

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A SZENZITIZÁCIÓ MIGRÉNBEN ÉS ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLEIBEN



Dr. Párdutz Árpád

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

SZENT-GYÖRGYI ALBERT ORVOSTUDOMÁNYI KAR

NEUROLÓGIAI KLINIKA

2023

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	4
2. CÉLKITŰZÉSEK	5
3. A MIGRÉN ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLJEINEK VIZSGÁLATA	6
3.1. A NTG adása, mint a migrén állatkísérletes modellje.....	6
3.1.1. c-fos és nNOS expressziójának változása patkány TNC-ben NTG adása után	6
3.1.2. A TNC-be futó afferensek CGRP tartalmának változása patkányban NTG adása után	7
3.1.3. 5HT és 5HTT megjelenése patkány TNC-ben NTG adása után	8
3.1.4. A CamKII expressziója patkány TNC-ben NTG adása után.....	9
3.1.5. TRPV1, NFkB, COX2 megjelenése patkány TNC-ben NTG adása után.....	10
3.1.6. A kinurenin útvonal a fejfájás NTG modelljében.....	11
3.2. Orofaciális formalin, mint a fejfájás állatkísérletes modellje	12
3.2.1. A viselkedés vizsgálata patkány orofaciális formalin modelljében	12
3.2.2. CGRP expresszió patkány TNC-ben orofaciális formalin adása után.....	13
3.2.3. c-fos és nNOS megjelenése a másodlagos trigeminális neuronok területén	13
3.3. A Gasser dúc elektromos ingerlése, mint a migrén állatkísérletes modellje	14
3.3.1. c-fos megjelenése a Gasser dúc elektromos ingerlése után	14
3.4. A dura kémiai ingerlésének hatása patkányban.....	16
3.4.1. c-fos vizsgálata a dura kémiai ingerlése után patkány TNC-ben	16
3.4.2. A CGRP, TRPV1 és nNOS patkány TNC-ben durális IS ingerlés után.....	18
4. MODULÁCIÓ LEHETŐSÉGE A MIGRÉN ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLJEIBEN	19
4.1. COX gátlás hatása a migrén NTG modelljében	19
4.2. Szumatriptán hatása a NTG modellben.....	20
4.3. Szumatriptán hatása a durális IS modellben	21
4.4. Krónikus ösztadiol hatása a NTG modellben.....	22
4.5. A krónikus ösztadiol kezelés hatása az orofaciális formalin modellben	24
4.6. KYNA moduláló hatása a NTG modellben	26
4.7. KYNA moduláló hatása a durális IS modellben.....	27
4.8. Kinureninek és nemi hormonok hatása a CSD kialakulásában	28
4.9. Kinurenin származékok hatása a fejfájás NTG modelljében.....	32
4.10. Az anandamid moduláló hatása patkányban szisztémás NTG adása után.....	35
5. ÖSSZEGZÉS (ÚJ EREDMÉNYEK, MEGÁLLAPÍTÁSOK).....	38
6. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT SZOLGÁLTATÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	40
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	41
8. IRODALOMJEGYZÉK	42
9. TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK.....	51

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5HIA – 5-hidroxi indolecetsav
5HT – szerotonin
5HTT – szerotonin transzporter
AEA – N-arachidonil-etanolamid, anandamid
AMPA – 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav
CamKII – kalmodulin-függő protein kináz II
CB – kannabinoid receptor
CFA – complete Freund adjuváns
cGMP – ciklikus guanozin-monofoszfát
CGRP – kalcitonin génrelációs peptid
COX – ciklooxygenáz
COX1 – ciklooxygenáz-1
COX2 – ciklooxygenáz-2
CSD – tovaterjedő kérgi gátlás/cortical spreading depression
DR – dorzális raphe mag
FHM1 – familiáris hemiplégiás migrén 1
GABA – gamma-amino vajsav
GPR30 – G-protein kapcsolt ösztrogén receptor
GPR35 – G-protein kapcsolt receptor 35
HPLC – nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
IDO – indolamin 2,3 dioxigenáz
IR – immunoreaktív
IS – inflammatory soup/„gyulladásos leves”
KAT – kinurenin aminoszferáz
KATII – kinurenin aminoszferáz 2
KMO – kinurenin monoxigenáz
KYNA – kinurénsav
KYNU – kinurenináz
LC – locus ceruleus
lys-ASA – lizil-acetil-szalicilát
L-KYN – kinurenin
nAChR – $\alpha 7$ nikotinos acetilkolin receptor
NFkB – nukleáris faktor kappa B
NMDA – N-metil-d-aszpartát
NO – nitrogén-monoxid
NOS – nitrogén-oxid szintáz
nNOS – neuronális nitrogén-oxid szintáz
NRM – nucleus raphe magnus
NSAID – nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek/non-steroid antiinflammatory drugs
NTG – nitroglicerín
OVX – ovariectomián átesett állatok
OVX+E₂ – ovariectomizált, ösztradiol kezelt állatok
OVX-Form – ovariectomizált állatok, melyek bajuszpárnájukba formalin injekciót kaptak
OVX+E₂-Form – ovariectomizált, ösztradiol kezelt állatok, melyek bajuszpárnájukba formalin injekciót kaptak

OVX-Phys – ovariektomizált állatok, melyek bajuszpárnájukba fiziológiás sóoldat injekciót kaptak (kontroll csoport)
OVX+E₂-Phys – ovariektomizált, ösztradiol kezelt állatok, melyek bajuszpárnájukba fiziológiás sóoldat injekciót kaptak (kontroll csoport)
PAG – periaqueductalis szürkeállomány
PGE₂ – prosztaglandin E₂
PROB – probenecid
s.c. – subcutan
SIF – szintetikus intersticiális folyadék
SZR81 – N-(2-N-pirrolidiniletíl)-4-oxo-1H kvinolin-2-karboxamid hidroklorid/szintetikus kinurénsav analóg
TDO – triptofán 2,3 dioxigenáz
TG – trigeminális ganglion/Gasser-dúc
TNC – kaudális trigeminális mag
TRPV1 – tranziens receptor potenciál vanilloid 1

1. BEVEZETÉS

A fejfájásbetegségek patomechanizmusának pontos megértéséhez alapvető fontosságúak az állatkísérletes modellek. Sajnos egy modell sem tudja maradéktalanul leképezni a fejfájások során lezajló összes változást, de mégis sokszor segíthetnek a kórfolyamatok tisztázásában. A szenzitizáció következménye az idegrendszer feldolgozó funkciójának megváltozása, mely a fejfájásbetegségek esetén a fájdalmas és nem fájdalmas ingerekre adott abnormális válaszban nyilvánul meg. Ezek a jelenségek a trigeminális aktivációval egyetemben, több primer fejfájásban tetten érhetőek akár a klinikai kép tekintetében (lűktető fejfájás, allodynia) vagy funkcionális/elektrofiziológiai vizsgálatokkal. A fejfájások kezelésében kiemelt jelentőségű a trigeminális aktiváció csökkentése, de az utóbbi időben fokozott hangsúlyt kapott a szenzitizáció folyamata, hisz megjelenése lényegesen befolyásolhatja a klinikai képet és a kezelés hatásosságát. A fentiek miatt különösen fontos az aktivációs és szenzitizációs folyamatokban részt vevő molekulák vizsgálata az állatkísérletes modellekben.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink célja az volt, hogy a migrén több állatkísérletes modelljében feltérképezzük a trigeminális aktiváció és szenzitizáció folyamatát különféle markerek segítségével. Ezt követően vizsgáljuk egyes, különböző támadáspontú molekulák ezekre gyakorolt modulációs hatását, és ezáltal betekintést nyerünk a migrénes roham alatt kialakuló változások kórfolyamatába.

2.1. Különböző aktivációs és szenzitizációs markerek vizsgálata a patkány trigeminális rendszerében a NO donor NTG szisztémás adását követően

- 2.1.1. A neuronális aktivitást jelző c-fos protein és a NO endogén szintézisében szerepet játszó nNOS expressziójának változása a TNC területén.
- 2.1.2. A primer trigeminális afferensek centrális nyúlványaiban megjelenő CGRP mennyiségének mérése.
- 2.1.3. A TNC területén expresszálandó 5HT tartalmú rostok és a 5HTT változásának vizsgálata.
- 2.1.4. A CamKII expressziójának mérése a TNC területén.
- 2.1.5. A TRPV1, NFkB, COX2 megjelenésének vizsgálata a TNC-ben.
- 2.1.6. A kinurenin útvonal főbb enzimei változásának vizsgálata ebben a modellben.

2.2. Orofaciális formalin modell hatásának vizsgálata a trigeminális rendszerre patkányban

- 2.2.1. A viselkedés jellegzetességeinek vizsgálata a fenti modellben.
- 2.2.2. CGRP expresszió követése patkány TNC-ben orofaciális formalin adása után.
- 2.2.3. c-fos és nNOS megjelenése a másodlagos trigeminális neuronok területén ugyanebben a modellben.

2.3. A Gasser dúc elektromos ingerlése, mint a trigeminális aktiváció állatkísérletes modellje

- 2.3.1. c-fos expresszió megjelenésének feltérképezése a trigeminális rendszerben és a migrénben szerepet játszó agytörzsi struktúrákban a Gasser-dúc elektromos ingerlése után patkányban.

2.4. A dura kémiai ingerlésének vizsgálata, mint trigeminális aktivációs modell vizsgálata patkányban

- 2.4.1. Az IS és CFA durális hatása a TNC c-fos expresszióra.
- 2.4.2. Durális IS hatása a CGRP, TRPV1 és nNOS megjelenésére a TNC területén.

2.5. Moduláció lehetősége a migrén állatkísérletes modelljeiben

- 2.5.1. A COX gátlás hatása a NTG modellben a TNC nNOS és CamKII expressziójára.
- 2.5.2. Szumatriptán hatása a NTG modellben.
- 2.5.3. Szumatriptán hatása a durális IS modellben.
- 2.5.4. Krónikus ösztadiol hatása a NTG modellben.
- 2.5.5. A krónikus ösztadiol kezelés hatása az orofaciális formalin modellben.
- 2.5.6. A KYNA moduláló hatása a NTG modellben.
- 2.5.7. A KYNA moduláló hatása a durális IS modellben.
- 2.5.8. Kinureninek és nemi hormonok hatása a CSD kialakulásában.
- 2.5.9. Kinurenin származékok hatása a fejfájás NTG modelljében.
- 2.5.10. Az anandamid moduláló hatása patkányban szisztémás NTG adása után.

3. A MIGRÉN ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLJEINEK VIZSGÁLATA

3.1. A NTG adása, mint a migrén állatkísérletes modellje

A nitrogén-monoxid (NO) donor nitroglicerin (NTG) az orvoslásban régóta alkalmazott gyógyszer az angina pectoris, a szívinfarktus és a szívelégtelenség kezelésére (Marsh és Marsh 2000). Ezt a molekulát különösen érdekessé teszi, hogy sokszor gyorsan kifejlődő fejfájást okoz a pácienseknél (Iversen és mtsai., 1989). Függetlenül a NTG beadási módjától, a gyorsan kialakuló fájdalom után órákkal erős, aura nélküli migrénre jellemző fejfájás jelentkezik kizárólag a migrénben szenvedő betegeknél, melynek időtartama jóval hosszabb (Sicuteri és mtsai., 1987, Sances és mtsai., 2004) és jól reagál a migrén rohamkezelésében alkalmazott szerotonin (5HT) agonista triptánokra (Iversen és Olesen 1996). Emiatt vetődött fel a NTG alkalmazása, mint több szempontból érdekes és ígéretes migrén modell. A NTG-el kapcsolatos humán vizsgálatok eredményei felvetették a lehetőségét annak, hogy kísérleti állatoknak NTG-t adva a migrénnek megfelelő eltérések jelentkezhetnek (Tassorelli és Joseph 1995, Tassorelli és mtsai., 1999), így a módszer széles körben alkalmazott migrén modell lett, melyet elsősorban rágcsálókra alkalmaznak, hogy reprodukálják a migrén alatt zajló változásokat. Az alkalmazott dózis széles tartományban változik, de a legelfogadottabb a 10 mg/kg NTG parenteralis adása, mely egérben és patkányban is megfelelő.

3.1.1. c-fos és nNOS expressziójának változása patkány TNC-ben NTG adása után

Háttér

A NO egy gáz állagú neurotranszmitter, mely könnyedén átjut a sejtmembránokon, és endogén szintézise L-argininből a nitrogén-oxid szintáz (NOS) révén történik. Ez az enzim három izoformában létezik a szervezetben: a neuronális (nNOS), az endothelialis és az indukálható. A nNOS jelen van a gerincvelő hátsó szarvában, és a fájdalomérzés mellett szerepet játszik a hiperalgéria kialakulásában és az érző neuronok szenzitizációjában (Saito és mtsai., 1994, Lin és mtsai., 1999). Kísérleti állatok végtagjába adott subcutan (s.c.) formalin megemeli a megfelelő spinális dorzális szegmentum nNOS és c-fos expresszióját (Hunt és mtsai., 1987, Lam és mtsai., 1996), és ez utóbbi emelkedése kivédhető NOS inhibitor alkalmazásával, mely az NO kiemelt szerepére utal a nociceptív feldolgozás során (Wang és mtsai., 1999, Wu és mtsai., 2000).

A nNOS megtalálható a durális hízósejtekben, a trigeminális idegvégződésekben (Berger és mtsai., 1994), a Gasser-dúcban (TG) (Zhang és mtsai., 1996) és a kaudális trigeminális mag (TNC) területén is (Dohrn és mtsai., 1994). A NO donor NTG késleltetett rohamot vált ki migréneseiben (Sicuteri és mtsai., 1987) és aktiválja a trigeminális rendszert kísérleti állatokban (Tassorelli és Joseph 1995), ezáltal kiválóan modellezheti a betegséget. Késleltetett hatása arra utal, hogy a jelenség nem közvetlenül a NTG révén, hanem indirekt módon alakul ki. Ebben a folyamatban a NO perifériás és centrális hatása egyaránt lehetséges, melyben a nNOS szerepet kaphat.

Anyag és módszer

Felnőtt hím Wistar patkányok egyszeri s.c. NTG injekciót kaptak 10 mg/kg dózisban. Négy órával később az állatokat perfundáltuk, a TNC-t és a Th1 gerincvelői szegmentumot eltávolítottuk nNOS és c-fos immunhisztokémiai és nNOS Western blot vizsgálatok céljából. A gerincvelői sorozat metszetek I-III rétegében látható nNOS és c-fos immunoreaktív (IR) sejteket megszámoltuk.

Eredmények

A TNC területén elvéve találtunk c-fos pozitív sejteket, viszont elég nagy számban észleltünk nNOS jelölődésű neuronokat, és NTG hatására mindkettő sejtípus száma szignifikánsan megemelkedett a TNC-ben. A torakális gerincvelő magasságában viszont nem észleltünk ilyen változást. A Western blot eredmények párhuzamba állíthatók az immunkhisztokémiával. A nNOS protein expressziója megemelkedett ugyanitt NTG adása után, de nem változott a Th1 szegmentumban.

Megfigyeléseink jelentősége

A NTG több órás latenciával megemeli a TNC nNOS expresszióját. Emellett újra igazoltuk, hogy a neuronális aktiváció markerének tekinthető c-fos is megnövekedett hasonló lokalizációban. A hatás szelektívnek tűnik a TNC-re, hisz nem láttunk változást a háti gerincvelő magasságában. A TNC megnövekedett nNOS immunreaktivására a legvalószínűbb magyarázat az indirekt hatás az elsődleges trigeminális érző rostok fokozott aktivitása következtében. A NTG képes a meningeális nociceptorok aktiválására (Knyihár-Csillik és Vécsei 1999) és ismert, hogy a NTG c-fos emelő hatása megszűnik, ha a kísérleti állatok kapszaicin előkezelést kapnak, mely elpusztítja a nociceptív A δ és C rostokat (Tassorelli és mtsai., 1997), és hasonló moduláló hatással bír a NOS inhibitor előzetes adása is (Wu és mtsai., 2000).

Eredményeink fontosak lehetnek a migrénes fájdalom megértésében. A TNC-ben megemelkedett nNOS magasabb helyi NO szintet eredményezhet, mely más neurotranszmitterek révén felelős lehet a c-fos emelkedésért és a centrális szenzitizáció kialakulásáért. Ezen hatások szelektívnek tűnnek a trigeminális rendszerre, azaz a trigeminális és perifériás nocicepció folyamatában különbségek lehetnek. A NO indukált nNOS emelkedés egy önerősítő folyamathoz vezethet, mely illeszkedik a NTG késleltetett migrént okozó hatásához, és részjelensége lehet a másodlagos trigeminális érző neuronok centrális szenzitizációs folyamatának, melyet migrénesekben is leírtak (Burstein és mtsai., 2000).

3.1.2. A TNC-be futó afferensek CGRP tartalmának változása patkányban NTG adása után

Háttér

A kalcitonin génrelációs peptid (CGRP) a fájdalomérzés kulcsfontosságú neurotranszmittere, mely NO közvetítése révén is felszabadulhat a terminálisokból (Garry és mtsai., 2000) és koncentrációja megemelkedik a jugularis vénában migrénes roham kapcsán (Goadsby és mtsai., 1990). A migrén egyik állatkíséreltes modelljében, a TG elektromos ingerlésekor, mely vazodilatációt és plazma extravazációt okoz a durában (Buzzi és Moskowitz 1992), az itt elhelyezkedő CGRP tartalmú rostok morfológiai változáson mennek keresztül (Knyihár-Csillik és mtsai., 1995). Ezeket, a CGRP-t érintő változásokat mind migrénesekben, mind kísérleti állatokban ki lehet védeni 5HT_{1B/D} agonista triptánok adásával (Knyihár-Csillik és mtsai., 2000, Goadsby és Edvinsson 1993).

Anyag és módszer

Felnőtt hím Wistar patkányok egyszeri s.c. NTG injekciót kaptak 10 mg/kg dózisban. Négy órával ezután az állatokat perfundáltuk, a TNC-t és a Th1 gerincvelői szegmentumot eltávolítottuk CGRP immunkhisztokémia céljából. A CGRP pozitív rostok által borított területet képanalizátorral határoztuk meg. Nagyobb nagyítást alkalmazva vizsgáltuk a terminálisokban elhelyezkedő szinaptikus boutonok méretét is.

Eredmények

A TNC-ben és Th1 gerincvelő hátsó szarvában gazdag CGRP pozitív rostfestődést figyeltünk meg. Az előbbiben a CGRP jelölődést mutató végződés által borított terület szignifikánsan kisebb volt 4 órával a NTG adása után. A Th1 magasságában ez a különbség nem mutatkozott. A szinaptikus boutonok mérete szignifikánsan csökkent a NTG kezelés után a TNC területén, míg ez a paraméter sem mutatott változást a Th1 szinten.

Megfigyeléseink jelentősége

A nNOS kapcsán észlelt változásokhoz hasonlóan (Párdutz és mtsai., 2000) a NTG szelektíven képes befolyásolni a TNC CGRP expresszióját. Állatkísérletekben magasabb turnover és fokozott CGRP felszabadulás jelentkezik lokális gyulladás (Sluka és mtsai., 1992), formalin (Zhang és mtsai., 1994), illetve kapszaicin (Garry és mtsai., 2000) adását követően a megfelelő gerincvelői szegmentumban. Ezen eredményeink alapján fokozódó transzmitter felszabadulás feltételezhető a végződésekből, melyet a NO mediált A δ és C rost aktiváció okoz. Ezt a feltételezést támogatja a boutonok méretcsökkenése is NTG adását követően. Hasonló jelenséget lehet tapasztalni a dura CGRP tartalmú rostjaiban a TG elektromos ingerlésénél (Knyihár-Csillik és mtsai., 2000).

3.1.3. 5HT és 5HTT megjelenése a patkány TNC-ben NTG adása után

Háttér

A szerotoninerg mechanizmusok alapvetőek mind a nocicepció szabályozásában (Roberts 1984, Fasmer és mtsai., 1985), mind a migrén patogenezésében (Sicuteri 1972, Ferrari és mtsai., 1989). Migrénes rohamok után a vizelet 5-hidroxi indolecetsav (5HIAA) tartalma megemelkedhet (Deanovic és mtsai., 1975), és egyes vizsgálatok a roham alatt magasabb plazma 5HT és alacsony 5HIAA szintet találtak, míg a rohamok között ez visszajára fordult, alacsony plazma 5HT mellett megemelkedett a 5HIAA szintje (Ferrari és mtsai., 1989, Humphrey 1991). A szerotonin transzporter (5HTT) felelős a 5HT visszavételéért a szinaptikus részből, ezáltal csökkenti az utóbbi hatását. Migrénesekben a vérlemezék 5HTT mennyisége alacsony (Geaney és mtsai., 1984), az agytörzs területén viszont emelkedett expressziót mutattak ki ezekben a betegekben (Schuh-Hofer és mtsai., 2007).

Anyag és módszer

Felnőtt hím Wistar patkányok egyszeri s.c. NTG injekciót kaptak 10 mg/kg dózisban. Négy óra elteltével az állatokat perfundáltuk és a TNC-t eltávolítottuk 5HT és 5HTT immunhisztokémiai és Western blot vizsgálatok céljából. A 5HT esetében a Th1 gerincvelői mintákat is vizsgáltuk. Mindkét esetben a pozitív rostok által borított területet képanalizátorral elemeztük. Nagyobb nagyítást alkalmazva analizáltuk a terminálisokban elhelyezkedő pozitív varikozitások méretét is.

Eredmények

A TNC-ben jelentős mennyiségű 5HT és 5HTT pozitív rost észlelhető, melyek eloszlása - nem meglepően - nagyfokú hasonlóságot mutat. A TNC-ben mind a 5HT, mind a 5HTT jelölődést mutató végzések által borított terület szignifikánsan megemelkedett 4 órával a NTG adása után, ill. a 5HTT pozitív varikozitások mérete is növekedett, míg a 5HT-IR boutonok mérete nem változott. A Th1 magasságában 5HT esetében nem okozott változást a NTG. A Western blot vizsgálatok szignifikáns 5HTT expresszió növekedést mutattak a TNC területén NTG adását követően.

Megfigyeléseink jelentősége

A 5HT TNC-re lokalizált emelkedése NTG után igen érdekes eredmény annak tükrében, hogy a legtöbb ilyen végződés a felsőbb agyi központok leszálló rostjaiból származik. A magasabb expresszió ez esetben feltehetőleg a csökkent felszabadulás következménye lehet. A NTG kétféle módon befolyásolhatja a TNC 5HT tartalmát: lehetséges, hogy közvetlenül helyileg hatva modulálja a 5HT terminálisokat vagy indirekt módon befolyásolja a felsőbb szerotoninerg magvakat. Formalin adása után megemelkedik a 5HT anyagcsere mind a gerincvelő megfelelő szegmentumában, mind a nucleus raphe magnusban (Puig és mtsai., 1992), ugyanakkor a karragenin okozta gyulladás is 5HT emelkedést okozott a gerincvelőben és a periaqueductalis szürkeállományban (PAG) (Zhang és mtsai., 2000). Érdekes módon most is szelektív hatást észleltünk, hisz nem volt változás a Th1 magasságában. Ennek a szelektivitásnak a pontos okát még nem ismerjük, de feltehetőleg a trigeminális A δ és C nociceptív rostok egyedi receptorpopulációjának (pl. a 5HT_{1B/1D} receptorok) köszönhető. A szisztémás NTG adás a 5HTT expresszióját is megemelte a TNC területén. Az előző adatokkal együtt értelmezve elképzelhető, hogy fokozott turnover állhat a jelenség mögött. Jól ismert a kapcsolat a NO és a szerotoninerg neurotranszmisszó vonatkozásában (Miller és Hoffmann 1994, Zhu és mtsai., 2004), és egyes kísérletek felvetik a reciprok kapcsolatot a két rendszer között (Chanrion és mtsai., 2007). A migrénes auráért felelős tovaterjedő kérgi gátlás (CSD) (Hadjikhani és mtsai., 2001) okozta 5HT depléciót részben NO mediált folyamatnak tartják (Saengjaroenatham és mtsai., 2005).

3.1.4. A CamKII expressziója patkány TNC-ben NTG adása után

Háttér

A kalmodulin-függő protein kináz II (CamKII) az idegrendszer teljes területén megtalálható és részt vesz az intracelluláris tér Ca⁺⁺ koncentrációjának szabályozásában (Hudmon és mtsai., 2002). Képes autofoszforilációra (Yang és mtsai., 1999), mely önnön aktivitását erősíti, és így kulcsszerepet játszik pl. a hippocampus sejtjeinek elhúzódó potenciációjában (Havik és mtsai., 2003). A CamKII az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorokhoz kötődve megemeli az NMDA és a 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav (AMPA) receptorokon átáramló kationok mennyiségét a patkány gerincvelő hátsó szarvában (Kolaj és mtsai., 1996), ahol szerepet játszhat a centrális szenzitizáció kialakításában. Mind a kapszaicin, mind a s.c. adott formalin megemeli az enzim expresszióját a megfelelő gerincvelői hátsó szarv területén (Fang és mtsai., 2002, Liang és mtsai., 2004), azaz vizsgálata releváns lehet a NTG modellben.

Anyag és módszer

Felnőtt hím Wistar patkányok egyszeri s.c. NTG injekciót kaptak 10 mg/kg dózisban. 4 órával az injekciók adása után az állatokat perfundáltuk, a TNC-t és a Th1 gerincvelőt eltávolítottuk, és CamKII immunhisztokémiai és Western blot vizsgálatokat végeztünk.

Eredmények

A TNC-ben jelentős mennyiségű CamKII pozitív sejt található. NTG adását követően szignifikánsan megemelkedett a festődést mutatott sejtek száma és a protein expresszió. A Th1 szintjében nem volt változás ezekben a paraméterekben.

Megfigyeléseink jelentősége

A NTG a c-fos és nNOS expresszióra gyakorolt hatásához hasonlóan (Párdutz és mtsai., 2000) megemelte a CamKII mennyiségét a TNC területén, és itt is ugyanazt a szelektivitást találtuk, mint az előző

kísérletekben, azaz a változás nem jelent meg a Th1 gerincvelői magasságban. A NTG-ből keletkező NO a trigeminális nociceptív afferensek révén hozhatja létre ezt a hatást (Tassorelli és mtsai., 1997). Sok egyéb funkciója mellett a CamKII kiemelt szerepet játszik az érző működésben és a fájdalomérzésben: a hátsó gyöki ganglionsejtek és különösen a TG sejtek többsége CamKII pozitivitást mutat (Ichikawa és mtsai., 2004). Emellett a trigeminális ganglionsejtek kapszaicin okozta hiperexcitabilitása is részben CamKII modulált folyamat: az A típusú K^+ áramok csökkenése (Liu és Simon 2003) és a vanilloid receptorok foszforilációjának révén (Jung és mtsai., 2004), ill. rágcsálókban a CamKII többfajta adenilát ciklázot aktivál, melyek mind részt vehetnek a gerincvelői szintű centrális szenzitizációs folyamatokban (Wei és mtsai., 2006). Eredményeink arra utalnak, hogy a CamKII részt vesz a NO okozta trigeminális szenzitizáció folyamatában és ezáltal szerepet játszhat a migrén patogenezisében is.

3.1.5. TRPV1, NFkB, COX2 megjelenése a patkány TNC-ben NTG adása után

Háttér

A tranzies receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) a fájdalomérzés egyik fontos integrátora, ami jelentős mértékben expresszálódik a gerincvelőben, és a fizikai és kémiai nocicepció egyik integrátorának tekinthető (Tominaga és mtsai., 1998). A NO képes a TRPV1 aktivációjára, és ezáltal megemeli az intracelluláris Ca^{++} szintet (Miyamoto és mtsai., 2009, Pan és mtsai., 2013). A nukleáris faktor kappa B (NFkB) - a minden állati sejtben kifejeződő, a DNS transzkripciót és a sejt túlélését szabályozó komplex molekula - komoly szereplő a gyulladással kapcsolatos folyamatok kialakulásában, mivel hatással van több citokin expressziójára, melyek igazoltan szerepet játszanak a fájdalom és a hiperalgéria kialakulásában (Kress és mtsai., 1996). A ciklooxygenáz-2 (COX2) szintén megtalálható a gerincvelői hátsó szarv területén, részt vesz a nociceptív feldolgozásban (Beiche és mtsai., 1998, Mazario és mtsai., 2001), és szintje megemelkedik a TNC területén az orofaciális fájdalominger alkalmazásakor (Gao és mtsai., 2010).

Anyag és módszer

Felnőtt hím Wistar patkányok egyszeri s.c. NTG injekciót kaptak 10 mg/kg dózisban. 4 órával az injekciók adása után az állatokat perfundáltuk, a TNC-t eltávolítottuk, és TRPV1 és NFkB immunhisztokémiai, valamint COX2 Western blot vizsgálatokat végeztünk.

Eredmények

A NTG egyaránt megemelte a TRPV1, a COX2 és a NFkB expresszióját a TNC területén.

Megfigyeléseink jelentősége

Az észlelt változások beleilleszthetők a modellünkben lezajló trigeminális aktiváció és szenzitizáció folyamatába, és a jelenségek markerének tekinthetők. A gerincvelőben expresszálódó TRPV1 funkciója is szorosan kapcsolódik a perifériás és centrális szenzitizáció jelenségéhez (Saloman és mtsai., 2013), melyet lényegesen csökkent ezen receptor blokkolása (Kim és mtsai., 2014). Korábban ismert, hogy a NO donorok képesek a TRPV1 expresszió megemelésére különböző sejt típusokban (Miyamoto és mtsai., 2009, Leonelli és mtsai., 2013), és a gyulladással kapcsolatos fájdalom kapcsán is hasonló eredményre jutottak (Ji és mtsai., 2002, Kao és mtsai., 2012). Ezek alapján a NTG hatása indirektnek tűnik: neurogén gyulladást alakíthat ki, és a keletkező mediátorok, pl. 5HT és bradykinin hatására jöhet létre a TRPV1 emelkedés (Strassman és mtsai., 1996). A gyulladás okozta TRPV1 expresszió növekedést számos kísérlet alátámasztja: ilyen hatású többek között az interleukin-1 és 6 (Malek és mtsai., 2015), valamint a complete Freund adjuváns (CFA) adása (Amaya és mtsai., 2003). A CGRP szisztémás adása is képes a

TRPV1 expresszióját fokozni a patkány TG-ban, azaz a gyulladáshoz vezető folyamatok mellett ez a direkt hatás is szerepet játszhat az észlelt változások létrejöttében (Chatchaisak és mtsai., 2013).

Eredményeink szerint a NO képes a NFkB szintjét is megemelni a TNC területén, melyhez hasonló hatást tudtak kimutatni korábban a durában is (Reuter és mtsai., 2002). A NFkB útvonal aktiválódása a mi esetünkben a NTG direkt hatása következtében vagy a kialakuló durális gyulladás kapcsán indirekt módon alakulhat ki. A jelenség mind a TRPV1, mind a nNOS részvételével létrejöhet: a TRPV1-en keresztül beáramló Ca^{++} befolyásolhatja a NFkB funkcióját (Sappington és mtsai., 2008). Másrészt az is feltételezhető, hogy a megemelkedett nNOS fokozza a NFkB aktivitását (Parohova és mtsai., 2009). Ezek alapján a NFkB fontos eleme a NTG okozta trigeminális aktiváció és szenzitizáció folyamatának.

A vizsgálatainkban észlelt NTG okozta COX2 emelkedés létrejöhet a NFkB útvonalon keresztül, melyről ismert, hogy képes emelni a COX2 expresszióját (Lee és mtsai., 2004). A ciklooxygenáz (COX) aktivitás megemelkedik makrofágokban és fibroblasztokban NO hatására (Salvemini és mtsai., 1993), emellett a COX2 gátlás kivédi a NTG okozta c-fos aktivációt a TNC-ben (Tassorelli és mtsai., 1997). Közismert, hogy a nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek, melyek hatásukat COX, és ezen belül elsősorban a COX2 izoforma gátlása révén érik el (Yaksh és mtsai., 2001), kiválóan alkalmasak a migrénes rohamok kezelésére (Párdutz és mtsai., 2010). A saját kísérleteink mellett egyéb adatok is arra utalnak, hogy a COX2 alapvető szerepet játszik a trigeminális aktivációs és szenzitizációs folyamatokban, amit az is megerősít, hogy COX2 emelkedést lehet detektálni NTG után a hipotalamusz és az agytörzs területén (Tassorelli és mtsai., 2007).

3.1.6. A kinurenin útvonal a fejfájás NTG modelljében

Háttér

Az érző és nociceptív rendszerek szenzitizációs folyamataiban alapvető szerepet tulajdonítanak a glutamát és receptorainak, különösen az NMDA receptoroknak (Woolf és Salter 2000). A kinurensav (KYNA) a triptofán anyagcsere terméke, neuroprotektív és antiglutamáterg hatású, mely többek között az NMDA, az aromás szénhidrogén és a G proteinhez kapcsolt receptor 35-höz (GPR35) kötődik, és több kísérleti eredmény azt mutatja, hogy antinociceptív hatású a migrén különféle modelljeiben (Csáti és mtsai., 2015, Lukács és mtsai., 2016). A kinurenin útvonal első és sebességmeghatározó lépése a triptofán N-formil kinurenin átalakulás, melyet a triptofán 2,3-dioxigenáz (TDO) és az indolamin 2,3-dioxigenáz (IDO) katalizál. Ezt követően az N-formil kinurenin a formamidáz segítségével kinureninné (L-KYN) alakul, melyet a kinurenin aminotranszferázok (KAT) alakítanak KYNA-vá. Ezzel párhuzamosan a L-KYN antranilsavvá, ill. hidroxiantranilsavvá alakul a kinurenin-monoxigenáz (KMO) és kinurenináz (KYNU) segítségével. Az útvonal másik terméke a kvinolénsav, mely a KYNA-val ellentétben glutamát agonista hatású és részt vehet a neuronális sejtpusztulás mechanizmusában (Behan és mtsai., 1999, Guidetti és Schwarcz 1999).

Anyag és módszer

Felnőtt hím Wistar patkányok egyszeri s.c. NTG injekciót kaptak 10 mg/kg dózisban, az állatok másik fele placebo kezelésben részesült. 4 órával ezután az állatokat perfundáltuk, a TNC-t eltávolítottuk, és Western blot vizsgálatokat végeztünk TDO2, IDO1, KAT, KYNU és KMO expressziót vizsgálva.

Eredmények

A NTG a kinurenin útvonal összes vizsgált enzimének expresszióját szignifikánsan csökkentette a patkány TNC-ben.

Megfigyeléseink jelentősége

A NO képes azIDO aktivitását mérsékelni makrofágokban (Thomas és mtsai., 2007), és hatására az enzim csökkent képződését írták le a csontvelőben (Hara és mtsai., 2008). Az is ismert, hogy a NO donorok mitokondriális funkciózavart okozhatnak a légzési lánc bénítása és citokróm C felszabadulása révén (Ushmorov és mtsai., 1999), ami kapcsolatba hozható a csökkent kinurenin aminosztransferáz 2 (KATII) szinttel (Vécsei és mtsai., 2013). Nagyon lényeges kiemelni, hogy a kinureninek fontos szerepet játszanak az immunfunkciók szabályozásában, pl. azIDO, a KMO és KYNU transzkripcióját az interferonok és a proinflammatoros citokinek szabályozzák (Mándi és mtsai., 2012, Hassanain és mtsai., 1993). A NTG képes a NFkB aktiválására (Nagy-Grócz és mtsai., 2016, Greco és mtsai., 2005), ami központi szerepet játszik a gyulladás kialakulásában, és a gyulladásos mediátorok NTG hatására történő felszabadulását prednizolonnal ki lehetett védeni (Tfelt-Hansen és mtsai., 2009). Mindezt összegezve feltételezhető, hogy a NO hatása a kinurenin anyagcserére direkt és indirekt módon, a gyulladásos reakciók révén is megvalósulhat. Mivel a centrális szenzitizációban kulcsszerepet játszik a glutamát és NMDA receptorai (Sarchielli és mtsai., 2007), a kinurenin útvonal alacsonyabb működése és az ebből következő KYNA csökkenés részt vehet ebben a folyamatban az NMDA diszinhibíció révén.

3.2. Orofaciális formalin, mint a fejfájás állatkísérletes modellje

Az orofaciális régió stimulálása alkalmas lehet az ide lokalizálódó fájdalommal járó kórképek vizsgálatára, mint pl. a trigeminus neuralgia vagy egyes fejfájásbetegségek. Leginkább a régióba adott s.c. formalin alkalmazása a legismertebb, mint a trigeminális rendszer aktivációját és szenzitizációját okozó állatkísérletes modell. Az így beadott hígított formalin szöveti károsodást okoz, mely jellegzetes viselkedési és elektrofiziológiai jelenségeket vált ki. A típusos válasz kétfázisú, egy pár percig tartó kezdeti szakasz után átmeneti szünetet követően egy elhúzódó, tartós fázis jelentkezik, mely akár fél óráig is eltarthat (Raboisson és mtsai., 2004). Az első szakaszért leginkább a nociceptorok közvetlen ingerlése felelős, míg a második periódusban a gyulladás kialakulásának következményeivel kell számolni (Tjolsen és mtsai., 1992). Az ebben a szakaszban felszabaduló prosztaglandin E2 (PGE₂), interleukin 1 és egyéb szenzitizációs folyamatok is alapvető szerepet játszanak (Svensson és Yaksh 2002, Watkins és mtsai., 1997), azaz párhuzam állítható fel a modell és egyes fejfájásbetegségek patomechanizmusa között.

3.2.1 A viselkedés vizsgálata a patkány orofaciális formalin modelljében

Anyag és módszer

Felnőtt hím patkányok felső bajuszpárnájába 50 µl 1,5%-os formalin oldatot fecskendeztünk s.c., míg az állatok másik fele 50 µl fiziológiás sóoldatot kapott. Habitációt követően az injekció után az állatokat azonnal egy 30x30x30 cm méretű tükörfalú terráriumba helyeztük. Az állatokat 45 percen át vizsgáltuk, a viselkedésükről videofelvétel készült.

Eredmények

Hasonlóan a korábbiakhoz az injekciót követően a patkányok azonnal vakarni kezdték az érintett területet kb. 3-4 percen keresztül. Ezt követően kb. 10 perces nyugalmi fázis következett, melyet egy hosszabban tartó, de kevésbé intenzív ún. tónusos szakasz követett, ami 20-22 percig tartott. Mindkét periódus alatt a fájdalommal összekapcsolható aktivitás szignifikánsan magasabb értéket mutatott a formalinnal kezelt patkányoknál, a fiziológiás sóoldattal kezeltékhez viszonyítva.

Megfigyeléseink jelentősége

Ezen vizsgálatok megerősítették a korábban is megfigyelt és leírt kétfázisú viselkedési mintázatot, melyet a trigeminális területre adott formalin okozott (Clavelou és mtsai., 1995), és a későbbi kísérleteinkhez referenciaként szolgált.

3.2.2. CGRP expresszió patkány TNC-ben orofaciális formalin adása után

Háttér

A CGRP kiemelkedő szerepet játszik a migrén patomechanizmusában, a szintje emelkedett migrénesekben az egészséges kontrollokhoz viszonyítva (Fusayasu és mtsai., 2007), és szisztémás adása rohamot provokálhat a betegekben (Hansen és mtsai., 2010, Lassen és mtsai., 2002). Vizsgálata kiemelt fontosságú a fejfájás állatkísérletes modelljeiben.

Anyag és módszer

Felnőtt hím patkányok felső bajuszpárnájába 50 µl 1,5%-os formalin oldatot fecskendeztünk s.c., míg az állatok másik fele 50 µl fiziológiás sóoldatot kapott. Négy órával az injekciók adása után az állatokat perfundáltuk, a TNC-t eltávolítottuk, és CGRP immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk a TNC-ből készült sorozatmetszeteken. A CGRP pozitív rostok által borított területet képanalizátorral vizsgáltuk.

Eredmények

A CGRP pozitív rostok által lefedett terület a TNC-ben nem változott meg szignifikánsan a formalin kezelés hatására egyik magasságban sem.

Megfigyeléseink jelentősége

A trigeminális aktiváció egyéb modelljeiben a CGRP változásai gyorsan bekövetkeznek és órákon belül megszűnnek (Buzzi és mtsai., 1991, Greco és mtsai., 2008), mellyel jelen eredményeink párhuzamba állíthatóak, azaz feltételezhető, hogy a CGRP esetleges változásai állatkísérletes modellünkben hamarabb lezajlottak.

3.2.3. c-fos és nNOS megjelenése a másodlagos trigeminális neuronok területén

Háttér

A c-fos protein a neuronális aktiváció kapcsán expresszálódik, a nNOS pedig szenzitizációs markernek tartható a trigeminovaskuláris rendszer területén. Ezek a jelenségek az orofaciális formalin modell alkalmazása során is lezajlanak, ezért a vizsgálatuk fontos lehet.

Anyag és módszer

Felnőtt hím patkányok felső bajuszpárnájába 50 µl 4%-os formalin oldatot fecskendeztünk s.c., míg az állatok másik fele 50 µl fiziológiás sóoldatot kapott. Négy órával az injekciók adása után az állatokat perfundáltuk, a TNC-t eltávolítottuk, majd sorozatmetszeteket készítettünk c-fos és nNOS immunhisztokémiai vizsgálatok céljából. A sorozatmetszetek TNC-beli helyét megállapítottuk, majd a festődő sejteket megszámoztuk az injekció oldalával ipszi- és kontralaterálisan.

Eredmények

Szignifikáns c-fos és nNOS emelkedést detektáltunk a formalin kezelés után a TNC azon területein, melyek szomatotópiásan megfelelnek az orofaciális formalin modell okozta nociceptív hatásnak.

Megfigyeléseink jelentősége

A korábbi vizsgálatokhoz hasonló eredményeket kaptunk, melyek igazolják, hogy más modellekhez hasonlóan (pl. szisztémás NTG adása), az orofaciális formalin is képes a trigeminális rendszer aktivációs és szenzitizációs markereit megemelni.

3.3. A Gasser dúc elektromos ingerlése, mint a migrén állatkísérletes modellje

A migrénes roham patogenezisében kiemelt szerepet játszó trigeminovaszkuláris rendszer aktiválódása (Moskowitz 1984) állatkísérletekben modellezhető a TG elektromos ingerlésével. Ennek hatására CGRP szabadul fel a primer afferensek végződéseiből mind a periférián (Knyihár-Csillik és mtsai., 1995), mind a centrális terminális területén (Knyihár-Csillik és mtsai., 1998), megnövekszik a durális erek albumin permeabilitása (Markowitz és mtsai., 1987), és ezen utóbbi hatást migrénellenes gyógyszerek alkalmazásával ki lehet védeni (Limmroth és mtsai., 2001). Mindezen eredmények azt sugallják, hogy a TG elektromos ingerlése következtében bekövetkező állatkísérletes változások részben hasonlatosak lehetnek a migrénben lezajló folyamatokhoz.

3.3.1. c-fos megjelenése a Gasser dúc elektromos ingerlése után

Háttér

A c-fos expressziójának mérése jó információt adhat az idegrendszeri struktúrák aktivitásának mértékéről. A migrénben zajló aktiváció és szenzitizáció során a TNC neuronjainak fokozott aktivitása észlelhető (Bergerot és mtsai., 2006). Emellett azonban számos magcsoport aktivitását leírták migrénes roham kapcsán a híd dorzolaterális részén, valamint a dorzális középgyban (Weiller és mtsai., 1995), mely nem kimutatható a fejre lokalizálódó más fájdalmas állapotoknál (May és mtsai., 1998). Ez arra utalhat, hogy az itt elhelyezkedő struktúrák – a PAG, a nucleus raphe magnus (NRM), a dorzális raphe mag (DR) és a locus ceruleus (LC) részt vehetnek a migrén patogenezisében. Azt viszont nem tudjuk egyértelműen, hogy ezen magok aktiválódása a migrénes roham okaként vagy következményeként értékelendő.

A NRM része a leszálló fájdalom szabályzó rendszernek és komoly bemeneteket kap a kortexből (Carlton és mtsai., 1983). A NRM ingerlése befolyásolja a TNC nociceptív bemenetét (Basbaum és mtsai., 1984), és a NRM aktivitását befolyásolják a migrénellenes gyógyszerek (Ellrich és mtsai., 2001). Ezek alapján a mag fontos szerepe vethető fel a migrén kialakulásában.

A DR a legnagyobb szerotoninerg magnak tekinthető az agytörzsben, mely szerepet játszik a fájdalomérzés szabályozásában (Wang és Nakai 1994), és aktivitása megemelkedik migrénes roham kapcsán (Ter Horst és mtsai., 2001).

A központi idegrendszerben a locus ceruleus (LC) noradrenalin tartalma a legmagasabb, az itt található neuronok nyúlványai a felsőbb agyi régiók mellett a gerincvelő és a TNC területére is adnak bemenetet (Samuels és Szabadi 2008). A funkcióját hasonlatosnak tartják a NRM-hoz a fájdalomérzés szabályozásában (Mokha és mtsai., 1986), továbbá a TNC innervációja mellett (Simpson és mtsai., 1997) az agyi érhálózatba is küld rostokat, ezáltal befolyásolhatja a migrénes roham alatti érrendszeri történéseket (Lance és mtsai., 1983).

A PAG ingerlése analgézíát válthat ki emberben (Hosobuchi és mtsai., 1977), de egyes ventrolaterális PAG-hoz közel elhelyezkedő implantátumok migrénes rohamokat válthatnak ki (Raskin és mtsai., 1987), így ez a struktúra mind a fájdalom csillapításában, mind a migrén kialakulásában szerepet játszhat. A ventrolaterális PAG aktiválódásának igazolása trigeminális fájdalom kapcsán azt jelezheti, hogy ez a struktúra szerepet játszhat a trigeminális érző működés integrációjában (Hoskin és mtsai., 2001).

Anyag és módszer

Felnőtt hím patkányok jobb oldali TG-ba koncentrikus bipoláris elektródát süllyesztettünk klorálhidrát anesztéziában. Az állatok felénél 30 percig 10 Hz, 0,5 mA-es elektromos ingerlést alkalmaztunk, míg a kontrollcsoportban nem történt ingerlés az elektróda behelyezése után. Kettő és négy órával később az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk. Az agytörzsből az obex felett 1,5 mm-től sorozatmetszeteket készítettünk c-fos immunhisztokémia céljából, mely során állatonként az egyes metszetek 300 μm távolságra voltak egymástól. Az immunhisztokémia után toluidinkék festést is alkalmaztunk az agytörzsi struktúrák könnyebb azonosítása végett. A c-fos pozitív sejteket megszámoztuk a TNC, LC, NRM és DR területén a Paxinos Watson atlasz (Paxinos és mtsai., 2007) alapján, és a különböző területeken talált értékeket a képanalizátor (MozaiX, AXioVision, Zeiss, Németország) által meghatározott területet figyelembe véve μm^2 -re adtuk meg.

Eredmények

A TG elektromos ingerlése mindkét időintervallumban megemelte az azonos oldali TNC-ben a c-fos pozitív sejtek számát. A NRM mindkét oldalán sejttség emelkedést észleltünk ingerlés után. Nem változott szignifikánsan viszont a LC, DR és PAG c-fos pozitív sejtjeinek száma a stimulációt követően.

Megbeszélés

Vizsgálataink kimutatták, hogy a TG elektromos ingerlése nem okoz egységes aktivitásnövekedést a migrén generátoroknak tartott magcsoportokban. Maga az elektromos ingerlés az elsődleges trigeminális érző neuronok direkt aktivátora, mely a perifériás végződésen durális extravazációt és neurogén gyulladást hoz létre (Markowitz és mtsai., 1987), míg a centrális nyúlványok révén aktiválódnak a TNC másodlagos érző neuronjai is (Knyihár-Csillik és mtsai., 1997). Ezt a jelen vizsgálataink is megerősítették, mivel mind 2, mind 4 órát követően jelentős c-fos emelkedés volt az ipszilaterális TNC területén az ingerlésnek megfelelően.

A NRM neuronjainak magasabb aktivitását észleltük az elektromos ingerlést követően 2, illetve 4 órával. Ezt a jelenséget feltehetőleg nem a TNC aktivációjának direkt hatása okozza, mivel a közvetlen kapcsolat a két magcsoport között gyenge, különösen a felszínes laminákat illetően (Hermann és mtsai., 1997, Sugiyó és mtsai., 2005). A legvalószínűbb az, hogy a NRM fokozott működése a leszálló fájdalomérző rendszer aktiválódása révén, indirekt módon jön létre a kortexen és a talamuszon vagy a PAG-on keresztül (Hermann és mtsai., 1997).

A DR nem kap direkt bemenetet a TNC-ből (Marchand és Hagino 1983), és az aktivitása nem változott a TG elektromos ingerlése után, azaz rövidtávon nem játszik fontos szerepet a trigeminális nocicepció modulációjában ebben a modellben, annak ellenére, hogy a mag része a leszálló és felszálló rendszereknek, melyek a fájdalomérzést kontrollálják (Wang és Nakai 1994)

Korábbi vizsgálatok igazolták a LC aktivitásfokozódását fájdalmas ingerek után (Ter Horst és mtsai., 2001, Baulmann és mtsai., 2000), de a fájdalomérzés mellett a stressz is emelheti a magcsoport aktivitását (McDevitt és mtsai., 2009). A jelen kísérletben a TG ingerlése megváltoztatta a c-fos pozitivitást ezen a területen, de a kontrollcsoportban is elég magas aktivitást észleltünk. Négy óra után ez csökken mind az álműtött, mind a kontrollcsoportban, ami szintén arra utalhat, hogy nem a trigeminális fájdalom, hanem

a stressz okozhatja az itt detektálható eltéréseket. A LC és TNC közötti kapcsolatáról az eddigi kísérleti adatok ellentmondásosak: egyes eredmények azt támogatják, hogy csak minimális kapcsolat (Luppi és mtsai., 1995) van közöttük, míg mások a TNC I laminája és a LC között találtak összeköttetést (Craig 1992). A saját eredményeink alapján az feltételezhető, hogy a LC nem kap direkt bemenetet a TNC területéről, és lehetséges, hogy a LC részvétele a leszálló fájdalom szabályozásban a NRM-on keresztül történik (Tanaka és mtsai., 1996). Érdekes módon nem találtunk változást a PAG egyetlen régiójában sem stimuláció után, pedig a TNC és ezen mag között direkt kapcsolat van. Korábbi vizsgálatok emelkedést detektáltak itt nociceptív ingerlés után, de a stimuláció paraméterei mások voltak (Hoskin és mtsai., 2001). Feltételezve, hogy a fenti változások másodlagosak, azaz nincs erős, direkt összeköttetés a fenti magok és a TNC között, akkor az ingerlés hatására a felszálló fájdalomérző pályák a talamuszon keresztül aktiválják a kortextet és innen indul a leszálló rendszer modulációja. A TG elektromos ingerlése után a migrén generátoroknak tartott magok nem mutattak egyidejű aktivitásfokozódást, ami azt a megfigyelést erősíti, hogy ez a jelenség a migrénre specifikus.

3.4. A dura kémiai ingerlésének hatása patkányban

3.4.1. c-fos vizsgálata a dura kémiai ingerlése után patkány TNC-ben

Háttér

A migrén kapcsán jelentkező trigeminális aktivációban kiemelt lehet a trigeminális rendszer által gazdagon beidegzett dura mater és annak érrendszere (Hoffmann és mtsai., 2019). Emiatt kézenfekvő állatkísérletes modellnek tűnik a dura kémiai ingerlése, melyet elsősorban „gyulladásos levessel” (inflammatory soup - IS), ill. complete Freund adjuvánssal (CFA) lehet elvégezni. A korábbi irodalmi adatok szerint ezek a kezelések 2-4 órás latenciával képesek a trigeminális rendszer aktiválására (Lukács és mtsai., 2015, Burstein és mtsai., 1998), mely megfelelhet az allodynia kialakulási idejének migrénes pácienseknél. Bár a módszer elterjedt, de korábbi kísérlet nem vizsgálta a durális ingerlés okozta trigeminális aktiváció pontos szomatotópiás eloszlását és a kísérleti körülmények (anesztézia, sztereotaxiás készülék, lokális lidokain alkalmazása a műtét alatt) hatását.

Anyag és módszer

Altatás és sztereotaxiás rögzítés után patkányok koponyacsontját eltávolítottuk, majd a dura matert szabaddá téve jobb oldalra IS (1 mM bradikinin, 100 μ M prosztaglandin, 1 mM 5HT, 1 mM hisztamin, pH 5,0 10 mM HEPES pufferben), ill. CFA (Sigma-Aldrich, USA) oldatot vagy ezek oldószereit helyeztük. Fél óra múlva a területet lemostuk, majd 2 és 4 (CFA), valamint 2,5 és 4 óra múlva (IS) az állatokat perfundáltuk. A kontroll csoportokban hasonló módon jártunk el azzal a különbséggel, hogy a kezelést az oldószerekkel, CFA esetében fiziológiás sóoldattal, IS esetén szintetikus intersticiális folyadékkal (SIF - 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5mM CaCl₂, 10 mM glükóz 10 mM HEPES pufferben, pH 7,3) végeztük el, majd az előzőekben leírtak szerint az állatokat perfundáltuk. A TNC-t c-fos immunhisztokémiai festések céljából eltávolítottuk, külön csoportokban vizsgáltuk az anesztézia, a perfúzió, a sztereotaxiás készülék és a műtéti területen alkalmazott lokális lidokain kezelés esetleges moduláló hatását. A sejteket a trigeminális ágak (V/1, 2, 3) TNC-beli szomatotópiás elhelyezkedése szerint is megszámloltuk Strassman és Vos munkájára alapozva (Strassman és Vos 1993).

Eredmények

Az általános anesztézia és a perfúzió nem befolyásolta a c-fos megjelenését a kísérleti összeállításunkban. A sztereotaxiás készülék használata a TNC V/2-es szomatotópiás területén okozott c-fos emelkedést, a műtét alatt alkalmazott lokális lidokain viszont mindegyik csoportban csökkenti a c-

fos aktivitást az V/1-es területen. A CFA kezelés nem emelte meg szignifikánsan a c-fos pozitív sejtek számát sem a másik oldalhoz, sem a kontroll állatokhoz képest, sem 2, sem 4 óra elteltével. Ezzel szemben az IS alkalmazása szignifikánsan megnövelte az érintett oldal c-fos expresszióját, mind 2,5, mind 4 óra után. A különbség az V/1-es szomatotópiának megfelelően volt a legszámottevőbb.

Megbeszélés

A c-fos protein expressziójának mérése széles körben alkalmazott módszer a nociceptív neuronok aktiválásának felmérésére (Coggeshall és mtsai., 2005). A stimulus hatására a transzkripció már 5 perc után elkezdődik, és a terméket már 30 perc után ki lehet mutatni, a féléletideje pedig kb. 2 órára tehető (Greenberg és mtsai., 1984, Abbadie és mtsai., 1992, Svendsen és Lykkegaard 2001).

Korábbi vizsgálatok felvetették, hogy az uretán anesztézia és a pentobarbitál adása utáni perfúzió is önmagában képes a TNC sejtjeinek aktiválására (Strassman és Vos 1993), de mi nem találtunk ilyen változást klorálhidrát altatás kapcsán. A sztereotaxiás készülék alapvető fontosságú az állatkísérletes beavatkozások pontos végrehajtásában, mely vizsgálatainkban az V/2-es szomatotópiás területen okozott megemelkedett c-fos expressziót, melynek oka feltehetőleg az elülső rögzítés lehet az orr területén. A műtét alatt helyileg alkalmazott lidokain kezelés képes volt csökkenteni az V/1 területén megjelenő c-fos expressziót függetlenül attól, hogy kontroll vagy kezelt állatcsoportról volt szó, ezért a lidokain lokális alkalmazása javasolható ilyen esetekben, hogy csökkentsük a műtét okozta hatásokat.

A CFA szub- vagy intadermális injekciója alkalmazható a gyulladással, illetve neuropátiás fájdalom modellezésére, beadva gyorsan ödémát és hiperalgiát okoz (Iadarola és mtsai., 1988). A korai hatások gyorsan kialakulnak és kb. 24-72 óra körül érik el a csúcukat, de hosszú távú szövődeményeket is leírtak, pl. granulomatózus gyulladást és szöveti nekrozist (Osebold és mtsai., 1982). A 2 és 4 órás túlélési időt ezen komplikációk elkerülése végett választottuk. Érdekes módon sem a rövidebb, sem a hosszabb túlélési idő esetén nem láttunk c-fos emelkedést, ha a kezelt-kezeletlen oldalt, illetve állatokat hasonlítottuk össze. Valószínű, hogy a hatás kiteljesedéséhez nem állt rendelkezésre elég idő. A CFA s.c. adása ödémát és hiperalgiát okoz, melynek csúcspontja kb. 24 óránál figyelhető meg (Iadarola és mtsai., 1988), továbbá a parotisba adott CFA esetén is késleltetett a TNC-ben megjelenő c-fos emelkedés, mely 72 órával később a legkifejezettebb (Ogawa és mtsai., 2003). Egy másik vizsgálatban a durán lokálisan, 20 percen át alkalmazott CFA gyulladással járó folyamatokat indított meg a TG területén 4-24 óra között, és megemelkedett a CGRP és interleukin 1 β szintje a kontrollcsoporthoz képest (Lukács és mtsai., 2015). Emellett hosszabb – 7 napos – túlélési idő esetén igazoltak c-fos növekedést a TNC területén (Lukács és mtsai., 2017). Összegezve, ezekben a kísérletekben a hatás minimum 2-4 óra után indul és 1-3 napot követően éri el a csúcspontját, mely egybeesik a késleltetett gyulladással járó reakció időbeli lefolyásával, melyet a CFA elsődleges hatásának tartunk (Dvorak és Dvorak 1974). Ezek alapján a CFA topikális adása inkább a migrén krónikussá válásának lehet a modellje (Edvinsson és mtsai., 2019).

A migrénben szerepet játszó steril gyulladás folyamatát a durára adott IS-el is lehet modellezni (Chen és mtsai., 2019, Arulmani és mtsai., 2006). Az IS-ben található bradikinin, PGE₂, 5HT és hisztamin képesek az érző neuronok terminálisainak közvetlen és - egyéb mediátorok felszabadítása révén - a közvetett aktiválására is. Már 20 perccel a stimuláció után ki lehet mutatni az aktivációs és szenzitizációs markereket az elsődleges érző neuronok szintjén és két óra után a másodlagos érző neuronok területén is (Burstein és mtsai., 1998, Levy és Strassman 2002), melyet a mi vizsgálatainkban is sikerült igazolni. Az IS az V/1 szomatotópiás területnek megfelelően okozta a legkifejezettebb c-fos emelkedést, mely megfelel a durális beidegzésnek. A jobb (kezelés oldala) és a bal oldali TNC között is szignifikáns különbség mutatkozott, mivel a dura szomatoszenzoros innervációja zömében ipsilaterális, és az IS okozta c-fos emelkedés a stimuláció után 4 órával is megmaradt. Korábbi vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a durális IS okozta trigeminális és extratrigeminális allodynia 3 óra latenciával érte el maximumát

és 5-6 óráig tartott (Edelmayer és mtsai., 2009). Ez arra utal, hogy a centrális szenzitizáció kialakulása az IS indirekt hatásának köszönhető, és magyarázhatja a fennmaradó aktivitásfokozódást a kísérletünkben alkalmazott időpontoknál. Ezen felül a durális IS okozta trigeminális aktiváció és szenzitizáció több pontban is hasonlóságot mutat a migrénben zajló változásokkal. Az allodynia a migrénes betegek több mint 60%-nál megjelenik, és időbeli lefutása hasonlít az állatkísérletes modellben megfigyelhető megjelenéssel (Jakubowski és mtsai., 2005, Lipton és mtsai., 2008). Az utóbbi változásokat több nem specifikus és specifikus migrénben hatásos gyógyszer befolyásolni képes, azaz az IS kezelésnek fontos szerepe lehet új szerek vizsgálatában (Jakubowski és mtsai., 2007, Burstein és mtsai., 2004). Összefoglalva az IS durális topikális adása képes a migrénben lezajló egyes változások állatkísérletes modellezésére, míg a CFA esetén hosszabb latencia esetén alakul ki a trigeminovaskuláris rendszer aktiválódása, azaz inkább a krónikus állapot modellje lehet.

3.4.2. A CGRP, TRPV1 és nNOS patkány TNC-ben durális IS ingerlés után

Anyag és módszer

Altatás és sztereotaxiás rögzítés után patkányok koponyacsontját eltávolítottuk, majd a dura matert szabaddá téve jobb oldalra IS oldatot vagy ezek oldószerét (SIF) helyeztük. Fél órával később a területet lemostuk, majd 2,5 és 4 óra múlva az állatokat perfundáltuk, és a TNC-t CGRP, TRPV1 és nNOS immunhisztokémiai festések céljából eltávolítottuk. A CGRP és TRPV1 pozitív rostok által fedett terület képanalizátor segítségével a terület százalékaként határoztuk meg, míg a nNOS pozitív sejteket megszámláltuk.

Eredmények

Kettő és fél, illetve 4 órával az IS kezelés után a CGRP pozitív rostok által fedett terület szignifikánsan nagyobb volt a TNC-ben a kontrollhoz viszonyítva. Hasonló eredményt láttunk a TRPV1 esetében 4 órát követően, míg a nNOS festődést mutató sejtek száma is megemelkedett 4 órás latenciával.

Megbeszélés

A trigeminalis rendszer ingerlése durális neurogén gyulladás kialakulásához vezet, melyben neurotransmitter felszabadulás (glutamát, 5HT, prosztaglandinok) és hízósejt degranuláció jellemző (Malhotra 2016), ill. perifériás szenzitizációt hoz létre ugyanitt (Strassman és mtsai., 1996).

A megemelkedett CGRP a TNC területén az elsődleges érző rostok fokozott működésére utalhat, amely többlet CGRP felszabadulással is járhat, és a terminálisok területén megnövekedett expresszió a magasabb turnover-t jelezheti (Greco és mtsai., 2008). Ezzel párhuzamba állítható az a megfigyelés, hogy IS intraciszternális adása után a jugularis véna vérében magasabb a CGRP koncentráció, azaz ebben az esetben is megemelkedett a felszabadulás a végződésekből (Hoffmann és mtsai., 2012a). A CGRP fokozott megjelenése ilyen módon több, a nociceptorokat is aktiváló mediátor együttes megjelenésével azt eredményezi, hogy létrejön a trigeminális rendszer aktivációja és szenzitizációja (Buckley és mtsai., 1991).

Négy órás latenciával a TRPV1 expressziója is fokozódik a kísérletünkben. Hasonló jelenséget észleltek patkány hátsó gyöki dúcsejtekben lokális gyulladást követően (Amaya és mtsai., 2003). Ez az aktiváció megemelkedett intracelluláris Ca^{++} szintet eredményez, mely neuropeptid felszabaduláshoz vezethet (Nakanishi és mtsai., 2010; Boillat és mtsai., 2014), és szerepet játszik az ödéma és a neurogén gyulladás kialakulásában (Brain és Williams 1989, Vincent és mtsai., 2013). Az állatkísérletes eredmények párhuzamba állíthatók a humán vizsgálatokkal: a TRPV1 mennyisége mind a trigeminális ganglionban

(Hou és mtsai., 2003), mind a durát is beidegző trigeminális rostokban (Quartu és mtsai., 2016) jelentős, és ezek a rostok CGRP-t is tartalmaznak (Shimizu és mtsai., 2007). A TRPV1 expressziójának fokozódását figyelték meg humán vizsgálatok során gyulladással járó fájdalom kialakulását követően (Matthews és mtsai., 2004), és migrénes alanyoknál a kapszaicin képes volt a rohamok enyhítésére (Fusco és mtsai., 2003) feltehetőleg a TRPV1 deszenzitizációja révén (Hoffmann és mtsai., 2012b). Mindezen adatok megerősítik, hogy a TRPV1 kulcsszereplője a trigeminális aktivációnak és szenzitizációnak emberben és kísérleti állatban egyaránt, és jelen változásai párhuzamba állíthatóak a migrénben zajló eltérésekkel.

A nNOS pozitív sejtek számában is emelkedést láttunk 4 órával az IS kezelést követően, mely aktiválta a másodlagos érző neuronokat a TNC-ben (Dubin és mtsai., 2010). A NO donorok képesek CGRP-t felszabadítani a TG sejteiből és a TNC területén (Bellamy és mtsai., 2006), illetve a hisztamin és a bradikinin képes NO-t felszabadítani az endotheliális sejtekből (Palmer és mtsai., 1987), mely a NO és a gyulladással szoros kapcsolatára utal. A NO termelés megemelkedése egy öngerősítő folyamathoz vezethet az agyhártyákban, ami CGRP, prosztaglandinok és egyéb mediátorok felszabadulásán keresztül gyors vazodilatációt eredményez (Sarker és mtsai., 2002). Ebben a folyamatban a TG szatellita sejtjei is részt vehetnek, melyek NO hatására gyulladással járó mediátorok expresszióját mutatják (Capuano és mtsai., 2009). Ennek tükrében a nNOS ebben a kísérleti modellben is fontos markere a trigeminális szenzitizációs folyamatoknak.

Érdekes módon a CGRP változásai megelőzték a TRPV1 és nNOS emelkedést a kísérleteinkben. Ez arra utal, hogy az előbbi inkább az elsődleges trigeminális nociceptorok aktiválódását jelzi, míg a TRPV1 és nNOS a később kialakuló szenzitizáció részjelenségének tartható.

4. MODULÁCIÓ LEHETŐSÉGE A MIGRÉN ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLJEIBEN

A betegségek állatkísérletes modelljei a kórélettani folyamatok egy részét utánozzák, ezért a kísérletek során észlelhető változások modulálása betekintést nyújthat az adott betegség pontos folyamatába és lehetőséget biztosíthat az esetleges jövőbeli farmakológiai célpontok azonosításában.

4.1. COX gátlás hatása a migrén NTG modelljében

Háttér

Korábbi kísérletek igazolták, hogy a NTG szisztémás adása késleltetett módon aktiválni képes az aktivációs és szenzitizációs markereknek tartott molekulákat a TNC területén, mely folyamatban feltehetőleg a prosztaglandinok játszanak szerepet. A COX gátló nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek (NSAID) hatékonynak bizonyultak mind a migrénes (Lange és mtsai., 2000), mind a tenziós (Schoenen 2000) fejfájás kezelése során, és a prosztaglandinok számos neuronális folyamatban szerepet játszanak ideértve a nocicepciót is. A szintetizáló enzimnek több izoformája ismert: az állandó szinten expresszálódó ciklooxygenáz-1 (COX1), az indukálható COX-2 és a legújabban felfedezett ciklooxygenáz-3 (Willoughby és mtsai., 2000). Annak ellenére, hogy lényeges különbség van a COX1 és COX2 genetikai struktúrája és szabályozása között, a két protein szerkezete és funkciója igen hasonló (Smith és Dewitt 1996). Elsődlegesen a COX2 szerepe feltételezhető a fájdalomérzés folyamatában, de az egyes kísérletes eredmények a COX1 expressziójának emelkedését mutatták gyulladással (Wallace és mtsai., 1998). Mindkét izoforma megtalálható gerincvelőben, míg a COX1 az érző dúcokban is jelen van (Chopra és mtsai., 2000). Patkányokban a COX1, illetve COX2 inhibitorok eltérő módon hatnak a nocicepcióra, mely mindkét izoenzim részvételére utal ebben a folyamatban (Mazario és mtsai., 2001).

Anyag és módszer

Kísérleteinkben felnőtt hím Wistar patkányokat használtunk. Előkezelés szempontjából több csoportot alkottunk: kontroll (előkezelés nélkül), lys-ASA – az állatok lizil-acetil-szalicilátot (Aspegic®, Sanofi-Synthelabo, Franciaország) kaptak 50 mg/kg dózisban, COX1 – a patkányok szelektív COX1 inhibitor, SC560-t kaptak többfajta dózisban (1, 3, 5 mg/kg) és COX2 gátló – NS398 előkezeléssel (1, 3, 5 mg/kg). Fél órával később az állatok fele s.c. NTG injekciót kapott 10 mg/kg dózisban, míg a többi patkány a NTG oldószerét kapta, majd 4 óras túlélést követően a korábbiaknak megfelelően feldolgoztuk a TNC-t, ill. nNOS és CamKII immunhisztokémiai festéseket végeztünk és a pozitív sejteket megszámláltuk. A lys-ASA előkezelés esetében nNOS Western blot vizsgálat is történt a TNC-ből, melyet β -aktinra korrigáltunk.

Eredmények

A korábbiakhoz hasonlóan a NTG kezelés szignifikánsan megemelte a nNOS és CamKII expresszióját, melyet a lys-ASA előkezelés ki tudott védeni a nNOS esetében. Hasonló hatása volt a COX2 inhibitor előkezelésnek, mely dóziszfüggő módon érvényesült mindkét marker esetében. A COX1 gátló nem volt hatással a NTG okozta változásokra.

Megbeszélés

A COX2 megtalálható a hátsó szarvak területén (Beiche és mtsai., 1998), kolokalizációt mutathat a nNOS-al (Maihöfner és mtsai., 2000) és szerepet játszik a centrális szenzitizációban (Samad és mtsai., 2001), míg a COX1 kimutatható a trigeminális érző dúcban (Dou és mtsai., 2004). A lys-ASA a NSAID-okhoz hasonlóan mind a két izoformát gátolja, migrénben is hatásos, jól átmegy a vér-agy gáton és hatásideje viszonylag hosszú (Gatti és mtsai., 1998). Az, hogy képes kivédeni a NTG okozta nNOS emelkedést, arra utal, hogy ebben a folyamatban a prosztanoidok fontos szerepet játszanak. További kísérleteinkben csak a COX2 inhibitor volt képes ilyen hatást elérni, a COX1-gátló nem. Bár a COX1 megtalálható a TG sejtjeiben, és vannak adatok arra is, hogy ez az izoenzim szerepet játszik a fájdalomérzés folyamatában (Dou és mtsai., 2004, Zhu és Eisenach 2003), de még több tanulmány emeli ki a COX2 szerepét. Állatkísérletekben a COX2 állandó expresszióját mutatták ki a gerincvelő hátsó szarvában (Beiche és mtsai., 1998). Feltételezhető, hogy ezen izoforma által szintetizált prosztanoidok szerepet játszanak a szinaptikus transzmisszióban és fokozzák a poszt-szinaptikus aktivitást (Adams és mtsai., 1996, Kimura és mtsai., 1985). Ezek az adatok egybehangzóak azokkal a megfigyelésekkel, melyek szerint az aktiváció és centrális szenzitizáció folyamatában elsősorban a COX2 izoenzim szerepét kell feltételezni (Samad és mtsai., 2001). A nimesulid, mely elsősorban COX2 inhibitornak tartható, állatkísérletekben lényegesen csökkentette a nociceptív viselkedési válaszokat és kivédte a NTG okozta hiperalgéziát is (Tassorelli és mtsai., 2003). Összegezve: az a tény, hogy a COX2 inhibitor két fontos szenzitizációs marker - a nNOS és a CamKII - emelkedését is ki tudta védeni a modellben, arra utal, hogy a NTG okozta centrális szenzitizáció folyamatában a TNC COX2-t expresszáló interneuronjai kiemelt szerepet tölthetnek be, és ez az enzim kulcsszereplő a migrénes roham kialakulásában.

4.2. Szumatriptán hatása a NTG modellben

Háttér

A triptánok a migrén specifikus rohamkezelésében leginkább alkalmazott farmakonok, melyek az 5HT_{1B/1D} receptorok agonistáiként csökkentik a trigeminális nocicepciót és igen hatékonyak a fejfájás csillapításában (Buzzi és Moskowitz 1991). A NO donor NTG aktiváló és szenzitizációs hatásában elsősorban a trigeminális elsődleges érző neuronok centrális nyúlványai vehetnek részt, melyeken

megtalálható az 5HT_{1D} receptor is (De Vries és mtsai., 1999, Hargreaves és Shephard 1999), ezért fontos lehet a triptánok vizsgálata a migrén állatkísérletes modelljeiben.

Anyag és módszer

Hasonlóan a korábbiakhoz felnőtt hím patkányokat használtunk. Az előkezelés szempontjából az állatokat két csoportra osztottuk, az aktív előkezelést kapó csoportban a patkányok 0,6 mg/kg dózisú szumatriptán (Imitrex® GSK, Egyesült Királyság) injekciót kaptak. Tíz perccel később az állatok felét NTG-vel, míg a másik felét a NTG oldószereivel kezeltük. Négy óra elteltével az állatokat perfundáltuk, és a TNC-t eltávolítottuk nNOS immunhisztokémia és Western blot céljából. A pozitív sejteket megszámláltuk, és megmértük a blotok relatív optikai denzitását.

Eredmények

Mind az immunhisztokémiai, mind a Western blot analízis azt mutatta, hogy a NTG okozta nNOS expressziónövekedést nem védte ki a szumatriptán előkezelés.

Megbeszélés

Érdekes módon a migrénes rohamban rendkívül hatásos szumatriptán a kísérletünkben nem tudta kivédeni a NTG okozta nNOS emelkedést, azaz ezen szenzitizációs folyamatnak nem volt hatékony gátlója. A NO okozta nNOS emelkedés hátterében a centrális primer afferensek és a másodlagos érző neuronok közötti önerősítő folyamatot feltételezünk. Ebben az esetben a primer afferenseken megtalálható 5HT_{1B/1D} agonista farmakon, a transzmitterfelszabadulás gátlása révén megszakíthatja ezt a folyamatot (Arviu és mtsai., 1996). Állatkísérletekben a szumatriptán képes volt megakadályozni a CGRP felszabadulást a trigeminális végződésekből a TG elektromos ingerlését követően (Knyihár-Csillik és mtsai., 1997), és NTG krónikus adása esetén kivédte a hiperalgéziát (Pradhan és mtsai., 2014). A szumatriptán hatástalansága jelen vizsgálatunkban arra utal, hogy a 5HT_{1B/1D} receptorok aktiválása nem képes a NO okozta nNOS emelkedés kivédésére. Korábbi vizsgálatok a 5HT_{2B} receptorok szerepét vetették fel az endothelialis NO felszabadulás kapcsán (Schmuck és mtsai., 1996), ill. a 5HT_{2A} receptorok jelentőségét, melyek aktiválása képes a trigeminovaskuláris neuronok nNOS expressziójának növelésére (Srikiatkhachorn és mtsai., 2002). Ezek alapján a 5HT_{1B/1D} receptorok mellett más 5HT receptorok is szerepet játszanak a trigeminovaskuláris rendszer szenzitizációs folyamatában, magyarázva a szumatriptán hatástalanságát. Az ineffektivitás másik okaként azt is figyelembe kell venni, hogy a szumatriptán hidrofíl vegyület, nehezen megy át a vér-agy gáton (Humphrey és mtsai., 1991), és nem képes hatékonyan modulálni a TNC-ben zajló önerősítő folyamatot. A szumatriptán csak akkor volt hatékony a sinus sagittalis superior ingerlése után, ha az állatok a vér-agy gátat károsító mannitolt kaptak (Kaube és mtsai., 1993), míg ez nem volt szükséges a lipofilebb triptánok alkalmazásakor (Goadsby és Hoskin 1996, Goadsby és Knight 1997). A szumatriptán hatékonyan védi ki a NTG okozta rohamot migrénes alanyokban (Iversen és Olesen 1996), de ez esetben az alkalmazott NTG dózis nagyságrenddel alacsonyabb, mely az állatokban csak szenzitizációs folyamatokat indít el, de nem képes a trigeminális nociceptorok ativálására (Jones és mtsai., 2001). Lehetséges, hogy az itt alkalmazott magasabb NTG adag kifejezettebb trigeminális aktivációt okoz, melyet már nem tud blokkolni a szumatriptán.

4.3. Szumatriptán hatása a durális IS modellben

Anyag és módszer

Az IS és SIF kezelés előtt 10 perccel az állatok fele szumatriptán (Imigran® GSK, Egyesült Királyság) injekciót kapott s.c. 0,6 mg/kg dózisban, ezt követően a korábbiakban leírtak szerint történt a dura IS és

SIF kezelése. Kettő és fél, illetve 4 óra múlva az állatokat perfundáltuk, és a TNC-t CGRP, TRPV1 és nNOS immunhisztokémiai festések céljából eltávolítottuk. A CGRP és TRPV1 pozitív rostok által fedett területet képanalizátor segítségével határoztuk meg, míg a nNOS pozitív sejteket megszámláltuk.

Eredmények

Az IS kezelt állatokban mind a 3 marker expressziója szignifikánsan magasabb volt (CGRP 2,5 és 4 óra után, TRPV1, nNOS 4 órát követően). A szumatriptán előkezelés ezen hatásokat képes volt szignifikáns módon csökkenteni.

Megbeszélés

A vizsgálatunkban a szumatriptán képes volt a CGRP és TRPV1 megemelkedő expresszióját modulálni a 5HT_{1B/D} receptorokon keresztül hatva. A CGRP kolokalizációt mutat a 5HT_{1B/D} receptorokkal a trigeminális rendszerben (Ma és mtsai., 2001), és a szumatriptán preszinaptikusan blokkolja a nociceptív neuropeptidok felszabadulását az elsődleges idegvégződésekből (Arviu és mtsai., 1996). Mivel a TRPV1 hatás részben a receptor aktivációját követő CGRP felszabaduláson keresztül érvényesül (Meng és mtsai., 2009), ezért a 5HT moduláló hatása a TRPV1-re valószínűnek tűnik. Ezt megerősíti, hogy az intraciszternálisan adott IS TRPV1 növelő hatását is kivédi a szumatriptán (Meents és mtsai., 2015).

Az előkezelés kivédte az IS okozta nNOS emelkedést is a TNC területén. A szumatriptán gátolja a vazoaktív peptidok felszabadulását a periférián és gátolja a neurogén gyulladás kialakulását (Goadsby és Edvinsson 1993). Képes kivédeni az intraciszternális karragenin adás utáni nNOS emelkedést az agytörzsben (Demirpence és mtsai., 2009), azaz a 5HT_{1B/D} agonisták kivédik az IS okozta szenzitizációt, mely a durális neurogén gyulladás alatt alakul ki.

4.4. krónikus ösztadiol hatása a NTG modellben

Háttér

A fájdalom intenzitásának érzékelése és a fájdalomcsillapítókra adott válasz különbözhet a nemeknél, alacsonyabb fájdalomküszöb, érzékenyebb fájdalomdiszkrimináció és magasabb fájdalomérzet jellemzi a nőket bizonyos körülmények között (Walker és Carmody 1998, Feine és mtsai., 1991, Wise és mtsai., 2002). Emellett megfigyelhető, hogy a kraniofaciális területre lokalizálódó fájdalom szindrómák gyakrabban fordulnak elő náluk, mint például a temporomandibuláris diszfunkció (LeResche 1997) vagy az arcidegzsába (Katusic és mtsai., 1990).

A nemi hormonok, elsősorban az ösztadiol, lényegesen befolyásolják a primer fejfájások, így a migrén klinikai képét. A serdülőkort követően a nők kétszer, háromszor gyakrabban szenvednek migrénben, mint a férfiak. A plazma hirtelen ösztrogénszint csökkenése is migrént provokálhat, pl. a menstruációt megelőző időszakban (Somerville 1975), és a betegség javulhat, amikor a hormonszintek stabilak, mint például terhesség alatt vagy menopauzában (Marcus 1995, Silberstein és Merriam 2000). A tenziós fejfájás előfordulása is lényegesen magasabb a nők esetében (Rasmussen és mtsai., 1991). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a nemi hormonok lényegesen befolyásolhatják a trigeminális fájdalomérzést.

Az állatkísérletes eredmények is megerősítik a fájdalomérzésben fellelhető szexuális dimorfizmust, valamint a nemi hormonok moduláló hatását az orofaciális fájdalomérzés kapcsán (Cairns 2007), továbbá patkányoknál igazolt a nemi hormonok befolyása a lokalizációfüggő fájdalom esetében (Pajot és mtsai., 2003). A kraniofaciális fájdalomérzetet érintő nemi kettősség arra utal, hogy a trigeminális neuronok érzékenyek a nemi hormonokra, melyek módosíthatják működésüket. Ezek a receptorok megtalálhatóak mind a TG, mind a TNC területén, mely megteremtheti a lehetőségét a modulatív

hatásnak az aktiváció, ill. a perifériás és centrális szenzitizáció területén egyaránt (Bereiter és mtsai., 2005, Gupta és mtsai., 2011, Lee és mtsai., 2013, 2016). A sok összegyűlt kísérletes adat ellenére a fejfájások kapcsán tapasztalt nemi különbségek pontos mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, emiatt érdekes lehet a krónikus ösztadiol kezelés hatását vizsgálni a patkány NTG modelljében.

Anyag és módszer

Két hónapos felnőtt nőstény Sprague-Dawley patkányokat mély anesztézia alkalmazásával ovariektomizáltunk. Az ösztrogén kezelt csoport állatainál 15 mm hosszú (3,18 mm külső és 1,57 mm belső átmérőjű) silastic kapszulát ültettünk a bőr alá, mely 17β -ösztadiol és koleszterol 1:1 arányú keverékével volt megtöltve (OVX+E₂). A hormonkezelést nem kapó állatok (OVX) csak koleszterolt tartalmazó kapszulát kaptak. A beültetést követően heti gyakorisággal, 5 alkalommal vért vettünk a farokvénából, majd centrifugálás után a szérumból ösztadiol szintet mértünk.

Eredmények

A mért ösztadiol szint az első héttől kezdve szignifikánsan magasabb volt az OVX+E₂ állatoknál az OVX csoporthoz képest. Az OVX+E₂ patkányok mért ösztrogénszintje összevethető a proösztrozban lévő állatok hormonszintjével. Az OVX állatoknál is mérhető sokkal alacsonyabb, de nem elhanyagolható ösztrogénszint a plazmában, mely extragonadális eredetűnek tartható (Zhao és mtsai., 2005).

Anyag és módszer

Felnőtt nőstény patkányok ovariektómiáját követően az állatok felénél 17β -ösztadiol (OVX+E₂), másik felénél koleszterol (OVX) tartalmú kapszulát ültettünk a bőr alá a fentieknek megfelelően. Egy hónappal később az állatok fele egyszeri s.c. NTG injekciót kapott 10 mg/kg dózisban, míg a többi állatot a NTG oldószerével kezeltük. A kezelést követően négy órával a patkányokat perfundáltuk, majd a TNC-t eltávolítottuk immunhisztokémiai festések (CGRP, 5HT és CamKII) és Western blot (CamKII) céljából. A festett metszetek esetében az immunpozitív rostok által fedett területeket (CGRP és 5HT) és a festődést mutató sejtek számát (CamKII) vizsgáltuk. A Western blot esetében a relatív optikai denzitásértékeket hasonlítottuk össze.

Eredmények

Az OVX állatokban a hímek eredményeihez hasonlóan a NTG kezelés markáns változásokat okozott. A CGRP-IR rostok által lefedett terület csökkent, míg a 5HT és a CamKII expresszió szignifikánsan emelkedett a NTG hatására a TNC területén. Az OVX+E₂ patkányoknál a NTG hatása nem érvényesült, és az alap expresszió a CGRP esetén alacsonyabb, míg a 5HT esetében magasabb volt.

Megbeszélés

Kísérleti adataink igazolják, hogy az ösztadiol befolyásolja a CGRP, a 5HT és a CamKII expresszióját a patkány TNC-ben szisztémás NTG után. Korábbi adatok alapján az ösztrogén képes a CGRP mennyiségét csökkenteni mind a gerincvelőben (Moussaoul és mtsai., 1996), mind pedig az érző dúcok sejtjeiben (Yang és mtsai., 1998). A raphe magban indukálja a 5HT szintézis sebességhatározó enzimét, a triptofán hidroxilázt (Pecins-Thomson és mtsai., 1996, Lu és mtsai., 1999, Bethea és mtsai., 2000), miközben csökkenti a 5HTT-t, mely a visszavételért felelős (Pecins-Thomson és mtsai., 1998, Rehavi és mtsai., 1998).

A CGRP esetében a mi kísérleteinkben is csökkent expressziót tapasztalhatunk a TNC területén azoknál az állatoknál, ahol az ösztadiol plazmakoncentrációja magasabb, mely párhuzamba állítható a fenti, korábbi eredményekkel. Az ösztrogén receptorok jelen vannak a gerincvelői érző dúcok sejtjeiben (Yang és mtsai., 1998, Taleghany és mtsai., 1999), valamint a gerincvelői szürkeállományban (Shughrue és

mtsai., 1997). Az ösztadiol ezeken a receptorokon keresztül hatva csökkentheti a CGRP expressziót és védi ki a NTG hatásait. A CGRP-vel szemben a krónikusan magas ösztrogénszint megemelte a 5HT expressziót a TNC területén, mely hatásért elsősorban az ösztrogén okozta magasabb triptofán hidroxiláz és a csökkent 5HT visszavétel tehető felelőssé. Emellett az ösztrogén képes a 5HT_{1A} receptorok deszenzitizációjára a hipotalamuszban (Raap és mtsai., 2000), mely a leszálló szerotoninerg rendszer indirekt serkentését eredményezheti. Az ösztrogén receptorok, melyek felelősek lehetnek a hatás kialakulásáért, megtalálhatóak a raphe mag neuronjaiban (Leranth és mtsai., 1999). Hasonlóan a CGRP-hez, a 5HT esetében sem mutatkozott változás az OVX+E₂ állatokban NTG kezelés után, melyet akár annak is tulajdoníthatunk, hogy az eleve megemelkedett expresszió miatt további növekedés már nem volt lehetséges. Másrészt az is ismert, hogy az ösztadiol képes plasztikus változásokat létrehozni a szinapszisok struktúrájában egyes agyi területeken (García-Segura és mtsai., 1994), mely alapján ilyen változások esetlegesen a TNC területén is kialakulhattak.

A krónikus ösztadiol kezelés kivédi a NTG indukált CamKII emelkedést is. A hippocampusban, ahol a CamKII alapvető szerepet játszik a hosszú távú potenciációban, az ösztadiol megemeli ezen enzim expresszióját (Pozzo-Miller és mtsai., 1999, Sawai és mtsai., 2002). A mi eredményeink ellentmondanak ennek, hisz nem találtunk alap CamKII expressziónövekedést krónikus ösztadiol kezelés során, viszont eltűnt a NTG hatása.

Érdekes párhuzamot vonni a kísérleteink eredménye, mely szerint a migrént provokáló NTG (Olesen és mtsai., 1993) hatását a magas ösztrogén szint kivédi, és a klinikum között. A migrénes fejfájás legtöbbször lényegesen javul terhesség alatt, amikor a nemi hormonok szintje stabilan magas (Marcus 1995, Silberstein és Merriam 2000).

4.5. A krónikus ösztadiol kezelés hatása az orofaciális formalin modellben

Anyag és módszer

Felnőtt nőstény patkányok ovariectomiáját követően az állatok felénél ösztrogén (OVX+E₂), másik felénél koleszterol (OVX) tartalmú kapszulát ültettünk a bőr alá a korábbiakban leírtaknak megfelelően. 3 héttel később az állatokat két csoportba osztottuk: az első csoportban a patkányok egyszeri s.c. 50 µl 1,5%-os formalin injekciót kaptak a jobb oldali bajuszpárnába (OVX-Form, OVX+E₂-Form), az állatok másik fele fiziológiás sóoldatot kapott ugyanígy (OVX-Phys, OVX+E₂-Phys). Ezt követően az állatok viselkedését tükörfalú terráriumban vizsgáltuk (30x30x30 cm), mely fölött 1 m-el kamerát helyeztünk el. Az állatok 10 perces habituáció után megkapták az injekciót, majd 45 percig visszatettük őket és viselkedésüket a korábban már leírtak szerint analizáltuk (Clavelou és mtsai., 1995).

Négy órával a formalin és sóoldat injekciók adása után az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk, majd a TNC-ből sorozatmetszeteket készítettünk c-fos immunhisztokémiai vizsgálatok céljából. A metszeteket fénymikroszkóp alatt vizsgálva megszámoltuk a festődést mutató sejteket.

Eredmények

A viselkedési válasz követte a korábbi vizsgálatokban talált mintázatot. A fiziológiás sóoldatot kapott állatok viselkedése nem változott lényegesen, viszont a formalin injekció után az állatok intenzíven vakarták az érintett területet 3-4 percen keresztül. Az első fázisnak nevezett periódust egy 9-10 percig tartó nyugalmi szakasz követte, majd egy kevésbé intenzív, állandó vakarási reakciót észleltünk az állatok részéről, az ún. második fázist, mely kb. fél óráig tartott. Eredményeink azt mutatják, hogy a formalin injekciót kapott állatok fájdalomkerülő viselkedése szignifikánsan hosszabb, mint a sóoldatosoké.

Emellett azt észleltük, hogy az OVX+E₂-Form állatok szignifikánsan több időt töltöttek vakarózással az OVX-Form állatokhoz képest az első és a második fázis során.

Megbeszélés

Az eredményeink azt mutatják, hogy esetünkben a krónikus β -ösztradiol kezelés pronociceptív hatással bír. Ez a hatás az orofaciális formalin modell első és második fázisában is észlelhető. Az előbbi a formalin okozta kémiai stimulációnak, a második pedig az ezt követő gyulladós reakciónak tudható be (Tjolsen és mtsai., 1992). Emellett a krónikus ösztrogénkezelés kifejezettebbé tette a formalin okozta c-fos expressziót, mely ebben az esetben a nocicepció markerének tekinthető (Harris 1998). Az ösztrogén trigeminális nocicepciót moduláló hatása az alfa, béta és a G-protein kapcsolt ösztrogén receptoron (GPR30) keresztül valósulhat meg, ezek mind megtalálhatóak a trigeminális rendszerben. Az alfa receptorok az elsődleges trigeminális neuronok több mint 20%-ban a nagyobb sejtek magjaiban és a kisebb sejtek citoplazmájában fordulnak elő (Liverman és mtsai., 2009a), emellett a TG szatellita gliasejtjei is expresszálják őket (Puri és mtsai., 2011). A béta receptorok is jelen vannak mind a kisebb, mind a nagyobb dúcsejtekben, viszont hiányoznak a szatellita sejtekből (Puri és mtsai., 2011). A GPR30 a trigeminális dúcsejtek közel harmadában jelenik meg, főleg a kisebb sejtek plazmájában, de kimutatható a nagyobb méretű neuronokban is. Az alfa és a GPR30 receptorok kb. 10%-ban mutatnak kolokalizációt a patkány TG esetén (Liverman és mtsai., 2009a), és ez a jelenség a TNC felszíni lamináiban is fennáll az alfa és béta receptor között (Bereiter és mtsai., 2005). Ezen kívül az alfa receptorok megtalálhatók a nocicepcióra reagáló idegsejtekben (Amandusson és Blomqvist 2010), míg a GPR30 egerek TNC-jében is megjelenik (Hazell és mtsai., 2009). Humán szövettani vizsgálatok is igazolták az alfa receptor jelenlétét a TNC neuronjaiban, gliasejtjeiben és rostjaikban, míg a béta receptort a neuronok citoplazmájában mutatták ki (Fenzi és Rizutto 2011). A kísérleti adatok arra utalnak, hogy ezen receptorok modulációja befolyásolja a trigeminális nocicepció folyamatát: CFA okozta temporomandibuláris gyulladás esetében az ösztrogén dóziszfüggő módon pronociceptív hatásának bizonyult, és ösztrogén receptor antagonistá adásával mérsékelhető volt a gyulladós reakció (Kou és mtsai., 2011). Ugyanebben a modellben az ösztrogén receptor agonista kezelés fokozta a mechanikus allodynia kialakulását, és az elsődleges trigeminális neuronokban pronociceptív állapotra utaló változások jelentek meg (Liverman és mtsai., 2009b). Az ösztrogének két útvonalon is kifejthetik hatásukat: lassabb, genomikus és gyorsabb, nem genomikus módon (Heldring és mtsai., 2007, Srivastava és mtsai., 2013). Az előbbi esetben egyes gének transzkripciója változik meg, mint például a mitogén-aktivált protein kináz-1, az interleukin-1 receptor I, a bradikinin B2 receptor, a gamma-amino vajsav (GABA) transzporter protein, a GABA A receptor $\alpha 6$ alegység, az opioid receptor-like 1 receptor, a purinoreceptor P2X3, a TRPV1 és a neuropeptid Y, melynek kapcsán a kraniofaciális fájdalomhoz is köthető, hosszú távú változásokat detektáltak különböző sejtekben (Puri és mtsai., 2011, Puri és mtsai., 2006, Puri és mtsai., 2005, Flores és mtsai., 2003., Yu és mtsai., 2011, Yamagata és mtsai., 2016). Emellett az ösztrogén non-genomikus transzmembrán változásokat is képes kialakítani, melyek sokkal rövidebb idő alatt bekövetkeznek (Puri és mtsai., 2006, Tashiro és mtsai., 2009, 2012, Liverman és mtsai., 2009b, Fávaro-Moreira és mtsai., 2009). Ezek a változások sok olyan folyamatra hatnak, melyek alapvetően a trigeminális nocicepciót vagy éppen az endogén antinociceptív rendszert érintik (Niu és mtsai., 2012, Tashiro és mtsai., 2008), illetve a TNC neuronjainak ingerküszöbét befolyásolják (Flake és mtsai., 2005). Más kísérletekben az idegsejtek aktivációs (Diogenes és mtsai., 2006), illetve tüzelési aktivitásának (Tashiro és mtsai., 2012) vagy a glutamáterg neurotranszmisszióknak (Gazerani és mtsai., 2010, Bereiter és Benetti 2006) a változásait mutatták ki. Az ovariektomizált állatok ösztradiol kezelése más kísérletekben fokozta az arc allodiniáját (Liverman és mtsai., 2009b). Hasonló, állatokban végzett tartósabb ösztrogénpótlás pedig erősítette a fájdalomérzettel kapcsolatos viselkedésmintázatot temporomandibuláris gyulladós modellben (Kou és mtsai., 2011), mely esetben feltételezhető, hogy az ösztrogén fokozza a NF κ B DNS kötődését és bizonyos target gének átíródását. Egy másik vizsgálatban a két nappal korábban adott egyszeri ösztradiol injekció fokozta az ovariektomizált állatok s.c. karragenin okozta termális hiperalgéziáját, melyet a csökkent alfa kettő receptorális hatásnak tulajdonítottak (Nag és Mokha 2016). A proösztrosznak megfelelő magas ösztrogénszint hatására gyakoribb volt a

nocicepcióra utaló viselkedésminta intraokuláris kapszaicin adását követően, és a másodlagos trigeminális érző neuronok magasabb aktivitását jelezte a c-fos expresszió, melyet az ösztrogén indukált TRPV1, ill. anoctamin 1 expresszióknak tulajdonítottak (Yamagata és mtsai., 2016). Az ösztrogén hatásának komplexitását jelzi, hogy a trigeminális aktiváció másik modelljében inkább antinociceptív hatást észleltünk krónikus ösztrogénkezelést követően (Párdutz és mtsai., 2002, 2006). Ezen felül néhány kísérletes adat arra utal, hogy az ösztradiol kezelés nem bír lényeges hatással a nocicepcióra (Diogenes és mtsai., 2006, Niu és mtsai., 2012, Nag és Mokha 2006).

Összefoglalva a tartósan magas ösztradiol szint, a többi nemi hormon hatását kiiktatva pronociceptív a patkány orofaciális formalin modelljében. Az ösztrogén receptorok megtalálhatóak a trigeminális rendszerben és hatásukat feltehetően a TRPV1 és az anoctamin TNC-beli expressziónövekedésén és a Gasser dúc NFkB és ERK utak modulálásán keresztül éri el.

4.6. KYNA moduláló hatása a NTG modellben

Háttér

A kinurenin útvonal a triptofán lebomlásának egyik iránya, melynek végterméke a nikotin-adenin-dinukleotid (Beadle és mtsai., 1947). Az anyagcsereút központi vegyülete a kinurenin (L-KYN), mely semleges aminosav transzporter segítségével jut át a vér-agy gáton (Fukui és mtsai., 1991). Az agyban a L-KYN négy neuroaktív vegyületté alakulhat: 3-hidroxikinureninné, antranilsavvá, kvinolénsavvá és KYNA-vá, melyek cerebroventrikuláris adása viselkedési változásokat okoz rágcsálókban (Lapin 1978). A KYNA a kinurenin útvonal egy neuroaktív molekulája, mely L-KYN-ből képződik a neuronokban és az asztrocitákban a KAT révén (Guidetti és mtsai., 1997). Egyike az olyan endogén vegyületeknek, mely az excitátoros aminosav receptorok gátlását okozza, emiatt potenciális jelölt lehet bizonyos neurológiai kórképek jövőbeli kezelésében (Stone 2001). Képes gátolni NMDA receptorokat (Kessler és mtsai., 1989), dóziszfüggően hat az AMPA és kainát receptorokra is (Perkins és Stone 1985). Kísérletes adatok utalnak arra, hogy az agy emelkedett KYNA szintje neuroprotektív hatású lehet (Miranda és mtsai., 1997), és a kinurenineknek szerepe lehet a fejfájásos kórképekben is (Kiss és mtsai., 2004). A KYNA kevésbé jut át a vér-agy gáton (Fukui és mtsai., 1991), mely korlátozza az alkalmazhatóságát. Perifériásan adagolt L-KYN és a liquortér szerves sav transzporter gátló probenecid (PROB) együttes alkalmazásakor viszont lényegesen emelkedik az intracerebrális KYNA koncentráció (Santamaria és mtsai., 1996).

A L-KYN+PROB előkezelés kivédi a NTG okozta c-fos aktiválódást a TNC területén (Knyihár-Csillik és mtsai., 2007). Az elsődleges és másodlagos trigeminális érző neuronok közötti kapcsolat részben glutamáterg szinapszisok révén valósul meg (Goadsby és Classey 2000), és több adat utal az NMDA receptorok kulcsszerepére a centrális szenzitizációs mechanizmusokban (Haley és mtsai., 1990, Woolf és Thompson 1991). Állatkísérletes és humán adatok alapján a glutamát receptorok szerepe alapvető a migrénben résztvevő struktúrákban (Vikelis és Mitsikostas 2000). Ennek tükrében, hogy jobban megértsük az NMDA receptorok szerepét a trigeminális aktiváció és szenzitizáció folyamatában, megvizsgáltuk a L-KYN+PROB előkezelés hatását a TNC területén a patkány NTG modelljében.

Anyag és módszer

Felnőtt hím Sprague-Dawley patkányok fele L-KYN+PROB előkezelésben részesült (300 mg/kg és 200 mg/kg dózisban), míg az állatok másik fele oldószert kapott. Fél órával ezután az állatok egy részénél a TNC-t eltávolítottuk KYNA nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC) meghatározás céljából. A patkányok másik csoportja s.c. NTG (10 mg/kg), ill. placebo injekciót kapott, majd 4 órával később perfúziót követően a TNC-t feldolgoztuk nNOS Western blot és immunhisztokémiai vizsgálatok céljából.

Eredmények

Fél órával a L-KYN+PROB kezelés után a TNC KYNA tartalma nagyságrendekkel, szignifikánsan emelkedett a kontroll állatokhoz képest. Az immunhisztokémiai vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a NTG szignifikánsan megemeli a nNOS pozitív sejtek számát a TNC-ben, míg a L-KYN+PROB kezelés ezt a hatást kivédi. A Western blot analízis is megerősítette az immunhisztokémiai vizsgálatok adatait.

Megbeszélés

A HPLC eredményeink alapján a szerves sav transzporter inhibitor PROB együtt adása L-KYN-nel képes lényegesen megemelni a KYNA központi idegrendszeri koncentrációját (Santamaría és mtsai., 1996, Vécsei és mtsai., 1992). A további eredmények arra utalnak, hogy a KYNA képes kivédeni a NTG okozta nNOS emelkedést. Ez utóbbi jelenség hátterében az elsődleges trigeminális nociceptorok centrális nyúlványainak NO okozta aktivációja állhat, ami a megemelt nNOS révén öngerősítő folyamatot hozhat létre a TNC-ben, melyben a glutamát kulcsszerepet játszhat. A TNC-ben az összes glutamátreceptor típus expressziója megfigyelhető (Tallaksen-Greene és mtsai., 1992), az NMDA receptorok kiemelt szerepet játszanak a NO szintézisében (Entrena és mtsai., 2005), ráadásul ezek aktivációja kulcsfontosságú a hátsó szarvban kialakuló centrális szenzitizációs folyamatok kapcsán is (Hardingham és Bading 2003, Woolf és Salter 2000). Az NMDA blokádi kivédi a C-rost, ill. a bőr kémiai ingerlése okozta hátsó szarvi centrális szenzitizációt (Davies és Lodge 1987, Haley és mtsai., 1990). Ráadásul több vizsgálat igazolta az NMDA és NO/ciklikus guanozil-monofoszfát (cGMP) rendszer közötti kapcsolatot a nNOS aktivációja révén (Bredt és mtsai., 1990), továbbá in vitro kísérletek szerint az NMDA okozta excitotoxicitás a nNOS által termelt NO felesleg függvényében változik (Garthwaite és mtsai., 1988). Összességében ezek az adatok komoly interakcióra utalnak a két rendszer között, mely most igazolódott a trigeminális rendszerben is. Az, hogy a NTG a CamKII expresszióját megemeli a TNC-ben szintén párhuzamba állítható a többi eredménnyel, hisz a foszforilált NMDA receptorok hiperexcitabilitást eredményeznek, erősítve a centrális szenzitizációs folyamatokat (Woolf és Salter 2000). Szintén az NMDA receptorok foszforilációját írták le neuropátiás fájdalom modelljében, ill. kapszaicin okozta hiperalgézia során (Gao és mtsai., 2005, Zou és mtsai., 2000). Intraciszternális kapszaicin adását követően mind az NMDA, mind a non-NMDA gátlás kivédi a TNC c-fos emelkedését (Mitsikostas és mtsai., 1998,1999). Ezek alapján a központi idegrendszerben felhalmozódott KYNA az NMDA receptor antagonizmusával védheti ki a centrális szenzitizációt (McCormack 1994). Az NMDA antagonizmus mellett (IC₅₀ ~ 8 µM) (Kessler és mtsai., 1989) a KYNA képes az AMPA és a kainát receptorokon is hatni (Perkins és Stone 1985). Az NMDA antagonisták (MK-801) mellett, a szintetikus AMPA antagonisták (GYKI-52466) is hatékonyan blokkolják a trigeminális nocicepciót (Storer és Goadsby 1999), akárcsak az NMDA és AMPA antagonisták LY293558 is. Összefoglalva a KYNA - elsősorban antiglutamáterg hatása révén - képes a trigeminális szenzitizáció blokkolására a migrén NTG modelljében, ezáltal a migrénelles kezelések új támadáspontját adhatja.

4.7. KYNA moduláló hatása a durális IS modellben

Háttér

A KYNA, mint a triptofán anyagcsere neuroaktív metabolitja több receptoron hathat, mint az NMDA, az AMPA, a kainát és a GPR35, és befolyásolhatja a neurogén gyulladás kifejlődését (Vécsei és mtsai., 2013). Korábbi vizsgálatok szerint a KYNA antiinflammatoros hatással bír a trigeminális rendszerben (Csáti és mtsai., 2015), viselkedésvizsgálatok alapján is antinociceptív tulajdonságú az állatokban (Heyliger és mtsai., 1998) és hatékonyan csökkenti a neuropátiás fájdalmat is (Pineda-Farias és mtsai., 2013).

Anyag és módszer

A felnőtt patkányok fele KYNA injekciót kapott s.c. 1 mmol/kg dózisban, majd ezt követően 1 órával a korábbiakban részletezett módon történt meg a dura IS és SIF kezelése. Kettő és fél, illetve 4 óra múlva az állatokat perfundáltuk, és a TNC-t CGRP, TRPV1 és nNOS immunhisztokémiai festések céljából eltávolítottuk. A CGRP és TRPV1 pozitív rostok által fedett területet képanalizátor segítségével határoztuk meg, míg a nNOS pozitív sejteket megszámoltuk.

Eredmények

Az IS kezelt állatokban mind a 3 marker expressziója szignifikánsan magasabb volt: a CGRP esetében ez a hatás már 2,5 óras latenciával jelentkezett, míg a többieknél 4 óra elteltével észleltük ezen változásokat. A KYNA előkezelés ezeket az emelkedéseket képes volt szignifikáns módon csökkenteni.

Megbeszélés

A KYNA neuroaktív hatását elsősorban a glutamát receptorok blokkolásával és a GPR35 kötődés révén fejtí ki (Vécsei és mtsai., 2013). Három órával a dura lokális IS kezelése után a TNC glutamát tartalma megemelkedik (Sarker és Fraser 2002), ahol az NMDA-n kívül, megtalálhatóak az AMPA, kainát és metabotróp glutamát receptorok is (Storer és Goadsby 1999). Ismert, hogy a nem NMDA receptorok antagonistái is sikeresen csökkentik a másodlagos nociceptorok aktivitását (Dougherty és mtsai., 1992), valamint hogy az AMPA receptorok befolyásolják a c-fos expressziót és a neurotranszmissziót a trigeminális rendszerben (Mitsikostas és mtsai., 1999), továbbá az, hogy perifériás fájdalom modellben a kainát receptorok aktiválódása mechanikus és termikus hiperalgécia, illetve allodynia megjelenésével társult (Choi és mtsai., 2012). A CGRP képes a TNC területén a glutamát expresszióját fokozni (Choi és mtsai., 2012), és a glutamát magasabb szintje észlelhető migrénes betegeknél a rohamok alatt és között (Campos és mtsai., 2013), ezért a korábbiakat is figyelembe véve a legvalószínűbb az, hogy a glutamát erg neurotranszmisszió megváltozása felelős a CGRP expresszió modulálásáért.

A TRPV1 és az NMDA receptorok kolokalizációt mutatnak a TG-ban, és patkányban mechanikus hiperalgécia esetén a két receptor a CamKII és protein kináz C útvonalok révén interakcióba kerül (Lee és mtsai., 2012). Hasonló kolokalizáció figyelhető meg a GPR35 esetében is a hátsó gyöki érző dúc kis és közepes átmérőjű sejtjeiben, mely utóbbi receptor a protein kináz A útvonalon keresztül befolyásolhatja a TRPV1 működését (Ohshiro és mtsai., 2008).

A KYNA a nNOS expresszióját is képes volt befolyásolni a modellünkben, ami elsősorban a KYNA NMDA antagonistá hatásának köszönhető, mely receptor aktivációja a NO képződést serkenti a TNC-ben (Dohrn és Beitz 1994). A másik magyarázat az lehet, hogy a KYNA az érző dúcokban lévő GPR35-hez kötődve (Cosi és mtsai., 2011) G proteinen keresztül gátolja az adenilát cikláz aktivitását (Ohshiro és mtsai., 2008), ami hatással lehet a nNOS működésére. (Ohnishi és mtsai., 2008, Boissel és mtsai., 2004).

Összességében a fenti eredményeink párhuzamba állíthatóak azzal a megfigyeléssel, hogy a kinurenin útvonal megváltozott működése kapcsolatban áll bizonyos fejfájásbetegségekkel, pl. krónikus migrénben és cluster fejfájásban csökkent KYNA szint detektálható (Curto és mtsai., 2015a, b).

4.8. Kinureninek és nemi hormonok hatása a CSD kialakulásában

Háttér

A migrénes betegek 20-30%-ában a fejfájást ún. aurajelenség előzi meg, mely legtöbbször a látótérben megjelenő villanó fények formájában jelentkezik (Rasmussen és Olesen 1992). Erős tudományos bizonyítékok támasztják alá (Hadjikhani és mtsai., 2001), hogy a migrénes aura megfelel a CSD-nek, ami

legtöbbször a tarkólebenyből indul ki. Ez a jelenség egy lassan tovaterjedő (3-5 mm/min) neuronális és glia eredetű depolarizációs hullám, melyet egy hosszabban tartó gátlás követ (Leao 1944). Ez a folyamat többféleképpen előidézhető, pl. lokális K^+ alkalmazásával, ami a migrénes aura modelljének tekinthető (Bergerot és mtsai., 2006). Állatkísérletekben a CSD képes a trigeminális nociceptorok aktiválására, ami felelős lehet a migrénes fejfájás létrejöttéért (Bolay és mtsai., 2002, Moskowitz 1984, Moskowitz és mtsai., 1993).

Glutamát vagy NMDA adása kiválthat CSD-t (Ayata és Moskowitz 2006), és a familiáris hemiplégiás migrén transzgenikus knock-in egérmodelljében mind az egyes (FHM1) (Tottene és mtsai., 2009; van den Maagdenberg és mtsai., 2004), mind a kettős típus (Leo és mtsai., 2011) esetén a CSD kialakulása a megnövekedett glutamát felszabaduláshoz kötött. Az NMDA antagonisták gátolják a CSD kialakulását és tovaterjedését (Nellgard és Wieloch 1992), míg ezzel párhuzamosan az NMDA blokkoló ketamin jól csökkentette az aurajelenséget a FHM-es betegeknél anélkül, hogy a fejfájást befolyásolta volna (Kaube és mtsai., 2000).

A CSD kialakulása függ a nemtől is, mivel annak kialakulási küszöbe alacsonyabb nőstény egereknél a hímekhez viszonyítva (Brennan és mtsai., 2007). Női nemi hormonok hatására az in vitro neokortex preparátumokon a CSD kialakulási gyakorisága és amplitúdója megnő (Sachs és mtsai., 2007), és egyes adatok arra utalnak, hogy az ösztrogén megemeli a CSD terjedési sebességét is (Guedes és mtsai., 2009). A FHM1 nőstény knock-in egerek CSD érzékenysége csökken ovariectomia után, mely részlegesen visszaállítható ösztrogénkezelés mellett (Eikermann-Haerter és mtsai., 2009). Ezen kívül az aura nélküli migrénnel ellentétben, az aurás migrén előfordulása megnő magas ösztrogénszint kapcsán, mint pl. terhességben (Maggioni és mtsai., 1997) és fogamzásgátló tabletta szedése esetén (Granella és mtsai., 2000).

A KYNA endogén glutamát antagonistaként (Kessler és mtsai., 1989) képes a K^+ indukálta CSD kialakulását gátolni a patkány kortextben (Világi és mtsai., 2001) és a cerebellumban (Lauritzen és mtsai., 1988). Kísérleteink célja az volt, hogy a kinureninek CSD-re gyakorolt hatását vizsgáljuk a női nemi hormonális státusz tükrében.

Anyag és módszer

Felnőtt hím és nőstény patkányokat használtunk a kísérlethez. Az állatokat előkezelés szempontjából négy csoportra osztottuk. Az első csoport fiziológiás sóoldatot kapott, a második PROB kezelésben részesült (200 mg/kg), a harmadik csoport L-KYN injekciót kapott (300 mg/kg), míg a negyedik csoport állatai kombinált előkezelést. A kontroll és a L-KYN csoportba további nőstény állatokat tettünk és a CSD-t a patkányok ciklusának függvényében analizáltuk. A ciklusidőt a kísérlet előtt határoztuk meg a hüvelyi kenet Giemsa festődése alapján.

A kezelések után fél órával a patkányok külön csoportjában, hím és nőstény állatokat felhasználva HPLC-vel meghatároztuk az agy KYNA koncentrációját.

A CSD kiváltásához és a regisztrációhoz klorálhidráttal altatott patkányokat használtunk. Az állatokat sztereotaxiás készülékben rögzítettük, a koponyacsontot szabadabbá tettük és három lyukat fúrtunk occipitálisan (stimuláció helye), occipitoparietálisan (első regisztrációs hely) és frontálisan (második regisztrációs hely). A kezelések után fél órával a CSD-t a stimulációs régióra helyezett 1 M KCl oldattal átítatott vattával váltottuk ki. A CSD-ket egy órán keresztül megszámoltuk és kiszámoltuk a frekvenciát. Emellett az első és a második regisztrációs helyet vizsgálva következtettünk a CSD terjedési sebességére.

Eredmények

A L-KYN+PROB előkezelések két nagyságrenddel megemelték az agyi KYNA koncentrációját. Önmagában a PROB és a L-KYN kezelés is szignifikáns emelkedést okozott a kontroll állatokhoz képest. A nőstényeknél magasabb alap KYNA szint mutatkozott a hímekhez viszonyítva, és ez a különbség a PROB kezelést követően is megmaradt, de nem mutatkozott szignifikánsnak a többi előkezelésnél.

A nőstényeknél mindegyik aktív előkezelés szignifikánsan csökkentette a parietoccipitális CSD-k frekvenciáját, legmarkánsabban a kombinált előkezelés. Hím patkányok esetében csak a L-KYN+PROB kezelés mérsékelte szignifikánsan a CSD-k előfordulási gyakoriságát. Az aktív előkezelést nem kapott nőstény állatoknál a nemi ciklus nem befolyásolta a CSD megjelenését. A L-KYN kezelést kapott nőstény állatok diösztruszában viszont szignifikánsan kisebb volt a CSD frekvencia.

Megbeszélés

A korábbiaknak megfelelően ismét igazolódott, hogy a L-KYN adása, különösen, ha a szerves sav transzporter gátló PROB-el kombináljuk, képes megemelni a kortikális KYNA koncentrációt. Mindegyik kezelési csoportot figyelembe véve a KYNA szintje magasabb a nőstény állatokban, mint a hímekben, mely a nőstények magasabb KYNA szintetizáló képességére utalhat. A L-KYN utáni KYNA emelkedés aránya viszont a hímekben magasabb. A nemi hormonok befolyásolhatják a triptofán metabolizmus enzimeit, mely magyarázhatja az eltérő KYNA értékeket.

A TDO és az IDO a kezdő és sebességmeghatározó lépésnek tekinthető a kinurenin útvonalban. Szájon át adagolt triptofán mellett a vizelettel ürült kinurenin metabolitok mennyisége magasabb nőkben, mint férfiakban, mely női hormonok moduláló hatására utalhat (Michael és mtsai., 1964). A nemi hormonok és a TDO, IDO közötti kapcsolat nem teljesen tisztázott: a liquorban mért KYNA szint néhány vizsgálat szerint nőkben magasabb (Nilsson és mtsai., 2007), míg mások nem találtak nemi különbséget (Ilzecka és mtsai., 2003). Egyes eredmények szerint az ösztrogéneknek TDO indukáló hatása van, míg az androgének ellentétesen viselkednek (Rose és Braidman 1971). Ami az IDO-t illeti, direkt hormonális hatás nem valószínű, de citokin indukálta IDO aktivitás előfordulhat (Oxenkrug 2007). Az ösztrogén képes fokozni az IDO aktivitását az antigénprezentáló sejtekben (Zhu és mtsai., 2007), mely magyarázatot adhat a magasabb IDO szintre a nőkben a gyakoribb autoimmun betegségekből (Pertovaara és mtsai., 2005, Widner és mtsai., 2000). Összességében ezek a hatások magyarázhatják, hogy az alap KYNA szint miért emelkedettebb a nőstény állatokban. Az anyagcsereút további enzimeit, mint a KAT, a kinurenin-3-hidroxiláz és a KYNU az ösztrogének hatására inkább gátlódnak a májban (Brown és mtsai., 1961, Rose 1966) és feltételezhetően az agyban is (Rossi és mtsai., 2010). A KAT-ra gyakorolt gátló hatás elsősorban a csökkent piridoxál 5-foszfát mennyiségnek tudható be. A kinurenin 3-hidroxiláz expressziója csökken ösztrogénkezelt majmok raphe magjában (Bethea és mtsai., 2009), és a kinurenináz is gátlódik a májban ösztrogén hatására (Wolf és mtsai., 1980). Az ösztrogénnel ellentétben a progeszteronnak nincs gátló hatása a KAT-ra vagy a kinurenin 3-hidroxilázra (Saad és mtsai., 1974). Ezek alapján az is magyarázható, hogy miért magasabb a KYNA központi idegrendszeri koncentrációjának emelkedési aránya L-KYN kezelés után a hímekben a nőstényekhez képest.

A vizsgálatainkban a PROB egyedüli adása csökkentette a nőstény állatok CSD frekvenciáját, míg ilyen hatás a hímekben nem fordult elő. Önmagában adva a PROB ugyan gátolja a KYNA központi idegrendszeri kiürülését, de ez nem emeli meg a KYNA koncentrációját a mikromolós nagyságrendig, mely elegendő az NMDA receptorok gátlásához (Taylor és mtsai., 1997, Urenjak és mtsai., 1997). A nőstény állatokban a PROB utáni KYNA koncentráció 10 ng/g nagyságrendig emelkedett, mely nanomolaris nagyságrendnek felel meg. Ezért a PROB egyéb hatását is feltételezni lehet, mint a pannexin 1 gátlása, ami az ATP felszabadulásban játszik szerepet (Silverman és mtsai., 2008) vagy a multidrog rezisztens protein blokkolása, illetve indirekt módon másodlagos hírvivőkre hatva (Taylor és mtsai.,

1997). Másrészt a KYNA non-kompetitíven gátolja az $\alpha 7$ nikotinos acetil-kolin receptorokat (nAChR) már nanomolaris koncentrációban is (Hilmas és mtsai., 2001, Stone és mtsai., 2007), így a preszinaptikus nAChR-ra hatva képes lehet csökkenteni a felszabaduló glutamát mennyiségét (Grilli és mtsai., 2006, Konradsson-Geuken és mtsai., 2010). Feltételezhetően ezen mehanizmus révén a KYNA szint megduplázódása 50%-al csökkenti a striatum glutamát felszabadulását (Carpenedo és mtsai., 2001). Tehát lehetséges, hogy PROB adása után a kissé megemelkedő KYNA szint képes annyira mérsékelni a glutamát felszabadulást a nőstényekben, ami már megjelenik a CSD frekvencia csökkenésében. Az agyi nAChR sűrűség nagyobb a nőstény állatokban, mely fokozhatja a nemek közötti különbséget a KYNA-val szembeni érzékenység tekintetében.

A L-KYN csökkentette a CSD frekvenciát a nőstény állatokban, különösen ha PROB-el kombinálva adtuk, és ekkor a hím állatokban is hasonló hatással bírt. A L-KYN hatása a korábban már leírt következményes kortikális KYNA emelkedésnek tulajdonítható. A KYNA a központi idegrendszer több funkciójában részt vesz (Schwarcz és Pellicciari, 2002), melyek közül kiemelendő az NMDA receptor antagonistá hatása (Kessler és mtsai., 1989, Perkins és Stone 1982). Az anyagcsereút KYNA felé térítése a kvinolénsav képződése helyett kinurenin 3-hidroxiláz inhibitor alkalmazásával védő hatással bír a konvulziókkal szemben és megakadályozza a neuronok pusztulását (Chiarugi és mtsai., 1995; Moroni és mtsai., 2003). Mivel az jól ismert, hogy az NMDA receptorok alapvető szerepet játszanak a CSD kialakulásában és tovaterjedésében (Lauritzen és Hansen 1992; Marrannes és mtsai., 1988; Somjen 2001), azt feltételeztük, hogy a megemelt KYNA koncentráció okozta gátlásuk fékezi a CSD-t. Nem meglepő, hogy a PROB-el kombinált kezelés még kifejezettebb hatással bír, hisz gátlódik a KYNA kiürülése a központi idegrendszerből, illetve a PROB önmagában is gátló hatást fejthet ki. Azt találtuk, hogy a kezelések hatása a CSD-re kifejezettebb a nőstény állatoknál, és ezen belül is leginkább a ciklus diösztrozus fázisában, melyet mind az ösztrogén neuronális excitabilitásra, mind a kinurenin anyagcserére gyakorolt hatása magyarázhat. Mint korábban említettük az ösztrogének általánosságban fokozzák a CSD-t a nőstény állatokban. Erre utalnak a mi vizsgálati eredményeink is, mert a CSD frekvencia számszerűen magasabb a proösztrozusban lévő állatoknál, amikor az ösztrogénszint magas. Mivel az elemszám alacsony, ez a különbség nem éri el a statisztikailag szignifikáns értéket, hacsak a kontroll és a L-KYN adatokat nem vesszük egybe. A glutamáterg neurotranszmissziót, ami alapvető a CSD kialakulásában, befolyásolja az ösztrogén, mely megemeli az NMDA receptorok expresszióját és aktivitását a központi idegrendszerben (Dominguez és mtsai., 2007; Gazzaley és mtsai., 1996; Tang és mtsai., 2008). A dendritűské, (Brinton és mtsai., 1997) és az NMDA receptor dominálta szinapszisok száma is emelkedik ösztrogén hatására, és változékonyságot mutat a női nemi ciklus kapcsán (Woolley és McEwen 1992, 1993, 1994). Mindezen hatások mellett az ösztrogének kinurenin anyagcserére gyakorolt hatása is fontos lehet az eredményeink megértésében. Ahogy korábban említettük, a kinureninre gyakorolt hormonális hatás bonyolult, de a legtöbb eredmény azt mutatja, hogy az ösztrogén nem segíti a KYNA képződését L-KYN-ből, mivel a fő szintetizáló enzimét, a KAT-ot inkább gátolja. Mindenesetre az ösztrogén okozta emelkedett kortikális excitáció és a csökkent KYNA szint együtt nem magyarázza egyértelműen a magasabb L-KYN okozta CSD szupressziót a nőstényekben a hímekhez képest, összességében inkább az ellenkezőjét várnánk. Azt feltételezzük, hogy a nemek közti különbség leginkább a L-KYN diösztrozusban gyakorolt hatásának köszönhető és kisebb mértékben kapcsolható az ösztrozushoz. A proösztrozus ösztrogénúcsától távol eső, alacsonyabb diösztrozus alatti ösztrogénszint csökkenti a glutamáthoz kapcsolódó ingerküszöböt és visszaállítja a magasabb KYNA szintézist, mely maximalizálja a L-KYN CSD-t csökkentő hatását. A másik fontos nemi hormon, a progeszteron is szerepet játszhat az észlelt változások kialakításában, hisz több adat utal arra, hogy csökkenti az agyi excitabilitást (Frye 2010, Lambert és mtsai., 2003) és szintje megemelkedik a diösztrozus alatt (Freeman 2006). A progeszteron csökkentheti az NMDA receptorok aktivitását és több módon elősegítheti a L-KYN okozta CSD csökkenést: antagonistá hatás révén (Frye és Rhodes 2009), a kötőhelyek számának csökkenése

(Cyr és mtsai., 2000) és az egyik aktivátor, a szigma1 receptor bénítása révén (Maurice és mtsai., 2006). Ettől függetlenül valószínűtlen, hogy a progeszteron lényeges szerepet játszik a L-KYN diösztuszban észlelhető hatásában. Egyrészt a kontroll nőstény állatok CSD frekvenciája numerikusan alacsonyabb az ösztusz alatt, amikor a progeszteronszint alacsony, mint diösztuszban, amikor a progeszteronszint emelkedik. Másrészt annak ellenére, hogy a progeszteronnak antikonvulzív hatást tulajdonítanak, in vitro kortikális preparátumokhoz adva az ösztrogénhez hasonlóan inkább emelik a CSD előfordulását és amplitúdóját (Sachs és mtsai., 2007), mely jelenséggel párhuzamba állítható az aurás migrén rosszabbodása terhességben vagy hormonális fogamzásgátló alkalmazása kapcsán. Végül a progeszteron hatását főleg egy metabolitjának az allopregnenolonnak tulajdonítják, mely a GABA_A receptorokon hat. Több vizsgálat utal arra, hogy ezen utóbbi receptornak elhanyagolható szerepe van a CSD kialakulásában: GABA_A agonisták nem befolyásolják a CSD kialakulását (Addae és mtsai., 2011, Ayata 2009), és a CSD nem módosítja a GABA felszabadulást (Fabricius és mtsai., 1993) és a GABA_A receptorok expresszióját (Haghir és mtsai., 2009, Redecker és mtsai., 2002).

Összefoglalva a L-KYN perifériás adásával létrejött KIR-i KYNA emelkedés gátolja a CSD kialakulást az agyban, elsősorban az NMDA antagonizmus révén. A L-KYN hatása markánsabb a nőstény állatokban és függ a nemi ciklustól is. Ezt a nemi dimorfizmust a gonadális hormonok kinurenin anyagcseréje gyakorolt hatásával és a kortikális ingerlékenység megváltozásával magyarázhatjuk. Emellett nem kizárható háttér az agy eltérő fejlődése a nemeknél. Mivel a CSD jelensége megfelel a migrénes aurának, ez új lehetőséget biztosíthat migrénellenes kezelések kifejlesztésére is.

4.9. Kinurenin származékok hatása a fejfájás NTG modelljében

Háttér

A KYNA központi idegrendszeri hatásait gátolja, hogy a molekula nehezen jut át a vér-agy gáton (Fukui és mtsai., 1991), azonban az előzőekben leírt felhasználási mód (L-KYN+PROB) mellett lehetséges a KIR-be jobban bejutó KYNA analógok vizsgálata. Ezért kísérleteinkben a vér-agy gáton jobban átjutó KYNA származék, az N-(2-N-pirrolidinilet)-4-oxo-1H kvinolin-2-karboxamid hidroklorid (SZR81) hatását vizsgáltuk a trigeminovaszkuláris aktiváció NTG modelljében, patkányokban.

Anyag és módszer

KYNA meghatározás HPLC-vel

A kísérletekhez a korábbiakhoz hasonlóan felnőtt hím Wistar patkányokat használtunk. A KYNA meghatározáshoz két állatcsoportot hoztunk létre. Az első csoport nem kapott aktív kezelést, a mintákat egy órával a placebo injekció után dolgoztuk fel HPLC mérések céljából. A második csoport patkányai 1 mmol/kg dózisban SZR81-t kaptak, majd 1, illetve 5 órával később az állatokat perfundáltuk, és a TNC-t eltávolítottuk KYNA meghatározás céljából.

Immunhisztokémia

A patkányokat előkezelés szempontjából 4 csoportra osztottuk. Az első csoport nem kapott aktív előkezelést. A többi csoport különböző dózisokban SZR81-t kapott – 0,1 mmol/kg, 0,5 mmol/kg és 1 mmol/kg adagolással. Egy órával később az állatok felét 10 mg/kg dózisú egyszeri NTG injekcióval kezeltük, míg a patkányok másik felét a NTG oldószerével. Négy órával később a perfúziós fixálás után a TNC-t eltávolítottuk, majd sorozatmetszeteket készítettünk, melyen CGRP, c-fos, nNOS és CamKII immunhisztokémiai festést végeztünk. A CGRP festődést képanalizátorral vizsgáltuk a többi metszet esetén a pozitív sejteket megszámláltuk.

Western blot

Két előkezelési csoportot alkottunk, az első csoport nem kapott aktív kezelést, míg a második csoport 1 mg/kg dózisú SZR81 kezelésben részesült. Ezt követően NTG/oldószer injekciók következtek a fenti bekezdésnek megfelelően, majd 4 órával ezután a TNC-t eltávolítottuk CGRP és nNOS Western blot céljából. Belső kontrollként β -aktint használtunk.

Viselkedésvizsgálatok

A vizsgálatot 3 óra 40 perccel a NTG, ill. placebo injekciók adása után végeztük 30 perces habituációt követően. Az állatokat open-field dobozba helyeztük, majd 15 percen át rögzítettük a járkálási időt, a megtett távolságot és az ágaskodások számát.

Eredmények

KYNA koncentráció

A HPLC mérések a TNC-ben egyértelmű KYNA emelkedést mutattak egy órával az SZR81 beadása után a kontrollcsoporthoz képest, mely 5 óra elteltével visszatért az alapszintre. Annak ellenére, hogy más validálást igényel, vizsgáltuk a plazma KYNA szintjét is, és előzetes eredményeink alapján itt sokkal kifejezettebb emelkedést tapasztaltunk.

Immunhisztokémia

A TNC felszíni rétegeiben gazdag CGRP rosthálózat, valamint számos c-fos, nNOS és CamKII pozitív sejt található, melyek eloszlása homogén volt a vizsgált TNC szakasz teljes hosszán. A CGRP pozitív rostok által fedett terület szignifikánsan csökkent NTG kezelés után, ezzel szemben a c-fos, nNOS és CamKII festődést mutató sejtek számában a NTG szignifikáns emelkedést okozott. Ezeket a hatásokat az SZR81 előkezelés dóziszfüggő módon ki tudta védeni. A legkisebb alkalmazott adagolás (0,1 mmol/kg) nem befolyásolta szignifikánsan a NTG okozta változásokat, míg a magasabb dózis (0,5 mmol/kg és 1 mmol/kg) kiküszöbölte a NTG hatását a CGRP, c-fos, nNOS és CamKII tekintetében.

Western blot

Az adataink alátámasztották az immunhisztokémia által mutatott eredményeket. A NTG szignifikánsan lecsökkentette a CGRP és megemelte a nNOS expressziót, míg a legnagyobb dózisú SZR81 előkezelés ezt a hatást kivédte.

Viselkedésvizsgálatok

A patkányok által megtett távolság csökkent NTG kezelés hatására, ezt az SZR81 előkezelés ki tudta védeni. A mozgással töltött idő tekintetében és az ágaskodások számában nem volt különbség egyik csoport között sem.

Megbeszélés

A korábbi munkákhoz hasonlóan itt is igazolódott, hogy a NTG képes a trigeminális rendszer stimulációjára, mely a CGRP csökkenésével és a c-fos, nNOS, CamKII emelkedésével jár a TNC területén. Az immunhisztokémia és a Western blot által kimutatott CGRP csökkenés transzmitter felszabadulást jelez a centrális végződésekből, mely az elsődleges érző neuronok aktivitását jelzi (Zhang és mtsai., 1994). A másodlagos trigeminális érző idegsejtek területén is hasonló jelenség mutatkozik, melyet az emelkedett c-fos megjelenés jelez megerősítve a korábbi vizsgálatok eredményét (Tassorelli és Joseph 1995, Párdutz és mtsai., 2000, 2002, 2007). Ezen kívül a fájdalommal kapcsolatban jelentkező szenzitizációs markernek tartható nNOS és CamKII expresszió (Chacur és mtsai., 2010, Fang és mtsai.,

2002) is megemelkedik ugyanitt. A NTG okozta szenzitizációs folyamatokat már klinikai vizsgálatok is megerősítették (Di Clemente és mtsai., 2009). A korábbi kutatások alapján ezekben a folyamatokban kiemelt jelentőségű az NMDA és az nAChR receptorok szerepe. Az elsődleges trigeminális neuronok fokozott tüzelése megemeli a TNC glutamát tartalmát és ez korrelál az arc szenzoros érzékenységével (Oshinsky és Luo 2006). Feltehetőleg az NMDA receptorokon keresztül (Wang és Mokha 1996) terjed át az elsődleges trigeminális neuronok aktivitása a másodlagosokra (Burstein és mtsai., 1998). Emellett adatok támasztják alá, hogy az NMDA rendszer kapcsolódik a NO képződéshez (Entrena és mtsai., 2005), és interakció van az NMDA és a NO/cGMP rendszer között (Bredt és mtsai., 1990). Az NMDA okozta excitotoxicitás mértéke függ a nNOS rendszer által termelt NO többlettől (Garthwaite és mtsai., 1988). Az NMDA trigeminális fájdalom feldolgozásban játszott szerepét humán vizsgálatok is alátámasztják, ahol az antagonistá ketamin képes volt a migrénes fájdalmat enyhíteni (Nicolodi és Sicuteri 1995). Más glutamát receptorok is megtalálhatóak a TNC-ben (Tallaksen-Greene és mtsai., 1992), melyek szintén közvetíthetik ezt a hatást. Ezt az elméletet alátámasztják azok a megfigyelések, mely szerint az antagonisták képesek kivédeni a c-fos emelkedést (Mitsikostas és mtsai., 1999) és a kiváltott válaszokat a TNC-ben (Storer és Goadsby 1999). Ezen másodlagos érző neuronok aktivitását a preszinaptikus nAChR-k is modulálhatják, megváltoztatva az ingerületátvitelt a központi idegrendszer felé (McGehee és mtsai., 1995, Gray és mtsai., 1996). Az open-field tesztnél is azt észleltük, hogy a megtett távolság csökkent a NTG csoportban, mely szintén nociceptív reakcióként értékelhető (Denenberg 1969).

Az SZR81 dózisfüggő módon védte ki a NTG hatásokat és a HPLC eredmények ismeretében azt gondoljuk, hogy az SZR81 legalábbis részben KYNA-vá alakul, és ez felelős lehet az észlelt hatásokért. Mivel a központi idegrendszeri KYNA emelkedés csak mérsékelt, ezért úgy gondoljuk, hogy a látottakért elsősorban a perifériás KYNA hatása felelős, mely az SZR81-ből alakult ki. Emellett az SZR81 közvetlen hatása is feltételezhető elméletileg mind a perifériás, mind a központi idegrendszer területén, és ezzel a feltételezéssel párhuzamba állítható egy másik, a vér-agy gáton jobban penetráló KYNA-származék hasonló hatása egy korábbi kísérletben (Marosi és mtsai., 2010).

Az SZR81 okozta CGRP felszabadulás markáns csökkenése a trigeminális aktiváció során perifériás hatást feltételez. A glutamát receptorok megtalálhatók a trigeminális rendszer környéki részén (Quartu és mtsai., 2002, Watanabe és mtsai., 1994), és a gátlásuk csökkenti a CGRP felszabadulását (Garry és mtsai., 2000). Az nAChR-k is jelen vannak a TG-ban (Liu és mtsai., 1998), és a gátlásuk szintén csökkentheti a glutamát mennyiségét (Carpenedo és mtsai., 2001) és kivédi a CGRP által okozott vazodilatációt az arcon (Just és mtsai., 2005). A GPR35 is jelen van mRNS és fehérje szinten a nociceptív pályarendszer területén, beleértve a spinális dúcot és a gerincvelőt is, és negatív módon csatolódik az érző dúc adenilát cikláz rendszeréhez, ami befolyásolhatja a fájdalomérzést (Ohshiro és mtsai., 2008). Eredményeinkkel párhuzamba állítható az a korábbi megfigyelés, miszerint a lokálisan adott KYNA dózisfüggően képes csökkenteni a mechanikus allodynaiát ízületi gyulladásos modellben (Mécs és mtsai., 2009).

Az SZR81 másodlagos érző neuronokra gyakorolt moduláló hatása a c-fos expresszió változásával mérhető, mely az elsődleges trigeminális nociceptorok gátlása mellett a trigeminális rendszer centrális részére kifejtett hatással is létrejöhet. A glutamát receptorok jelen vannak a másodlagos trigeminális érző neuronok posztszinaptikus membránján (Tallaksen-Greene és mtsai., 1992), és fontos szerepet játszanak ezen idegsejtek nociceptív aktiválásában. Ehhez kapcsolódóan a glutamát receptorok blokkolása csökkenti a c-fos expressziót fájdalomban (Mitsikostas és mtsai., 1998, 1999). Az $\alpha 7$ nikotinos receptorok gátlása az elsődleges trigeminális érző neuronokon (Liu és mtsai., 1998) pedig csökkentheti a glutamát felszabadulását ezek végződéseiből (Carpenedo és mtsai., 2001), és ezáltal mérsékli a másodlagos érző neuronok aktiválódását (Carstens és mtsai., 2000). A korábbi kísérletek is azt igazolják, hogy a KYN+PROB és egy másik KYNA analóg, az SZR72 sikeresen kivédte a c-fos aktivációt a TNC

területén NTG adása után, míg a KYNA önmagában adva kevésbé volt hatásos, feltehetőleg a csökkent vér-agy gát penetrancia folytán (Knyihár-Csillik és mtsai., 2007, 2008).

Az SZR81 moduláló hatása a nNOS és a CamKII expresszióra a NTG okozta centrális szenzitizáció gátlását jelzi, mivel mindkét enzim kiemelt fontosságú ebben a folyamatban (Chacur és mtsai., 2010, Fang és mtsai., 2002), mely alatt a folyamatos fájdalmas ingerlés következményeként anatómiai és funkcionális plasztikus változások alakulnak ki, ahol az NMDA és az AMPA receptoroknak kulcsszerepük van (Latremoliere és Woolf 2009). Összességében úgy tűnik, hogy az SZR81 a perifériás hatásain túl, az NMDA és/vagy AMPA gátláson keresztül is befolyásolhatja a centrális szenzitizáció folyamatát, így a nNOS és CamKII expresszióját is. Az is lehetséges, hogy az $\alpha 7$ nikotinos receptor gátlása indirekt módon is modulálja ezt a folyamatot a glutamát felszabadulás csökkenésén keresztül (Carpenedo és mtsai., 2001). A viselkedésvizsgálatok is azt mutatják, hogy az SZR81 antinociceptív hatású, mely párhuzamba állítható a fenti morfológiai eredményekkel.

Összefoglalva az SZR81 csökkentette a trigeminális aktivációt a periférián és a másodlagos trigeminális érző neuronok területén. Ezen túl a TNC-ben kivédte azokat a molekuláris változásokat, melyek a centrális szenzitizáció jelenségéhez köthetőek. Amellett, hogy a hatásért részben perifériás - SZR81, KYNA átalakulás - tehető felelőssé, direkt és indirekt központi idegrendszeri mechanizmusok is feltételezhetők.

4.10. Az anandamid moduláló hatása patkányban szisztémás NTG adása után

Háttér

A kannabinoid receptorok (CB) G-proteinhez kapcsoltak, két fő típusuk van a CB1 és a CB2, az előbbi jelen van a májban, tüdőben és a központi idegrendszerben, míg az utóbbi az immunsejteken expresszálódik (Lynn és mtsai., 1994, Pettit és mtsai., 1996).

Állatkísérletek alapján feltételezhető, hogy az endokannabinoidok szintjének változása kapcsolható a fájdalomérzéshez és az antinocicepcióhoz (Guindon és Hohmann 2009). A CB1 receptorok megtalálhatóak a TG-ban és az elsődleges érző neuronok centrális nyúlványaiban (Pertwee és mtsai., 2001), és képesek gátolni a durális innervációt adó A δ és C típusú trigeminális neuronok tüzelését, ami ezen receptorok fájdalomérzésben betöltött szerepére utal (Wilson és Nicoll 2002). Annak ellenére, hogy a pszichoaktív mellékhatásaik korlátozzák a terápiás alkalmazásukat (Crawley és mtsai., 1993), az endokannabinoidok és a nocicepció kapcsolatát széles körűen vizsgálják. A legelőször felfedezett endokannabinoid az N-arachidonil-etanolamid, másnéven anandamid (AEA), CB receptor és TRPV1 agonista hatással bír (Ross 2003), emellett patkányokban képes kivédeni a NTG okozta hiperalgéziát és c-fos emelkedést a TNC területén (Greco és mtsai., 2010), mely arra utal, hogy befolyásolja a trigeminális fájdalom feldolgozását.

TRPV1, nNOS, NFkB, COX2, KATII

Első kísérletsorozatunkban arra kerestük a választ, hogy az AEA kezelés képes-e a trigeminális aktiváció, ill. szenzitizáció különböző markereit modulálni a patkány NTG modelljében. A TRPV1, nNOS és NFkB mellett a COX2 és a KATII expresszióját vizsgáltuk.

Anyag és módszer

Kísérleteinkben felnőtt hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. Az állatokat négy csoportra osztottuk. Az első csoport volt az abszolút kontroll, az AEA és a NTG oldószereit kapták. A második csoport csak NTG kezelésben részesült (10 mg/kg intraperitonealisan). A harmadik és negyedik csoport

két alkalommal kapott AEA (Sigma-Aldrich, USA) injekciókat 5mg/kg dózisban fél órával a NTG, ill. placebo kezelés előtt, majd 1 órával ezután. Az állatokat négy órával a NTG/NTG oldószer után perfundáltuk, és a TNC-t feldolgoztuk immunhisztokémiai festések (TRPV1, nNOS és NFkB) és Western blot (nNOS, COX-2 és KATII) vizsgálatok céljából. Az immunhisztokémiai eljárásokkal festett metszeteken a TRPV1 festődést mutató rostok és a nNOS sejtek által fedett terület százalékos arányát képanalizátorral határoztuk meg, míg az NFkB festődést mutató sejtek számát optikai disszektor módszerrel mértük (Gundersen és mtsai., 1988). A Western blot csíkoknál denzitometriás analízist végeztünk, melyet β -aktinra normalizáltunk.

Eredmények

Az immunhisztokémiai vizsgálatok alapján kimutatható, hogy a NTG okozta TRPV1, nNOS és NFkB emelkedést az AEA kezelés képes volt kivédeni. A Western blot eredmények szerint a NTG okozta nNOS, COX2 emelkedést és a KATII csökkenést szintén kivédte az AEA adása.

Megbeszélés

Megfigyeléseink azt mutatják, hogy a CB és TRPV1 agonista AEA kivédi a NTG TRPV1 expressziót fokozó hatását. Ez párhuzamba állítható azzal, hogy az ionotróp CB receptorok aktiválódása bizonyos fájdalom modellekben a nocicepció receptorainak gátlását, valamint a hiperalgéria csökkenését eredményezi (Akopian és mtsai., 2009), és az AEA intratekális adása csökkenti az állatok érzékenységét termikus fájdalomra, mely hatást a TRPV1 antagonistá capsazepine kivédi (Horvath és mtsai., 2008). Az AEA ezen kívül képes deszenzitizálni a TRPV1 receptorokat a vázizomzat arterioláiban (Lizanecz és mtsai., 2006), mely arra utal, hogy csökkenti ezen receptorok aktivitását. Másrésztől gátolja a CGRP és NO indukált durális vazodilatációt pre- és posztzinaptikus támadási ponttal (Akerman és mtsai., 2004). Humán vérmintákból kimutatták, hogy az AEA képes a NTG indukált mRNS expressziót visszaszorítani a mononukleáris sejtekben (Peng és mtsai., 2014). Nem tudjuk, hogy milyen mértékű a TRPV1 szerepe az AEA modulált szenzitizációs folyamatokban, de az irodalmi adatok alapján (Akerman mtsai., 2004, 2007) inkább a CB1 szerepe tűnik fontosabbnak.

A NTG adás után megfigyelhető nNOS emelkedés a TNC területén egy önerősítő folyamatot sejtet a másodlagos trigeminális érző neuronokban (Párdutz és mtsai., 2000), melyet az AEA ki tud védeni. Több vizsgálati eredmény is alátámasztja a CB1 és a NO rendszer közötti szoros kapcsolatot: a nNOS és a CB1 kolokalizációt mutat a gerincvelő II laminájában található neuronokon (Salio és mtsai., 2002), míg a NTG okozta hiperalgéria az endokannabinoidok szintjének változását okozza a patkány különböző agyi régióiban (Greco és mtsai., 2010). A kapott eredményeink párhuzamba állíthatók azokkal a megfigyelésekkel, melyben a CB1 agonisták kivédtek a KCl indukált nNOS emelkedést a kisagyi szemcsesejtekben (Hillard és mtsai., 1999), ill. azokkal a kísérletekkel, melyekben a kannabinoid agonisták képesek voltak a neuronok nNOS mRNS szintjét csökkenteni (Carney és mtsai., 2009).

A NFkB fontos szerepet játszik a NTG okozta neurogén gyulladás kialakulásában (Reuter és mtsai., 2002), melyet az AEA modulálni képes. Ennek hátterében az állhat, hogy a citokin kaszkádra hatva a tumor nekrosis faktor által mediált aktivációt gátolja (Sancho és mtsai., 2003). Emellett igazolódott, hogy az AEA a lipopoliszacharid okozta aktivitást is képes kivédeni, mely arra utal, hogy gátolja a proinflammatoros mediátorokat a NFkB-n keresztül (Nakajima és mtsai., 2006). Ez utóbbi fontosságát az is kiemeli, hogy a NFkB gátló pathenolid kivédte a NTG okozta c-fos emelkedést a patkány TNC-ben (Tassorelli és mtsai., 2005). Feltételezhető, hogy az endokannabinoidok a proinflammatoros faktorok átírásának gátlásával negatív visszacsatolást biztosítanak a gyulladásos folyamatokban (Berdyshev és mtsai., 2001).

Fontos kiemelni, hogy az AEA a COX2 egyik szubsztrátja, mely prosztaglandint és etanolamidot eredményez (Yu és mtsai., 1997). Az AEA sikeresen kivédte a NTG okozta COX2 emelkedést is a kísérleti modellünkben. Ennek mechanizmusa nem teljesen ismert, az egyik feltételezés, hogy a termék negatív

feedback hatása lehet ezért felelős, ami csökkenti a COX2 expressziót. Az AEA képes a citokin indukált gyulladáshoz vezető kaskád gátlására is, és lehetséges, hogy ez eredményezi a COX2 csökkenő megjelenését.

A NTG okozta KATII csökkenést megakadályozza az AEA adása, mely 2-arachidonil-glicerinnel hasonlóan csökkenti a kalcium okozta citokróm C felszabadulást a mitokondriumokból, ezáltal védve azokat a citokróm mediált károsodástól, mely DNS fragmentációt és apoptózist okozhat (Catanzaro és mtsai., 2009, Zaccagnino és mtsai., 2012). Összességében a NTG mitokondriális diszfunkciót okozó hatása is feltételezhető, melyet az AEA kivéd a citokróm C felszabadulás gátlásán keresztül.

5HTT

A kísérleti adatok szerint a migrén és a vérlemezkék 5HT homeosztázisa összefüggnek egymással (Danese és mtsai., 2014), és ez utóbbira hatással lehetnek a kannabionoidok: a δ 1-tetrahidrokannabinol képes a 5HT vérlemezkékből történő felszabadulását gátolni (Volfe és mtsai., 1985), míg a 5HT felvételt többfajta kannabionoid is gátolni képes (Velenovska és Fisar 2007, Volfe és mtsai., 1985). A szerotoninerg rendszer és a kannabionoidok perifériás interakciója viszonylag széleskörűen vizsgált téma, viszont kevesebbet tudunk a központi idegrendszeri kölcsönhatásokról. Ezek alapján, a korábbi eredményekből kiindulva kézenfekvő volt vizsgálni, hogy az AEA előkezelés hatással van-e a NTG indukált 5HTT expresszióra.

Anyag és módszer

A vizsgálathoz felnőtt hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. A csoportok és az állatok kezelése megegyezett az előző fejezetben leírtakkal. Négy órával a NTG/placebo adását követően az állatokat perfundáltuk, a TNC-t eltávolítottuk immunhisztokémiai és Western blot vizsgálatok céljából. Az immunhisztokémia esetében a 5HTT festődést mutatott rostok által fedett terület százalékos arányát határoztuk meg, míg a Western blot esetén a csíkok optikai denzitását mértük meg, belső kontrollként gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) meghatározást használtunk.

Eredmények

A NTG okozta megemelkedett 5HTT expressziót megerősítette az immunhisztokémiai vizsgálatok eredménye és a Western blot is. Érdekes módon azokban az állatokban, akik csak AEA kezelést kaptak a csupán NTG kezelésben részesülőkhöz hasonlóan magas 5HTT szint mutatkozott. A kombinált aktív kezelést kapott patkányokban (NTG+AEA) viszont meglepő módon alacsony 5HTT expresszió látszott mind az immunhisztokémiai, mind a Western blot adatok alapján.

Megbeszélés

Eredményeink azt mutatják, hogy a NTG korábban leírt hatása mellett az AEA kezelés jelentős moduláló hatással bírt a 5HTT TNC-beli megjelenésére állatkísérletes modellünkben, az AEA önmagában megemelte az expressziót. A szakirodalmi adatok alapján az AEA több gén kifejeződését szabályozza, legtöbbször receptorokon keresztül (CB), de leírtak receptor independens hatást is (Correa és mtsai., 2008; Mestre és mtsai., 2011; Sancho és mtsai., 2003). Esetünkben nem lehet kizárni az indirekt hatást, mivel igazolt, hogy az AEA képes a nNOS aktiválása révén megemelni a NO szintet (Carney és mtsai., 2009), így lehetséges, hogy a megemelkedett 5HTT szint ennek a következménye. Az is ismert, hogy a CB1 receptor aktiváció képes a leszálló pályarendszerek működését megváltoztatni és így csökkenteni a nocicepciót, és az AEA is szerepet játszik ebben a jelenségben (Akerman és mtsai., 2004, 2013). A saját vizsgálataink is azt mutatták, hogy az AEA előkezelés képes kivédeni a NTG okozta változásokat a szenzitizációs és gyulladáshoz vezető markerek tekintetében a TNC területén. Ennek tükrében váratlan az a megfigyelés, hogy az AEA+NTG csoportban a 5HTT expresszió az abszolút kontroll állatokéhoz hasonlóan alacsony szintű volt. Ennek oka nem teljesen egyértelmű, és több lehetséges mechanizmus is felmerülhet. Lehetséges egy negatív feedback mechanizmus bekapcsolódása, mivel mind a NTG, mind az AEA megemeli a NO és a cGMP szintet (Carney és mtsai., 2009). Azt is figyelembe kell venni, hogy a NTG képes az endokannabinoidok lebontásában részt vevő enzimek aktivitását fokozni a patkányok

agytörzsében (Greco és mtsai., 2010), ezáltal befolyásolhatja az endokannabinoid anyagcsere utat. Azt sem zárhatjuk ki, hogy a kombinált kezelés genomikus szinten hat, és a 5HTT gyors expressziónövekedése 4 óra elteltével már nem érvényesül, a szintek visszaesnek.

Összefoglalva, az AEA kulcsszerepet játszik a trigeminális centrális szenzitizáció markereinek modulálásában és hatással van a 5HTT expresszió szabályzására, így feltételezhető, hogy a migrén kialakulásában is kiemelkedő jelentőségű a kannabinoid és a trigeminális rendszer kapcsolata.

5. ÖSSZEGZÉS (ÚJ EREDMÉNYEK, MEGÁLLAPÍTÁSOK)

Munkánkban a trigeminális rendszer állatkísérletes aktivációját és szenzitizációját vizsgáltuk és a kapott eredményeket igyekeztünk párhuzamba állítani a migrén patomechanizmusára jellemző folyamatokkal.

1. A NO donor NTG szisztémás adása patkányokban szelektíven fokozza a TNC területén található másodlagos trigeminális neuronok nNOS expresszióját. Ez egy helyi öngerősítő folyamatot hozhat létre, mely magyarázatot adhat a NTG okozta migrénes fejfájás nagyobb latenciájára, és a rohamok kapcsán jelentkező centrális szenzitizációs jelenségek modellje lehet, míg a nNOS ezen folyamatok markerének tekinthető.
2. A NTG a CamKII expresszióját is megemeli a TNC területén, mely enzim kulcsszerepet játszik a glutamáterg neurotranszmisszió szabályozásában és ezáltal a szenzitizációs folyamatok fenntartásában.
3. A szisztémás NTG adás lecsökkentette a CGRP expressziót mutató rostok által fedett területet és a boutonok méretét a TNC területén, mely transzmitterfelszabadulás, a trigeminális rendszer aktivációjára utal. Ugyanitt emelkedett a 5HT pozitív rostok mennyisége, ami a perifériás vagy centrális szerotoninergerg pályák fejfájásban betöltött szerepét erősíti.
4. A NTG megemelte mind a TRPV1, a COX2 és a NFkB expresszióját a TNC területén, melyek mind a gyulladási folyamatokban és nociceptív működésben szerepet játszó molekulák.
5. A szisztémás NTG lecsökkentette a kinurenin útvonal enzimeinek expresszióját a TNC-ben, mely összességében elsősorban KYNA csökkenést okoz. Az endogén antiglutamáterg hatás mérséklődése is szerepet játszhat a szenzitizációs folyamatok felerősödésében a trigeminális rendszerben.
6. Az orofaciális formalin modellel végzett vizsgálatainkban a TNC területén c-fos és nNOS emelkedés mutatkozott, mely kapcsolatba hozható az aktivációs és szenzitizációs jelenségekkel.
7. A TG elektromos ingerlését követően szignifikáns c-fos emelkedést találtunk az ipszilaterális TNC területén, mely jelzi a trigeminális aktivációt. Emellett az NRM mindkét oldalán is hasonló változást észleltünk, ez indirekt módon következhetett be a kortexen, talamuszon, illetve a PAG-on keresztül.
8. A kétféle durális kémiai ingerlésnél CFA adása után nem észleltük a másodlagos trigeminális nociceptorok fokozott aktivitását, míg az IS képes volt ezen aktivitást megnövelni, mely c-fos expresszióban nyilvánult meg. Ezen eredmények különböző latenciájú trigeminális aktivációra utalnak ebben a modellben.
9. A durális IS alkalmazása megemelte a patkány TNC CGRP, TRPV1 és nNOS tartalmát, mely jelzi az aktivációs és szenzitizációs folyamatok aktiválódását ebben a modellben.

10. A COX2 inhibitorok képesek a NTG okozta nNOS és CamKII változásokat kivédeni a TNC területén, míg a COX1 gátlás és a szumatriptán előkezelés erre nem volt képes. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a COX2 izoenzim játszik szerepet a szenzitizációs folyamatok kialakulásában. A szumatriptán, annak ellenére, hogy effektív a migrén rohamkezelésében nem volt hatásos a kísérletünkben, feltehetőleg a rosszabb vér-agy gát penetranciája miatt.
11. A krónikus ösztadiol kezelés kivédte a NTG okozta változásokat a 5HT, a CGRP és a CamKII tekintetében. Ebben a modellben a hormon adása antinociceptív hatásúnak tűnik. Ezzel ellentétben az orofaciális formalin teszt alkalmazásakor az ösztadiol fokozza a TNC c-fos expresszióját és a nociceptív viselkedésmintát. Ebben az esetben pronociceptív hatást tanúsít. Ez alapján az ösztadiol hatása a trigeminális fájdalomra komplex folyamat, jelentősen függhet a stimulus minőségétől.
12. A glutamát antagonistá KYNA magasabb koncentrációja a központi idegrendszerben vagy a KYNA analógok alkalmazása kivédte a NTG okozta változásokat, azaz befolyásolja az aktivációs és szenzitizációs mechanizmusokat a trigeminális rendszerben.
13. A KYNA képes a migrénben is szerepet játszó CSD kialakulását fékezni feltételezhetően a glutamát antagonistá hatása miatt. Érdekes módon ez a hatás nőstény állatokban kifejezettebb, melyet a gonadális hormonok triptofán anyagcserére és kortikális excitabilitásra gyakorolt hatásával magyarázhatunk.
14. Mind a KYNA, mind a szumatriptán sikeresen kivédi a durális IS kezelés okozta változásokat az aktivációs és szenzitizációs markerek tekintetében (CGRP, TRPV1 és nNOS), és ebben a modellben hatása hasonló a migrén rohamterápiájában igen hatékony szumatriptánéhoz. A KYNA esetében a perifériás és centrális glutamát antagonistá hatás érvényesülhet, míg a szumatriptán a perifériás 5HT_{1B/D} receptorok blokkolása révén hathat.
15. A CB receptor agonista AEA kivédte a NTG okozta szenzitizációs marker (TRPV1, nNOS, NFκB, COX2 és KATII) változásokat a TNC-ben.
16. Az AEA képes modulálni a 5HTT expresszióját a NTG modellben. Önmagában adva megemeli a 5HTT expresszióját, de a NTG-el kombinált kezelés érdekes módon csökkent 5HTT-t eredményezett, melyet a két molekula esetleges interakciójával lehet magyarázni.

A migrén kialakításában számos idegrendszeri struktúra részt vesz létrehozva a legmarkánsabb tünetet, a fejfájást, mely során a trigeminális rendszer aktivációja és szenzitizációja meghatározó jelenség (Dodick 2018). Vizsgálatainkkal ezt a két jelenséget tanulmányoztuk többfajta állatkísérletes modell alkalmazásával. Markereket találtunk, melyek mérése információt adhat az állatokban zajló folyamatokról, így tükrözhetik a migrénes páciensek trigeminális aktivációjának és szenzitizációjának mechanizmusát és lezajlását. Ezek közül kiemelendő a NO donor NTG adásakor megemelkedő nNOS, mely szép példája a trigeminális önerősítő folyamatoknak, és jelentősége humán vizsgálatokkal is igazolódott (Olesen 2010). A különböző aktivációs és szenzitizációs markerek viselkedésének feltérképezése után vizsgálatainkkal a változások modulálására fókuszáltunk. Egyrészt migrénben is használatos hatásmechanizmusú farmakonokat próbáltunk ki és igazoltuk, hogy a COX2-nek kiemelt jelentősége van a trigeminális aktiváció kialakulásában. Más farmakológiai támadáspontú szerek közül a KYNA és származékai nagy hatékonysággal védték ki a migrén különböző modelljeiben észlelhető változásokat, melyet elsősorban a glutamát antagonistá hatásuknak tulajdonítunk. Ezen vegyületcsoport a későbbiekben ígéretes jelölt lehet a klinikai gyógyszervizsgálatokban. A kannabinoid agonista

anandamidnak is fontos hatása volt a modellekben, mely a CB receptorok szerepére utalhat a fejfájások patomechanizmusában.

A migrén és a fejfájások általában jelentős szexuális dimorfizmust mutatnak, emiatt érdekes kísérleteket végeztünk az ösztrogén hatásának feltérképezése céljából ezekben a modellekben. Eredményeink alapján elmondható, hogy az ösztradiol hatása komplex, akár pro- akár antinociceptív is lehet az alkalmazott modelltől függően. Ez párhuzamba állítható azokkal a megfigyelésekkel, melyek szerint a nemi hormonok fejfájások klinikumára gyakorolt hatása bonyolult folyamat, nem csak a hormonok aktuális koncentrációja, hanem annak változása is fontos lehet, nem beszélve a gonadális hormonok egymásra hatásáról.

Ezek az alap kutatásban elért eredmények hozzájárulhatnak a fejfájások és a migrén folyamatainak pontosabb megértéséhez és új támadáspontú kezelések kifejlesztésére adhatnak lehetőséget.

6. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT SZOLGÁLTATÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Párdutz Á, Krizbai I, Multon S, Vecsei L, Schoenen J. Systemic nitroglycerin increases nNOS levels in rat trigeminal nucleus caudalis. *Neuroreport*. 2000 Sep 28;11(14):3071-5.

Párdutz Á, Multon S, Malgrange B, Parducz A, Vecsei L, Schoenen J. Effect of systemic nitroglycerin on CGRP and 5-HT afferents to rat caudal spinal trigeminal nucleus and its modulation by estrogen. *Eur J Neurosci*. 2002 Jun;15(11):1803-9.

Párdutz Á, Szatmári E, Vecsei L, Schoenen J. Nitroglycerin-induced nNOS increase in rat trigeminal nucleus caudalis is inhibited by systemic administration of lysine acetylsalicylate but not of sumatriptan. *Cephalalgia*. 2004 Jun;24(6):439-45.

Párdutz Á, Hoyk Z, Varga H, Vecsei L, Schoenen J. Oestrogen-modulated increase of calmodulin-dependent protein kinase II (CamKII) in rat spinal trigeminal nucleus after systemic nitroglycerin. *Cephalalgia*. 2007 Jan;27(1):46-53.

Varga H, **Párdutz Á**, Vámos E, Plangar I, Egyud E, Tajti J, Bari F, Vecsei L. Cox-2 inhibitor attenuates NO-induced nNOS in rat caudal trigeminal nucleus. *Headache*. 2007 Oct;47(9):1319-25.

Varga H, **Párdutz Á**, Vámos E, Bohár Z, Bago F, Tajti J, Bari F, Vecsei L. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 attenuates nitroglycerin-induced calmodulin-dependent protein kinase II alpha in rat trigeminal nucleus caudalis. *Neurosci Lett*. 2009 Feb 20;451(2):170-3.

Vámos E, **Párdutz Á**, Varga H, Bohár Z, Tajti J, Fülöp F, Toldi J, Vecsei L. I-kynurenine combined with probenecid and the novel synthetic kynurenic acid derivative attenuate nitroglycerin-induced nNOS in the rat caudal trigeminal nucleus. *Neuropharmacology*. 2009 Sep;57(4):425-9.

Chauvel V, Vámos E, **Párdutz Á**, Vecsei L, Schoenen J, Multon S. Effect of systemic kynurenine on cortical spreading depression and its modulation by sex hormones in rat. *Exp Neurol*. 2012 Aug;236(2):207-14.

Bohár Z, Fejes-Szabó A, Tar L, Varga H, Tajti J, **Párdutz Á**, Vecsei L. Evaluation of c-Fos immunoreactivity in the rat brainstem nuclei relevant in migraine pathogenesis after electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Neurol Sci*. 2013 Sep;34(9):1597-604.

Fejes-Szabó A, Bohár Z, Vámos E, Nagy-Grócz G, Tar L, Veres G, Zádori D, Szentirmai M, Tajti J, Szatmári I, Fülöp F, Toldi J, **Párdutz Á**, Vecsei L. Pre-treatment with new kynurenic acid amide dose-dependently prevents the nitroglycerine-induced neuronal activation and sensitization in cervical part of trigemino-cervical complex. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014 Jul;121(7):725-38.

Fejes-Szabó A, Bohár Z, Nagy-Grócz G, Vámos E, Tar L, Pődör B, Tajti J, Toldi J, Vécsei L, **Párdutz Á**. Effect of probenecid on the pain-related behaviour and morphological markers in orofacial formalin test of the rat. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2015;14(3):350-9.

Nagy-Grócz G, Tar L, Bohár Z, Fejes-Szabó A, Laborc KF, Spekker E, Vécsei L, **Párdutz Á**. The modulatory effect of anandamide on nitroglycerin-induced sensitization in the trigeminal system of the rat. *Cephalalgia*. 2016 Aug;36(9):849-61. doi: 10.1177/0333102415613766. Epub 2015 Oct 28.

Nagy-Grócz G, Laborc KF, Veres G, Bajtai A, Bohár Z, Zádori D, Fejes-Szabó A, Spekker E, Vécsei L, **Párdutz Á**. The Effect of Systemic Nitroglycerin Administration on the Kynurenine Pathway in the Rat. *Front Neurol*. 2017 Jun 14;8:278. Erratum in: *Front Neurol*. 2020 Sep 24;11:1049.

Nagy-Grócz G, Bohár Z, Fejes-Szabó A, Laborc KF, Spekker E, Tar L, Vécsei L, **Párdutz Á**. Nitroglycerin increases serotonin transporter expression in rat spinal cord but anandamide modulated this effect. *J Chem Neuroanat*. 2017 Nov;85:13-20.

Fejes-Szabó A, Spekker E, Tar L, Nagy-Grócz G, Bohár Z, Laborc KF, Vécsei L, **Párdutz Á**. Chronic 17 β -estradiol pretreatment has pronociceptive effect on behavioral and morphological changes induced by orofacial formalin in ovariectomized rats. *J Pain Res*. 2018 Sep 25;11:2011-2021.

Laborc KF, Spekker E, Bohár Z, Szűcs M, Nagy-Grócz G, Fejes-Szabó A, Vécsei L, **Párdutz Á**. Trigeminal activation patterns evoked by chemical stimulation of the dura mater in rats. *J Headache Pain*. 2020 Aug 15;21(1):101.

Spekker E, Laborc KF, Bohár Z, Nagy-Grócz G, Fejes-Szabó A, Szűcs M, Vécsei L, **Párdutz Á**. Effect of dural inflammatory soup application on activation and sensitization markers in the caudal trigeminal nucleus of the rat and the modulatory effects of sumatriptan and kynurenic acid. *J Headache Pain*. 2021 Mar 31;22(1):17. doi: 10.1186/s10194-021-01229-3. PMID: 33789568; PMCID: PMC8011387.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálásan köszönöm szüleimnek, hogy szeretetükkel és nevelésükkel olyan emberré váltam, aki belevághatott ebbe a munkába, édesapámnak, aki már gyermekkoromban felkeltette az érdeklődésemet a természettudományok és a tudományos kutatómunka iránt. Köszönet illeti középiskolai tanáraimat, hisz az ott szerzett tudás alapozta meg a későbbi karrieremet. Rengeteget tanultam Jancsó Gábor professzor úrtól, aki TDK hallgatóként megismertetett a szomatoszenzoros és fájdalomérző rendszer mélyebb működésével. Vécsei László professzor úrnak kiemelt hálával tartozom, mivel példamutatással és fáradhatatlan segítséggel pártfogolta munkámat. Egyúttal köszönöm Klivényi Péter professzor úrnak, hogy tudományos és oktatói ambícióimat mindvégig támogatta a Neurológiai Klinikán. Tajti János professzor úr barátsága és szakmai támogatása kiemelkedő volt a fejfájásbetegek ellátásával és a kutatással kapcsolatban, hálával tartozom érte. Munkámban meghatározó volt a Jean Schoenen professzornál töltött idő a Liege-i Tudományegyetemen, mely megalapozta a tudományos irányultságomat a migrén vizsgálata területén. Köszönöm Dr. Fejes-Varga Hedvignek, Dr. Vámos Enikőnek, Dr. Fejes-Szabó Annamáriának, Fülöpné Dr. Bohár Zsuzsannának, Dr. Nagy-Grócz Gábornak, Dr. Spekker Eleonórának és Dr. Laborc Klaudiának, mint munkatársaknak és PhD hallgatóknak a sok erőfeszítést, mellyel a kutatómunkájukat végezték. Hálás vagyok a Neurológiai Klinika összes munkatársának, hisz folyamatosan segítettek céljaim elérését és a hallgatóimnak, akiket oktathattam, mivel tőlük is rengeteget tanulhattam. Kiemelt hálával gondolok Dr. Varga Lindára, kinek az odafigyelése nagyon sokat jelent nekem. Köszönöm Dr. Papp Zoltánnak és Dr. Szpisjak Lászlónak segítő barátságukat és fiamnak, Árpádnak a szeretetteljességét, mely nélkül ezt a feladatot sokkal nehezebb lett volna elvégezni.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbadie C, Besson JM. *Neuroscience*. 1992 Jun;48(4):985-93.
- Adams J, Collaço-Moraes Y, de Bellerocche J. *J Neurochem*. 1996 Jan;66(1):6-13.
- Addae JI, Ali N, Stone TW. *Eur J Pharmacol*. 2011 Feb 25;653(1-3):41-6.
- Akerman S, Kaube H, Goadsby PJ. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Apr;309(1):56-63.
- Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Jan;320(1):64-71.
- Akerman S, Holland PR, Lasalandra MP, Goadsby PJ. *J Neurosci*. 2013 Sep 11;33(37):14869-77.
- Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Patwardhan A, Hargreaves KM. *Trends Pharmacol Sci*. 2009 Feb;30(2):79-84.
- Amandusson A, Blomqvist A. *Eur J Pain*. 2010 Mar;14(3):245-8.
- Amaya F, Oh-hashii K, Naruse Y, Iijima N, Ueda M, Shimosato G, Tominaga M, Tanaka Y, Tanaka M. *Brain Res*. 2003 Feb 14;963(1-2):190-6.
- Arulmani U, Gupta S, VanDenBrink AM, Centurión D, Villalón CM, Saxena PR. *Cephalalgia*. 2006 Jun;26(6):642-59.
- Arvieu L, Mauborgne A, Bourgoin S, Oliver C, Feltz P, Hamon M, Cesselin F. *Neuroreport*. 1996 Aug 12;7(12):1973-6.
- Ayata C, Moskowitz MA. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 May;290(5):H1837-41.
- Ayata C. *Cephalalgia*. 2009 Oct;29(10):1095-114.
- Basbaum AI, Fields HL. *Annu Rev Neurosci*. 1984;7:309-38.
- Baulmann J, Spitznagel H, Herdegen T, Unger T, Culman J. *Neuroscience*. 2000;95(3):813-20.
- Beadle GW, Mitchell HK, Nyc JF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1947 Jun;33(6):155-8.
- Behan WM, McDonald M, Darlington LG, Stone TW. *Br J Pharmacol*. 1999 Dec;128(8):1754-60.
- Beiche F, Klein T, Nüsing R, Neuhuber W, Goppelt-Struebe M J. *Neuroimmunol*. 1998 Aug 14;89(1-2):26-34.
- Bellamy J, Bowen EJ, Russo AF, Durham PL. *Eur J Neurosci*. 2006 Apr;23(8):2057-66.
- Berdyshev EV, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH. *FASEB J*. 2001 Oct;15(12):2171-8
- Bereiter DA, Cioffi JL, Bereiter DF. 2005 Nov;50(11):971-9.
- Bereiter DA, Benetti AP. *Pain*. 2006 Dec 15;126(1-3):175-83.
- Berger RJ, Zuccarello M, Keller JT. *Neuroreport*. 1994 Jan 12;5(4):519-21.
- Bergerot A, Holland PR, Akerman S, Bartsch T, Ahn AH, MaassenVanDenBrink A, Reuter U, Tassorelli C, Schoenen J, Mitsikostas DD, van den Maagdenberg AM, Goadsby PJ. *Eur J Neurosci*. 2006 Sep;24(6):1517-34.
- Bethea CL, Mirkes SJ, Shively CA, Adams MR. *Biol Psychiatry*. 2000 Mar 15;47(6):562-76.
- Bethea CL, Reddy AP, Tokuyama Y, Henderson JA, Lima FB. *Front Neuroendocrinol*. 2009 Jul;30(2):212-38.
- Boillat A, Alijevic O, Kellenberger S. *Mol Cell Neurosci*. 2014 Jul;61:13-22.
- Boissel JP, Bros M, Schröck A, Gödtel-Armbrust U, Förstermann U. *Biochemistry*. 2004 Jun 8;43(22):7197-206.
- Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. *Nat Med*. 2002 Feb;8(2):136-42.
- Brain SD, Williams TJ. *Br J Pharmacol*. 1989 May;97(1):77-82.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. *Nature*. 1990 Oct 25;347(6295):768-70. doi: 10.1038/347768a0. PMID: 1700301.
- Brennan KC, Romero Reyes M, López Valdés HE, Arnold AP, Charles AC. *Ann Neurol*. 2007 Jun;61(6):603-6.
- Brinton RD, Proffitt P, Tran J, Luu R. *Exp Neurol*. 1997 Oct;147(2):211-20.
- Brown RR, Thornton MJ, Price JM. *J Clin Invest*. 1961 Apr;40(4):617-23.
- Buckley TL, Brain SD, Rampart M, Williams TJ. *Br J Pharmacol*. 1991 Jun;103(2):1515-9.
- Burstein R, Yamamura H, Malick A, Strassman AM. *J Neurophysiol*. 1998 Feb;79(2):964-82.
- Burstein R, Yarnitsky D, Goor-Aryeh I, Ransil BJ, Bajwa ZH. *Ann Neurol*. 2000 May;47(5):614-24.
- Burstein R, Jakubowski M. *Ann Neurol*. 2004 Jan;55(1):27-36.
- Buzzi MG, Moskowitz MA. 1991 Sep;11(4):165-8.
- Buzzi MG, Carter WB, Shimizu T, Heath H 3rd, Moskowitz MA. *Neuropharmacology*. 1991 Nov;30(11):1193-200.
- Buzzi MG, Moskowitz MA. *Pathol Biol (Paris)*. 1992 Apr;40(4):313-7.
- Cairns BE. *Headache*. 2007 Feb;47(2):319-24.
- Campos F, Sobrino T, Pérez-Mato M, Rodríguez-Osorio X, Leira R, Blanco M, Mirelman D, Castillo J. *Cephalalgia*. 2013 Oct;33(14):1148-54.
- Capuano A, De Corato A, Lisi L, Tringali G, Navarra P, Dello Russo C. *Mol Pain*. 2009 Aug 6;5:43.
- Carlton SM, Leichnetz GR, Young EG, Mayer DJ. *J Comp Neurol*. 1983 Feb 10;214(1):43-58.
- Carney ST, Lloyd ML, MacKinnon SE, Newton DC, Jones JD, Howlett AC, Norford DC. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2009 Sep;4(3):338-49.
- Carpeneo R, Pittaluga A, Cozzi A, Attucci S, Galli A, Raiteri M, Moroni F. *Eur J Neurosci*. 2001 Jun;13(11):2141-7.
- Carstens E, Simons CT, Dessirier JM, Carstens MI, Jinks SL. *Exp Brain Res*. 2000 Jun;132(3):375-83.

Catanzaro G, Rapino C, Oddi S, Maccarrone M. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Oct 16;388(2):439-42.

Chacur M, Matos RJ, Alves AS, Rodrigues AC, Gutierrez V, Cury Y, Britto LR. *Braz J Med Biol Res.* 2010 Apr;43(4):367-76.

Chanrion B, Mannoury la Cour C, Bertaso F, Lerner-Natoli M, Freissmuth M, Millan MJ, Bockaert J, Marin P. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 8;104(19):8119-24.

Chatchaisak D, Srikiatkachorn A, Maneesri-le Grand S, Govitrapong P, Chetsawang B. *J Chem Neuroanat.* 2013 Jan;47:50-6.

Chen N, Su W, Cui SH, Guo J, Duan JC, Li HX, He L. *Neural Regen Res.* 2019 Jan;14(1):100-106.

Chiarugi A, Carpenedo R, Molina MT, Mattoli L, Pellicciari R, Moroni F. *J Neurochem.* 1995 Sep;65(3):1176-83.

Choi IS, Cho JH, An CH, Jung JK, Hur YK, Choi JK, Jang IS. *Br J Pharmacol.* 2012 Sep;167(2):356-67.

Chopra B, Giblett S, Little JG, Donaldson LF, Tate S, Evans RJ, Grubb BD. *Eur J Neurosci.* 2000 Mar;12(3):911-20.

Clavelou P, Dallel R, Orliaguet T, Woda A, Raboisson P. *Pain.* 1995 Sep;62(3):295-301.

Coggeshall RE. *Prog Neurobiol.* 2005 Dec;77(5):299-352.

Correa F, Docagne F, Clemente D, Mestre L, Becker C, Guaza C. *Biochem J.* 2008 Feb 1;409(3):761-70.

Cosi C, Mannaioni G, Cozzi A, Carlà V, Sili M, Cavone L, Maratea D, Moroni F. *Neuropharmacology.* 2011 Jun;60(7-8):1227-31.

Craig AD. *Brain Res.* 1992 Jul 3;584(1-2):325-8..

Crawley JN, Corwin RL, Robinson JK, Felder CC, Devane WA, Axelrod J. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993 Dec;46(4):967-72.

Csáti A, Edvinsson L, Vécsei L, Toldi J, Fülöp F, Tajti J, Warfvinge K. *J Headache Pain.* 2015;16:99.

Curto M, Lionetto L, Negro A, Capi M, Fazio F, Giamberardino MA, Simmaco M, Nicoletti F, Martelletti P. *J Headache Pain.* 2015a;17:47.

Curto M, Lionetto L, Negro A, Capi M, Perugino F, Fazio F, Giamberardino MA, Simmaco M, Nicoletti F, Martelletti PJ. *Headache Pain.* 2015b;17(1):27.

Cyr M, Ghribi O, Di Paolo T. *J Neuroendocrinol.* 2000 May;12(5):445-52.

Danese E, Montagnana M, Lippi G. *Thromb Res.* 2014 Jul;134(1):17-22

Davies SN, Lodge D. *Brain Res.* 1987 Oct 27;424(2):402-6.

De Vries P, Villalón CM, Saxena PR. *Eur J Pharmacol.* 1999 Jun 30;375(1-3):61-74.

Deanović Z, Iskrić S, Dupelj M. *Biomedicine.* 1975 Nov 10;23(9):346-9.

Denenberg VH. *Ann N Y Acad Sci.* 1969 Jul 30;159(3):852-9.

Demirpence S, Kurul SH, Kiray M, Tugyan K, Yilmaz O, Köse G. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2009 Apr;70(2):129-35.

Di Clemente L, Coppola G, Magis D, Gérardy PY, Fumal A, De Pasqua V, Di Piero V, Schoenen J. *Pain.* 2009 Jul;144(1-2):156-61.

Diogenes A, Patwardhan AM, Jeske NA, Ruparel NB, Goffin V, Akopian AN, Hargreaves KM. *J Neurosci.* 2006 Aug 2;26(31):8126-36.

Dohrn CS, Mullett MA, Price RH, Beitz AJ. *J Comp Neurol.* 1994 Aug 15;346(3):449-60.

Dohrn CS, Beitz AJ. *Neurosci Lett.* 1994 Jul 4;175(1-2):28-32.

Dodick DW. *Headache.* 2018 May;58 Suppl 1:4-16.

Dominguez R, Liu R, Baudry M. *J Neurochem.* 2007 Apr;101(1):232-40.

Dou W, Jiao Y, Goorha S, Raghov R, Ballou LR. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2004 Oct;74(1-4):29-43.

Dougherty PM, Palecek J, Paleckova V, Sorkin LS, Willis WD. *J Neurosci.* 1992 Aug;12(8):3025-41.

Dubin AE, Patapoutian A. *J Clin Invest.* 2010 Nov;120(11):3760-72.

Dvorak AM, Dvorak HF. 1974 Jul;27(1):99-114.

Edelmayer RM, Vanderah TW, Majuta L, Zhang ET, Fioravanti B, De Felice M, Chichorro JG, Ossipov MH, King T, Lai J, Kori SH, Nelsen AC, Cannon KE, Heinricher MM, Porreca F. *Ann Neurol.* 2009 Feb;65(2):184-93.

Edvinsson L, Haanes KA, Warfvinge K. *Nat Rev Neurol.* 2019 Aug;15(8):483-490.

Eikermann-Haerter K, Dileköz E, Kudo C, Savitz SI, Waeber C, Baum MJ, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, Moskowitz MA, Ayata C. *J Clin Invest.* 2009 Jan;119(1):99-109.

Ellrich J, Messlinger K, Chiang CY, Hu JW. *Pain.* 2001 Feb 15;90(3):227-231.

Entrena A, Camacho ME, Carrión MD, López-Cara LC, Velasco G, León J, Escames G, Acuña-Castroviejo D, Tapias V, Gallo MA, Vivó A, Espinosa A. *J Med Chem.* 2005 Dec 29;48(26):8174-81.

Fabricius M, Jensen LH, Lauritzen M. *Brain Res.* 1993 May 28;612(1-2):61-9.

Fang L, Wu J, Lin Q, Willis WD. *J Neurosci.* 2002 May 15;22(10):4196-204.

Fasmer OB, Berge OG, Hole K. *Neuropharmacology.* 1985 Aug;24(8):729-34.

Fávaro-Moreira NC, Torres-Chávez KE, Fischer L, Tambeli CH. *Neuroscience.* 2009 Dec 1;164(2):724-32.

Feine JS, Bushnell CM, Miron D, Duncan GH. *Pain.* 1991 Mar;44(3):255-262.

Fenzi F, Rizzuto N. *Eur J Pain.* 2011 Nov;15(10):1002-7.

Ferrari MD, Odink J, Tapparelli C, Van Kempen GM, Pennings EJ, Bruyn GW. *Neurology.* 1989 Sep;39(9):1239-42.

Flake NM, Bonebreak DB, Gold MS. *J Neurophysiol.* 2005 Mar;93(3):1585-97.

Flores CA, Shughrue P, Petersen SL, Mokha SS. *Neuroscience*. 2003;118(3):769-78.

Freeman M.E., 2006. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Neill, J.D. (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier Academic Press, pp. 2327–2388.

Frye, C.A., Rhodes, M.E., 2009. Female sex steroids and neuronal excitability. In: Schwartzkroin, P. (Ed.), *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research*, Volume 1. Academic Press, Oxford, pp. 477–484.

Frye CA. *Epilepsia*. 2010 Jul;51 Suppl 3:135-40.

Fukui S, Schwarcz R, Rapoport SI, Takada Y, Smith QR. *J Neurochem*. 1991 Jun;56(6):2007-17.

Fusayasu E, Kowa H, Takeshima T, Nakaso K, Nakashima K. *Pain*. 2007 Apr;128(3):209-214.

Fusco BM, Barzoi G, Agrò F. *Br J Anaesth*. 2003 Jun;90(6):812.

Gao X, Kim HK, Chung JM, Chung K. *Pain*. 2005 Jul;116(1-2):62-72.

Gao Y, Duan YZ. *Anat Rec (Hoboken)*. 2010 Mar;293(3):485-91.

García-Segura LM, Chowen JA, Párducz A, Naftolin F. *Prog Neurobiol*. 1994 Oct;44(3):279-307.

Garry MG, Walton LP, Davis MA. *Brain Res*. 2000 Apr 10;861(2):208-19.

Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. *Nature*. 1988 Nov 24;336(6197):385-8.

Gatti G, Barzaghi N, Attardo Parrinello G, Vitiello B, Perucca E. *Int J Clin Pharmacol Res*. 1989;9(6):385-9.

Gazerani P, Dong X, Wang M, Kumar U, Cairns BE. *Brain Res*. 2010 Mar 10;1319:70-82.

Gazzaley AH, Weiland NG, McEwen BS, Morrison JH. *J Neurosci*. 1996 Nov 1;16(21):6830-8.

Geaney DP, Rutterford MG, Elliott JM, Schächter M, Peet KM, Grahame-Smith DG. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1984 Jul;47(7):720-3.

Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. *Ann Neurol*. 1990 Aug;28(2):183-7.

Goadsby PJ, Edvinsson L. *Ann Neurol*. 1993 Jan;33(1):48-56.

Goadsby PJ, Hoskin KL. *Pain*. 1996 Oct;67(2-3):355-9.

Goadsby PJ, Knight Y. *Br J Pharmacol*. 1997 Nov;122(5):918-22.

Goadsby PJ, Classey JD. *Brain Res*. 2000 Sep 1;875(1-2):119-24.

Granello F, Sances G, Pucci E, Nappi RE, Ghiotto N, Napp G. *Cephalalgia*. 2000 Oct;20(8):701-7.

Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA. *Nature*. 1996 Oct 24;383(6602):713-6.

Greenberg ME, Ziff EB. *Nature*. 1984 Oct 4-10;311(5985):433-8.

Greco R, Tassorelli C, Cappelletti D, Sandrini G, Nappi G. *Neurotoxicology*. 2005 Oct;26(5):795-800.

Greco R, Tassorelli C, Sandrini G, Di Bella P, Buscone S, Nappi G. *Cephalalgia*. 2008 Feb;28(2):114-26.

Greco R, Gasperi V, Sandrini G, Bagetta G, Nappi G, Maccarrone M, Tassorelli C. *Cephalalgia*. 2010 Mar;30(3):296-302.

Grilli M, Raiteri L, Patti L, Parodi M, Robino F, Raiteri M, Marchi M. *Br J Pharmacol*. 2006 Nov;149(6):724-32.

Guedes RC, de Oliveira JA, Amâncio-Dos-Santos A, García-Cairasco N. *Epilepsy Res*. 2009 Feb;83(2-3):207-14.

Guidetti P, Okuno E, Schwarcz R. *J Neurosci Res*. 1997 Nov 1;50(3):457-65.

Guidetti P, Schwarcz R. *Eur J Neurosci*. 1999 Nov;11(11):3857-63.

Guindon J, Hohmann AG. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2009 Dec;8(6):403-21.

Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, et al. *APMIS*. 1988 Oct;96(10):857-81.

Gupta S, McCarson KE, Welch KM, Berman NE. *Headache*. 2011 Jun;51(6):905-22.

Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, Kwong KK, Cutrer FM, Rosen BR, Tootell RB, Sorensen AG, Moskowitz MA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr 10;98(8):4687-92.

Haghir H, Kovac S, Speckmann EJ, Zilles K, Gorji A. *Neuroscience*. 2009 Nov 10;163(4):1340-52.

Haley JE, Sullivan AF, Dickenson AH. *Brain Res*. 1990 Jun 4;518(1-2):218-26.

Hansen JM, Hauge AW, Olesen J, Ashina M. *Cephalalgia*. 2010 Oct;30(10):1179-86.

Hara T, Ogasawara N, Akimoto H, Takikawa O, Hiramatsu R, Kawabe T, Isobe K, Nagase F. *Immunol Lett*. 2008 Feb 15;116(1):95-102.

Hardingham GE, Bading H. *Trends Neurosci*. 2003 Feb;26(2):81-9.

Hargreaves RJ, Shephard SL. *Can J Neurol Sci*. 1999 Nov;26 Suppl 3:S12-9.

Harris JA. *Brain Res Bull*. 1998;45(1):1-8.

Hassanain HH, Chon SY, Gupta SL. *J Biol Chem*. 1993 Mar 5;268(7):5077-84.

Håvik B, Røkke H, Bårdsen K, Davanger S, Bramham CR. *Eur J Neurosci*. 2003 Jun;17(12):2679-89.

Hazell GG, Yao ST, Roper JA, Prossnitz ER, O'Carroll AM, Lolait SJ. *J Endocrinol*. 2009 Aug;202(2):223-36.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. *Physiol Rev*. 2007 Jul;87(3):905-31.

Hermann DM, Luppi PH, Peyron C, Hinckel P, Jouvet M. *J Chem Neuroanat*. 1997 Jun;13(1):1-21.

Heyliger SO, Goodman CB, Ngong JM, Soliman KF. *Pharmacol Res*. 1998 Oct;38(4):243-50.

Hillard CJ, Muthian S, Kearn CS. *FEBS Lett.* 1999 Oct 8;459(2):277-81.

Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz R, Albuquerque EX. *J Neurosci.* 2001 Oct 1;21(19):7463-73.

Hoffmann J, Wecker S, Neeb L, Dirnagl U, Reuter U. *Cephalalgia.* 2012a Jul;32(9):659-67.

Hoffmann J, Suprongsinchai W, Andreou AP, Summ O, Akerman S, Goadsby PJ. *Pain.* 2012b Nov;153(11):2226-2232.

Hoffmann J, Baca SM, Akerman S. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 Apr;39(4):573-594.

Horvath G, Kekesi G, Nagy E, Benedek G. *Pain.* 2008 Feb;134(3):277-284.

Hoskin KL, Bulmer DC, Lasalandra M, Jonkman A, Goadsby PJ. *J Anat.* 2001 Jan;198(Pt 1):29-35.

Hosobuchi Y, Adams JE, Linchitz R. *Science.* 1977 Jul 8;197(4299):183-6.

Hou M, Uddman R, Tajti J, Edvinsson L. *Brain Res.* 2003 Feb 28;964(2):179-86.

Hudmon A, Schulman H. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:473-510.

Humphrey PP. *J Neurol.* 1991;238 Suppl 1:S38-44.

Humphrey PP, Feniuk W, Marriott AS, Tanner RJ, Jackson MR, Tucker ML. *Eur Neurol.* 1991;31(5):282-90.

Hunt SP, Pini A, Evan G. *Nature.* 1987 Aug 13-19;328(6131):632-4.

Iadarola MJ, Brady LS, Draisci G, Dubner R. *Pain.* 1988 Dec;35(3):313-326.

Ichikawa H, Gouty S, Regalia J, Helke CJ, Sugimoto T. *Brain Res.* 2004 Apr 16;1005(1-2):36-43.

Ihzecka J, Kocki T, Stelmasiak Z, Turski WA. *Acta Neurol Scand.* 2003 Jun;107(6):412-8.

Iversen HK, Olesen J, Tfelt-Hansen P. *Pain.* 1989 Jul;38(1):17-24.

Iversen HK, Olesen J. *Cephalalgia.* 1996 Oct;16(6):412-8.

Jakubowski M, Levy D, Goor-Aryeh I, Collins B, Bajwa Z, Burstein R. *Headache.* 2005 Jul-Aug;45(7):850-61.

Jakubowski M, Levy D, Kainz V, Zhang XC, Kosaras B, Burstein R. *Neuroscience.* 2007 Aug 24;148(2):573-83.

Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmolli R, Woolf CJ. *Neuron.* 2002 Sep 26;36(1):57-68.

Jones MG, Lever I, Bingham S, Read S, McMahon SB, Parsons A. *Cephalalgia.* 2001 Jul;21(6):643-55.

Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H, Oh U. *J Biol Chem.* 2004 Feb 20;279(8):7048-54.

Just S, Arndt K, Doods H. *Neurosci Lett.* 2005 Jun 10-17;381(1-2):120-4.

Kao DJ, Li AH, Chen JC, Luo RS, Chen YL, Lu JC, Wang HL. *J Neuroinflammation.* 2012 Aug 8;9:189.

Katusic S, Beard CM, Bergstralh E, Kurland LT. *Ann Neurol.* 1990 Jan;27(1):89-95.

Kaube H, Hoskin KL, Goadsby PJ. *Br J Pharmacol.* 1993 Jul;109(3):788-92.

Kaube H, Herzog J, Käufer T, Dichgans M, Diener HC. *Neurology.* 2000 Jul 12;55(1):139-41.

Kessler M, Terramani T, Lynch G, Baudry M. *J Neurochem.* 1989 Apr;52(4):1319-28.

Kim YS, Chu Y, Han L, Li M, Li Z, LaVinka PC, Sun S, Tang Z, Park K, Caterina MJ, Ren K, Dubner R, Wei F, Dong X. *Neuron.* 2014 Feb 19;81(4):873-887.

Kimura H, Okamoto K, Sakai Y. *Brain Res.* 1985 Mar 25;330(2):235-44.

Kiss C, Shepard PD, Bari F, Schwarcz R. *Brain Res.* 2004 Mar 26;1002(1-2):129-35.

Knyihár-Csillik E, Tajti J, Mohtasham S, Sari G, Vecsei L. *Neurosci Lett.* 1995 Jan 30;184(3):189-92.

Knyihár-Csillik E, Tajti J, Samsam M, Sány G, Slezák S, Vécsei L. *J Neurosci Res.* 1997 Jun 1;48(5):449-64.

Knyihár-Csillik E, Tajti J, Samsam M, Sány G, Buzás P, Vécsei L. *Exp Brain Res.* 1998 Jan;118(1):111-4.

Knyihár-Csillik E, Vécsei L. *Neurosci Lett.* 1999 Jan 29;260(2):97-100.

Knyihár-Csillik E, Tajti J, Csillik AE, Chadaide Z, Mihály A, Vécsei L. *Eur J Neurosci.* 2000 Nov;12(11):3991-4002.

Knyihár-Csillik E, Toldi J, Mihály A, Krisztin-Péva B, Chadaide Z, Németh H, Fenyó R, Vécsei L. *J Neural Transm (Vienna).* 2007;114(4):417-21.

Knyihár-Csillik E, Mihály A, Krisztin-Péva B, Robotka H, Szatmari I, Fulop F, Toldi J, Csillik B, Vecsei L. *Neurosci Res.* 2008 Aug;61(4):429-32.

Kolaj M, Cerne R, Cheng G, Brickey DA, Randić M. *J Neurophysiol.* 1994 Nov;72(5):2525-31.

Konradsson-Geuken A, Wu HQ, Gash CR, Alexander KS, Campbell A, Sozeri Y, Pellicciari R, Schwarcz R, Bruno JP. *Neuroscience.* 2010 Sep 15;169(4):1848-59.

Kou XX, Wu YW, Ding Y, Hao T, Bi RY, Gan YH, Ma X. *Arthritis Rheum.* 2011 Jul;63(7):1888-97.

Kress M, Reeh PW. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 24;93(26):14995-7.

Kristensen JD, Post C, Gordh T Jr, Svensson BA. *Pain.* 1993 Sep;54(3):309-316.

Lance JW, Lambert GA, Goadsby PJ, Duckworth JW. *Headache.* 1983 Nov;23(6):258-65.

Lam HH, Hanley DF, Trapp BD, Saito S, Raja S, Dawson TM, Yamaguchi H. *Neurosci Lett.* 1996 Jun 7;210(3):201-4.

Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW, Peters JA. *Prog Neurobiol.* 2003 Sep;71(1):67-80.

Lange R, Schwarz JA, Hohn M. *Cephalalgia.* 2000 Sep;20(7):663-7.

Lapin IP. *J Neural Transm.* 1978;42(1):37-43.

Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. *Cephalalgia.* 2002 Feb;22(1):54-61.

Latremoliere A, Woolf CJ. *J Pain*. 2009 Sep;10(9):895-926.

Lauritzen M, Rice ME, Okada Y, Nicholson C. *Brain Res*. 1988 Dec 20;475(2):317-27.

Lauritzen M, Hansen AJ. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1992 Mar;12(2):223-9.

Leão AAP. *J Neurophysiol* 1944; 7: 359–390.

Lee J, Saloman JL, Weiland G, Auh QS, Chung MK, Ro JY. *Pain*. 2012 Jul;153(7):1514-1524.

Lee KM, Kang BS, Lee HL, Son SJ, Hwang SH, Kim DS, Park JS, Cho HJ. *Eur J Neurosci*. 2004 Jun;19(12):3375-81.

Lee KS, Asgar J, Zhang Y, Chung MK, Ro JY. *Neuroscience*. 2013 Dec 19;254:395-403.

Lee KS, Zhang Y, Asgar J, Auh QS, Chung MK, Ro JY. *Neuroscience*. 2016 Sep 7;331:52-61.

Leo L, Gherardini L, Barone V, De Fusco M, Pietrobon D, Pizzorusso T, Casari G. *PLoS Genet*. 2011 Jun;7(6):e1002129.

Leonelli M, Martins DO, Britto LR. *Cell Mol Neurobiol*. 2013 Apr;33(3):379-92.

Leranth C, Shanabrough M, Horvath TL. *Exp Brain Res*. 1999 Oct;128(3):417-20.

LeResche L. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8(3):291-305.

Levy D, Strassman AM. *J Physiol*. 2002 Jan 15;538(Pt 2):483-93.

Liang DY, Li X, Clark JD. *Neurosci Lett*. 2004 Apr 22;360(1-2):61-4.

Limmroth V, Katsarava Z, Liedert B, Guehring H, Schmitz K, Diener HC, Michel MC. *Pain*. 2001 May;92(1-2):101-6.

Lin Q, Palecek J, Palecková V, Peng YB, Wu J, Cui M, Willis WD. *J Neurophysiol*. 1999 Mar;81(3):1075-85.

Lipton RB, Bigal ME, Ashina S, Burstein R, Silberstein S, Reed ML, Serrano D, Stewart WF. *Ann Neurol*. 2008 Feb;63(2):148-58.

Liu L, Chang GQ, Jiao YQ, Simon SA. *Brain Res*. 1998 Nov 2;809(2):238-45.

Liu L, Simon SA. *J Neurophysiol*. 2003 Mar;89(3):1387-401.

Liverman CS, Brown JW, Sandhir R, McCarson KE, Berman NE. *Cephalalgia*. 2009a Jul;29(7):729-41.

Liverman CS, Brown JW, Sandhir R, Klein RM, McCarson K, Berman NE. *Cephalalgia*. 2009b May;29(5):520-31.

Lizanec E, Bagi Z, Pásztor ET, Papp Z, Edes I, Kedei N, Blumberg PM, Tóth A. *Mol Pharmacol*. 2006 Mar;69(3):1015-23.

Lu NZ, Shlaes TA, Gundlach C, Dziennis SE, Lyle RE, Bethea CL. *Endocrine*. 1999 Dec;11(3):257-67.

Lukács M, Haanes KA, Majláth Z, Tajti J, Vécsei L, Warfvinge K, Edvinsson L J *Headache Pain*. 2015;16:564.

Lukács M, Warfvinge K, Kruse LS, Tajti J, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L, Edvinsson L J *Headache Pain*. 2016 Dec;17(1):64.

Lukács M, Warfvinge K, Tajti J, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L, Edvinsson L J *Headache Pain*. 2017 Dec;18(1):39.

Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvet M. *Neuroscience*. 1995 Mar;65(1):119-60.

Lynn AB, Herkenham M. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Mar;268(3):1612-23.

Ma QP, Hill R, Sirinathsinghi D. *Eur J Neurosci*. 2001 Jun;13(11):2099-104.

Maggioni F, Alessi C, Maggino T, Zanchin G. *Cephalalgia*. 1997 Nov;17(7):765-9.

Maihöfner C, Tegeder I, Euchenhofer C, deWitt D, Brune K, Bang R, Neuhuber W, Geisslinger G. *Neuroscience*. 2000;101(4):1093-108.

Malek N, Pajak A, Kolosowska N, Kucharczyk M, Starowicz K. *Mol Cell Neurosci*. 2015 Mar;65:1-10.

Malhotra R. *Ann Indian Acad Neurol*. 2016 Apr-Jun;19(2):175-82.

Mándi Y, Vécsei L. *J Neural Transm (Vienna)*. 2012 Feb;119(2):197-209.

Marchand JE, Hagino N. *Neuroscience*. 1983 May;9(1):95-106

Marcus DA. *Pain*. 1995 Aug;62(2):129-139.

Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA. *J Neurosci*. 1987 Dec;7(12):4129-36.

Marosi M, Nagy D, Farkas T, Kis Z, Rózsa E, Robotka H, Fülöp F, Vécsei L, Toldi J. *J Neural Transm (Vienna)*. 2010 Feb;117(2):183-8.

Marrannes R, Willems R, De Prins E, Wauquier A. *Brain Res*. 1988 Aug 9;457(2):226-40.

Marsh N, Marsh A. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000 Apr;27(4):313-9.

Matthews PJ, Aziz Q, Facer P, Davis JB, Thompson DG, Anand P. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004 Sep;16(9):897-902.

Maurice T, Grégoire C, Espallergues J. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006 Aug;84(4):581-97.

May A, Kaube H, Büchel C, Eichten C, Rijntjes M, Jüptner M, Weiller C, Diener CH. *Pain*. 1998 Jan;74(1):61-66.

Mazario J, Gaitan G, Herrero JF. *Neuropharmacology*. 2001 Jun;40(7):937-46.

McCormack K. *Drugs*. 1994;47 Suppl 5:28-45; discussion 46-7.

McDevitt RA, Szot P, Baratta MV, Bland ST, White SS, Maier SF, Neumaier JF. *Brain Res*. 2009 Aug 18;1285:109-18.

McGehee DS, Heath MJ, Gelber S, Devay P, Role LW. *Science*. 1995 Sep 22;269(5231):1692-6.

Meacs L, Tuboly G, Nagy E, Benedek G, Horvath G. *Anesth Analg*. 2009 Oct;109(4):1297-304.

Meents JE, Hoffmann J, Chaplan SR, Neeb L, Schuh-Hofer S, Wickenden A, Reuter U. *J Headache Pain*. 2015;16:57.

Meng J, Ovsepian SV, Wang J, Pickering M, Sasse A, Aoki KR, Lawrence GW, Dolly JO. *J Neurosci*. 2009 Apr 15;29(15):4981-92.

Mestre L, Iñigo PM, Mecha M, Correa FG, Hernangómez-Herrero M, Loria F, Docagne F, Borrell J, Guaza C. *J Neuroinflammation*. 2011 Aug 18;8:102.

Michael AF, Drummond KN, Doeden D, Anderson JA, Good RA. *J Clin Invest*. 1964 Sep;43(9):1730-46.

Miller KJ, Hoffman BJ. *J Biol Chem*. 1994 Nov 4;269(44):27351-6

Miranda AF, Boegman RJ, Beninger RJ, Jhamandas K. *Neuroscience*. 1997 Jun;78(4):967-75.

Mitsikostas DD, Sanchez del Rio M, Waeber C, Moskowitz MA, Cutrer FM. *Pain*. 1998 May;76(1-2):239-48.

Mitsikostas DD, Sanchez del Rio M, Waeber C, Huang Z, Cutrer FM, Moskowitz MA. *Br J Pharmacol*. 1999 Jun;127(3):623-30.

Miyamoto T, Dubin AE, Petrus MJ, Patapoutian A. *PLoS One*. 2009 Oct 29;4(10):e7596.

Mokha SS, McMillan JA, Iggo A.. *Exp Brain Res*. 1986;61(3):597-606

Moroni F, Carpenedo R, Cozzi A, Meli E, Chiarugi A, Pellegrini-Giampietro DE. *Adv Exp Med Biol*. 2003;527:127-36.

Moskowitz MA. *Ann Neurol*. 1984 Aug;16(2):157-68.

Moskowitz MA, Nozaki K, Kraig RP. *J Neurosci*. 1993 Mar;13(3):1167-77.

Moussaoul S, Duval P, Lenoir V, Garret C, Kerdelhue B. *Neuropeptides*. 1996 Dec;30(6):546-50.

Nag S, Mokha SS. *Behav Brain Res*. 2016 Nov 1;314:152-8.

Nagy-Grócz G, Tar L, Bohár Z, Fejes-Szabó A, Laborc KF, Spekker E, Vécsei L, Párdutz Á. *Cephalalgia*. 2016 Aug;36(9):849-61.

Nakajima Y, Furuichi Y, Biswas KK, Hashiguchi T, Kawahara K, Yamaji K, Uchimura T, Izumi Y, Maruyama I. *FEBS Lett*. 2006 Jan 23;580(2):613-9.

Nakanishi M, Hata K, Nagayama T, Sakurai T, Nishisho T, Wakabayashi H, Hiraga T, Ebisu S, Yoneda T. *Mol Biol Cell*. 2010 Aug 1;21(15):2568-77.

Nellgård B, Wieloch T. *Acta Physiol Scand*. 1992 Dec;146(4):497-503.

Nicolodi M, Sicuteri F. *Int J Clin Pharmacol Res*. 1995;15(5-6):181-9..

Nilsson LK, Nordin C, Jönsson EG, Engberg G, Linderholm KR, Erhardt S. *J Psychiatr Res*. 2007 Jan-Feb;41(1-2):144-51.

Niu KY, Zhang Y, Ro JY. 2012 Nov;153(11):2283-2291.

Ogawa A, Ren K, Tsuboi Y, Morimoto T, Sato T, Iwata K. *Exp Brain Res*. 2003 Oct;152(3):307-16.

Ohnishi T, Okuda-Ashitaka E, Matsumura S, Katano T, Nishizawa M, Ito S. *J Neurochem*. 2008 Jun 1;105(6):2271-85

Ohshiro H, Tonai-Kachi H, Ichikawa K. 2008 Jan 11;365(2):344-8.

Olesen J, Iversen HK, Thomsen LL. *Neuroreport*. 1993 Aug;4(8):1027-30.

Olesen J. *Neurotherapeutics*. 2010 Apr;7(2):183-90.

Osebold JW. *J Am Vet Med Assoc*. 1982 Nov 15;181(10):983-7.

Oshinsky ML, Luo J. *Headache*. 2006 Jun;46 Suppl 1:S39-44.

Oxenkrug GF. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Dec;1122:35-49.

Pajot J, Ressayat C, Ngom I, Woda A. *Pain*. 2003 Jul;104(1-2):367-73.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. *Nature*. 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6.

Pan L, Song K, Hu F, Sun W, Lee I. *Eur J Pharmacol*. 2013 Sep 5;715(1-3):280-5.

Párdutz Á, Krizbai I, Multon S, Vecsei L, Schoenen J. *Neuroreport*. 2000 Sep 28;11(14):3071-5.

Párdutz Á, Multon S, Malgrange B, Parducz A, Vecsei L, Schoenen J.. *Eur J Neurosci*. 2002 Jun;15(11):1803-9.

Párdutz Á, Hoyk Z, Varga H, Vecsei L, Schoenen J. *Cephalalgia*. 2007 Jan;27(1):46-53.

Párdutz Á, Schoenen J. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010 Jun 17;3(6):1966-1987.

Parohova J, Vrankova S, Barta A, et al. *Activitas Nervosa Superior Rediviva* 2009; 51: 123–126.

Paxinos G, Watson C . *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th edn. Academic Press, London. 2007

Pecins-Thompson M, Brown NA, Kohama SG, Bethea CL. *J Neurosci*. 1996 Nov 1;16(21):7021-9.

Pecins-Thompson M, Brown NA, Bethea CL. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998 Jan;53(1-2):120-9.

Peng LM, Chen XP, Shi RZ, Chen L, Li YJ, Yang TL.. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014 Nov;64(5):460-4.

Perkins MN, Stone TW. *Brain Res*. 1982 Sep 9;247(1):184-7.

Perkins MN, Stone TW. *Exp Neurol*. 1985 Jun;88(3):570-9.

Pertovaara M, Raitala A, Uusitalo H, Pukander J, Helin H, Oja SS, Hurme M. *Clin Exp Immunol*. 2005 Oct;142(1):155-61.

Pertwee RG. *Prog Neurobiol*. 2001 Apr;63(5):569-611.

Pettit DA, Anders DL, Harrison MP, Cabral GA. *Adv Exp Med Biol*. 1996;402:119-29.

Pineda-Farias JB, Pérez-Severiano F, González-Esquivel DF, Barragán-Iglesias P, Bravo-Hernández M, Cervantes-Durán C, Aguilera P, Ríos C, Granados-Soto V. *Eur J Pain*. 2013 Oct;17(9):1365-73.

Pozzo-Miller LD, Inoue T, Murphy DD. *J Neurophysiol*. 1999 Mar;81(3):1404-11.

Pradhan AA, Smith ML, McGuire B, Tarash I, Evans CJ, Charles A. *Pain*. 2014 Feb;155(2):269-274.

Puig S, Rivot JP, Besson JM. *Brain Res*. 1992 Sep 11;590(1-2):250-4.

Puri J, Bellinger LL, Kramer PR. *J Cell Physiol*. 2011 Dec;226(12):3169-80.

Puri V, Cui L, Liverman CS, Roby KF, Klein RM, Welch KM, Berman NE. *Neuropeptides*. 2005 Aug;39(4):409-17.

Puri V, Puri S, Svojanovsky SR, Mathur S, Macgregor RR, Klein RM, Welch KM, Berman NE. *Cephalalgia*. 2006 Jan;26(1):33-42.

Quartu M, Serra MP, Ambu R, Lai ML, Del Fiacco M. *Mech Ageing Dev*. 2002 Mar 15;123(5):463-71.

Quartu M, Serra MP, Boi M, Poddighe L, Picci C, Demontis R, Del Fiacco M. *J Anat.* 2016 Dec;229(6):755-767.

Raap DK, DonCarlos L, Garcia F, Muma NA, Wolf WA, Battaglia G, Van de Kar LD. *Neuropharmacology.* 2000 Jul 24;39(10):1823-32.

Raboisson P, Dallel R. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004 Apr;28(2):219-26.

Raskin NH, Hosobuchi Y, Lamb S. *Headache.* 1987 Sep;27(8):416-20.

Rasmussen BK, Jensen R, Schroll M, Olesen J. *J Clin Epidemiol.* 1991;44(11):1147-57.

Rasmussen BK, Olesen J. *Cephalalgia.* 1992 Aug;12(4):221-8; discussion 186.

Redecker C, Wang W, Fritschy JM, Witte OW. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002 Dec;22(12):1463-75.

Rehavi M, Goldin M, Roz N, Weizman A. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998 Jun 1;57(1):31-7.

Reuter U, Chiarugi A, Bolay H, Moskowitz MA. *Ann Neurol.* 2002 Apr;51(4):507-16.

Roberts MH. *Neuropharmacology.* 1984 Dec;23(12B):1529-36.

Rose DP. *Clin Sci.* 1966 Oct;31(2):265-72.

Rose DP, Braidman IP. *Am J Clin Nutr.* 1971 Jun;24(6):673-83.

Ross RA. *Br J Pharmacol.* 2003 Nov;140(5):790-8017.

Rossi F, Valentina C, Garavaglia S, Sathyasaikumar KV, Schwarcz R, Kojima S, Okuwaki K, Ono S, Kajii Y, Rizzi M. *J Med Chem.* 2010 Aug 12;53(15):5684-9.

Saad AA, Abdel-Tawab GA, el-Zoghby SM, Mostafa MH, Moursi GE. *Biochem Pharmacol.* 1974 Mar 1;23(5):999-1013.

Sachs M, Pape HC, Speckmann EJ, Gorji A. *Neurobiol Dis.* 2007 Jan;25(1):27-34.

Saengjaroenatham C, Supornsilpchai W, Ji-Au W, Srikiatkachorn A, Maneesri-le Grand S. *Int J Neurosci.* 2015 Feb;125(2):130-9.

Saito S, Kidd GJ, Trapp BD, Dawson TM, Bredt DS, Wilson DA, Traystman RJ, Snyder SH, Hanley DF. *Neuroscience.* 1994 Mar;59(2):447-56.

Salio C, Fischer J, Franzoni MF, Conrath M. *Neuroscience.* 2002;110(4):755-64.

Saloman JL, Chung MK, Ro JY. *Neuroscience.* 2013 Mar 1;232:226-38.

Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Aug 1;90(15):7240-4.

Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ. *Nature.* 2001 Mar 22;410(6827):471-5.

Samuels ER, Szabadi E. *Curr Neuropharmacol.* 2008 Sep;6(3):235-53

Sances G, Tassorelli C, Pucci E, Ghiotto N, Sandrini G, Nappi G. *Cephalalgia.* 2004 Feb;24(2):110-9.

Sancho R, Calzado MA, Di Marzo V, Appendino G, Muñoz E. *Mol Pharmacol.* 2003 Feb;63(2):429-38.

Santamaría A, Ríos C, Solís-Hernández F, Ordaz-Moreno J, González-Reynoso L, Altagracia M, Kravzov J. *Neuropharmacology.* 1996 Jan;35(1):23-8.

Sappington RM, Calkins DJ. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Jul;49(7):3004-17.

Sarchielli P, Di Filippo M, Nardi K, Calabresi P. *Curr Pain Headache Rep.* 2007 Oct;11(5):343-51.

Sarker MH, Fraser PA. *J Physiol.* 2002 Apr 1;540(Pt 1):209-18.

Sawai T, Bernier F, Fukushima T, Hashimoto T, Ogura H, Nishizawa Y. *Brain Res.* 2002 Sep 20;950(1-2):308-11

Schmuck K, Ullmer C, Kalkman HO, Probst A, Lubbert H. *Eur J Neurosci.* 1996 May;8(5):959-67.

Schoenen J. *Rev Neurol (Paris).* 2000;156 Suppl 4:4S87-92.

Schuh-Hofer S, Richter M, Geworski L, Villringer A, Israel H, Wenzel R, Munz DL, Arnold G. *J Neurol.* 2007 Jun;254(6):789-96.

Schwarcz R, Pellicciari R. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Oct;303(1):1-10.

Shimizu T, Toriumi H, Sato H, Shibata M, Nagata E, Gotoh K, Suzuki N. *Brain Res.* 2007 Oct 10;1173:84-91.

Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. *J Comp Neurol.* 1997 Dec 1;388(4):507-25.

Sicuteri F. *Headache.* 1972 Jul;12(2):69-72.

Sicuteri F, Del Bene E, Poggioni M, Bonazzi A. *Headache.* 1987 Apr;27(4):180-5.

Silberstein SD, Merriam GR. *Cephalalgia.* 2000 Apr;20(3):148-54.

Silverman W, Locovei S, Dahl G. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008 Sep;295(3):C761-7.

Simpson KL, Altman DW, Wang L, Kirifides ML, Lin RC, Waterhouse BD. *J Comp Neurol.* 1997 Aug 18;385(1):135-47. PMID: 9268121.

Sluka KA, Dougherty PM, Sorkin LS, Willis WD, Westlund KN. *Brain Res Brain Res Rev.* 1992 Jan-Apr;17(1):29-38.

Smith WL, Dewitt DL. *Adv Immunol.* 1996;62:167-215.

Somerville BW. *Neurology.* 1975 Mar;25(3):239-44.

Somjen GG. *Physiol Rev.* 2001 Jul;81(3):1065-96. doi: 10.1152/physrev.2001.81.3.1065. PMID: 11427692.

Srikiatkachorn A, Suwattanasophon C, Ruangpattanatawee U, Phansuwan-Pujito P. *Headache.* 2002 Jul-Aug;42(7):566-74.

Srivastava DP, Woolfrey KM, Penzes P. *Pharmacol Rev.* 2013 Sep 27;65(4):1318-50.

Stone TW. *Prog Neurobiol.* 2001 Jun;64(2):185-218.

Stone TW, Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Darlington LG. *Metab Brain Dis.* 2007 Dec;22(3-4):337-52.

Storer RJ, Goadsby PJ. *Neuroscience.* 1999;90(4):1371-6.

Strassman AM, Vos BP. *J Comp Neurol.* 1993 May 22;331(4):495-516..

Strassman AM, Raymond SA, Burstein R. *Nature.* 1996 Dec 12;384(6609):560-4.

Sugiyo S, Takemura M, Dubner R, Ren K. *J Comp Neurol.* 2005 Dec 26;493(4):510-23.

Svendsen O, Lykkegaard K. *Acta Agric Scand A Anim Sci* 2001, 51:131–134

Svensson CI, Yaksh TL. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:553-83.

Taleghany N, Sarajari S, DonCarlos LL, Gollapudi L, Oblinger MM. *J Neurosci Res.* 1999 Sep 1;57(5):603-15.

Tallaksen-Greene SJ, Young AB, Penney JB, Beitz AJ. *Neurosci Lett.* 1992 Jul 6;141(1):79-83.

Tang B, Ji Y, Traub RJ. *Pain.* 2008 Jul 31;137(3):540-549.

Tanaka M, Matsumoto Y, Murakami T, Hisa Y, Iбата Y. *Neurosci Lett.* 1996 Mar 22;207(1):53-6.

Tashiro A, Okamoto K, Bereiter DA. *Eur J Neurosci.* 2008 Nov;28(10):2065-74.

Tashiro A, Okamoto K, Bereiter DA. *Neuroscience.* 2009 Dec 29;164(4):1813-20.

Tashiro A, Okamoto K, Bereiter DA. *J Dent Res.* 2012 Feb;91(2):210-4.

Tassorelli C, Joseph SA. *Brain Res.* 1995 Jun 5;682(1-2):167-81.

Tassorelli C, Joseph SA, Nappi G. *Neuropharmacology.* 1997 Oct;36(10):1417-24.

Tassorelli C, Joseph SA, Nappi G. *Brain Res.* 1999 Sep 25;842(2):294-310.

Tassorelli C, Greco R, Sandrini G, Nappi G. *Drugs.* 2003 ;63 Suppl 1:9-22.

Tassorelli C, Greco R, Morazzoni P, Riva A, Sandrini G, Nappi G. *Cephalalgia.* 2005 Aug;25(8):612-21.

Tassorelli C, Greco R, Armentero MT, Blandini F, Sandrini G, Nappi G. *Int Rev Neurobiol.* 2007;82:373-82.

Taylor DL, Urenjak J, Zilkha E, Obrenovitch TP. *Brain Res.* 1997 Aug 1;764(1-2):117-25.

Ter Horst GJ, Meijler WJ, Korf J, Kemper RH. *Cephalalgia.* 2001 Dec;21(10):963-75.

Tfelt-Hansen P, Daugaard D, Lassen LH, Iversen HK, Olesen J. *Eur J Neurol.* 2009 Oct;16(10):1106-11.

Thomas SR, Terentis AC, Cai H, Takikawa O, Levina A, Lay PA, Freewan M, Stocker R. *J Biol Chem.* 2007 Aug 17;282(33):23778-87.

Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. *Pain.* 1992 Oct;51(1):5-17.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. *Neuron.* 1998 Sep;21(3):531-43.

Tottene A, Conti R, Fabbro A, Vecchia D, Shapovalova M, Santello M, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Pietrobon D.. *Neuron.* 2009 Mar 12;61(5):762-73.

Urenjak J, Obrenovitch TP, Zilkha E. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1997 Jan;355(1):36-42.

Ushmorov A, Ratter F, Lehmann V, Dröge W, Schirmmacher V, Umansky V. *Blood.* 1999 Apr 1;93(7):2342-52.

van den Maagdenberg AM, Pietrobon D, Pizzorusso T, Kaja S, Broos LA, Cesetti T, van de Ven RC, Tottene A, van der Kaa J, Plomp JJ, Frants RR, Ferrari MD. *Neuron.* 2004 Mar 4;41(5):701-10.

Velenovská M, Fisar Z. *Addict Biol.* 2007 Jun;12(2):158-66.

Vécsei L, Miller J, MacGarvey U, Beal MF. *Brain Res Bull.* 1992 Feb;28(2):233-8.

Vécsei L, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 Jan;12(1):64-82.

Vikelis M, Mitsikostas DD. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2007 Aug;6(4):251-7. doi: 10.2174/18715270781387279. PMID: 17691981.

Világi I, Klapka N, Luhmann HJ. *Brain Res.* 2001 Apr 20;898(2):288-96.

Vincent L, Vang D, Nguyen J, Gupta M, Luk K, Ericson ME, Simone DA, Gupta K. *Blood.* 2013 Sep 12;122(11):1853-62.

Volfe Z, Dvilansky A, Nathan I. *Int J Clin Pharmacol Res.* 1985;5(4):243-6.

Walker JS, Carmody JJ. *Anesth Analg.* 1998 Jun;86(6):1257-62.

Wallace JL, Bak A, McKnight W, Asfaha S, Sharkey KA, MacNaughton WK. *Gastroenterology.* 1998 Jul;115(1):101-9.

Wang H, Nie H, Zhang RX, Qiao JT. *J Neurosci Res.* 1999 Sep 15;57(6):824-9

Wang QP, Nakai Y. *Brain Res Bull.* 1994;34(6):575-85.

Wang XM, Mokha SS. *J Neurophysiol.* 1996 Sep;76(3):2093-6.

Watanabe M, Mishina M, Inoue Y. *Neurosci Lett.* 1994 Jan 3;165(1-2):183-6.

Watkins LR, Martin D, Ulrich P, Tracey KJ, Maier SF. *Pain.* 1997 Jul;71(3):225-35.

Wei F, Vadakkan KI, Toyoda H, Wu LJ, Zhao MG, Xu H, Shum FW, Jia YH, Zhuo M. *J Neurosci.* 2006 Jan 18;26(3):851-61.

Weiller C, May A, Limmroth V, Jüptner M, Kaube H, Schayck RV, Coenen HH, Diener HC. *Nat Med.* 1995 Jul;1(7):658-60.

Widner B, Sepp N, Kowald E, Ortner U, Wirleitner B, Fritsch P, Baier-Bitterlich G, Fuchs D. *Immunobiology.* 2000 Apr;201(5):621-30.

Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR.. *Lancet.* 2000 Feb 19;355(9204):646-8.

Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*. 2002 Apr 26;296(5568):678-82. doi: 10.1126/science.1063545. PMID: 11976437.

Wise EA, Price DD, Myers CD, Heft MW, Robinson ME. *Pain*. 2002 Apr;96(3):335-342.

Wolf H, Walter S, Brown RR, Arend RA. *Scand J Clin Lab Invest*. 1980 Feb;40(1):15-22.

Woolf CJ, Thompson SWN. *Pain*. 1991 Mar;44(3):293-299.

Woolf CJ, Salter MW. *Science*. 2000 Jun 9;288(5472):1765-9.

Woolley CS, McEwen BS. *J Neurosci*. 1992 Jul;12(7):2549-54.

Woolley CS, McEwen BS. *J Comp Neurol*. 1993 Oct 8;336(2):293-306.

Woolley CS, McEwen BS. *J Neurosci*. 1994 Dec;14(12):7680-7.

Wu J, Fang L, Lin Q, Willis WD. *Neuroscience*. 2000;96(2):351-7.

Yaksh TL, Dirig DM, Conway CM, Svensson C, Luo ZD, Isakson PC. *J Neurosci*. 2001 Aug 15;21(16):5847-53.

Yang E, Schulman H. *J Biol Chem*. 1999 Sep 10;274(37):26199-208.

Yang Y, Ozawa H, Lu H, Yuri K, Hayashi S, Nihonyanagi K, Kawata M. *Brain Res*. 1998 Apr 27;791(1-2):35-42.

Yamagata K, Sugimura M, Yoshida M, Sekine S, Kawano A, Oyamaguchi A, Maegawa H, Niwa H. *Endocrinology*. 2016 Nov;157(11):4309-4317.

Yu LH, Li N, Liu CY, Ma B. *Neuro Endocrinol Lett*. 2011;32(6):811-5.

Yu M, Ives D, Ramesha CS. *J Biol Chem*. 1997 Aug 22;272(34):21181-6.

Zaccagnino P, D'Orta S, Romano LL, Di Venere A, Sardanelli AM, Lorusso M. *J Bioenerg Biomembr*. 2012 Apr;44(2):273-80.

Zhang RX, Mi ZP, Qiao JT. *Regul Pept*. 1994 Apr 14;51(1):25-32.

Zhang YQ, Gao X, Zhang LM, Wu GC. *Neuroreport*. 2000 Nov 9;11(16):3539-43.

Zhang X, Ji RR, Arvidsson J, Lundberg JM, Bartfai T, Bedecs K, Hökfelt T. *Exp Brain Res*. 1996 Oct;111(3):393-404.

Zhao H, Tian Z, Hao J, Chen B. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005 Jan 21;3:6.

Zhu CB, Hewlett WA, Feoktistov I, Biaggioni I, Blakely RD. *Mol Pharmacol*. 2004 Jun;65(6):1462-74.

Zhu WH, Lu CZ, Huang YM, Link H, Xiao BG. *Mult Scler*. 2007 Jan;13(1):33-40.

Zhu X, Eisenach JC. *Anesthesiology*. 2003 Nov;99(5):1175-9.

Zou X, Lin Q, Willis WD. *J Neurosci*. 2000 Sep 15;20(18):6989-97.

9. TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

Párdutz Árpád tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása MTA V. Orvostudományi Osztály (2023.12.11)				
Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összesen
I. Folyóiratcikk²	51	---	---	---
szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	37	800	1147
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	1	0	0
szakcikk, magyar nyelvű	---	1	0	0
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként	---	0	0	0
összefoglaló közlemény	---	10	139	199
rövid közlemény	---	2	77	95
II. Könyv	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	2	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV)	---	53	1016	1441
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	53	---	1016	1441
V. További tudományos művek	6	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkek és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkek is	---	3	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	1	0	0
Olthalmak (szabadalmak)	---	2	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok⁵	0	---	0	0
Összes hivatkozás¹	---	---	1016	1441
Hirsch index⁶	24	---	---	---
g index⁶	37	---	---	---

Speciális tudományometriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	7	326
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	11	140
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2004) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	48	1226
Az utolsó 10 év (2013 - 2023) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkek száma	27	510
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	121	8,40%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	21
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0

Megjegyzések:
¹ a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok
² lektorált, tudományos folyóiratban
³ a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja
⁴ konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben
⁵ nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe
⁶ a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva.
⁷ közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé
n.a. = nincs adat