
39. Beaudet, M.M., Braas, L., May, V. Pituitary adenylate cyclase activating polipeptide (PACAP) expression in sympathetic preganglionic neurons innervating the superior cervical ganglion. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22:783.4, 1996.

40. Baun, M., Hay-Schmidt, A., Edvinsson, L. Pharmacological characterization and expression of VIP and PACAP receptors in isolated cranial arteries of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 670:186-194, 2011.
41. Baun, M., Pedersen, M.H., Olesen, J., Jansen-Olesen, I. Dural mast cell degranulation is a putative mechanism for headache induced by PACAP-38. *Cephalalgia* 32:337-345, 2012.
42. Beckers, H.J., Klooster, J., Vrensen, G.F., Lamers, W.P. Ultrastructural identification of trigeminal nerve terminals in the pterygopalatine ganglion of rats: an anterograde tracing and immunohistochemical study. *Brain Res.* 557:22-30, 1991.
43. Becser, N., Bovim, G., Sjaastad, O. Extracranial nerves in the posterior part of the head. Anatomic variations and their possible clinical significance. *Spine* 23:1435-1441, 1998.
44. Bellamy, J.L., Cady, R.K., Durham, P.L. Salivary levels of CGRP and VIP in rhinosinusitis and migraine patients. *Headache* 46:24-33, 2006.
45. Benedek, K., Tajti, J., Janáky, M., Vécsei, L., Benedek, G. Spatial contrast sensitivity of migraine patients without aura. *Cephalalgia* 22:142-145, 2002.
46. Berky, M. A migrén epidemiológiája. *Cephalalgia Hungarica* 6:5, 1999.
47. Bigal, M.E., Kurth, T., Santanello, N. Migraine and cardiovascular disease. A population-based study. *Neurology* 74:628-635, 2010.
48. Bigal, M.E., Lipton, R., Stewart, W. The epidemiology and impact of migraine. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 4:98-104, 2004.
49. Bigal, M.E., Walter, S. Monoclonal antibodies for migraine: preventing calcitonin gene-related peptide activity. *CNS Drugs* 28: 389-399, 2014.
50. Björklund, H., Hökfelt, T., Goldstein, M., Terenius, L., Olson, L. Appearance of the noradrenergic markers tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y in cholinergic nerves of the iris following sympathectomy. *J. Neurosci.* 5:1633-1640, 1985.
51. Blomquist, A.G., Herzog, H. Y-receptor subtypes-how many more? *Trends Neurosci.* 20:294-298, 1997.
52. Boćkowski, L., Sobaniec, W., Zelazowska-Rutkowska, B. Proinflammatory plasma cytokines in children with migraine. *Pediatr. Neurol.* 41:17-21, 2009.
53. Bohár, Zs., Fejes-Szabó, A., Tar, L., Varga, H., Tajti, J., Párdutz, Á., Vécsei, L. Evaluation of c-Fos immunoreactivity in the rat brainstem nuclei relevant in migraine pathogenesis after electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Neurol. Sci.* 34:1597-1604, 2013.
54. Bolay, H., Reuter, U., Dunn, A.K., Huang, Z., Boas, D.A., Moskowitz, M.A. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat. Med.* 8:136-142, 2002.
55. Boni, L.J., Ploug, K.B., Olesen, J. The in vivo effect of VIP, PACAP-38 and PACAP-27 and mRNA expression of their receptor in rat middle meningeal artery. *Cephalalgia* 39:837-847, 2009.
56. Borgdorff, P., Tangelder, G.J. Migraine: possible role of shear-induced platelet aggregation with serotonin release. *Headache* 52:1298-1318, 2012.
57. Bowen, E.J., Schmidt, T.W., Firm, C.S., Russo, A.F., Durham, P.L. Tumor necrosis factor-alpha stimulation of calcitonin gene-related peptide expression and secretion from rat trigeminal ganglion neurons. *J. Neurochem.* 96:65-77, 2006.
58. Brand, H.S., Jorning, G.G., Chamuleau, R.A., Abraham-Inpijn, L. Effect of a protein-rich meal on urinary and salivary free amino acid concentrations in human subjects. *Clin. Chim. Acta* 264:37-47, 1997.
59. Breslau, N., Davis, G.C., Andreski, P. Migraine, psychiatric disorders and suicide attempts: an epidemiologic study of young adults. *Psychiatry Res.* 37:11-23, 1991.

60. Breslau, N., Davis, G.C., Schultz, L.R., Peterson, E.L. Joint 1994 Wolff Award Presentation. Migraine and major depression: a longitudinal study. *Headache* 34:387-393, 1994.
61. Bugdayci, G., Yildiz, S., Altunrende, B., Yildiz, N., Alkoy, S. Salivary alpha amylase activity in migraine patients. *Auton. Neurosci.* 155:121-124, 2010.
62. Burnstock, G. Changes in expression of autonomic nerves in aging and disease. *J. Auton. Nerv. Syst.* 30:S25-S34, 1990.
63. Burstein, R., Cutrer, F.M., Yarnitsky, D. The development of cutaneous allodynia during a migraine attack: clinical evidence for the sequential recruitment of spinal and supraspinal nociceptive neurons in migraine. *Brain* 123:1703-1709, 2000/a.
64. Burstein, R., Jakubowski, M. Clinical implications of peripheral and central sensitization during migraine. *Pain 2002 – An Updated Review: Refresher Course Syllabus*, ed. Giamberardino, M.A., IASP, Press, Seattle, 2002.
65. Burstein, R., Yarnitsky, D., Goor-Aryeh, I., Ransil, B.J., Bajwa, Z.H. An association between migraine and cutaneous allodynia. *Ann. Neurol.* 47:614-624, 2000/b.
66. Buzzi, M.G., Moskowitz, M.A. The trigemino-vascular system and migraine. *Pathol. Biol. (Paris)* 40:313-317, 1992.
67. Cananzi, A.R., D' Andrea, G., Perini, F., Zamberlan, F., Welch, K.M. Platelet and plasma levels of glutamate and glutamine in migraine with and without aura. *Cephalalgia* 15:132-135, 1995.
68. Capdevila, J.H., Falck, J.R., Harris, R.C. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation: molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J. Lipid. Res.* 41:163-181, 2000.
69. Capdevila, J.H., Zeldin, D., Makita, K. Cytochrome P450 and the metabolism of AA and oxygenated eicosanoids. In: Ortiz de Montellano, P.R., ed. *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*, 2nd ed. New York, Plenum Press pp. 443-471, 1995.
70. Cao, Y., Welch, K.M., Aurora, S., Vikingstad, E.M. Functional MRI-BOLD of visually triggered headache in patients with migraine. *Arch. Neurol.* 56:548-554, 1999.
71. Celentano, D.D., Stewart, W.F., Lipton, R.B., Reed, M.L. Medication use and disability among migraineurs: a national probability sample. *Headache* 32:223-228, 1992.
72. Cernuda-Morollon, E., Martinez-Camblor, P., Alvarez R., Larrosa, D., Ramón, C., Pascual, J. Increased VIP levels in peripheral blood outside migraine attacks as a potential biomarker of cranial parasympathetic activation in chronic migraine. *Cephalalgia* 35:310-316, 2015.
73. 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.
74. Chan, K.Y., Baun, M., de Vries, R. Pharmacological characterization of VIP and PACAP receptors in the human meningeal and coronary arteri. *Cephalalgia* 31:181-189, 2011.
75. Chignard, M., Vargaftig, B.B. Blood platelet activation. In: Curtis-Prior, P.B., ed. *Prostaglandins: Biology and Chemistry of Prostaglandins and Related Eicosanoids*. Edinburgh, London, Melbourne, New York, Churchill Livingstone, pp. 205-216, 1988.
76. Christophe, J. Type I receptors for PACAP (a neuropeptide even more important than VIP). *Biochem. Biophys. Acta* 1154:183-199, 1993.
77. Chronicle, E.P., Mulleners, W.M. Visual system dysfunction in migraine. A review of clinical and psychophysical findings. *Cephalalgia* 16:525-535, 1996.
78. Coene, M.C., Bult, H., Claeys, M., Laekeman, G.M., Herman, A.G. Inhibition of rabbit platelet activation by lipoxygenase products of arachidonic and linoleic acid. *Thromb. Res.* 42:205-14, 1986.

79. Coleston, D.M., Chronicle, E., Kennard, C. Pre-cortical dysfunction of spatial and temporal visual processing in migraine. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 57:1208-1211, 1994.
80. Consumer Healthcare Products Association. OTC Sales Statistics – 1995-1999. Neilsen, A.C., 2000.
81. Couvineau, A., Laburthe, M. VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br. J. Pharmacol.* 166:42-50, 2012.
82. Covelli, V., Munno, I., Pellegrino, N.M., Altamura, M., Decandia, P., Marcuccio, C., Di Venere, A., Jirillo, E. Are TNF-alpha and IL-1 beta relevant in the pathogenesis of migraine without aura? *Acta Neurol. (Napoli)* 13:205-211, 1991.
83. Covelli, V., Munno, I., Pellegrino, N.M., Di Venere, A., Jirillo, E., Buscaino, G.A. Exaggerated spontaneous release of tumor necrosis factor-alpha/cachectin in patients with migraine without aura. *Acta Neurol. (Napoli)* 45:257-263, 1990.
84. Crassard, I., Conard, J., Bousser, M.G. Migraine and haemostasis. *Cephalalgia* 21:630-636, 2001.
85. Critchley, M. Migraine: from Cappadocia to Queen Square. In: *Background to migraine*. Ed.: Smith, R., London, Heinemann, 1967.
86. Cropper, E.C., Eisenman, J.S., Azmitis, E.C. 5-HT-immunoreactive fibers in the trigeminal nuclear complex of the rat. *Exp. Brain Res.* 55:515-522, 1984.
87. Csáti, 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/a.
88. Csáti, A., Tajti, J., Tuka, B., Edvinsson, L., Warfvinge, K. Calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human sphenopalatine ganglion -- interaction with the sensory system. *Brain Res.* 1435:29-39, 2012/b.
89. Dahlöf, C. Assessment of health-related quality of life in migraine. *Cephalalgia* 13:233-237, 1993.
90. Dahlöf, C., Bouchard, J., Cortelli, P. A multinational investigation of the impact of subcutaneous sumatriptan. II: health-related quality of life. *Pharmacoeconomics* 11:24-34, 1997.
91. D'Andrea, G., Gananzi, A.R., Joseph, R. Platelet glycine, glutamate and aspartate in primary headache. *Cephalalgia* 11:197-200, 1991.
92. D'Andrea, G., Gananzi, A.R., Perini, F., Hasselmark, L. Platelet model and their possible usefulness in the study of migraine pathogenesis. *Cephalalgia* 15:265-271, 1995.
93. Da Prada, M., Cesura, A.M., Launay, J.M., Richards, J.G. Platelets as a model for neurons? *Experientia* 44:115-126, 1988.
94. De Fusco, M., Marconi, R., Silvestri, L., Atorino, L., Rampoldi, L., Morgante, L., Ballabio, A., Aridon, P., Casari, G. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na⁺/K⁺ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat. Genet.* 33:192-196, 2003.
95. Davidoff, R.A. *Migraine: manifestations, pathogenesis and management*. Philadelphia, FA Davis Co., pp. 115-80, 1995.
96. Del Fiacco, M., Dessi, M.L., Levanti, M.C., Topographic localization of substance P in the human postmortem brainstem. An immunohistochemical study in the newborn and adult tissue. *Neuroscience* 12:591-611, 1984.
97. Demarquay, G., Lothe, A., Royet, J.P., Costes, N., Mick, G., Mauguière, F., Ryvlin, P. Brainstem changes in 5-HT1A receptor availability during migraine attack. *Cephalalgia* 31:84-94, 2011.

98. Den Boer, M. Breaking the vicious circle of migraine. In: *Migraine: A brighter future*. Ed.: Edmeads, J., Oxford, Cambridge Medical Publications, pp. 42-51, 1993.
99. Dennis, T., Fournier, A., Guard, S., St. Pierre, S., Quirion, R. Calcitonin gene-related peptide (hCGRP alpha) binding sites in the nucleus accumbens. Atypical structural requirements and marked phylogenetic differences. *Brain Res.* 539:59-66, 1991.
100. Derrington, A.M., Lennie, P. Spatial and temporal contrast sensitivities of neurones in lateral geniculate nucleus of macaque. *J. Physiol.* 357:219-240, 1984.
101. Dichgans, M., Freilinger, T., Eckstein, G., Babini, E., Lorenz-Depiereux, B., Biskup, S., Ferrari, M.D., Herzog, J., van den Maagdenberg, A.M., Pusch, M., Strom, T.M. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet* 366:371-377, 2005.
102. Dickson, L., Finlayson, K. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol. Ther.* 121:294-316, 2009.
103. Dobbin, J.P., Harth, M., McCain, G.A., Martin, R.A., Cousin, K. Cytokine production and lymphocyte transformation during stress. *Brain Behav. Immun.* 5:339-348, 1991.
104. Dodick, D., Silberstein, S. Central sensitization theory of migraine: clinical implications. *Headache* 46:S182-S191, 2006.
105. Dodick, D.W., Turkel, C.C., DeGryse, R.E., Aurora, S.K., Silberstein, S.D., Lipton, R.B., Diener, H.C., Brin, M.F., Group, P.C.M.S. OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: pooled results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phases of the PREEMPT clinical program. *Headache* 50: 921-36, 2010.
106. Drum, B., Armaly, M.F., Huppert, W. Scotopic sensitivity loss in glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 104:712-717, 1986.
107. Duckles, S.P., Said, S.I. Vasoactive intestinal peptide as a neurotransmitter in the cerebral circulation. *Eur. J. Pharmacol.* 78:371-374, 1982.
108. Ducros, A., Deiner, C., Joutel, A. The clinical spectrum of familial hemiplegic migraine associated with mutations in a neuronal calcium channel. *N. Eng. J. Med.* 345:17-24, 2001.
109. Durham, P.L., Russo A.F. Stimulation of the calcitonin gene-related peptide enhancer by mitogen-activated protein kinases and repression by an antimigraine drug in trigeminal ganglia neurons. *J. Neurosci.* 23:807-815, 2003.
110. Duverger, D., Edvinsson, L., MacKenzie, E.T., Oblin, A., Rouquier, L., Scatton, B., Zivkovic, B. Concentration of putative neurovascular transmitters in major cerebral arteries and small pial vessels of various species. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 7:497-501, 1987.
111. Ebersberg, A., Averbeck, B., Messlinger, K., Reeh, P.W. 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, 1999.
112. Ebersberger, A., Charbel Issa, P., Vanegas, H., Schaible, H.G. Differential effects of calcitonin gene-related peptide and calcitonin gene-related peptide 8-37 upon responses to N-methyl-D-aspartate or (R, S)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate in spinal nociceptive neurons with knee joint input in the rat. *Neuroscience* 99:171-178, 2000.
113. Ebersberg, A., Portz, S., Meissner, W., Schaille, H.G., Richter, F. Effects of N-, P/Q- and L-type calcium channel blockers on nociceptive neurons of the trigeminal nucleus with input from the dura. *Cephalalgia* 24:250-261, 2004.
114. Edmeads, J. The treatment of headache: a historical perspective. In: Gallagher, R.M., ed. *Therapy for headache*. New York, Marcel Dekker Inc., pp. 1-8, 1990.

115. Edmeads, J.G., Findlay, H., Tugwell, P., Pryse-Philips, W., Nelson, R.F., Murray, T.J. Impact of migraine and tension-type headache and life-style, consulting behaviour and medication use: a Canadian population survey. *Can. J. Neurol. Sci.* 20:131-137, 1993.
116. Edvinsson, L. Functional role of perivascular peptides in the control of the cerebral circulation. *Trends Neurosci.* 8:126-131, 1985.
117. Edvinsson, L. The role of perivascular peptides in migraine. In: *Migraine: Pharmacology and genetics*. Eds.: Sandler, M., Ferrari, M., Harnett, S., London, Chapman and Hall, pp. 199-221, 1996.
118. Edvinsson, L. CGRP blockers in migraine therapy: where do they act? *Br. J. Pharmacol.* 155:967-969, 2008.
119. Edvinsson, L. Role of VIP/PACAP in primary headaches. *Cephalalgia* 33:1070-1072, 2013.
120. Edvinsson, L. CGRP receptor antagonists and antibodies against CGRP and its receptor in migraine treatment. *Br. J. Clin. Pharmacol.* doi: 10.1111/bcp.12618, 2015.
121. Edvinsson, L., Brodin, E., Jansen, I., Uddman, R. Neurokinin A in cerebral vessels: characterization, localization and effects in vitro. *Reg. Peptides* 20:181-197, 1988.
122. Edvinsson, L., Cantera, L., Jansen-Olesen, I., Uddman, R. Expression of calcitonin gene-related peptide1 receptor mRNA in human trigeminal ganglia and cerebral arteries. *Neurosci. Lett.* 229:209-211, 1997.
123. Edvinsson, L., Copeland, J.R., Emson, P.C., McCulloch, J., Uddman, R. Nerve fibers containing neuropeptide Y in the cerebrovascular bed: immunocytochemistry, radioimmunoassay and vasomotor effects. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 7:45-57, 1987/a.
124. Edvinsson, L., Elsas, T., Suzuki, N. 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, 2001.
125. Edvinsson, L., Ekman, R., Jansen, I., McCulloch, J., Uddman, R. Calcitonin gene-related peptide and cerebral blood vessels: distribution and vasomotor effects. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 7:720-728, 1987/b.
126. Edvinsson, L., Ekman, R., Jansen, I., Ottosson, A., Uddman, R. Peptide-containing nerve fibers in human cerebral arteries: immunocytochemistry, radioimmunoassay and in vitro pharmacology. *Ann. Neurol.* 21:432-437, 1987/c.
127. Edvinsson, L., Emson, P., McCulloch, J., Tatemoto, K., Uddman, R. Neuropeptide Y: cerebrovascular innervation and vasomotor effects in the cat. *Neurosci. Lett.* 43:79-84, 1983.
128. Edvinsson, L., Emson, P., McCulloch, J., Tatemoto, K., Uddman, R. Neuropeptide Y: immunocytochemical localization to and effect upon feline pial arteries and veins in vitro and in situ. *Acta Physiol. Scand.* 122:155-163, 1984.
129. Edvinsson, L., Goadsby, P.J. Neuropeptides in headache. *Eur. J. Neurol.* 5:329-341, 1998.
130. Edvinsson, L., Hara, H., Uddman, R. Retrograde tracing of nerve fibers to the rat middle cerebral artery with true blue; colocalization with different peptides. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9:212-218, 1989.
131. Edvinsson, L., Krause, D. *Cerebral Blood Flow and Metabolism*, Second Edition, Philadelphia, Lippincott, Williams and Wilkins, 2002.
132. Edvinsson, L., MacKenzie, E.T., McCulloch, J. *Cerebral Blood Flow and Metabolism*. New York, Raven Press, 1993.
133. Edvinsson, L., McCulloch, J. Distribution and vasomotor effects of peptide H (CPII) in feline cerebral blood vessels in vitro and in situ. *Reg. Peptides* 10:345-356, 1985.
134. Edvinsson, L., McCulloch, J., Uddman, R. Substance P: immunohistochemical localization and effect upon cat pial arteries in vitro and in situ. *J. Physiol. (London)* 325:251-258, 1981.

135. Edvinsson, L., Owmann, C., Sjöberg, N.O. Autonomic nerves, mast cells, and amine receptors in human brain vessels. A histochemical and pharmacological study. *Brain Res.* 115:337-393, 1976.
136. Edvinsson, L., Rosendahl-Helgesen, S., Uddman, R. Substance P. Localization, concentration and release in cerebral arteries, choroid plexus and dura mater. *Cell Tissue Res.* 234:1-7, 1983.
137. Edvinsson, L., Uddman, R. Adrenergic, cholinergic and peptidergic nerve fibers in dura mater-involvement in headache? *Cephalalgia* 1:175-179, 1981.
138. Edvinsson, L., Uddman, R. Neurobiology in primary headaches. *Brain Res. Rev.* 48:438-456, 2005.
139. Edvinsson, L., Villalon, C.M., MaassenVanDenBrink, A., Basic mechanisms of migraine and its acute treatment. *Pharmacol. Ther.* 136:319-333, 2012.
140. Eftekhari S, Salvatore CA, Calamari A, Kane SA, Tajti J, Edvinsson L. Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human trigeminal ganglion. *Neuroscience* 169:683-96, 2010.
141. Eftekhari, S., Salvatore, C.A., Johansson, S., Chen, T.B., Zeng, Z., Edvinsson, L. Localization of CGRP, CGRP receptor, PACAP and glutamate in trigeminal ganglion. Relation to the blood-brain barrier. *Brain Res.* 1600:93-109, 2015.
142. Elliott, A.M., Peroutka, J.S., Welch, S. Familial hemiplegic migraine, nystagmus, and cerebellar atrophy. *Ann. Neurol.* 39:100-106, 1996.
143. Evans, B.N., Rosenblatt, M.I., Mayer, L.O. CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide, and adrenomedullin receptors. *J. Biol. Chem.* 275:31438-31443, 2000.
144. Fahrenkrug, J., Hannibal, J., Tams, J. Immunohistochemical localization of the VIP1 receptor (VPAC1R) in rat cerebral blood vessels: relation to PACAP and VIP containing nerves. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20:1205-1214, 2000.
145. Ferrari, M.D. Migraine. *Lancet* 351:1043-1051, 1998.
146. Ferrari, M.D. Migraine as an ion-transporter disorder. *Cephalalgia* 25:842, 2005.
147. Ferrari, M.D., Odink, J., Bos, K.D., Malessy, M.J., Bruyn, G.W. Neuroexcitatory plasma amino acids are elevated in migraine. *Neurology* 40:1582-1586, 1990.
148. Fidan, I., Yüksel, S., Ymir, T., Irkeç, C., Aksakal, F.N. The importance of cytokines, chemokines and nitric oxide in pathophysiology of migraine. *J. Neuroimmunol.* 171:184-188, 2006.
149. Fields, H.L., Basbaum, A.I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: Wall, P.D., Melzack, R., eds. *Textbook of pain*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1994.
150. Fischer, M.J., Koulchitsky, S., Messlinger, K. The nonpeptide calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN4096BS lowers the activity of neurons with meningeal input in the rat spinal trigeminal nucleus. *J. Neurosci.* 25:5877-5883, 2005.
151. Ford-Hutchinson, A.W., Gresser, M., Young, R.N. 5-Lipoxygenase. *Ann. Rev. Biochem.* 63:383-417, 1994.
152. Gallai, V., Sarchielli, P., Coata, G. Serum and salivary magnesium levels in migraine. Results in a group of juvenile patients. *Headache* 32:132-135, 1992.
153. Gallai, V., Sarchielli, P., Trequattrini, A., Paciaroni, M., Usai, F., Palumbo, R. Neuropeptide Y in juvenile migraine and tension-type headache. *Headache* 34:35-40, 1994.
154. Gardner, K., Barmada, M.M., Ptacek, L.J., Hoffman, E.P. A new locus for hemiplegic migraine maps to chromosome 1q31. *Neurology* 49:1231-1238, 1997.
155. Gawel, M., Connolly, J.F., Rose, F.C. Migraine patients exhibit abnormalities in the visual evoked potential. *Headache* 23:49-52, 1983.

156. Gelfand, A.A., Reider, A.C., Goadsby, P.J. Cranial autonomic symptoms in pediatric migraine are the rule, not the exception. *Neurology* 81:431-436, 2013.
157. Gerth, W.C., Carides, G.W., Dasbach, E.J., Visser, W.H., Santanello, N.C. The multinational impact of migraine symptoms on healthcare utilisation and work loss. *Pharmacoeconomics* 19:197-206, 2001.
158. Gervil, M., Ulrich, V., Kyvik, K.O., Olesen, J., Russel, M.B. Migraine without aura: a population-based twin study. *Ann. Neurol.* 46:606-611, 1999/a.
159. Gervil, M., Ulrich, V., Kaprio, J., Olesen, J., Russel, M.B. The relative role of genetic and environmental factors in migraine without aura. *Neurology* 53:995-999, 1999/b.
160. Gibbins, I.L., Brayden, J.E., Bevan, J.A. Perivascular nerves with immunoreactive vasoactive intestinal polipeptide in cephalic arteries of the cat: distribution, possible origins and functional implications. *Neuroscience* 13:127-134, 1984.
161. Goadsby, P.J. A triptan too far? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64:143-147, 1998.
162. Goadsby, P.J. Neurovascular headache and a midbrain vascular malformation: evidence for a role of the brainstem in chronic migraine. *Cephalalgia* 22:107-111, 2002.
163. Goadsby, P.J. Migraine aura: a knock-in mouse with a knock-out message. *Neuron* 41:679-680, 2004.
164. Goadsby, P.J. Migraine pathophysiology. *Headache* 45:S14-S24, 2005/a.
165. Goadsby, P.J. Migraine, allodynia, sensitisation and all of that. *Eur. J. Neurol.* 53:10-16, 2005/b.
166. Goadsby, P.J., Duckworth, J.W. Low frequency stimulation of the locus coeruleus reduces regional cerebral blood flow in the spinalized cat. *Brain Res.* 476:71-77, 1989.
167. Goadsby, P.J., Edvinsson, L. Human in vivo evidence for trigeminovascular activation in cluster headache. Neuropeptide changes and effects of acute therapies. *Brain* 117:427-434, 1994.
168. Goadsby, P.J., Edvinsson, L. Neuropeptide changes in a case of chronic paroxysmal hemicrania--evidence for trigemino-parasympathetic activation. *Cephalalgia* 16:448-450, 1996.
169. Goadsby, P.J., Edvinsson, L., Ekman, R. Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of man and the cat during activation of the trigeminovascular system. *Ann. Neurol.* 23:193-196, 1988.
170. Goadsby, P.J., Edvinsson, L., Ekman, R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of human during migraine headache. *Ann. Neurol.* 28:183-197, 1990.
171. Goadsby, P.J., Ferrari, M.D. Migraine: a multifactorial, episodic neurovascular channelopathy? In: Rose, M.R., Griggs, R.C. eds. *Channelopathies of the Nervous System*, Oxford, Butterworth Heinemann, pp. 274-292, 2001.
172. Goadsby, P.J., Hoskin, K.L. The distribution of trigeminovascular afferents in the non-human primate brain *Macaca nemestrina*: a c-fos immunocytochemical study. *J. Anat.* 190:367-375, 1997.
173. Goadsby, P.J., Lambert, G.A., Lance, J.W. Differential effects on the internal and external carotid circulation of the monkey evoked by locus coeruleus stimulation. *Brain Res.* 249:247-254, 1982.
174. Goadsby, P.J., Lance, J.W. Brain stem effects on intra- and extracerebral circulations. Relation to migraine and cluster headache. In: Olesen J, Edvinsson L, eds. *Basic Mechanisms of Headache*. New York, Elsevier Science Publishers 413:427, 1988.
175. Goadsby, P.J., Zagami, A.S. Stimulation of the superior sagittal sinus increases metabolic activity and blood flow in certain regions of the brainstem and upper cervical spinal cord of the cat. *Brain* 114:1001-1011, 1991.

176. Goldstein, D.J., Wang, O., Saper, J.R., Stoltz, R., Silberstein, S.D., Mathew, N.T. Ineffectiveness of neurokinin-1 antagonist in acute migraine: a crossover study. *Cephalalgia* 17:785-790, 1997.
177. Gowers, W.R. In: *A Manual of Diseases of the Nervous System*, 1357 (P. Blakiston Son & Co., Philadelphia), 1888.
178. Graham, J.R., Wolff, H.G. Mechanism of migraine headache and action of ergotamine tartrate. *Arch. Neurol. Psych.* 39:737-763, 1938.
179. Grände, G., Nilsson, E., Edvinsson, L. Comparison of responses to vasoactive drugs in human and rat cerebral arteries using myography and pressurized cerebral artery method. *Cephalalgia* 33:152-159, 2013.
180. Gu, X.L., Yu, L.C. The colocalization of CGRP receptor and AMPA receptor in the spinal dorsal horn neuron of rat: a morphological and electrophysiological study. *Neurosci. Lett.* 414:237-241, 2007.
181. Gupta, R., Bhatia, M.S. A report of cranial autonomic symptoms in migraineurs. *Cephalalgia* 27:22-28, 2007.
182. Guseo, A., Giczi, J. Epidemiology of migraine in urban and rural communities in central Transdanubia, Hungary. In: *Headache Classification and Epidemiology*. Ed.: Olesen, J., New York, Raven Press, pp. 263-265, 1994.
183. Guven, H., Cilliler, A.E., Comoglu, S.S. Unilateral cranial autonomic symptoms in patients with migraine. *Acta Neurologica Belgica* 113:237-242, 2013.
184. Haan, J., Terwindt, G.M., Bos, P.L. Familial hemiplegic migraine in the Netherlands. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 96:244-249, 1994.
185. Haastrup, E.; Bukh, J.D.; Bock, C.; Vinberg, M.; Thørner L.W., Hansen, T., Werge, T., Kessing, L.V., Ullum, H. Promoter variants in IL18 are associated with onset of depression in patients previously exposed to stressful-life events. *J. Affect. Disord.* 136:134-138, 2012.
186. Hall, G.C., Brown, M.M., Mo, J., MacRae, K.D. Triptans in migraine: the risks of stroke, cardiovascular disease, and death in practice. *Neurology* 62:563-568, 2004.
187. Halliday, G.M., Li, Y.W., Joh, T.H., Cotton, R.G., Howe, P.R., Geffen, L.B., Blessing, W.W. Distribution of substance P-like immunoreactive neurons in the human medulla oblongata: co-localization with monoamine-synthesizing neurons. *Synapse* 2:353-370, 1988.
188. Hanington, E., Jones, R.J., Amess, J.A. Migraine: A platelet disorder. *Lancet* 2:720-723, 1981.
189. Harmar, A.J., Arimura, A., Gozes, I. International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol. Rev.* 50:165-270, 1998.
190. Harmar, T., Lutz, E. Multiple receptors for PACAP and VIP. *Trends Pharmacol. Sci.* 15:97-99, 1994.
191. Hartman, B.K., Swanson, L.W., Raichle, M.E., Preskorn, S.H., Clark, H.B. Central adrenergic regulation of cerebral microvascular permeability and blood flow; anatomic and physiologic evidence. *Adv. Exp. Med. Biol.* 131:113-126, 1980.
192. Harriott, A.M., Barrett, K.M. Dissectiong the association between migraine and stroke. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 15:5. doi: 10.1007/s11910-015-0530-8, 2015.
193. Hasnaoui A, Vray M, Richard A, Nachit-Ouinekh F, Boureau F; MIGSEV Group. Assessing the severity of migraine: development of the MIGSEV scale. *Headache* 43:628-635, 2003.
194. Hawken, M.J., Parker, A.J. Contrast sensitivity and orientation sensitivity in lamina IV of the striate cortex of Old World monkey. *Exp. Brain Res.* 54:367-372, 1984.
195. Hay DL, Poyner DR, Quirion R. International Union of Pharmacology. LXIX. Status of the calcitonin gene-related peptide subtype 2 receptor. *Pharmacol. Rev.* 60:143-145, 2008.

- 196.Headache Classification Committee of the International Headache Society. Classification and Diagnostic Criteria for Headache Disorders, Cranial Neuralgias and Facial Pain. *Cephalalgia* 8:1-96, 1988.
- 197.Headache Classification Committee of the International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders. *Cephalalgia* 24:1-160, 2004.
- 198.Headache Classification Committee of the International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 33:629-808, 2013.
- 199.Hedborg, K., Anderberg, U.M., Muhr, C. Stress in migraine: personality-dependent vulnerability, life events, and gender are of significance. *Ups. J. Med. Sci.* 116:187-199, 2011.
- 200.Helyes, Zs., Pozsgai, G., Börzsei, R., Németh, J., Bagoly, T., Márk, L., Pintér, E., Tóth, G., Elekes, K., Szolcsányi, J., Reglődi D. Inhibitory effect of PACAP-38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammatory processes in the rat. *Peptides* 28:1847-1855, 2007.
- 201.Henry, P., Michel, P., Brochet, B. A nationwide survey of migraine in France: prevalence and clinical features in adult. *Cephalalgia* 12:229-237, 1992.
- 202.Heroux M, Hogue M, Lemieux S, Bouvier M. Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1. *J. Biol. Chem.* 282:31610-31620, 2007.
- 203.Herpfer, I., Lieb, K. Substance P and substance P receptor antagonists in the pathogenesis and treatment of affective disorders. *World J. Biol. Psych.* 4:56-63, 2003.
- 204.Hershey, A.D., Tang, Y., Powers, S.W., Kabbouche, M.A., Gilbert, D.L., Glauser, T.A., Sharp, F.R. Genomic abnormalities in patients with migraine and chronic migraine: preliminary blood gene expression suggests platelet abnormalities. *Headache* 44:994-1004, 2004.
- 205.Hicks, T.P., Lee, B.B., Vidyasagar, T.R. The responses of cells in macaque lateral geniculate nucleus to sinusoidal gratings. *J. Physiol.* 337:183-200, 1983.
- 206.Ho, T.W., Edvinsson, L., Goadsby, P.J. CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. *Nat. Rev. Neurol.* 6:573-582, 2010.
- 207.Honkasalo, M.L., Kaprio, J., Winter, T. Migraine and concomitant symptoms among 8167 adult twin pairs. *Headache* 35:70-78, 1995.
- 208.Hoskin, K.L., Bulmer, D.C., Goadsby, P.J. Fos expression in the trigeminocervical complex of the cat after stimulation of the superior sagittal sinus is reduced by L-NAME. *Neurosci. Lett.* 266:173-176, 1999/a.
- 209.Hoskin, K.L., Zagami, A.S., Goadsby, P.J. Stimulation of the middle meningeal artery leads to Fos expression in the trigeminocervical nucleus: a comparative study of monkey and cat. *J. Anat.* 194:579-588, 1999/b.
- 210.Hosobuchi, Y, Adams, J.E., Linchitz, R. Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone. *Science* 197:183-186, 1977.
- 211.Hosoya, M., Kimura, C., Ogi, K., Ohkubo, S., Miyamoto, S., Kugoh, H., Shimuzu, M., Onda, H., Oshimura, M. Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polipeptide (PACAP) gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1129:199-206, 1992.
- 212.Hou, L., Li, W., Wang, X. Mechanism of interleukin-1 beta-induced calcitonin gene-related peptide production from dorsal root ganglion neurons of neonatal rats. *J. Neurosci. Res.* 73:188-197, 2003/b.
- 213.Hou, M., Uddman, R., Tajti, J., Edvinsson, L. Nociceptin immunoreactivity and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *Brain Res.* 964:179-186, 2003/a.
- 214.Hou, M., Uddman, R., Tajti, J., Kanje, M., Edvinsson, L. Capsaicin receptor immunoreactivity in the human trigeminal ganglion. *Neurosci. Lett.* 330:223-226, 2002.

- 215.Hökfelt, T., Broberger, C., Xu, Z.Q., Sergeev, V., Ubink, R., Diez, M. Neuropeptides-an overview. *Neuropharmacology* 39:1337-1356, 2000.
- 216.Htun, P., Fateh-Moghadam, S., Tomandl, B., Handschu, R., Klinger, K., Stellos, K., Garlichs, C., Daniel, W., Gawaz, M. Course of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in cerebrovascular ischemia. *Stroke* 37:2283-2287, 2006.
- 217.Jakab, B., Reglődi, D., Józsa, R., Hollósy, T., Tamás, A., Lubics, A., Lengvári, I., Oroszi, G., Szilvássy, Z., Szolcsányi, J., Németh, J. Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *J. Biochem. Biophys. Methods* 61:189-98, 2004.
- 218.Jakab, G., Salamon, I., Petrusz, P., Rethelyi, M. Termination patterns of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerve fibers in the dorsal horn of the human spinal cord. *Exp. Brain Res.* 80:609-617, 1990.
- 219.Jansen-Olesen, I., Zhou, M., Zinck, T., Xu, C.B., Edvinsson, L. Expression of inducible nitric oxide synthase in trigeminal ganglion cells during culture. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 97:355-363, 2005.
- 220.Jarvi, R., Pelto-Huikko, M. Localization of neuropeptid Y in human sympathetic ganglia: correlation with met-enkephalin, tyrosine hydroxylase and acetylcholinesterase. *Histochemistry* 22:86-94, 1990.
- 221.Jensen, K., Tfelt-Hansen, P., Lauritzen, M., Olesen, J. Classic migraine, a prospective recording of symptoms. *Acta Neurol. Scand.* 73:359-362, 1986.
- 222.Jesurum, J.T., Fuller, C.J., Murinova, N., Truva, C.M., Lucas, S.M. Aspirin's effect on platelet inhibition in migraineurs. *Headache* 52:1207-1218, 2012.
- 223.Jones, J.M. Great pains: famous people with headaches. *Cephalalgia* 19:627-630, 1999.
- 224.Joutel, A., Bousser, M.G., Biouesse, V. A gene for familial hemiplegic migraine maps to chromosome 19. *Nat. Genet.* 5:40-45, 1993.
- 225.Joutel, A., Ducros, A., Vahedi, K. Genetic heterogeneity of familial hemiplegic migraine. *Am. J. Hum. Genet.* 55:1166-1172, 1994.
- 226.Ju, G., Hökfelt, T., Brodin, E., Fahrenkurg, J., Fischer, A.J., Frey, P., Elde, R.P., Brown, J.C. Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immuno-reactivity and their relation to substance P-, galanin-, vasoactive intestinal polipeptide- and cholecystokinin- immunoreactive ganglion cells. *Cell Tissue Res.* 247:417-431, 1987.
- 227.Juhász, G., Zsombok, T., Modos, E.A., Olajos, S., Jakab, B., Németh, J., Szolcsányi, J., Vitrai, J., Bagdy, G. NO-induced migraine attack: strong increase in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and negative correlation with platelet serotonin release. *Pain* 106:461-470, 2003.
- 228.Juhász, G., Zsombok, T., Jakab, B., Németh, J., Szolcsányi, J., Bagdy, G. Sumatriptan causes parallel decrease in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and migraine headache during nitroglycerin induced migraine attack. *Cephalalgia* 25:179-183, 2005.
- 229.Jurkat-Rott, K., Freilinger, T., Dreier, J.P. Variability of familial hemiplegic migraine with novel A1A2 Na⁺/K⁺-ATPase variants. *Neurology* 62:1857-1861, 2004.
- 230.Kaplan, E., Shapley, R.M. The primate retina contains two types of ganglion cells, with high and low contrast sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2755-2757, 1986.
- 231.Karsan, N. Goadsby, P.J. Calcitonin gene-related peptide and migraine. *Curr. Opin. Neurol.* 28:250-254, 2015.
- 232.Kaube, H., Keay, K., Hoskin, K.L., Bandler, R., Goadsby, P.J. Expression of c-fos-like immunoreactivity in the trigeminal nucleus caudalis and high cervical cord following stimulation of the sagittal sinus in the cat. *Brain Res.* 629:95-102, 1993/a.

- 233.Keller, J.T., Marfurt, C.F. Peptidergic and serotonergic innervation of rat dura mater. *J. Comp. Neurol.* 309:515-534, 1991.
- 234.Kemper, R.H., Meijler, W.J., Korf, J., Ter Horst, G.J. Migraine and function of the immune system: a meta-analysis of clinical literature published between 1966 and 1999. *Cephalalgia* 21:549-557, 2001.
- 235.Kerr, F.W., Olafson, R.A. Trigeminal and cervical volleys. Convergence on single units in the spinal gray at C-1 and C-2. *Arch. Neurol.* 5:171-178, 1961.
- 236.Khalil, N.M. Investigations of visual function in migraine using visual evoked potentials and visual psychophysical test. Ph.D. Thesis. London: University of London, 1991.
- 237.Kimberly, W.T. Biomarkers in neurocritical care. *Neurotherapeutics* 9:17-23, 2012.
- 238.Kimura, J. *Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice.* FA Davis Company, Philadelphia, 1983.
- 239.Kimura, C., Ohkubo, S., Ogi, K., Hosoya, M., Itoh, Y., Onda, H., Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R.R., Stibbs, H.H. A novel peptide which stimulates adenylate cyclase: molecular cloning and characterization of the ovine and human cDNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166:81-89, 1990.
- 240.Kitano, A., Shimomura, T., Takeshima, T., Takahashi, K. Increased 11-dehydrothromboxane B2 in migraine: platelet hyperfunction in patients with migraine during headache-free period. *Headache* 34:515-518, 1994.
- 241.Knutsson, M., Edvinsson, L. Distribution of mRNA for VIP and PACAP receptor in human cerebral arteries and cranial ganglia. *Neuroreport* 13:507-509, 2002.
- 242.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.
- 243.Knyihár-Csillik, E., Tajti, J., Samsam, M., Sáry, Gy., Búzás, 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.
- 244.Knyihár-Csillik, E., Tajti, J., Samsam, M., Sáry, Gy., Slezák, S., Vécsei, L. Effect of 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.
- 245.Kovacs, K., Herman, F., Filep, J., Jelencsik, I., Magyar, K., Csanda, E. Platelet aggregation of migraineurs during and between attacks. *Cephalalgia* 10:161-165, 1990.
- 246.Kristiansen, K.A., Edvinsson, L. Regulatory effect of inflammation on cytokines in rat trigeminal ganglion. *Cephalalgia* 29:84, 2009.
- 247.Kristiansen, K.A., Edvinsson, L. Neurogenic inflammation: a study of rat trigeminal ganglion. *J. Headache Pain* 11:485-495, 2010.
- 248.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.
- 249.Kurth, T., Schurks, M., Logroscino, G., Buring, J.E. Migraine frequency and risk of cardiovascular disease in women. *Neurology* 73:581-588, 2009.
- 250.Laburthe, M., Couvineau, A., Gaudin, P., Maoret, J.J., Rouyer-Fessard, C., Nicole, P. Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1 and other members of their new family of G-protein-linked receptors, structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor. *Ann. NY. Acad. Sci.* 805:94-111, 1996.

- 251.Laburthe, M., Couvineau, A., Tan, V. Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 28:1631-1639, 2007.
- 252.Lagarde, M., Chen, P., Véricel, E., Guichardant, M. Fatty acid-derived lipid mediators and blood platelet aggregation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 82:227-30, 2010
- 253.Lai, T.H., Fuh, J.L., Wang, S.J. Cranial autonomic symptoms in migraine: characteristics and comparison with cluster headache. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 80:1116-1119, 2009.
- 254.Lance, J.W. Mechanism and management of headache. London, Butterworth, 1982.
- 255.Lance, J.W., Goadsby, P.J. Mechanism and management of headache. Oxford, Butterworth-Heinemann, 1998.
- 256.Lance, J.W., Lambert, G., Goadsby, P.J., Duckworth, J.W. Brain stem influences on the cephalic circulation: experimental data from cat and monkey of relevance to the mechanism of migraine. *Headache* 23:258-265, 1983.
- 257.Lance, J.W., Lambert, G., Goadsby, P.J., Zagami, A.S. Contribution of experimental studies to understanding the pathophysiology of migraine. In: Sandler, M, Collins, G.M., eds. *Migraine: a spectrum of ideas*. Oxford, Oxford University Press, pp. 21-39, 1990.
- 258.Lantéri-Minet, M., Duru, G., Mudge, M., Cottrell, S. Quality of life impairment, disability and economic burden associated with chronic daily headache, focusing on chronic migraine with or without medication overuse: a systematic review. *Cephalalgia* 31:837-850, 2011.
- 259.Lashley, K.S. Patterns of cerebral integration indicated by the scotomas of migraine. *Arch. Neurol. Psych.* 46:331-339, 1941.
- 260.Larhammar, D. Evolution of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polipeptide. *Regul. Peptides* 62:1-11, 1996.
- 261.Larsson, B., Bille, B., Pederson, N. Genetic influence in headaches: a Swedish twin study. *Headache* 35:513-519, 1995.
- 262.Larsson, L.I., Edvinsson, L., Fahrenkrug, J. Immunohistochemical localization of a vasodilatory polipeptide (VIP) in cerebrovascular nerves. *Brain Res.* 113:400-404, 1976.
- 263.Lassen, L.H., Haderslev, P.A., Jacobsen, V.B., Iversen, H.K., Sperling, B., Olesen, J. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia* 22:54-61, 2002
- 264.Launer, L.J. Terwindt, G.M., Ferrari, M.D. The prevalence and characteristics of migraine in a population-based cohort: the GEM study. *Neurology* 53:537-542, 1999.
- 265.Leao, A.A.P. Spreading depression of activity in cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 7:359-390, 1944.
- 266.Lee, T.J.F., Saito, A., Berezin, I. Vasoactive intestinal polipeptide-like substance: the potential transmitter for cerebral vasodilation. *Science* 22:898-901, 1984.
- 267.Lee, B.B., Smith, V.C., Pokorny, J., Kremers, J. Rod inputs to macaque ganglion cells. *Vision Res.* 37:2813-2828, 1997.
- 268.Leonardi, M., Steiner, T.J., Scher, A.T., Lipton, R.B. The global burden of migraine: measuring disability in headache disorders with WHO's Classification of Functioning, Disability and Health (ICF). *J. Headache Pain* 6:429-440, 2005.
- 269.Levy, D., Burstein, R., Strassman, A.M. Calcitonin gene-related peptide does not excite or sensitize meningeal nociceptors: implications for the pathophysiology of migraine. *Ann. Neurol.* 58:698-705, 2005.
- 270.Lieb, K., Ahlvers, K. Effects of the neuropeptide substance P on sleep, mood, and neuroendocrine measures in healthy young men. *Neuropsychopharmacol.* 27:1041-1049, 2002.

- 271.Lipton, H.L., McNamara, D.B., Armstead, W.M., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J. In: Curtis-Prior, P.B., ed. Prostaglandins: Biology and Chemistry of Prostaglandins and Related Eicosanoids. Edinburgh, London, Melbourne, New York, Churchill Livingstone, pp. 217-237, 1988.
- 272.Lipton, R.B., Bigal, M.E. Migraine: epidemiology, impact, and risk factors for progression. *Headache* 45:S3-S13, 2005.
- 273.Lipton, R.B., Bigal, M.E., Diamond, M., Freitag, F. Reed, M.L., Stewart, W.F. Migraine prevalence, disease burden, and the need for preventive therapy. *Neurology* 68:343-349, 2007.
- 274.Lipton, R.B., Bigal, M.E., Kolodner, K., Stewart, W.F., Liberman, J.N., Steiner, T.J. The family impact of migraine: population-based studies in the USA and UK. *Cephalalgia* 23:429-440, 2003.
- 275.Lipton, R.B., Diamond, S., Reed, M., Diamond, M.L., Stewart, W.F. Migraine diagnosis and treatment: results from the American Migraine Study II. *Headache* 41:638-645, 2001/a.
- 276.Lipton, R.B., Hamelsky, S.W., Kolodner, K.B., Steiner, T.J., Stewart, W.F. Migraine, quality of life, and depression: a population-based case-control study. *Neurology* 55:629-635, 2000.
- 277.Lipton, R.B., Hamelsky, S.W., Stewart, W.F. Epidemiology and impact of migraine. In: Silberstein, S.D., Lipton, R.B., Dalessio, D.J., eds. *Wolff's Headache and Other Head Pain*. New York, NY, Oxford University Press, pp. 85-107, 2001/b.
- 278.Lipton, R.B., Silberstein, S.D. Why study the comorbidity of migraine. *Neurology* 44:4-5, 1994.
- 279.Lipton, R.B., Stewart, W.F., Diamond, S., Diamond, M.L., Reed, M. Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II. *Headache* 41:646-657, 2001/c.
- 280.Lipton, R.B., Stewart, W.F., Celentano D.D. Prevalence of migraine headache in the United States. Relation to age, income, race and other socio-demographic factors. *JAMA* 267:64-59, 1992.
- 281.Liu-Chen, L.Y., Gillespie, S.A., Norregaard, T.V., Moskowitz, M.A. Co-localization of retrogradely transported wheat germ agglutinin and the putative neurotransmitter substance P within trigeminal ganglion cells projecting to cat middle cerebral. *J. Comp. Neurol.* 225:187-192, 1984.
- 282.Liveing, E. On megrim, sick-headache and some allied disorders: A contribution to the pathology of nerve storms. London, Churchill, 1873.
- 283.Lovick, T.A., Wolstencroft, J.H. Projections from brain stem nuclei to the spinal trigeminal nucleus in the cat. *Neuroscience* 9:411-420, 1983.
- 284.Lundberg, J.M., Rudehill, A., Sollevi, A. Frequency- and reserpine-dependent chemical coding of sympathetic transmission: differential release of noradrenaline and neuropeptide Y from pig spleen. *Neurosci. Lett.* 63:96-100, 1986.
- 285.Lyngberg, A., Jensen, R., Rasmussen, B.K., Jorgensen, T. Incidence of migraine in a Danish population-based follow-up study. *Cephalalgia* 23:596, 2003.
- 286.Lyons, A., Petrucelli, R.J. *Medicine: An illustrated history*. New York, Abrams, 1987.
- 287.van den Maagdenberg, A.M., Pietrobon, D., Pizzorusso, T., Kaja, S., Broos, L.A., Ceseti, T., van de Ven, R.C., Tottene, A., van der Kaa, J., Plomp, J.J., Frants, R.R., Ferrari, M.D. A CACNA1A knock-in migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* 41:701-710, 2004.
- 288.van den Maagdenberg, A.M., Vanmolkot, K.R.J., Welch, K.M.A., de Vries, B., Dichgans, M., Ramadan, N., Stam, A.H., Tieleman, A., Terwindt, G.M., Haan, J., Frants, R.R., Ferrari, M.D. Mutations in the neuronal voltage-gated sodium channel *SCN1A* in familial hemiplegic migraine type 3. *Cephalalgia* 25:1194, 2005.
- 289.MacGregor, A. *Migraine in women*. London, Martin Dunitz, 1999.
- 290.Maertens de Noordhout, A., Timsit-Berthier, M., Timsit, M., Schoenen, J. Contingent negative variation in headache. *Ann. Neurol.* 19:78-80, 1986.

291. Maes, M., Song, C., Lin, A., De Jongh, R., Van Gastel, A., Kenis, G., Bosmans, E., De Meester, I., Benoy, I., Neels, H., Demedts, P., Janca, A., Scharpé, S., Smith, R.S. The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine* 10:313-318, 1998.
292. Malmgren, R., Hasselmark, L. The platelet and the neuron: two cells in focus in migraine. *Cephalalgia* 8:7-24, 1988.
293. Manzoni, G., Farina, S., Lanfranchi, M. Solari, A. Classic migraine: clinical findings in 164 patients. *Eur. Neurol.* 24:163-169, 1985.
294. Markovics, A., Kormos, V., Gaszner, B., Lashgarara, A., Szőke, É., Sándor, K., Szabadfi, K., Tuka, B., Tajti, J., Szolcsányi, J., Pintér, E., Hashimoto, H., Kun, J., Reglődi, D., Helyes, Zs. Pituitary adenylate cyclase-activating polipeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol. Dis.* 45:633-644, 2012.
295. Marquardt, L., Ruf, A., Mansmann, U., Winter, R., Schuler, M., Buggle, F., Mayer, H., Grau, A. Course of platelet activation markers after ischemic stroke. *Stroke* 33:2570-2574, 2002.
296. Martinez, F., Castillo, J., Rodriguez, J.R., Leira, R., Noya, M. Neuroexcitatory amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid during migraine attacks. *Cephalalgia* 13:89-93, 1993.
297. Mathew, N.T, Kailasam, J., Seifert, T. Clinical recognition of allodynia in migraine. *Neurology* 63:848-852, 2004
298. May, A., Goadsby, P.J. The trigeminovascular system in humans: pathophysiological implications for primary headache syndromes of the neural influences on the cerebral circulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19:115-127, 1999.
299. May, A., Goadsby, P.J. Substance P receptor antagonists in the therapy of migraine. *Exp. Opin. Investig. Drugs* 10:673-678, 2001.
300. May, A., Ophoff, R.A., Terwindt, G.M. Familial hemiplegic migraine locus on 19p13 is involved in the common forms of migraine with and without aura. *Hum. Genet.* 96:604-608, 1995.
301. Mayberg, M., Langers, R.S., Zervos, N.T., Moskowitz, M.A. Perivascular meningeal projections from cat trigeminal ganglia: possible pathway for vascular headache in man. *Science* 213:228-230, 1981.
302. McCulloch, J., Edvinsson, L. Cerebral circulatory and metabolic effects of vasoactive intestinal polipeptide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 238:H449-H456, 1980.
303. McKendrick, A.M., Vingrys, A.J., Badcock D.R., Heywood J.T. Visual dysfunction between migraine events. *Invest. Opht. Visual Sci.* 42:626-633, 2001.
304. McLatchie, L.M., Fraser, N.J., Main, M.J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M.G., Foord, S.M. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin receptor-like receptor. *Nature* 393:333-339, 1998.
305. McNaughton, F.L. The innervation of the intracranial blood vessels and dural sinuses. *Res. Publ. Assoc. Nerv. Ment. Dis.* 18:178-200, 1938.
306. van Meeteren, A., Vos J.J. Resolution and contrast senitivity at low luminances. *Vision Res.* 12:835-833, 1972.
307. Meng, J., Ovs.epian, 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.
308. Menken, M., Munsat, T.L., Toole, J.F. The global burden of disease study-implications for neurology. *Arch. Neurol.* 57:418-420, 2000.

- 309.Merigan, W.H., Maunsell, J.H. How parallel are the primate visual pathways? *Annu. Rev. Neurosci.* 16:369-402 1993.
- 310.Merikangas, K.R., Tierney, C., Martin, N.G. Genetics of migraine in the Australian Twin Registry. In: Rose, C.F., ed. *New Advances in Headache Research*, 4. London, Smith-Gordon, pp. 27-28, 1994.
- 311.Messlinger, K., Fischer, M.J., Lennerz, J.K. Neuropeptide effects in the trigeminal system: pathophysiology and clinical relevance in migraine. *Keio J. Med.* 60:82-89, 2011.
- 312.Messlinger, K., Lennerz, J.K., Eberhardt, M., Fischer, M.J. CGRP and NO in the trigeminal system: mechanisms and role in headache generation. *Headache* 52:1411-1427, 2012.
- 313.Mezei, Zs., Kis, B., Gecse, Á., Tajti, J., Boda, B., Telegdy, G., Vécsei, L. Platelet arachidonate cascade of migraineurs in the interictal phase. *Platelets* 11:222-225, 2000.
- 314.Mezei, Zs., Kis, B., Gecse, Á., Telegdy, Gy., Ábrahám, Gy., Sonkodi, S. Platelet eicosanoids and the effect of captopril in blood pressure regulation. *Eur. J. Pharm.* 340:67-73, 1997.
- 315.Michel, P., Dartigues, J.F., Lindousli, A., Henry, P. Loss of productivity and quality of life in migraine sufferers among French workers: results from the GAZEL cohort. *Headache* 37:71-78, 1997.
- 316.Micieli, G. Suffering in silence. In: *Migraine: A Brighter Future*. Ed.: Edmeads, J. Oxford, Cambridge Medical Publications, pp. 1-7, 1993.
- 317.Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R.D., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M.H., Coy, D.H. Isolation of a novel 38 residue hypothalamic polipeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:567-574, 1989.
- 318.Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R.D., Kitada, C., Kubo, K., Fujino, M., Arimura, A. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polipeptide with 38 residues (PACAP-38). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170:643-648, 1990.
- 319.Moller, K., Zhang, Y.Z., Hakanson, R., Luts, A., Sjölund, B., Uddman, R., Sundler, F. Pituitary adenylate cyclase activating peptide is a sensory neuropeptide: immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neuroscience* 57:725-732, 1993.
- 320.Montagna, P., Cortelli, P., Monari, L. ³¹P-magnetic resonance spectroscopy in migraine without aura. *Neurology* 44:666-669, 1994/a.
- 321.Montagna, P., Cortelli, P., Barbiroli, B. Magnetic resonance spectroscopy studies in migraine. *Cephalalgia* 14:184-193, 1994/b.
- 322.Moskowitz, M.A. Defining a pathway to discovery from bench to bedside: the trigeminovascular system and sensitisation. *Headache* 48:688-690, 2008.
- 323.Mulder, H., Uddman, R., Moller, K., Zhang, Y., Z., Ekblad, E., Alumets, J., Sundler, F. Pituitary adenylate cyclase activating polipeptide expression in sensory neurons. *Neuroscience* 63:307-312, 1994.
- 324.Mulder, H., Uddman, R., Moller, K., Elsas, T., Ekblad, E. Alumets, J., Sundler, F. Pituitary adenylate cyclase activating polipeptide is expressed in autonomic neurons. *Regul. Pept.* 59:121-128, 1995.
- 325.Munoz, M., Convenas, R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology. *Amino Acids* 46:1727-1750, 2014.
- 326.National Center of Health Statistics. *Vital and Health Statistics of the United States*. D.H.E.W. PHS Publication No. 53. Advance data. Hyattsville, M.D. National Center for Health Statistics, 1979.
- 327.Németh, J., Reglödi, D., Pozsgai, G., Szabó, A., Elekes, K., Pintér, E., Szolcsányi, J., Helyes Zs. Effect of pituitary adenylate cyclase activating polipeptide-38 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neuroscience* 143:223-230, 2006.

- 328.Nielsen, K.C., Owman, C. Adrenergic innervation of pial arteries related to the circle of Willis in the cat. *Brain Res.* 6:773-776, 1967.
- 329.Nilsson, T., Cantera, L., Edvinsson, L. Presence of neuropeptide Y Y1 receptor mediating vasoconstriction in human cerebral arteries. *Neurosci. Lett.* 204:145-148, 1996.
- 330.Nosedá, R., Kainz, V., Jakubowski, M., Gooley, J.J., Saper, C.B., Digre, K., Burstein, R. A neural mechanism for exacerbation of headache by light. *Nat. Neurosci.* 13:239-245, 2010.
- 331.Nozaki, K., Boccalini, P., Moskowitz, M.A. Expression of c-fos-like immunoreactivity in brainstem after meningeal irritation by blood in the subarachnoid space. *Neuroscience* 49:669-680, 1992.
- 332.Obermann, M., Yoon, M.S., Dommès, P., Kuznetsova, J., Maschke, M., Weimar, C., Limmroth, V., Diener, H.C., Katsarava, Z. Prevalence of trigeminal autonomic symptoms in migraine: a population-based study. *Cephalalgia* 27:504-509, 2007.
- 333.Olesen, J., Burstein, R., Ashina, M., Tfelt-Hansen, P. Origin of pain in migraine: evidence for peripheral sensitisation. *Lancet Neurol.* 8:679-690, 2009.
- 334.Olesen, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Wittchen, H.U., Jonsson, B. The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur. J. Neurol.* 19:155-162, 2012.
- 335.Olesen, J., Tfelt-Hansen, P., Welch, K.M.A. *The Headaches*. Second edition, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia 2000.
- 336.Olsen, J. Measurement techniques. Questionnaire, telephone interview, clinical interview, validation and reliability. In: *Headache classification and epidemiology*. Ed.: Olesen, J., London, Raven Press, pp. 197-204, 1994.
- 337.Ophoff, R.A., Eijk, R.V., Sandkuijl, L.A. Genetic heterogeneity of familial hemiplegic migraine. *Genomics* 22:21-26, 1994.
- 338.Ophoff, R.A., Terwindt M.G., Vergouwe, N.M. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca^{2+} channel gene CACNL1A4. *Cell* 87:543-552, 1996.
- 339.Ophoff, R.A., Terwindt, M.G., Frants, R.R. P/Q-type Ca^{2+} channel defects in migraine, ataxia and epilepsy. *Trends Pharmacol. Sci.* 19:121-127, 1998.
- 340.Osterhaus, T.J., Gutterman, D.L., Plachetka, J.R. Health care resources and lost labor costs of migraine headaches in the United States. *Pharmacoeconomics* 2:67-76, 1992.
- 341.Overvad, K. Epidemiological study design and measurement of associations. In: *Headache classification and epidemiology*. Ed.: Olesen, J., New York, Raven Press, pp. 189-196, 1994.
- 342.Owens, M.J., Nemeroff, C.B. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clin. Chem.* 40:288-295, 1994.
- 343.Owman, C., Edvinsson, L. Histochemical and pharmacological approach to the investigation of neurotransmitters, with particular regard to the cerebrovascular bed. In: *Neurogenic Control of the Brain*. Eds.: Owman, C., Edvinsson, L. Oxford, Pergamon Press, pp. 1-38., 1977.
- 344.Palkovits, M., Jacobowitz, D.M. Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the rat brain. II. Hindbrain (mesencephalon, rhombencephalon). *J. Comp. Neurol.* 157:29-42, 1974.
- 345.Palkovits, M., Somogyvári-Vígh, A., Arimura, A. Concentrations of pituitary adenylate cyclase-activating polipeptide (PACAP) in human brain nuclei. *Brain Res.* 699:116-120, 1995.
- 346.Parantainen, J., Vapaatalo, H. Prostaglandins in the pathophysiology of migraine. In: Curtis-Prior, P.B., ed. *Prostaglandins: Biology and Chemistry of Prostaglandins and Related Eicosanoids*. Edinburgh, London, Melbourne, New York, Churchill Livingstone, pp. 386-401, 1988.

347. Penfield, W., McNaughton, F.L. Dural headache and innervation of the dura mater. *Arch. Neurol. Psych.* 44:43-75, 1940.
348. Perini, F., D'Andrea, G., Galloni, E., Pignatelli, F., Billo, G., Alba, S., Bussone, G., Toso, V. Plasma cytokine levels in migraineurs and controls. *Headache* 45:926-931, 2005.
349. Pietrobon, D., Moskowitz, M.A. Pathophysiology of migraine. *Annu. Rev. Physiol.* 75:365-391, 2013.
350. Pietrobon, D., Striessnig, J. Neurobiology of migraine. *Nat. Rev. Neurosci* 4:386-398, 2003.
351. Piovesan, E.J., Kowacs, P.A., Oshinsky, M.L. Convergence of cervical and trigeminal sensory afferents. *Curr. Pain Headache Rep.* 7:377-383, 2003.
352. Poletti, C.E. C2 and C3 pain dermatomes in man. *Cephalalgia* 11:155-159, 1991.
353. Prigge, S.T., Boyington, J.C., Faig, M., Doctor, K.S., Gaffney, B.J., Amzel, L.M. Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie.* 79:629-36, 1997.
354. Prusinski, A. Historical background. In: *Migraine in general practice. Basic concepts.* Ed.: Ekbom, K., London, Smith-Gordon, pp. 9-14, 1993.
355. Pryse-Philips, W., Findlay, H., Tugwell, P., Edmeads, J., Murray, T.J., Nelson, R.F. A Canadian population survey on the clinical, epidemiologic and societal impact of migraine and tension-type headache. *Can. J. Neurol. Sci.* 19:333-339, 1992.
356. Ptacek, L.J. The place of migraine as a channelopathy. *Curr. Opin. Neurol.* 11:217-226, 1998.
357. Puig-Parellada, P., Planas, J.M., Giménez, J., Obach, J. Migraine: implication of arachidonic acid metabolites. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 49:537-547, 1993.
358. Puig-Parellada, P., Planas, J.M., Giménez, J., Sanchez, J., Gaya, J., Tolosa, E., Obach, J. Plasma and saliva levels of PGI₂ and TxA₂ in the headache-free period of classical migraine patients. The effects of nicardipine. *Headache* 31:156-158, 1991.
359. Quartu, M., Diaz, G., Floris, A., Lai, M.L., Priestley, J.V., Del Fiacco, M. Calcitonin gene-related peptide in the human trigeminal sensory system at developmental and adult life stages: immunohistochemistry neuronal morphometry and coexistence with substance P. *J. Chem. Neuroanat.* 5:143-157, 1992.
360. Rahmann, A., Wienecke, T., Hansen, J.M., Fahrenkrug, J., Olesen, J., Ashina M. Vasoactive intestinal peptide causes marked cephalic vasodilation, but does not induce migraine. *Cephalalgia* 28: 226-236, 2008.
361. Raichle, M.E., Hartman, B.K., Eichling, Jo.O., Sharpe, L.G. Central noradrenergic regulation of cerebral blood flow and vascular permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 72:3726-3730, 1975.
362. 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.
363. Ramadan, N.M., Halvorson, H., van de Linde, A., Levine, S.R., Helpforn, J.A., Welch, K.M.A. Low brain magnesium in migraine. *Headache* 29:590-593, 1989.
364. Rapoport, A., Edmeads, J. Migraine: The evolution of our knowledge. *Arch. Neurol.* 57:1221-1223, 2000.
365. Raskin, N.H., Hosobuchi, Y., Lamb, S. Headache may arise from perturbation of the brain. *Headache* 27:416-420, 1987.
366. Rasmussen, B.K. Epidemiology of headache. *Cephalalgia* 15:45-68, 1995.
367. Rasmussen, B.K. Epidemiology of headache in Europe. In: *Headache Classification and epidemiology.* Ed.: Olesen, J., New York, Raven Press, pp. 231-237, 1994.

- 368.Rasmussen, B.K., Jensen, R., Schroll, M., Olesen, J. Epidemiology of headache in a general population, a prevalence study. *J. Clin. Epidemiol.* 44:1147-1157, 1991.
- 369.Rawlings, C.E., Rossitch, E. The history of trepanation in Africa with a discussion of its current status and continuing practice. *Surg. Neurol.* 41:507-513, 1994.
- 370.Ray, S.B., Wolff, H.G. Experimental studies on headache. Pain sensitive structures of the head and their significance in headache. *Arch. Surg.* 41:813-856, 1940.
- 371.Rikard-Bell, G.C., Tork, I., Sullivan, C., Scheibner, T. Distribution of substance P-like immunoreactive fibres and terminals in the medulla oblongata of the human infant. *Neurosci* 34:133-148, 1990.
- 372.Rimon, R., Le Greves, P. Elevation of substance P-like peptides in the CSF of psychiatric patients. *Biol. Psych.* 19:509-516, 1984.
- 373.Rose, P.M., Prabbavanthi, F., Lynch, J.S., Fraizer, S.t., Fisher, S.M., Kodukula, K., Kienzie, B., Seethala, R. Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. *J. Biol. Chem.* 270:22661-22664, 1995.
- 374.Rosenfeld, M.G., Amara, S.G., Evans, R.M. Alternative RNA processing: determining neuronal phenotype. *Science* 525:1315-1320, 1984.
- 375.Rosenfeld, M.G., Mermod, J.J., Amara, S.G., Swanson, S.W., Sawschenko, P.E., Rivier, J., Vale, W.W., Evans, R.M. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304:129-135, 1983.
- 376.Rozen, T.D. A history of cigarette smoking is associated with the development of cranial autonomic symptoms with migraine headaches. *Headache* 51:85-91, 2011.
- 377.Rozen, T., Swidan, SZ.. Elevation of CSF tumor necrosis factor alpha levels in new daily persistent headache and treatment refractory chronic migraine. *Headache* 47:1050-1055, 2007.
- 378.Ruggeri, Z.M. Platelets in atherothrombosis. *Nat. Med.* 8:1227-1234, 2002.
- 379.Rupniak, N.M. Elucidating the antidepressant actions of substance P (NK1 receptor) antagonists. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:257-261, 2002/a.
- 380.Rupniak, N.M. New insights into the antidepressant actions of substance P (NK1 receptor) antagonists. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80:489-494, 2002/b.
- 381.Rupniak, N.M., Kramer, M.S. Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 20:485-490, 1999.
- 382.Russel, M.B., Olesen, J. Increased risk and evidence of genetic factors in migraine. *Br. Med. J.* 311:541-544, 1995.
- 383.Russel, M.B., Olesen, J. A nosographic analysis of the migraine aura in a general population. *Brain* 119:355-361, 1996.
- 384.Ryff, C.D., Keyes, C.L. The structure of psychological well-being revisited. *J. Pers. Soc. Psychol.* 69:719-727, 1995.
- 385.Sacks, A. *Migraine*. Berkeley, Los Angeles, London, University of California Press, 1992.
- 386.Sacquegna, T., Lodi, R., De Carolis, P., Tinuper, P., Cortelli, P., Zaniol, P. Brain energy metabolism studied by ³¹P-MR spectroscopy in a case of migraine with prolonged aura. *Acta Neurol. Scand.* 86:376-80, 1992.
- 387.Said, S.I. Vasoactive intestinal polipeptide (VIP): current status. *Peptides* 5:143-50, 1984.
- 388.Said, S., Mutt, V. Polipeptide with broad biological activity: Isolation from small intestine. *Science* 169:1217-1218, 1970.

- 389.Sakai, Y., Nishikawa, M., Diksic, M., Aubé, M. α -[11C] methyl-L tryptophan-PET as a surrogate for interictal cerebral serotonin synthesis in migraine without aura. *Cephalalgia* 34:165-173, 2014.
- 390.Samsam, M., Covenas, R., Ahangari, R., Yajeya, J., Narvaez, J.A., Tramu, G. Alterations in neurokinin A, substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactivities in the caudal trigeminal nucleus of the rat following electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Neurosci. Lett.* 261:179-182, 1999.
- 391.Santanello, N.C., Hartmaier, S.L., Epstein, R.S., Silberstein, S.D. Validation of a new quality of life questionnaire for acute migraine headache. *Headache* 35:330-337, 1995.
- 392.Santanello, N.C., Polis, A.B., Hartmaier, S.L., Kramer, M.S., Block, G.A., Silberstein, S.D. Improvement in migraine-specific quality of life in a clinical trial of rizatriptan. *Cephalalgia* 17:867-872, 1997.
- 393.Sarchielli, P., Alberti, A., Coppola, F. Platelet-activating factor (PAF) in internal jugular venous blood of migraine without aura patients assessed during migraine attacks. *Cephalalgia* 24:623-630, 2004.
- 394.Sarchielli, P., Coata, G., Firenze, C. Serum and salivary magnesium levels in migraine and tension-type headache. Results in a group of adult patients. *Cephalalgia* 12:21-28, 1992.
- 395.Sarchielli, P., Pini, L.A., Zanchin, G., Alberti, A., Maggioni, F., Rossi, C., Floridi, A., Calabresi, P., Clinical-biochemical correlates of migraine attacks in rizatriptan responders and non-responders. *Cephalalgia* 26: 257-265, 2006.
- 396.Sauro, K.M., Becker, W.J. The stress and migraine interaction. *Headache* 49:1378-1386, 2009.
- 397.Savi, L.T., Condello, V., Bert, F. Prophylaxis of migraine with aura: A place for acetylsalicylic acid. *J. Headache Pain* 1:P195, 2013.
- 398.Schefrin, B.E., Tregear, S.J., Harvey, L.O., Werner, J.S. Senescent changes in scotopic contrast sensitivity. *Vision Res.* 39:3728-3733, 1999.
- 399.Scher, A.I., Stewart, W.F., Lipton, R.B. Migraine and headache: a meta-analytic approach. In: Crombie, I.K., ed. *Epidemiology of Pain*. Seattle, WA, IASP Press, pp. 15-170, 1999.
- 400.Schipper, H. Why measure quality of life? *Can. Med. Assoc. J.* 128:1367-1370, 1983.
- 401.Schmalbach, B., Stepanow, O., Jochens, A., Riedel, C. Deuschl, G., Kühlenbaumer, G. Determinants of platelet-leukocyte aggregation and platelet activation in stroke. *Cerebrovasc. Dis.* 39:176-180, 2015.
- 402.Schoenen, J. Acute migraine therapy: the newer drugs. *Curr. Opin. Neurol.* 10:237-243, 1997.
- 403.Schoenen, J. Cortical electrophysiology in migraine and possible pathogenetic implications. *Clin. Neurosci.* 5:10-17, 1998.
- 404.Schoenen, J. Migraine and serotonin: The quest for the Holy Grail goes on. *Cephalalgia* 34:163-164, 2014.
- 405.Schoenen, J., Wang, W., Albert, A., Delwaide, P.J. Potentiation instead of habituation characterizes visual evoked potentials in migraine patients between attacks. *Eur. J. Neurol.* 2:115-122, 1995.
- 406.Schon, F., Ghattei, M., Allen, J.M., Mulderry, P.K., Kelly, J.S., Bloom, S.R. The effect of sympathectomy on calcitonin gene-related peptide levels in the rat trigeminovascular system. *Brain Res.* 348:197-200, 1985.
- 407.Schuh-Hofer, S., Richter, M., Geworski, L., Villinger, A., Israel, H., Wenzel, R., Munz, L.D., Arnold, G. Increased serotonin transporter availability in the brainstem of migraineurs. *J. Neurol.* 254:789-796, 2007.
- 408.Schumacher, J.A., Wolff, H.G. Experimental studies on headache. *Arch. Neurol. Psych.* 45:199-214, 1941.
- 409.Schurks, M., Rist, P.M., Bigal, M.E., Buring, J.E., Lipton, R.B., Kurth T. Migraine and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 339:b3914, 2009.
- 410.Schytz, H.W., Birk, S., Wienecke, T., Kruuse, C., Olesen, J., Ashina, M. PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura. *Brain* 132:16-25, 2009.

- 411.Schytz, H.W., Olesen, J., Ashina, M. The PACAP receptor: a novel target for migraine treatment. *Neurotherapeutics* 7:191-196, 2010.
- 412.Seki, Y., Suzuki, Y., Baskaya, M.K. The effects of pituitary adenylate cyclase-activating polipeptide on cerebral arteries and vertebral artery blood flow in the rat trigeminovascular system. *Brain Res.* 348:197-200, 1995/a.
- 413.Seki, Y., Suzuki, Y., Baskaya, M.K., Kano, T., Saito, K., Takayasu, M. The effects of pituitary adenylate cyclase-activating polipeptide on cerebral arteries and vertebral artery blood flow in anesthetized the dogs. *Eur. J. Pharmacol.* 275:259-266, 1995/b.
- 414.Selby, G., Lance, J.W. Observations on 500 cases of migraine and allied vascular headache. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 23:23-32, 1960.
- 415.Shapley, R. Parallel pathways int he mammalian visual system. *Ann. NY. Acad. Sci.* 388:11-20, 1982.
- 416.Shepherd, A.J. Visual contrast processing in migraine. *Cephalalgia* 20:865-880, 2000.
- 417.Shibata, K., Osawa, M., Iwata, M. Simultaneous recording of pattern reversal electroretinograms and visual evoked potentials in migraine. *Cephalalgia* 17:742-747, 1997.
- 418.Silberstein, S.D. Migraine symptoms: results of a survey of self-reported migraineurs. *Headache* 35:387-396, 1995.
- 419.Silberstein, S.D., Lipton, R.B., Goadsby, P.J. Headache in Clinical Practice. Oxford, ISIS Medical Media, pp. 41-90, 1998.
- 420.Silberstein, S.D., Lipton, R.B., Goadsby, P.J. Headache in Clinical Practice. 2nd Edition. London, New York, Martin Dunitz, 2002.
- 421.Silberstein, S.D., Saper, J.R. Migraine: diagnosis and treatment. In: Wolff's headache and other head pain. Eds.: Dalessio, D., Silberstein, S.D., New York, 6th Edition, Oxford University Press, pp. 961-970, 1993.
- 422.Silberstein, S.D., Young, W.B. Migraine aura and prodrome. *Semin. Neurol.* 45:175-182, 1995.
- 423.Smith, W.L., Garavito, R.M., DeWitt, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271:33157-33160, 1996.
- 424.Smitherman, T.A., Burch, R., Sheikh, H., Loder, E. The prevalence, impact, and treatment of migraine and severe headaches in the United States: a review of statistics from national surveillance studies. *Headache* 53:427-436, 2013.
- 425.Solomon, G.D., Skobieranda, F.G., Graff, L.A. Quality of life and well-being of headache patients: measurement by the Medical Outcomes Study Instrument. *Headache* 33:351-358, 1993.
- 426.Sreedhara, S.P., Patel, D.R., Huang, J.X., Goetzl, E.J. Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193:546-553, 1993.
- 427.Stang, P.E., Osterhaus, J.T. Impact of migraine in the United States: data from national health interview survey. *Headache* 33:29-35, 1992.
- 428.Stang, P.E., Osterhaus, J.T., Celentano, D.D. Migraine: patterns of health care use. *Neurology* 44:47-53, 1994.
- 429.Stang, P.E., Sternfeld, B., Sidney, S. Migraine headache in a pre-paid health plan: ascertainment, demographics, physiological and behavioral factors. *Headache* 36:69-76, 1996.
- 430.Stankiewicz, A., Aderjan, D., Eippert, F., May, A. Trigeminal nociceptive transmission in migraineurs predicts migraine attacks. *J. Neurosci.* 31:1937-1943, 2011.

431. Steiger, H.J., Meakin, C.J. The meningeal representation in the trigeminal ganglion, an experimental study in the cat. *Headache* 24:305-309, 1984.
432. Steiner, T.J., Scher, A.I., Stewart, W.F., Kolodner, K., Liberman, J., Lipton, R.B. The prevalence and disability burden of adult migraine in England and their relationships to age, gender and ethnicity. *Cephalalgia* 23:519-527, 2003.
433. Steiner, T.J., Stovner, L.J., Katsarava, Z., Lainez, J.M., Lampl, C., Lantéri-Minet, M., Rastenyte, D., Ruiz de la Torre, E., Tassorelli, C., Barré, J., André, C. The impact of headache in Europe: principal results of the Eurolight project. *J. Headache Pain* 15:31, doi: 10.1186/1129-2377-15-31, 2014.
434. Stepien, A., Jagustyn, P., Trafny, A., Widerkiewicz, K. Effect of rizatriptan on CGRP level in migraine. *Cephalalgia* 23:738, 2003.
435. Stewart, W.F., Linet, M.S., Celentano, D.D., Van Natta, M., Ziegler, D. Age and sex-specific incidence rates of migraine with and without visual aura. *Am. J. Epidemiol.* 34:1111-1120, 1993.
436. Stewart, W.F., Lipton, R., Celentano, D.D., Reed, M.L. Prevalence of migraine headache in the United States: relation to age, income, race and other sociodemographic factors. *JAMA* 267:64-69, 1992.
437. Stewart, W.F., Lipton, R.B., Simon, D. Work-related disability: results from the American Migraine Study. *Cephalalgia* 16:231-238, 1996.
438. Stewart, W.F., Schechter, A., Lipton, R.B. Migraine heterogeneity: disability, pain intensity and attack frequency and duration. *Neurology* 144:S24-29, 1994/a.
439. Stewart, W.F., Schechter, A., Rasmussen, B.K. Migraine prevalence: a review of population based studies. *Neurology* 44:S17-23, 1994/b.
440. Stewart, W.F., Staffa, J., Lipton, R.B. Familial risk of migraine: a population-based study. *Ann. Neurol.* 41:166-172, 1997.
441. Storer, R.J., Akerman, S., Goadsby, P.J. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) modulates nociceptive trigeminovascular transmission in the cat. *Br. J. Pharmacol.* 142:1171-1181, 2004.
442. Stovner, L., Hagen, K. Prevalence, burden, and cost of headache disorders. *Curr. Opin. Neurol.* 19:281-285, 2006.
443. Stovner, L., Hagen, K., Jensen, R., Katsarava, Z., Lipton, R., Scher, A. The global burden of headache a documentation of headache prevalence and disability world-wide. *Cephalalgia* 27:193-210, 2007.
444. Suda, K., Smith, D.M., Ghatei, M.A., Murphy, J.K., Bloom, S.R. Investigation and characterization of receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in human brain by radioligand binding and chemical cross-linking. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 72:958-964, 1991.
445. Suzuki, N., Hardebo, J.E., Owman, C. Origins and pathways of cerebrovascular vasoactive intestinal polypeptide positive nerves in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 8:697-712, 1988.
446. Suzuki, N., Hardebo, J.E., Owman, C. Trigeminal fibre collaterals storing substance P and calcitonin gene-related peptide associate with ganglion cells containing choline acetyltransferase and vasoactive intestinal polypeptide in the sphenopalatine ganglion of the rat. An axon reflex modulating parasympathetic ganglionic activity? *Neuroscience* 30:595-604, 1989.
447. Syed, A.U., Koide, M., Braas, K.M., May, V., Wellman, G.C. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) potently dilates middle meningeal arteries: implications for migraine. *J. Mol. Neurosci.* 48:574-583, 2012.
448. Tajti, J., Csáti, A., Vécsei, L. Novel strategies for the treatment of migraine attacks via the CGRP, serotonin, dopamine, PAC1 and NMDA receptors. *Exp. Opin. Drug Metab. Toxicol.* 10:1509-1520, 2014.

- 449.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.
- 450.Tajti, J., Majlath Z., Szok D., Csáti A. Vécsei L. Drug safety in acute migraine treatment. *Exp. Opin. Drug Saf.* 14:891-909, 2015/c.
- 451.Tajti, J., Möller, S., Uddman, R., Bodi, I., Edvinsson, L. The human superior cervical ganglion: neuropeptides and peptide receptors. *Neurosci. Lett.* 263:121-124, 1999/b.
- 452.Tajti, J., Párdutz, Á., Vámos, E., Tuka, B., Kuris, A., Bohár, Zs., Fejes, A., Toldi, J., Vécsei, L. Migraine is a neuronal disease. *J. Neur. Transm.* 118:511-524, 2011.
- 453.Tajti, J., Szok, D., Majláth, Zs., Tuka, B., Csáti, A., Vécsei, L. Migraine and neuropeptides. *Neuropeptides* (in press) doi: 10.1016/j.npep.2015.03.006. 2015/a.
- 454.Tajti, J., Szok, D., Párdutz, Á., Tuka, B., Csáti, A., Kuris, A., Toldi, J., Vécsei, L. Where does a migraine attack originate? In the brainstem. *J. Neur. Transm.* 119:557-568, 2012.
- 455.Tajti, J., Tuka, B., Botz, B., Helyes, Zs., Vécsei, L. Role of pituitary adenylate cyclase-activating polipeptide in nociception and migraine. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 14:540-553, 2015/b
- 456.Tajti, J., Uddman, R., Edvinsson, L. Neuropeptide localization in the „migraine generator” region of the human brainstem. *Cephalalgia* 21:96-101, 2001.
- 457.Tajti, J., Uddman, R., Möller, S., Sundler, F., Edvinsson, L. Messenger molecules and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *J. Aut. Nerv. Syst.* 76:176-183, 1999/a.
- 458.Tarlov, A., Ware, J., Greenfield, S., Nelson, E.C., Perrin, E., Zalikoff, M. The Medical Outcome Study: an application of methods for monitoring the results of medical care. *JAMA* 262:925-930, 1989.
- 459.Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V. Neuropeptide Y – a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polipeptide. *Nature* 296:659-660, 1982.
- 460.Tatemoto, K., Mutt, V. Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polipeptides. *Nature* 285:417-418, 1980.
- 461.Teh, B.T., Silburn, P., Lindblad, K. Familial cerebellar periodic ataxia without myokymia maps to a 19-cM region on 19p13. *Am. J. Hum. Genet.* 56:1443-1449, 1995.
- 462.Ten Tusscher, M.P., Klooster, J., Baljet, B., Van der Werf, F., Vrensen, G.F. Pre- and post-ganglionic nerve fibres of the pterygopalatine ganglion and their allocation to the eyeball of rats. *Brain Res.* 517:315-323, 1990.
- 463.Terwindt, G.M., Haan, J., Ophoff, A.R. The quest for migraine genes. *Curr. Opin. Neurol.* 10:221-225, 1997/a.
- 464.Terwindt, G.M., Ophoff, R.A., Haan, J., Ferrari, M.D. The Dutch Migraine Genetics Research Group. Familial hemiplegic migraine: a clinical comparison of families linked and unlinked to chromosome 19. *Cephalalgia* 16:153-155, 1996.
- 465.Terwindt, G.M., Ophoff, R.A., Sandkuijl, L.A., van Eijk, R., Haan, J., Frants, R.R., Ferrari, M.D. Involvement of the familial hemiplegic migraine gene on 19p13 in migraine with and without aura. *Cephalalgia* 17:332-335, 1997/b.
- 466.Terwindt, G.M., Ophoff, R.A., VanEijk, R. Involvement of the CACNA1A gene containing region on 19p13 in migraine with and without aura. *Neurology* 56:1028-1032, 2001.
- 467.Thorwald, J. Science and secrets of early medicine. London: Thames and Hudson Ltd, pp. 300-307, 1962.

468. Tietjen, G.E., Khubchandani, J. Platelet dysfunction and stroke in the female migraineur. *Curr. Pain Headache Rep.* 13:386-391, 2009.
469. Tietjen, G.E., Khubchandani, J. Vascular biomarkers in migraine. *Cephalalgia* 35:95-117, 2015.
470. Tiller-Borcich, J.K., Capili, M., Gordan, G.S. Human brain calcitonin gene-related peptide (CGRP) is concentrated in the locus coeruleus. *Neuropeptides* 11:55-61, 1988.
471. Tong, S., Parfenova, H., Shibata, M. Pituitary adenylate cyclase-activating polipeptide dilates cerebral arterioles of newborn pigs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 203:343-347, 1993.
472. Tuka, B., Helyes, Z., Markovics, A., Bagoly, T., Németh, J., Márk, L., Brubel, R., Reglődi, D., Párdutz, A., Szolcsányi, J., Vécsei, L., Tajti, J. Peripheral and central alterations of pituitary adenylate cyclase activating polipeptide-like immunoreactivity in the rat in response to activation of the trigeminovascular system. *Peptides* 33: 307-316, 2012.
473. Tuka, B., Helyes, Zs., Markovics, A., Bagoly, T., Szolcsányi, J., Szabó, N., Tóth, E., Kincses, T., Vécsei, L., Tajti, J. Alterations in PACAP-38-like immunoreactivity in the plasma during ictal and interictal periods of migraine patients. *Cephalalgia* 33:1085-1095, 2013.
474. Uddman, R., Edvinsson, L., Ekman, R., Kingman, T.A., McCulloch, J. Innervation of feline cerebral vasculature by nerve fibres containing calcitonin gene-related peptide: trigeminal origin and co-existence with substance P. *Neurosci. Lett.* 62:131-136, 1985.
475. Uddman, R., Goadsby, P.J., Jansen, I., Edvinsson, L. PACAP, a VIP-like peptide, immunohistochemical localization and effect upon cat pial arteries and on cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13:291-297, 1993/a.
476. Uddman, R., Goadsby, P.J., Jansen, I., Edvinsson, L. Helospectin-like peptides: immunohistochemical localization and effects on cat pial arteries and on cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13:S206, 1993/b.
477. Uddman, R., Tajti, J., Hou, M., Sundler, F., Edvinsson, L. Neuropeptide expression in the human trigeminal nucleus caudalis and in the cervical spinal cord C1 and C2. *Cephalalgia* 22:112-116, 2002.
478. Uddman, R., Tajti, J., Möller, S., Sundler, F., Edvinsson, L. Neuronal messengers and peptide receptors in the human sphenopalatine and otic ganglia. *Brain Res.* 826:193-199, 1999/a.
479. 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.
480. Ulrich, V.M., Gervil, K.O., Kyvik, C. Evidence of a genetic factor in migraine with aura: a population-based Danish twin study. *Ann. Neurol.* 45:241-246, 1999.
481. Uncini, A., Lodi, R., Di Murio, A., Silvestri, G., Servidei, S., Lugesesi, A., Iotti, S., Zaniol, P., Barbiroli, B. Abnormal brain and muscle energy metabolism shown by ³¹P-MRS in familial hemiplegic migraine. *J. Neurol. Sci.* 129:214-222, 1995.
482. Vanmolkot, K.R., Kors, E.E., Hottenga, J.J., Terwindt, G.M., Haan, J., Hoefnagels, W.A., Black, D.F., Sandkuijl, L.A., Frants, R.R., Ferrari, M.D., van den Maagdenberg, A.M. Novel mutations in the Na⁺, K⁺-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. *Ann. Neurol.* 54:360-366, 2003.
483. Vapaatalo, H. Tolfenamic acid and migraine: aspects on prostaglandins and leukotrienes. *Pharmacol. Toxicol.* 75:76-80, 1994.
484. 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 polipeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* 61:283-357, 2009.

485. Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M. Pituitary adenylate cyclase-activating polipeptide and its receptors: from structure to function. *Pharmacol. Rev.* 52:269-324, 2000.
486. Veloso, F., Kumar, K., Toth, C. Headache secondary to deep brain implantation. *Headache* 38:507-515, 1998.
487. Vécsei, L., Majláth, Zs., Balog, A., Tajti, J. Drug targets of migraine and neuropathy: treatment of hyperexcitability. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets EABMs Special Issue.* 14:664-676, 2015/b.
488. Vécsei, L., Majláth, Zs., Szok, D., Csáti, A., Tajti, J. Drug safety and tolerability in prophylactic migraine treatment. *Exp. Opin. Drug Saf.* 14:667-681, 2015/a.
489. Vécsei, L., Szok, D., Csáti, A., Tajti, J. CGRP antagonists and antibodies for the treatment of migraine. *Exp. Opin. Investig. Drugs* 24:31-41, 2014/a.
490. Vécsei, L., Tuka, B., Tajti, J. Role of PACAP in migraine headaches. *Brain* 137:650-651, 2014/b.
491. Vécsei, L., Widerlöv, E., Ekman, R., Kovács, K., Jelencsik, I., Bozsik, Gy., Kapócs, G. Suboccipital cerebrospinal fluid and plasma concentrations of somatostatin, neuropeptide Y, and beta-endorphin in patients with common migraine. *Neuropeptides* 22:111-116, 1992.
492. Victor, T.W., Hu, X., Campbell, J.C., Buse, D.C., Lipton, R.B. Migraine prevalence by age and sex in the United States: a life-span study. *Cephalalgia* 30:1065-1072, 2010.
493. Vollbracht, S., Rapoport, A.M. The pipeline in headache therapy. *CNS Drugs* 27:717-729, 2013.
494. Vollbracht, S., Rapoport, A.M. New treatments for headache. *Neurol. Sci.* 35:89-97, 2014.
495. Wahlestedt, C., Reis, D.J. Neuropeptide Y-related peptides and their receptors – are the receptors potential therapeutic drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33:309-352, 1993.
496. Wahlestedt, C., Yanaihara, N., Hakanson, R. Evidence for different pre- and postjunctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. *Regul. Pept.* 13:307-318, 1986.
497. Wang, W., Timsit-Berthier, M., Schoenen, J. Intensity dependence of auditory evoked potentials is pronounced in migraine: an indication of cortical potentiation and low serotonergic neurotransmission? *Neurology* 46:1404-1409, 1996.
498. Ware, J.E. Conceptualizing and measuring generic health outcomes. *Cancer* 67:774-779, 1991.
499. Waters, W.E. Community studies of the prevalence of headache. *Headache* 9:178-186, 1970.
500. Wei, E.P., Kontos, H.A., Said, S.I. Mechanism of action of vasoactive intestinal polipeptide on cerebral arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 239:H765-H768, 1980.
501. Weiller, C., May, A., Limmorth, V., Jüptner, M., Kaube, H., Schayck, R., Coenen, H. H., Diener, H. C. Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat. Med.* 1:658-660, 1995.
502. Welch, K.M., Levine, S.R., D' Andrea, G., Schultz, L.R., Helpem, J.A. Preliminary observations on brain energy metabolism in migraine studied by in vivo phosphorus 31 NMR spectroscopy. *Neurology* 39:538-541, 1989.
503. Willis, T. *Cerebri Anatome*. London, Martin Allestry, 1664.
504. Willis, T. *Opera Omnia Amstelaedami: Hernicum Wetstenium*, 1682.
505. Wilson, D.A., O'Neill, J.T., Said, S.I. Vasoactive intestinal polipeptide and the canine cerebral circulation. *Circ. Res.* 48:138-148, 1981.
506. Wolf, J.E., Arden, G.B. elective magnocellular damage in melanoma-associated retinopathy: Comparison with congenital stationary nightblindness. *Vision Res.* 36:2369-2379, 1996.

507. Wolff, H.G. Headache and cranial arteries. In: Transactions of the Association of American Physicians. Eds.: Association of American Physicians, Philadelphia, Printed for the Association of American Physicians, pp. 193-198, 1938.
508. World Health Organization. WHOQOL: Measuring quality of life. Geneva: WHO, 1997.
509. World Health Organization. The World Health Report 2001. Geneva: WHO, pp:19-45, 2001.
510. Yu, Y., Lundeberg, T., Yu, L.C. Role of calcitonin gene-related peptide and its antagonist on the evoked discharge frequency of wide dynamic range neurons in the dorsal horn of the spinal cord in rats. *Regul. Pept.* 103:23-37, 2002.
511. Zagami, A.S., Edvinsson, L., Goadsby, P.J. Pituitary adenylate cyclase activating polipeptide and migraine. *Ann. Clin. Trans. Neurol.* 1:1036-1040, 2014.
512. Zagami, A.S., Edvinsson, L., Hoskin, K.L., Goadsby, P.J. Stimulation of the superior sagittal sinus causes extracranial release of PACAP. *Cephalalgia* 15:109, 1995.
513. Zagami, A.S., Goadsby, P.J., Edvinsson, L. Stimulation of the superior sagittal sinus in the cat causes release of vasoactive peptides. *Neuropeptides* 16:69-75, 1990.
514. Zeigler, D.W., Hur, Y.M., Bouchard, T.J. Migraine in twins raised together and apart. *Headache* 38:417-422, 1998.
515. Zhang, E.T., Mikkelsen, J.D., Fahrenkrug, J. Prepro-vasoactive intestinal polipeptide-derived peptide sequences in cerebral blood vessels of rats: on the functional anatomy of metabolic autoregulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11:932-938, 1991.
516. Ziegler, D.K., Hassanein, R.S. Specific headache phenomena: their frequency and coincidence. *Headache* 30:152-156, 1990.
517. Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110, 1983.
518. Zimmermann, K., Reeh, P.W., Averbeck, B. 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, 2002.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

1. 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. IF: 2.250
2. **Tajti, J.**, Möller, S., Uddman, R., Bódi, I., Edvinsson, L. The human superior cervical ganglion: neuropeptides and peptide receptors. *Neuroscience Letters* 263:121-124, 1999. IF: 2.085
3. **Tajti, J.**, Uddman, R., Möller, S., Sundler, F., Edvinsson, L. Messenger molecules and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *Journal of Autonomic Nervous System* 76:176-183, 1999. IF: 1.206
4. Uddman, R., **Tajti, J.**, Möller, S., Sundler, F., Edvinsson, L. Neuronal messengers and peptide receptors in the human sphenopalatine and otic ganglia. *Brain Research* 826:193-199, 1999. IF: 2.302
5. Mezei, Zs., Kis, B., Gecse, Á., **Tajti, J.**, Boda, B., Telegdy, G., Vécsei, L. Platelet arachidonate cascade of migraineurs in the interictal phase. *Platelets* 11:222-225, 2000. IF: 0.965
6. **Tajti, J.**, Uddman, R., Edvinsson, L. Neuropeptide messengers in the migraine generator region of the human brainstem. *Cephalgia* 21:96-101, 2001. IF: 3.502
7. Hou, M., Kanje, M., Longmore, J., **Tajti, J.**, Uddman, R., Edvinsson, L. 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors in the human trigeminal ganglion: co-localization with calcitonin gene-related peptide, substance P and nitric oxide synthase. *Brain Research* 909:112-120, 2001. IF: 2.489
8. Benedek, K., **Tajti, J.**, Janáky, M., Vécsei, L., Benedek, G. Spatial contrast sensitivity of migraine patients without aura. *Cephalgia* 22:142-145, 2002. IF: 3.775
9. Uddman, R., **Tajti, J.**, Hou, M., Sundler, F., Edvinsson, L. Neuropeptide expression in the human trigeminal nucleus caudalis and in the cervical spinal cord C1 and C2. *Cephalgia* 22:112-116, 2002. IF: 3.775
10. Hou, M., Uddmann, R., **Tajti, J.**, Edvinsson, L. Nociceptin immunoreactivity and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *Brain Research* 964:179-186, 2003. IF: 2.474
11. 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. *Neuroendocrinology Letters* 24:423-428, 2004. IF: 1.048
12. 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 Research* 1173:6-13, 2007. IF: 2.218
13. Eftekhari, S., Salvatore, C.A., Calamari, A., Kane, S.A., **Tajti, J.**, Edvinsson, L. Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and calcitonin gene-related peptide receptor components (calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying protein 1) in the human trigeminal ganglion. *Neuroscience* 169:683-696, 2010. IF: 3.215
14. **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. *Cephalgia* 31:95-105, 2011. IF: 3.430

15. Csáti, A., **Tajti, J.**, Kuris, A., Tuka, B., Edvinsson, L., Warfvinge, K. Distribution of VIP, PACAP, NOS and their receptors in human and rat sphenopalatine ganglion. *Neuroscience* 202:158-168, 2012. IF: 3.122
16. Csáti, A., **Tajti, J.**, Tuka, B., Edvinsson, L., Warfvinge, K. Calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human sphenopalatine ganglion - interaction with the sensory system. *Brain Research* 1435:29-39, 2012. IF: 2.879
17. Tuka, B., Helyes, Zs., Markovics, A., Bagoly, T., Németh, J., Márk, L., Brubel, R., Reglódi, 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. IF: 2.522
18. Tuka, B., Helyes, Zs., Markovics, A., Bagoly, T., Szolcsányi, J., Szabó, N., Tóth, E., Kincses, T., Vécsei, L. **Tajti, J.** Alterations in PACAP-38-like immunoreactivity in the plasma during ictal and interictal periods of migraine patients. *Cephalalgia* 33:1085-1095, 2013. IF: 4.121

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A tudományos munka szépségére egyetemi hallgatóként és kezdő orvosként Prof. Csillik Bertalan, Dr. Knyihár Erzsébet, Prof. Engelhardt József és Prof. Stanley H. Appel el nem felejthető módon hívták fel a figyelmemet.

Az önálló munkám kibontakoztatásához minden segítséget megadva, saját tevékenységét példaként adva köszönöm Prof. Vécsei László akadémikusnak, intézevezetőmnek az előrevivő folyamatos támogatását. Meghatározó szakmai élményt és kihívást adott Prof. Lars Edwinsson Svédország lundi laboratóriumában Prof. Rolf Uddman és Prof. Karin Warfvinge irányításával eltöltött időszak, és a jelenlegi együttgondolkodás, mely hálára készítet. Köszönöm Dr. Szok Délia segítő barátságát. Köszönöm Prof. Helyes Zsuzsanna, Prof. Szolcsányi János akadémikus, Sajede Eftekhari Ph.D., Dr. Mezei Zsófia, Dr. Rajda Cecília, Dr. Benedek Krisztina, Dr. Kuris Anikó, Dr. Csáti Anett, Dr. Tuka Bernadett együttes munkáját és minden társszerzőm közös erőfeszítéseit. Köszönöm volt és jelenlegi Ph.D. hallgatóimnak Dr. Tuka Bernadett, Dr. Csáti Anett, Dr. Majláth Zsófia, Dr. Lukács Melinda hasznos tevékenységét. Köszönöm Kállai Éva gondos titkárnői munkáját. A SZTE ÁOK Neurológiai Klinika munkatársainak és betegeinek köszönettel tartozom, hogy hozzájárultak céljaim megvalósításához. Köszönöm szüleim gondoskodó támogatását, testvérem és családjának figyelmét, feleségem szüleinek segítségét. Köszönöm gyermekeimnek Jánosnak és feleségének Anettnek, Máténak, feleségemnek Ilonának megértő szeretetét.