

apardutz_101_23

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A SZENZITIZÁCIÓ MIGRÉNBEN ÉS ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLEIBEN



Dr. Párdutz Árpád

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

SZENT-GYÖRGYI ALBERT ORVOSTUDOMÁNYI KAR

NEUROLÓGIAI KLINIKA

2023

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS.....	6
1.1. A perifériás szenzitizáció az idegrendszerben.....	6
1.2. A centrális szenzitizáció az idegrendszerben	8
1.3. A fejfájásokról általában	10
1.3.1. A fejfájások klinikai klasszifikációja	11
1.4. A migrén jellegzetességei	11
1.4.1. Történeti áttekintés.....	11
1.4.2. A migrén tünettana	11
1.4.3. A migrén patomechanizmusa	12
1.4.4. A migrén kezelési lehetőségei	14
1.5. Szenzitizációs folyamatok migrénben és primer fejfájásokban.....	14
2. CÉLKITŰZÉSEK	16
3. A MIGRÉN ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLJEINEK VIZSGÁLATA	17
3.1. A NTG adása, mint a migrén modellje	17
3.1.1. c-fos és nNOS expressziójának változása patkány TNC-ben NTG adása után	20
3.1.2. A TNC-be futó afferensek CGRP tartalmának változása patkányban NTG adása után	23
3.1.3. 5HT és 5HTT megjelenése patkány TNC-ben NTG adása után	25
3.1.4. A CamKII expressziója patkány TNC-ben NTG adása után.....	28
3.1.5. TRPV1, NFkB, COX2 megjelenése patkány TNC-ben NTG után	30
3.1.6. A kinurenin útvonal a fejfájás NTG modelljében.....	33
3.2. Orofaciális formalin, mint a fejfájás állatkísérletes modellje	37
3.2.1. A viselkedés vizsgálata patkány orofaciális formalin modelljében	37
3.2.2. CGRP expresszió patkány TNC-ben orofaciális formalin adása után.....	38
3.2.3. c-fos és nNOS megjelenése a másodlagos trigeminális neuronok területén	39
3.3. A Gasser dúc elektromos ingerlése, mint a migrén állatkísérletes modellje	41
3.3.1. c-fos megjelenése a Gasser dúc elektromos ingerlése után	41
3.4. A dura kémiai ingerlésének hatása patkányban.....	47
3.4.1. c-fos vizsgálata a dura kémiai ingerlése után patkány TNC-ben	47
3.4.2. A CGRP, TRPV1 és nNOS patkány TNC-ben durális IS ingerlés után.....	53
4. MODULÁCIÓ LEHETŐSÉGE A MIGRÉN ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLJEIBEN	57
4.1. COX gátlás hatása a migrén NTG modelljében	57
4.2. Szumatriptán hatása a NTG modellben.....	61
4.3. Szumatriptán hatása a durális IS modellben	64
4.4. Krónikus ösztadiol hatása a NTG modellben.....	68
4.5. A krónikus ösztadiol kezelés hatása az orofaciális formalin modellben	74
4.6. KYNA moduláló hatása a NTG modellben	79
4.7. KYNA moduláló hatása a durális IS modellben.....	83
4.8. Kinureninek és nemi hormonok hatása a CSD kialakulásában	88
4.9. Kinurenin származékok hatása a fejfájás NTG modelljében.....	93
4.10. Az anandamid moduláló hatása patkányban szisztémás NTG adása után.....	102
5. ÖSSZEGZÉS (ÚJ EREDMÉNYEK, MEGÁLLAPÍTÁSOK).....	113
6. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	115
6.1. A migrén állatkísérletes modelljei	115
6.1.1. NTG szisztémás adása patkányban.....	115
6.1.2. Patkány orofaciális formalin modellje	115
6.1.3. A TG elektromos ingerlése patkányban.....	115
6.1.4. A patkány dura mater kémiai ingerlése.....	115

6.1.5. A CSD kiváltása és regisztrációja kísérleti állatokban.....	116
6.2. Ovariectomia és ösztrogénkezelés.....	116
6.3. Vizsgálati módszerek.....	117
6.3.1. Immunhisztokémiai vizsgálatok.....	117
6.3.2. Western blot.....	119
6.3.3. HPLC.....	121
6.3.4. Képanalízis.....	121
6.3.5. Viselkedésvizsgálatok.....	121
6.4. Statisztikai elemzés.....	122
7. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT SZOLGÁLTATÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA.....	123
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	124
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	125

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5HIA – 5-hidroxi indolecetsav
 5HT – szerotonin
 5HTT – szerotonin transzporter
 AEA – N-arachidonil-etanolamid, anandamid
 ALD2 – aldehid dehidrogenáz 2
 AMPA – 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav
 ANOVA – varianciaanalízis
 BDNF – agyi eredetű növekedési faktor (brain derived growth factor)
 BK – bradykinin
 cAMP – ciklikus adenzin-monofoszfát
 CamKII – kalmodulin-függő protein kináz II
 CB – kannabinoid receptor
 CFA – complete Freund adjuváns
 cGMP – ciklikus guanozin-monofoszfát
 CGRP – kalcitonin génrelációs peptid
 CLR – kalcitonin receptor like receptor
 COX – ciklooxygenáz
 COX1 – ciklooxygenáz-1
 COX2 – ciklooxygenáz-2
 CREB – cAMP response binding protein
 CSD – tovaterjedő kérgi gátlás/cortical spreading depression
 DR – dorzális raphe mag
 ERK – extracellular signal-regulated kinase
 FHM1 – familiaris hemiplégias migrén 1
 GABA – gamma-amino vajsav
 GAPDH – glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz
 GPR30 – G-protein kapcsolt ösztrogén receptor
 GPR35 – G-protein kapcsolt receptor 35
 HPLC – nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
 IDO – indolamin 2,3 dioxigenáz
 IDO1 – indolamin dioxigenáz 1
 IDO2 – indolamin dioxigenáz 2
 IHS – Nemzetközi Fejfájás Társaság/International Headache Society
 i.p. – intraperitonealis
 IR – immunoreaktív
 IS – inflammatory soup/„gyulladásos leves”
 KAT – kinurenin aminoszferáz
 KATII – kinurenin aminoszferáz 2
 KIR – központi idegrendszer
 KMO – kinurenin monoxigenáz
 KYNA – kinurénsav
 KYNU – kinurenináz
 LC – locus ceruleus
 lys-ASA – lizil-acetil-szalicilát
 L-KYN – kinurenin
 MAPK – mitogén aktivált protein kináz

nAChR – $\alpha 7$ nikotinos acetilkolin receptor
NAD – nikotin adenin dinukleotid
NFkB – nukleáris faktor kappa B
NK1 – neurokinin-1
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
NSS – nucleus salivatorius superior
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 – ovariectomizált állatok, melyek bajuszpárnájukba fiziológiás sóoldat injekciót kaptak (kontroll csoport)
OVX+E₂-Phys – ovariectomizált, ösztradiol kezelt állatok, melyek bajuszpárnájukba fiziológiás sóoldat injekciót kaptak (kontroll csoport)
PAG – periaqueductalis szürkeállomány
PBS – foszfát puffer sóoldat
PBS-T – foszfát puffer sóoldat és 1%-os Triton X-100
PG – prosztaglandin
PGE2 – prosztaglandin E2
PKA – protein kináz A
PKC – protein kináz C
PROB – probenecid
RAMP – receptor activity-modifying protein
RCP – receptor komponens protein
s.c. – subcutan subcutan
SIF – szintetikus intersticiális folyadék
SP – P-anyag
SPG – ganglion sphenopalatinum
SZR81 – N-(2-N-pirrolidiniletíl)-4-oxo-1H kvinolin-2-karboxamid hidroklorid/ szintetikus kinurénsav analóg
TDO – triptofán 2,3 dioxigenáz
TDO1 – triptofán 2,3 dioxigenáz 1
TDO2 – triptofán 2,3 dioxigenáz 2
TG – trigeminális ganglion/Gasser-dúc
TNC – kaudális trigeminális mag
TRPV1 – tranziens receptor potenciál vanilloid 1

1. BEVEZETÉS

1.1. A perifériás szenzitizáció az idegrendszerben

Az érzőrendszer szenzitizációjáról akkor beszélünk, ha a szenzorium érzékenysége fokozódik a bejövő ingerek kapcsán. Perifériás szenzitizáció esetén leginkább a környéki struktúrák és az elsődleges érző neuronok érintettek.

A XX. század elején Sir Thomas Lewis brit orvos írta le a bőr karistolása után létrejövő választ: a mechanikus inger területén létrejövő bőrpírt, melyet a lokális hisztaminfelszabadulás okoz, az ezt követő élénkebb vörös kiterjedtebb választ az arteriolák dilatációja kapcsán és végül a duzzanatot, mely az intersticiális folyadékfeszaporodás miatt alakul ki. A jelenségsort Lewis-féle hármás válasznak nevezték el. Később hasonló jelenséget váltottak ki kísérletes körülmények között a bőr nociceptorainak elektromos és kémiai ingerlését követően. Mindkét esetben szükség volt az érintett terület ép szenzoros beidegzésére, mivel a folyamat alapja az axonreflex és a következményes neurotranszmitter és mediátorfelszabadulás, melyhez hasonló folyamatok játszódnak le az érző idegrendszer perifériás szenzitizációja során.

Ezen jelenség esetében a környéki idegek ingerlési küszöbe lecsökken és/vagy megemelkedik a válasz mértéke az elsődleges érző neuronok végződéseinél (Campbell és mtsai., 2006), mely folyamat célja a sérült struktúrák védelme azáltal, hogy aktivitásukat csökkenti. A szenzitizáció kialakulása egyrészt a nociceptorokból, másrészt nem neuronális sejtekből felszabaduló mediátoroknak köszönhető, melyek a károsodás helyén megjelennek és felhalmozódnak a szövetekben. Ebben a folyamatban számos molekula vesz részt. A sérült szövetek pH-ja csökken, kálium, prosztaglandinok (PG) és bradikinin (BK) szabadul fel belőlük, melyek az elsősorban kémiai ingerekre érzékeny C-rostokat aktiválják (Fitzgerald és Woolf 1984) és további PG szintézishez és felszabaduláshoz vezetnek. Ezáltal G-proteinhez kötött receptorokon és ligandfüggő ioncsatornákon hatva depolarizálódnak az elsődleges érző idegvégzések, továbbá csökken az akciós potenciálok küszöbe és emelkedik a neuronális tüzelés frekvenciája (McMahon és mtsai., 2006).

A fenti folyamat egyik kulcsmolekulája a kalcitonin gén-relációs peptid (CGRP). A 37 aminosavból álló CGRP a nyolcvanas években került a kutatók látókörébe, amikor felfedezték, hogy a kalcitonin gén alternatív splicingje egy teljesen más funkciójú peptidet, az α CGRP-t eredményezi (Amara és mtsai., 1982). Ezt követően felfedeztek egy újabb gént, amely egy homológ peptidet, a β CGRP-t kódolja (Amara és mtsai., 1985). Az α és β forma egy aminosavban különbözik egymástól patkányban, míg emberben három aminosav az eltérés.

A CGRP és receptora az emlősökben meglehetősen konzervált formájú (Wimalawansa 1996), és csaknem kizárólag az idegsejtekben jelenik meg, leginkább az érző neuronokban (Poyner és mtsai., 2002, Russell és mtsai., 2014). Immunhisztokémiai és in situ hibridizációs vizsgálatok alapján az α CGRP az érző idegekben fordul elő nagy mennyiségben, ahol a sejttest területén, a hátsó gyöki ganglionban vagy a Gasser-dúcban (TG) helyezkedik el, míg a β CGRP csaknem kizárólagosan a motoneuronokban és az enterális idegrendszerben található meg. A vizsgálatok alapján a két forma receptorkötése hasonló, csupán kis különbség észlelhető a hatáserősségükben (Mulder és mtsai., 1988, Noguchi és mtsai., 1990).

A CGRP a hatását heteromér receptoron keresztül fejt ki, mely a G-proteinhez kötődő kalcitonin receptor like receptor (CLR) és az ún. RAMP molekulából (receptor activity-modifying protein) áll. Egy harmadik fehérje, a receptor komponens protein (RCP) is fontos a teljes CGRP hatás megjelenéséhez azáltal, hogy összeköttetést teremt a CLR és a $G\alpha$ alegység között az adenilát cikláz aktiválásához (Russell

és mtsai., 2014). A megemelkedett ciklikus adenozil-monofoszfát (cAMP) szint aktiválhatja a protein kináz A-t (PKA), mely ATP szenzitív K⁺-csatornákat nyithat szerepet játszva a peptid értágító hatásában (Nelson és mtsai., 1990). A CGRP emellett részt vesz az endotél mediált vazodilatációban is, mely során szintén szerepet kaphat a cAMP (Brain és Grant 2004), és serkenti a nitrogén-monoxid (NO) útvonalat is (Smillie és mtsai., 2014). A CGRP nem növeli meg lényegesen az intracelluláris Ca⁺⁺ koncentrációt a hátsó gyöki ganglionsejtekben, de a megemelkedett cAMP koncentráció a PKA-n keresztül foszforilálja a cAMP response binding proteint (CREB), mely arra utalhat, hogy befolyásolni tudja a transzkripciót (Anderson és Seybold 2004). Emellett kimutatták, hogy hat a kalmodulin-függő protein kináz II (CamKII) (Wang és mtsai., 2010) és a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) rendszerre is (Kawase és mtsai., 1999).

A CGRP az elsődleges érző neuronok 45%-ban expresszálódik: túlnyomórészt a kis sejtekben és a C-rostokban, de ezen kívül megtalálható az A δ rostokban és kisebb mértékben a vastagabb mielinizált idegekben, valamint az alfa motoneuronokban is (Averill és mtsai., 1995). Szövetkárosodás hatására sokfajta proinflammatoros mediátor szabadul fel az elsődleges szenzoros idegsejtek végződéseiből, melyek közül kiemelkedő szerepe van a CGRP-nek és a P-anyagnak (SP). Ezek közvetlenül aktiválják a végződéseket és facilitálják a nociceptorok tüzelését, mely a hiperalgéria kialakulásához és fennmaradásához vezet (Basbaum és mtsai., 2009). Humán vizsgálatokban a CGRP intradermális adása tartós, órákon át tartó bőrpírt okoz (Brain és mtsai., 1985), és ez a hosszas hatás a molekula 7 perces féleletidejét tekintve tartós receptorális aktivációt vagy egyéb, tartós sejtszintű változásokat tükröz (Grant és mtsai., 2004). Az alkar bőrének direkt CGRP kezelése nem okozott fájdalomérzést vagy axon reflex mediált vazodilatációt humán vizsgálatok során, azaz feltehetőleg nem vesz részt közvetlenül a fájdalom kialakításában csak a szenzitizációban és a facilitációban (Weidner és mtsai., 2000). Összefoglalva: a CGRP a legfontosabb mediátornak tűnik az érző idegek aktivációjakor létrejövő vazodilatáció kapcsán emberben (Geppetti és mtsai., 2012), míg patkányokban a vazodilatáció mellett hízósejt degranuláció és hisztaminfelszabadulás is megfigyelhető (Schmelz és mtsai., 2001).

A fájdalom patomechanizmusának pontosabb megértésében sokat segített az ún. algogén molekulák hatásának feltérképezése. Az első felismert receptor, ami ezt a hatást közvetíti a tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1) volt, mely a paprika csípős anyagát a kapszaicint és a hozzá hasonló vegyületeket (vanilloidok) képes megkötni (Caterina és mtsai., 1997). A TRPV1 felelős többek között a resiniferatoxin (Caterina és mtsai., 1997), a piperin (McNamara és mtsai., 2005) és a mustárolaj hatásának kialakulásáért (Bandell és mtsai., 2004). A receptor maga egy hat transzmembrán szakaszból álló, nem-szelektív kationcsatorna, ami hosszú C végződéssel és az N-terminálison hat ankyrin doménnal rendelkezik (Liao és mtsai., 2013). A TRPV1 polimodális, érzékeny a fizikai és kémiai stimulációra, mint például a hő (Caterina és mtsai., 1997), alacsonyabb pH (Tominaga és mtsai., 1998) és mechanikus ingerlés (Walker és mtsai., 2003).

A TRPV1 nagy mennyiségben megjelenik a nociceptív szenzoros rostokon, melyek többféle, a fentiekben részletezett ingerek hatására fájdalomérzetet közvetítenek, amit CGRP és SP felszabadulása kísér. Ennek következményeként vazodilatáció és ödéma alakulhat ki, mely fontos részjelenség a neurogén gyulladás kialakulásában (Szallasi és Blumberg 1999).

A hátsó gyöki és trigeminális ganglionokban található nociceptív neuronok nagy része expresszál szerotonin (5HT) receptorokat, leginkább a 5HT_{2A}-t, melyek legtöbbször kolokalizációt mutatnak a TRPV1 receptorokkal (Loyd és mtsai., 2011). A lokális vazokonstriktív hatása mellett a 5HT komoly szerepet játszik a fájdalom kialakításában és fenntartásában is (Sommer 2004, Parada és mtsai., 2001). Az emlősökben a 5HT döntő többsége a perifériás szövetekben található, ahol aktív felvétel mellett felszabadulás is történik a vérlemezkékből, hízósejtekből, immunsejtekből (Sommer 2004), és a korai fázisban elsősorban proinflammatoros és pronociceptív tulajdonságokkal bír (Dray 1995).

Állatkísérletekben 5HT szint emelkedést figyeltek meg gyulladás esetén (Nakajima és mtsai., 2009) és hőhatás után (Sasaki és mtsai., 2006), míg humán vizsgálatokban ízületi fájdalom kapcsán (Kopp 1998), valamint allodynia esetén (Ernberg és mtsai., 2000a,b). A 5HT adása gyulladást és hiperalgéziát okoz mind a kísérleti állatokban (Taiwo és Levine 1992, Tokunaga és mtsai., 1998), mind emberekben (Ernberg és mtsai., 2006, Babenko és mtsai., 2000). Ennek mechanizmusa többféle lehet: egyrészt hatással van a TRPV1 receptorok szerkezetére gyulladás alatt, pl. 5HT hatására emelkedik a nociceptív rostok hő- és kapszaicinérzékenysége és a 5HT megemeli a TRPV1 csatornák Ca^{++} áteresztőképességét, valamint megkönnyíti a CGRP felszabadulást (Ohta és mtsai., 2006, Loyd és mtsai., 2012b). A 5HT_{1B,D}, 2A és 3A receptorok megtalálhatók a TRPV1 receptorral rendelkező elsődleges érző neuronokon (Loyd és mtsai., 2011), mely lehetőséget biztosít a 5HT moduláló hatására. Bonyolítja a helyzetet, hogy a 5HT_{1B,D} és a 5HT_{2A}, illetve 3A receptorok ellentétes hatással bírnak. Az előbbi agonizmusa csökkenti a gyulladást és a hiperalgéziát (Loyd és mtsai., 2012a), melyet kihasználunk a migrén akut kezelésénél a szelektív agonistáik, a triptánok alkalmazásával (Evers és mtsai., 2009), ezzel szemben a 5HT_{2A} és 3A receptorok agonistái hiperalgéziát elősegítő hatásúak (Ohta és mtsai., 2006, Obata és mtsai., 2000).

1.2. A centrális szenzitizáció az idegrendszerben

A centrális szenzitizáció jelenségét először 1983-ban írták le: ha az érintett bőrterületen lokális gyulladást váltottak ki, akkor a végtagi flexiós reflexválasz már nem csak fájdalmas ingerlés esetén jött létre, és a reflex kiváltásában résztvevő reflexogén zóna is nagyobb lett. Érdekes módon a jelenség a lokális gyulladás megszűnése után több órán át is fennmaradt. (Woolf 1983). Összességében elmondható, hogy centrális szenzitizáció esetén a fájdalomérző neuronok és pályarendszerek működésének erősödése észlelhető, melyet a növekvő excitabilitás, a csökkenő gátlás és a hatékonyabb szinaptikus neurotranszmisszió vált ki elhúzódó aktivitást, gyulladást vagy neuropátiás sérülést követően kialakuló plasztikus változások révén. Végeredményként lényegesen megváltozik a fájdalomérző rendszer működése, és az eddig küszöb alatti ingerek is továbbtődnek és kifejezettebb akciós potenciál választ alakítanak ki, miközben a centrális nociceptorok receptív mezeje megnövekszik, a spontán aktivitás megnő, a küszöb feletti ingerek erősebb választ eredményeznek, kialakul az allodynia, a nem fájdalmas ingerek fájdalomként való észlelése (Woolf 2007; Woolf és King 1990).

A perifériással ellentétben a centrális szenzitizáció során olyan bemenetet is kap a nociceptív rendszer, ami normális esetben nem működik, például a vastag myelinizált mechanoreceptív A β rostok révén (Woolf és Salter 2000). Mivel a jelenség a központi idegrendszer (KIR) idegsejtjeinek megváltozott sajátosságából ered, a hiperszenzitivitás a már nem gyulladt szövetben a kiváltó ok megszűnte után is megmaradhat a szokásos ingerek esetében, azaz nem biztos, hogy kapcsolódik az elsődleges fájdalomérző rostok aktivitásához. (Woolf 1983).

A glutamát a gerincvelői hátsó szarv gyorsan felszabaduló neurotranszmittere, melynek receptorai nagy sűrűségben vannak jelen a hátsó szarv területén. Az ionotróp N-metil-D-aszpartát (NMDA) és 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav (AMPA) receptorok majdnem minden szinapszisban előfordulnak (Antal és mtsai., 2008), de a metabotróp típusúak is nagy számban megtalálhatók itt (Alvarez és mtsai., 2000). Az NMDA receptor kiemelt jelentőségű a centrális szenzitizáció elindításában és fenntartásában, mivel mind a kompetitív, mind a non-kompetitív antagonisták megelőzik és kivédik a fájdalominger hatására létrejövő hiperexcitabilitást a másodlagos nociceptorok területén (Ma és Woolf 1995, Woolf és Thompson 1991). Normál körülmények között a hozzá kötődő Mg^{++} ion az NMDA receptort képes gátolni (Mayer és mtsai., 1984), de az elsődleges nociceptorokból tartósabban felszabaduló glutamát, CGRP és SP okozta depolarizáció eltávolítja a Mg^{++} -ot és még jobban elősegíti a

kationbeáramlást. Ez elsődleges szerepet játszik a szinaptikus hatékonyság növelésében, valamint a további Ca^{++} beáramlásban, mely számos intracelluláris jelút aktiválásával fenntartja a folyamatot.

A CGRP a centrális szenzitizáció folyamatában más módon is részt vehet. A CGRP receptor aktiválódása az elsődleges érző neuronok centrális termináisaiból felszabaduló peptid hatására indirekt módon szenzitizálhatja az NMDA receptorokat (Benarroch 2011). A tartós neuronális aktiváció a hátsó szarv területén a MAPK kaskádon keresztül foszforilálni képes az NMDA receptor NR1 alegységét és megkönnyíti a pronociceptív neurotranszmitterek megjelenését, mely elősegíti a fájdalommal kapcsolatos neurotranszmissziót (Latremoliere és Woolf 2009, South és mtsai., 2003, Woolf 2011). Érdekes módon a TNC területén a CGRP receptorokat elsősorban az idegvégződéseken találjuk meg és nem expresszálódnak a sejtesten (Eftekhari és mtsai., 2010). A gerincvelőt vizsgálva is azt találták, hogy a receptorok preszinaptikusan helyezkednek el, sokszor glutamáterg idegsejteken, melyek részben enkefalint is tartalmaznak és a rostok egy része preszinaptikus α_2 receptort is expresszál. Lehetséges, hogy a CGRP receptorok elősegítik a glutamát felszabadulását, mely kapcsán erősödik a nociceptív transzmisszió, és ezzel egyensúlyt tart az α_2 receptorok és az enkefalinok gátló hatása (Marvizón és mtsai., 2007). A CGRP gerincvelői pronociceptív hatására több bizonyíték is van, az viszont nem egyértelmű, hogy közvetlen hatásról vagy indirekt facilitáló effektusról van-e szó. Az bizonyosnak tűnik, hogy a perifériás fájdalomérző rostok ingerlése CGRP felszabadulást okoz a központi végződéseken (Russell és mtsai., 2014). Az intratekális CGRP nem befolyásolja a nociceptív és termikus válaszok küszöbét patkányokban, de a CGRP antagonisták alkalmazása viszont megemeli azokat (Kuraishi és mtsai., 1988). Más vizsgálatok ugyanakkor arra utalnak, hogy a gerincvelői CGRP a centrális szenzitizációt segíti elő és nem befolyásolja az akut nocicepciót: a CGRP antiszérum csökkentette a hiperalgéziát karragenin okozta ízületi gyulladásban, míg nem volt hatással a kontroll állatok nociceptív válaszaira (Kawamura és mtsai., 1989).

A SP a glutamáttal együtt szabadul fel a vékony, nem mielinizált rostokból és a neurokinin-1 (NK1) receptorhoz kötődve hosszan tartó depolarizációt idéz elő (Henry 1976), mely hozzájárul a C-rostok által közvetített szinaptikus potenciálok időbeli szummációjához (Xu és mtsai., 1992) és az ehhez kapcsolódó intracelluláris jelutak aktiválódásához. A CGRP szintén a kis átmérőjű szenzoros neuronok terméke, fokozza a SP hatását (Woolf és mtsai., 1986) és a CGRP1 receptorok révén elősegíti a PKA és protein kináz C (PKC) útvonal működését, ezáltal erősítve a centrális szenzitizáció folyamatát (Sun és mtsai., 2004). A CGRP ezen kívül megemeli az agyi eredetű növekedési faktor (BDNF) felszabadulását a trigeminális nociceptorokból (Buldyrev és mtsai., 2006), ami szerepet játszhat többek között a migrén kialakulásában (Fischer és mtsai. 2012).

A TRPV1 kiemelt jelentőségű a centrális szenzitizációs folyamatokban is: mind a PKA és PKC képes a receptor foszforilációjára, ezáltal megnövelve az érzékenységet (Bhave és mtsai., 2002, 2003). A foszfolipáz C aktivitásfokozódás miatt csökkenő inozitol-bifoszfát is felszabadítja a TRPV-t a gátlás alól (Prescott és Julius 2003), míg ezzel párhuzamosan a megemelkedett diacilglicerol a PKC-n keresztüli további foszforilációval növeli az aktivitást (Numazaki és mtsai., 2002).

A perifériás nociceptorok tartós és erőteljes stimulációjakor felszabaduló BK a hátsó szarvban expresszálódó B2 receptorokon keresztül fokozza a szinaptikus működést a PKA, PKC és az extracelluláris signal-regulated kinase (ERK) útvonalak aktiválása révén (Chapman és Dickenson 1992, Kohno és mtsai., 2008). A leszálló szerotoninergerg pályarendszer is hatással van az ERK kaskádra az ionotróp $5HT_3$ receptoron keresztül (Kayser és mtsai., 2007, Zeitz és mtsai., 2002) és feltételezhetően a metabotróp $5HT_7$ receptor révén is (Brenchat és mtsai., 2009).

Az intracelluláris Ca^{++} koncentráció bizonyos szintű emelkedése kulcsfontosságú a centrális szenzitizáció kialakulásában: ennek legfőbb forrása az NMDA-receptorokon beáramló Ca^{++} , de AMPA receptorokon

keresztül (Vikman és mtsai., 2008), a feszültségfüggő Ca^{++} csatornákon bejutó (Woolf és Salter 2000) és a metabotróp receptorokon keresztül az intracelluláris raktárokból történő felszabadulás révén is létrejöhet (Luo és mtsai., 2008). Az így felszaporodott Ca^{++} szerepe kiemelt jelentőségű az intracelluláris kinázok aktiválása szempontjából, melyek mind az NMDA, mind az AMPA receptorokat képesek foszforilálni, és ezáltal meg tudják változtatni az aktivitásukat, mely folyamatokban a PKC, PKA és a CamKII vesz részt (Chen és mtsai., 2007, Carvalho és mtsai., 2000). Ezzel párhuzamosan a szenzitizációs jelenségek kapcsán az ERK útvonal is aktiválódik: egyrészt a megemelkedett Ca^{++} koncentráció következményeként, másrészt a kalmodulin aktivált adenilát cikláz és ebből adódó PKA működés révén (Wei és mtsai., 2006). Ez az oka annak, hogy a foszforilált ERK megjelenése jelentős azokban a neuronokban, melyek a nociceptív bemenet miatt aktív jelátviteli utakat működtetnek és részt vesznek a centrális szenzitizáció kapcsán létrejövő plasztikus receptorális változásokban (Hu és mtsai., 2003, Kawasaki és mtsai., 2004). Az ERK fokozott működésének eredményeként pedig fokozódik az NMDA és AMPA receptorok hatékonysága (Kohno és mtsai., 2008) és csökken a K^+ kiáramlás, melyek együttesen fokozott membrán excitabilitáshoz vezetnek (Hu és mtsai., 2006). Ezzel párhuzamosan felerősödő expresszió mutatkozik a c-fos, az NK1, a tirozin-kináz B és a ciklooxygenáz-2 (COX2) géneknél (Ji és mtsai., 2009).

A gerincvelő hátsó szarvában képződő NO-nak szintén szerepe lehet a szenzitizációs folyamatokban (Wu és mtsai., 1998), melyben a ciklikus-guanozin monofoszfát (cGMP) kaszkád, bizonyos membrán csatornák nitrozilációja, adenzin-difoszfát ribolizáció és reaktív gyökök képződése játszhat szerepet (Davis és mtsai., 2001, Schwartz és mtsai., 2008).

Kiemelt jelentősége van a hiperszenzitivitás kialakulásában a hátsó szarv sejtjeiben indukálódó COX2-nek, mely fokozott prosztaglandin E2 (PGE2) képződést indít el (Samad és mtsai., 2001), ami a gerincvelői neuronokon lévő PGE2 receptor 2-höz kötődve felerősíti az NMDA és AMPA receptorok ionáramait (Kohno és mtsai., 2008). Ezen kívül nem szelektív kationcsatornákat nyit meg (Baba és mtsai., 2001) és gátolja a glicinerg neurotranszmissziót (Ahmadi és mtsai., 2002). A PGE2 preszinaptikusan is hat: a PGE2 receptor 4-en keresztül fokozza a transzmitterfelszabadulást (Vasko és mtsai., 1994).

1.3. A fejfájásokól általában

Fejfájásról beszélünk, amikor az arcot, fejet vagy nyakat érintő fájdalom az állapot fő jellegzetessége, mely az orvoslás során a fizikai tünetek összességét tekintve az egyik leggyakoribb panasz. Az egészségügyi ellátásban legtöbbször ún. elsődleges fejfájások tüneteivel jelentkeznek a páciensek, ahol közös jellemző, hogy a betegségnek önálló patomechanizmusa van, nem más kórkép áll a panaszok hátterében. Kevesebb, mint 10%-ban fordulnak elő a másodlagos fejfájások, ahol más betegség tüneteiként jelentkezhet a fej fájdalma. Az elsődleges fejfájások közé tartozó tenziós fejfájás globális prevalenciáját kb. 40%-ra lehet becsülni, míg a migrén esetében ez valamivel több, mint 10%. Ez utóbbi kórkép leginkább a 25 és 55 év közötti, aktív korosztályt érinti, és a nők mintegy háromszor gyakrabban szenvednek migréntől, mint a férfiak (Robbins és Lipton 2010, Stovner és mtsai., 2007). Az aktív népeiséget érintő gyakori előfordulás és a sokszor súlyos tünetek miatt a fejfájások okozta gazdasági teher az Európai Unióban óriási, 100 milliárd Eurós nagyságrendre becsülhető, melynek közel kétharmadát a migrénnel kapcsolatos költségek teszik ki. (Linde és mtsai., 2012).

1.3.1. A fejfájások klinikai klasszifikációja

A fejfájások csoportosítása a Nemzetközi Fejfájás Társaság (International Headache Society, IHS) kritériumrendszere szerint történik, melyet legutóbb 2018-ban vizsgáltak felül és újítottak meg (Headache Classification Committee 2018). A rendszerezés alapja az elsődleges és a másodlagos fejfájások elkülönítése. Az előbbi esetében a fejfájás önálló patomechanizmussal és jellegzetes klinikai tünetekkel rendelkezik, az idegrendszerben strukturális eltérés legtöbbször nem mutatkozik. Ide soroljuk a migrént, a tenziós típusú fejfájást és az ún. trigemino-autonóm fejfájásokat. A tüneti vagy másodlagos fejfájások ritkábbak, ilyenkor más betegség okozza a fej fájdalomérző rendszerének aktivációját, gyulladását vagy károsodását.

1.4. A migrén jellegzetességei

1.4.1. Történeti áttekintés

A migrén egyes tüneteit már az ókori egyiptomiak is felismerték az időszámításunk előtti második évezredben, a nyilalló erős fájdalom esetén speciális kezelést javasoltak. Azzal, hogy egy szorosan kötött vászondarabbal egy agyagkrokodilt rögzítettek a páciens fejére, lehet, hogy mérsékeltek a scalp ereinek tágulatát segítve a tünetek enyhülését. I.e. 400-ban Hippocrates leírta az aura jelenségét, de közel fél évszázadot kellett várni ahhoz, hogy Kappadókiai Aretaeus leírja a fejfájások első klasszifikációját, melyben az erős féloldali tartós fejfájást heterokrániának aposztrofálja, melyet később Galenus hemikrániának nevez el, amiből a migrén szó származtatható. A XII. században egy apáca, Bingeni Hildegard nagyon pontos leírást ad a „vízióiról”, melyek nagy valószínűséggel vizuális aurajelenségnek tarthatóak. Három évszázaddal később Thomas Willis pontos megfigyeléseket tesz közzé a migrénnel kapcsolatban, a betegséget érederetűnek, vazodilatáció következményének tartotta, hasonló elméletet publikált Erasmus Darwin (Charles Darwin nagyapja) is. Valamivel később, 1873-ban Edward Liveing a migrénes roham hátterében, hasonlóan az epilepsziához, az agyi neuronok „viharárt” véleményezte és rokonságot vélt felfedezni a két betegség között, már akkor felvetítve a migrén vaszkuláris és neuronális teóriájának kettősségét. Bár a pontos patomechanizmussal kapcsolatos vizsgálatok a mai napig folytatódnak, a migrént jelenleg elsődlegesen neuronális eredetűnek véljük, melyhez kapcsolódhatnak az érhálózat változásai (Burstein és mtsai., 2015).

1.4.2. A migrén tünettana

A migrénes roham a fejfájáson kívül sokfajta tünettellel jelentkezik, és a megjelenő klinikai képet négy stádiumra oszthatjuk. A fejfájást megelőzően órákkal, esetleg napokkal korábban jelentkezik a prodróma fázisa, mely a betegek 12-79%-ban megjelenik (Schoonman és mtsai., 2006). A tünetek sokszor pszichés jellegűek: deprimált hangulat, eufória, irritabilitás, koncentrációs zavar, de előfordulhat fény- és hangérzékenység, túlzott álomosság vagy a nyak izmainak feszülése, sóvárgás bizonyos ételek iránt, fokozott vizeletürítés és ásítás is (Silberstein és Young 1995). Ezt követően a migrénesek 25%-ban kialakul az ún. aura fázis, mely átmeneti központi idegrendszeri funkciózavar képében jelentkezik, kb. 5-20 perc alatt alakul ki és típusos esetben az időtartama nem haladja meg az 1 órát. Az aurajelenség kapcsán vagy ezt követően jelentkezik a jellegzetes migrénes fejfájás (Ziegler és Hassanein 1990). A leggyakoribb tünetek vizuálisak, látótérkiesés, csőlátás vagy csillámlátás fordul elő leginkább, emellett sokszor lépnek fel szomatoszenzoros jelenségek, elsősorban a felső végtag zsibbadása, beszédzavar, a motoros, esetleg agytörzsi tünetegyüttes jelentkezése ritkának mondható (Russell és Olesen 1996).

A fejfájás a migrénes roham során legtöbbször egyoldali, közepesen vagy nagyon erős, lüktető jegyeket mutat és 4-72 órán át tarthat. A panaszokat a fizikai aktivitás fokozza, a betegek pihenést, nyugalmat kívánnak, jellemző tünet a fény- és hangérzékenység, valamint a hányinger és hányás (Silberstein és Young 1995). Bár nem szerepel az IHS kritériumrendszerében, de a migrénes betegek kb. 60%-ában roham alatti allodynia alakul ki, azaz a nem fájdalmas ingereket fájdalmasnak érzékelik (Burstein és mtsai., 2000a), mely centrális szenzitizációs mechanizmus jelenlétére utal. Az allodynia legtöbbször a n. trigeminus ellátási területén jelentkezik, ilyenkor a másodlagos trigeminális nociceptorok részvétele feltételezhető, de ritkábban előfordulhat extratrigeminális lokalizációban is, mely a harmadlagos érző neuronok szenzitizációjára utalhat.

A fejfájást követően a betegek sokszor nem válnak tünetmentessé, a roham után akár napokig panaszokodhatnak általános rossz közérzetre, koncentráció gyengeségre, ingerlékenységre (Bose és Goadsby 2016), ez a posztdróma vagy lábadozási fázis.

1.4.3. A migrén patomechanizmusa

A migrénben a domináló tünet a fejfájás, melyet a trigeminovaszkuláris pályarendszer közvetít az agyhártyákból a központi idegrendszer felé. Az elsődleges érző neuronok a trigeminális ganglionban találhatóak, perifériás axonjaik ellátják a lágy és kemény agyhártyát, valamint a nagyobb cerebrális ereket (Uddman és mtsai., 1985), míg a centrális nyúlványok eléri a kaudális trigeminális magban (TNC) lévő másodlagos nociceptorokat (Liu és mtsai., 2004), melynek projekciói többek között a talamusz VPM magcsoportjába futnak és innen az információ a kortexbe jut. A TNC másodlagos neuronjai más agyi területekkel is közvetlen kapcsolatban állnak: az agytörzs egyes magcsoportjaival (formatio reticularis, periaqueductalis szürkeállomány, n. salivatorius superior), a hipotalamusszal és a törzsdúcokkal (striatum, nucleus subthalamicus) (Malick és mtsai., 2000).

Az első részletes elmélet a migrén patomechanizmusával kapcsolatban a huszadik század közepén látott napvilágot. Ezek alapján a betegséget elsődlegesen éreredetűnek tartották, az aurajelenséget az intrakraniális erek összehúzódásával, míg a fejfájást a koponya ereinek tágulatával magyarázták (Tunis és Wolff 1952). Ez jól illeszkedett azon korábbi megfigyelésekhez, miszerint az erős vazodilatátor amil-nitrát jól szüntette az aura tüneteit, míg az ereket összehúzó ergotamin hatékony volt a migrénes fejfájás csillapításában (Graham és Wolff 1938). A folyamatban kiemelt szerepet gondoltak a vérlemezékből kiürülő 5HT-nak, mely folyamat hatására csökken a kraniális érhálózat tónusa (Humphrey 1991). Ennek ellenére a migrén tisztán vaszkuláris teóriája nem tudta megmagyarázni a roham alatt jelentkező egyéb, központi idegrendszert érintő tüneteket, mint például a fény- és hangérzékenységet, ezért új elméletek kidolgozására volt szükség. A trigeminovaszkuláris teória központjában az agyhártyákat és azok ereit gazdagon beidegző n. trigeminus anatómiai és funkcionális változásait írja le, kiemelve a végződésekből felszabaduló vazoaktív hatással is bíró neuropeptideket, mint a CGRP, SP és a később felfedezett hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (Moskowitz és mtsai., 1979). Ezáltal egységbe foglalja a trigeminális rendszer aktiválódása során jelentkező „lefelé irányuló”, elsősorban a peptidfelszabadulás kapcsán jelentkező lokális hatásokat, valamint a centrális folyamatokat, melyek végül a fejfájás kialakulásához vezetnek (Moskowitz 1984). Jelen ismereteink szerint az feltételezhető, hogy a migrénes roham a központi idegrendszerből indul ki, de a fejfájás kialakulásához szükséges a perifériás struktúrák aktiválódása is (Olesen és mtsai., 2009).

Az egyik lehetséges kapcsolódási pont egy agyi elektrofiziológiai jelenség, a tovaterjedő kérgi gátlás (cortical spreading depression – CSD) lehet, mely során a kérgi neuronok és gliasejtek lassan tovaterjedő depolarizációja, majd gátlása észlelhető (Leao 1944). Az első leírás után gyorsan felmerült, hogy a CSD kérgi terjedési sebessége (3-5 mm/min), a szomatotopiát figyelembe véve megfeleltethető a migrénes

vizuális aurajelenségek időbeli lefolyásának (Leao és mtsai., 1945), de hosszú éveket kellett várni mire a korszerű funkcionális képalkotó vizsgálatok segítségével még valószínűbbé vált, hogy a migrénes aura megfelel a CSD-nek (Hadjikhani és mtsai., 2001). A CSD révén létrejövő depolarizáció megváltoztatja az agy lokális vérátáramlását, fokozza a neuronális és gliális anyagcserét, aminosavak és NO felszabadulását okozza (Read és mtsai., 1997) és kísérletes körülmények között képes a trigeminális rendszer aktiválására, melyet a TNC-ben észlelt c-fos expresszió változásával (Moskowitz és mtsai., 1993) és elektrofiziológiai vizsgálatokkal (Zhang és mtsai., 2011) is alátámasztottak. Az újabb állatkísérletes vizsgálatok arra utalnak, hogy a migrénben részt vevő agytörzsi struktúrákra a CSD a trigeminális afferensektől független módon, direkt, centrálisan futó pályarendszereken keresztül is hathat (Lambert és mtsai., 2011), mely a kérdést még érdekesebbé teszi.

A migrén egyik ritka, monogénesen öröklődő variánsánál, a familiáris hemiplégiás migrénben, a három leggyakoribb mutáció mindegyike megkönnyíti a CSD kialakulását az agyban (Kors és mtsai., 2003). A tünetek hasonlósága miatt feltételezhető, hogy a „klasszikus” aurás migrénes betegekénél is genetikai, illetve környezeti tényezők hatására megnő a CSD kialakulási esélye, mely a rohamok létrejöttéhez vezethet.

A fentiekől részben függetlenül derült fény arra, hogy a migrénes roham során bizonyos agytörzsi magvak aktiválódnak, mint például a nucleus raphe magnus (NRM) és dorsalis (DR), a locus ceruleus (LC) és a periaqueductalis szürkeállomány (PAG) (Weiller és mtsai., 1995). Ezek a magok befolyásolhatják a TNC aktivitását, részt vesznek a fájdalomérzés szabályozásában, továbbá szerepet játszhatnak a trigeminovaskuláris rendszer aktiválásában is (Edvinsson és Goadsby 1995). Ezek a kapcsolatok fontosak lehetnek a migrén egyéb kísérő tüneteinek kialakulásában, mint például a hányinger, hányás, ásítás, könnyezés, irritabilitás és fáradtság (Burstein és Jakubowski 2005).

A migrénes fejfájást megelőző és kísérő tünetek sokszínűsége arra utal, hogy a betegség sokkal több, mint egy „fejfájás”, tekintettel arra, hogy több kortikális, szubkortikális és agytörzsi területet érintő állapotról van szó, azaz a migrénes agy különbözik a nem migrénesétől (Borsook és mtsai., 2012), és nem lehet a migrén kialakulását kizárólag a CSD-nek vagy a migrén generátoroknak tulajdonítani. A migrént megelőző prodróma tünetei a hipotalamusz (fáradtság, deprimált hangulat, étel iránti sóvárgás, ásítás), az agytörzs (izmok érzékenysége és a nyak feszülése), az agykéreg (fény- és hangérzékenység, szagérzékenység) és a limbikus rendszer (depresszió) szerepére utalnak (Schulte és mtsai., 2016, Maniyar és mtsai., 2014). Az utóbbi időben a figyelem középpontjába a hipotalamusz került, melynek neuronjainak hatására megváltozik a szimpatikus és a paraszimpatikus idegrendszer tónusának aránya az agyhártyában az utóbbi javára (Burstein és Jakubowski 2005). A hipotalamusz összeköttetése révén képes lehet a nucleus salivatorius superior (NSS) preganglionáris idegsejtjeinek és a szimpatikus idegrendszer spinális neuronjainak tüzelését befolyásolni (Spencer és mtsai., 1990, Tucker és Saper 1985). A NSS képes acetilkolin, vazóaktív intesztinális peptid és NO felszabadítására a ganglion sphenopalatinumból (SPG), melynek rostjai gazdagon beidegzik az agyhártyákat, ahol vazodilatációt, plazma extravazációt és gyulladásgos mediátorok felszabadulását segítik elő (Larsson és mtsai., 1976, Nozaki és mtsai., 1993; Suzuki és Hardebo 1993). Emellett a NSS befolyásolja a TNC másodlagos érző neuronjainak tüzelését (Akerman és mtsai., 2012), valamint a meningeális nociceptorok aktivitása részben az SPG fokozott működéséhez kötött (Bolay és mtsai., 2002). A migrénes roham emellett sokszor fokozott paraszimpatikus tünetekkel jár az arcon, mint például a könnyezés vagy az orrfolyás (Havanka-Kanniainen és mtsai., 1988), és végül a SPG blokádnak hatékonyan bizonyul a migrénes fájdalom kezelésében (Cady és mtsai., 2015). A fentiek mellett az is lehetséges, hogy a hipotalamikus és agytörzsi magok képesek a trigeminális talamokortikális fájdalomérző struktúrák küszöbét csökkenteni, mely kulcsfontosságú lehet a fejfájásos roham kialakulásában (Nosedá és mtsai., 2014). A hipotalamusz és egyes agytörzsi magvak képesek a talamusz relémagjainak modulálására (Saper és mtsai., 2005, 2010):

dopamin, hisztamin, orexin, melanin koncentráció hormon tartalmú neuronokból hipotalamikusan bemenetet kapnak, míg az agytörzsből noradrenalin és 5HT-t tartalmazó rostok futnak ide (Nosedá és mtsai., 2014). Ez a bemenet szabályozza a talamokortikális kimenetek intenzitását: a dopamin, a magas koncentrációjú 5HT, a noradrenalin és az orexin facilitáló hatással, míg az alacsony 5HT szint és a melanin koncentráció hormon gátló hatással bír. Feltételezhető, hogy a relémagok működése befolyásolja, hogy a prodróma után kialakul-e migrénes fejfájás az adott egyénben, ill. tágabb értelemben azt, hogy a külső hatások összessége fejfájást okoz-e (Borsook és mtsai., 2012).

1.4.4. A migrén kezelési lehetőségei

A migrén terápiájának alapját a gyógyszeres kezelés jelenti, melyet roham esetében érdemes a lehető leghamarabb elkezdni (Steiner és mtsai., 2019). Az elsődlegesen választandó szerek a nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek (NSAID), melyek hatékonysága régóta bizonyított (Párdutz és mtsai., 2010). A rohamkezelésben kiemelkedően effektívnek bizonyultak a 5HT_{1B/D} receptor agonista triptánok (Cameron és mtsai., 2005), melyek blokkolják a trigeminális nociceptív transzmitterfelszabadulást, és kifejlésükben komoly szerepet játszott a 5HT szerepének kísérletes megismerése migrén során (Humphrey 2007). Szintén kecsesítő eredményekkel bírnak a frissebb kutatási eredmények alapján felfedezett 5HT_{1F} receptor agonista ditánok (Goadsby és mtsai., 2019) és a CGRP receptor antagonisták gepantok (Dodick és mtsai., 2019).

Mivel visszatérő rohamokkal jár, a migrén kezelésében kulcsfontosságú az olyan gyógyszerek alkalmazása, melyek a rosszullétek kialakulásának valószínűségét csökkentik. Az úgynevezett profilaxis szerek közül kiemelendők a β -blokkolók (Tfelt-Hansen 1986), antiepileptikumok, mint pl. a valproát és topiramát, a Ca⁺⁺ csatorna blokkoló flunarizine, valamint egyes triciklusos és szelektív szerotonin és noradrenalin visszavétel gátló típusú antidepresszánsok (Evers és mtsai., 2009). A β -blokkolók hatása feltehetőleg több támadásponton valósul meg, modulálják a PAG és a LC tüzelési frekvenciáját és csökkentik a centrális trigeminális magok facilitációját és a nitrogén-oxid szintáz (NOS) működését. A valproát és a topiramát a feszültségfüggő kationcsatornák blokkolása mellett a CGRP expressziójának, ill. felszabadulásának csökkentésén keresztül hatnak. Szintén Ca⁺⁺ csatorna blokkolás és a hiperexcitabilitás normalizálása révén működik a flunarizine, az antidepresszánsok pedig a csökkent 5HT és noradrenalin visszavétel kapcsán redukálják a fájdalomérzetet (Sprenger és mtsai., 2018). Az alap- és klinikai kutatásban is sokszor szereplő CGRP biológiai terápiával történő blokkolása adhatja a migrén legújabb megelőző kezelési módját (Charles és Pozo-Rosich 2019). Összességében elmondható, hogy a migrén farmakoterápiájának kifejlésében kiemelt szerepe van a trigeminális aktivációs mechanizmus tudományos feltérképezésének és vizsgálatának.

1.5. Szenzitizációs folyamatok migrénben és primer fejfájásokban

A fájdalomérző rendszer szenzitizációs jelenségei alapvető fontossággal bírnak a migrénesekben, és mind a perifériás, mind a központi idegrendszerben előfordulhatnak. Az előbbi során gyulladáscsökkentő mediátorok jelennek meg a trigeminális nociceptorok perifériás végződéseinek környezetében, melyek lokálisan hatva fokozzák a környéki fájdalomérző rostok érzékenységét. A migrénes roham során ez legmarkánsabban a lüktető fejfájásban nyilvánul meg, mikor a pulzushullám okozta intrakraniális nyomásváltozást éli meg a beteg ilyenformán (Strassman és mtsai., 1996). A jelenség a központi idegrendszerben is végbe mehet, mind a másodlagos, mind a harmadlagos trigeminális fájdalomérző neuronok területén (Burstin és mtsai., 2000b), melynek legfontosabb tünete a rohamok alatt több mint 50%-ban jelentkező allodynia, mikor a páciensek a nem fájdalmas ingereket fájdalmasnak tapasztalják

(Mathew 2004). Az allodynia ronthatja a migrénes roham kezelésének sikerességét (Burstein és mtsai., 2005), és a fejfájás akut kezelését a lehető leghamarabb javasolt elkezdni (Schürks és mtsai., 2008).

A szenzitizáció kialakulását a migrénes roham alatt jelenleg a következőképp képzeljük el: a fejfájás során aktiválódnak a nociceptív trigeminális afferensek (Moskowitz 1984), melynek hatására több folyamat is elindul. Egyrészt működésbe lép a trigeminotalamikus és a talamokortikális pályarendszer, mely felelős a fájdalom tudatossá válásáért. Ezzel párhuzamosan az elsődleges trigeminális afferensek kollaterálisaiából az axonreflex révén gyulladáshoz vezető mediátorok szabadulnak fel, ezek közül kiemelendő a CGRP, melynek koncentrációja meg is emelkedik a jugularis véna vérében a rohamok alatt (Goadsby és mtsai., 1990). Mivel a CGRP képes erősíteni a befelé irányuló Na^+ áramot az elsődleges érző struktúrákban (Natura és mtsai., 2005), feltételezhető, hogy a migrénesekben felszabadulva folyamatosan aktiválja az A δ rostokat, illetve a szatellita gliasejteket (Haanes és Edvinsson 2019). Harmadrészt a felsőbb areák (hipotalamusz, limbikus rendszer, cortex) képesek fokozni a NSS működését, mely paraszimpatikus efferensek révén további vazodilatáló peptidok felszabadulását váltja ki a dura területén (Burstein és Jakubowski 2005), azaz a roham alatt tovább erősödik a durális perivaszkuláris steril gyulladás, mely a perifériás szenzitizáció kiemelt tényezője (Malick és Burstein 2000). Ez a jelenség okolható a migrénes fejfájás lüktető jellegéért, mikor az intrakraniális erek pulzációja és a fej mozdítása hozzájárul a fájdalomérzet ingadozásához. A perifériás trigeminális nociceptorok így kialakuló folyamatos aktivitása plasztikus változásokat okozhat a másodlagos és a harmadlagos érző neuronok területén, melyek érzékenységi küszöbe lecsökken, és kifejlődik a centrális szenzitizáció. A jelenséget elsősorban a felszabaduló glutamát (Vikelis és mtsai., 2007) közvetíti, de feltehetőleg a PAG-ból eredő leszálló fájdalomcsillapító rendszerek funkciózavarára is szerepet játszik a kialakulásában (Schwedt és mtsai., 2014). A centrális szenzitizáció legmarkánsabb klinikai tünete az allodynia kialakulása, mikor a nem fájdalmas ingerek is fájdalmas érzetet okoznak. A szenzitizációs folyamat időbeli lefolyása jellegzetes, a perifériás szenzitizációt követi a másodlagos, majd a harmadlagos érző neuronok szenzitizációja. Az előbbinél a trigeminális területen jelentkezik allodynia, míg az utóbbinál extracephalicus megjelenésre is számítani lehet. (Burstein és mtsai., 2000b). Ezen jelenségek vizsgálhatóak is a migrénes roham során, ilyenkor a nociceptív pislogási reflex R2 válaszához alatti területe megnő a fájdalmas oldalon (Kaube és mtsai., 2002), ill. másfajta stimulációval is megemelkedik a vertex feletti N2a-P2 komplex amplitúdója (de Tommaso és mtsai., 2002). Ezen eredmények a szenzitizációs folyamatok elektrofiziológiai megfeleltetései lehetnek, és a cerebrális fájdalommatrix plasztikus változásaira utalhatnak.

Tenziós fejfájásban, elsősorban annak a krónikus formájában szintén kimutatható volt a szenzitizációs jelenség a nociceptív reflexek vizsgálatkor (Sand és Zwart 1994, Milanov és Bogdanova 2003). Míg a nyomási fájdalomküszöb epizodikus tenziós fejfájásban változatlan maradt (Göbel és mtsai., 1992), krónikus tenziós fejfájásban ennek csökkenését írták le elsősorban a temporális izomzat területén (Ashina és mtsai., 2005). Összességében feltételezhető, hogy a fájdalomérzékenység emelkedése az egész fájdalommatrixra kiterjed krónikus tenziós fejfájás esetén.

Cluster fejfájásban a rohamperiódus alatt, az érintett oldalon szenzitizációra utaló eltéréseket találtak a pislogási reflexet vizsgálva (Lozza és mtsai., 1997), melyet a naloxon adása kivédett, azaz a folyamat a csökkent leszálló opiáterg gátlással magyarázható. Ezt a jelenséget funkcionális képpalkotó vizsgálatokkal is sikerült alátámasztani (Sprenger és mtsai., 2006). Emellett feltételezik a hipotalamo-trigeminális kontroll funkciózavarát is (Malick és mtsai., 2000). Egy vizsgálat a corneareflex kiváltásához szükséges küszöb csökkenését mutatta a fejfájás oldalán rohamperiódus alatt, mely interiktálisan normalizálódott (Sandrini és mtsai., 1991). Cluster fejfájásban nem sikerült igazolni, hogy a szenzitizációs folyamatok kortikális szinten is jelen lennének, mivel nem találtak változásokat a habituációban a kiváltott válasz vizsgálatokban (Evers és mtsai., 1997), de ettől függetlenül a jelenségnek itt is fontos szerepe lehet.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink célja az volt, hogy a migrén több állatkísérletes modelljében feltérképezzük a trigeminális aktiváció és szenzitizáció folyamatát különféle markerek segítségével. Ezt követően vizsgálni kívántuk egyes, különböző támadáspontú molekulák ezekre gyakorolt modulációs hatását, hogy ezáltal betekintést nyerjünk 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. 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. A Szumatriptán hatása a NTG modellben.
- 2.5.3. A 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 AEA moduláló hatása patkányban szisztémás NTG adása után.

3. A MIGRÉN ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLEINEK VIZSGÁLATA

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 (lúktető 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 hatását. A fentiek miatt különösen fontos az aktivációs és szenzitizációs folyamatokban részt vevő molekulák vizsgálata az állatkísérletes modellekben.

3.1. A NTG adása, mint a migrén modellje

A nitroglicerín (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 az a kezdetektől fogva ismert jelenség, hogy sokszor gyorsan kifejlődő fejfájást okoz a pácienseknél. Ez a panasz percekben belül kialakul, kétoldali, lúktető lehet, de egyéb más migrénes jellegzetességet nem mutat, az erősség maximumát rövid idő alatt eléri és gyorsan elmúlik a gyógyszer adása után (Iversen és mtsai., 1989). Ezen azonnali fejfájás hátterében a NTG direkt értágító hatása állhat (Abrams 1985), melyet a molekulából felszabaduló NO fejt ki, megemelve a receptora, a szolubilis guanilát cikláz aktivitását. A képződő cGMP az érfal elernyedését váltja ki és akadályozza a vérlemezkék adhézióját (Loscalzo 1992).

Függetlenül a NTG beadási módjától, a gyorsan kialakuló fájdalom után órákkal erős, aura nélküli migrénre jellemző fejfájás kizárólag a migrénben szenvedő betegeknél jelentkezik, melynek időtartama jóval hosszabb az azonnali fejfájásénál (Sicuteri és mtsai., 1987, Sances és mtsai., 2004). Emiatt vetődött fel a NTG alkalmazása, mint több szempontból érdekes és ígéretes migrén modell. Egyrészt a NTG okozta késleltetett fejfájás a migrénesek 50-80%-ban kiváltható (Sances és mtsai., 2004), és ezen alanyok döntő többségében a provokált fejfájás megfelel az aura nélküli migrénes fejfájás IHS kritériumainak (Thomsen és mtsai., 1994). Másrészt ezekben az esetekben a migrénhez hasonlóan a fájdalomérző rendszer spinális facilitációja is megfigyelhető (Perrotta és mtsai., 2011). Harmadrészt ezen fejfájások egy része jól kezelhető a migrénben is hatékony triptánokkal (Juhász és mtsai., 2005) és megelőzhető valproát folyamatos adásával (Tvedskov és mtsai., 2004a). Emellett az ilyen rohamok kapcsán előfordulhat allodynia (Akerman és mtsai., 2019), továbbá a migrén patomechanizmusában fontos szerepet játszó agytörzsi magok aktivációit is kimutatták (Bahra és mtsai., 2001, Afridi és mtsai., 2005). Habár a fenti tényezők miatt a modell nagyon hasznosnak tűnik, ugyanakkor korlátai is vannak. A NTG nem képes aurát provokálni (Christiansen és mtsai., 1999), és a ritka, familiáris hemiplégiás migrénben szenvedő pácienseknél nem hoz létre migrénes fejfájást (Hansen és mtsai., 2008).

A NTG farmakológiai hatásait a NO felszabadulása révén fejt ki, mely egyrészt a NTG és tiol reakciójaként keletkező NO S-nitrozotiolból származik (Ignarro és mtsai., 1981), melyet a glutathion reduktáz és glutathion-S-transzferáz katalizál, miközben a NTG-ből 1,3-dinitroglicerát keletkezik (Ji és Bennett 2006). Ezzel párhuzamosan a mitokondriális aldehid dehidrogenáz 2-es (ALD2) révén 1,2-dinitroglicerín és nitrit is képződhet (Budás és mtsai., 2009), mely utóbbi tovább redukálódhat NO-dá, de ennek pontos folyamata nem ismert. Esetlegesen felmerül a mitokondriális III-as és IV-es komplex

szerepe is (Kozlov és mtsai., 1999), de más kutatási eredmények ezt nem támogatják (Kollau és mtsai., 2005).

Az ALD2 útvonal kiemelt szerepet játszhat a NO okozta vazodilatációban (Chen és mtsai., 2002), de kérdéses, hogy a NTG okozta allodynia mennyiben köthető ehhez az enzimrendszerhez. Sajnos kevés irodalmi adat áll rendelkezésre az ALD2 független NO donorok hatásáról fejfájásban (Guo és mtsai., 2013).

A NTG idegszövetben zajló metabolizmusa pontosan nem tisztázott, de a neuronokban és gliasejtekben mind a tiolok, ill. a glutation-S-transzferáz és a citokróm P450 enzimcsalád is jelen vannak. Ez azt jelentheti, hogy lehetséges a NTG NO-dá alakulása az agyszövetben is, amit kísérletes eredmények is alátámasztanak (Marks és mtsai., 1994). Állatkísérletes eredmények alapján a NTG fejfájással kapcsolatos hatását vélhetően a NO révén fejti ki, melyben szerepet játszik a guanilat cikláz és a cGMP (Ben Aissa és mtsai., 2018, Tassorelli és mtsai., 2004). Ez párhuzamba állítható azon megfigyelésekkel, melyek szerint a foszfodiészteráz 5-t gátló sildenafil migrént provokálhat (Kruuse és mtsai., 2003), és magasabb cGMP szinteket találtak a migrénes roham alatti páciensek szérumában (Stepien és Chalimoniuk 1998).

Humán vizsgálatok

Több kísérlet alátámasztotta, hogy a NTG adása másfajta tüneteket okoz egészséges önkéntesekben és migrénesekben. Egészségeseknek adva a NTG (max. 0,5 mg/kg/min dózisban adva 10-20 percen át) azonnali tompa fejfájást okoz, mely az infúzió leállításával gyorsan elmúlik (Iversen 1995). Migréneseknél ez az azonnali fejfájás kifejezettebb és a betegek nagy része órákkal később a saját migrénes rohamához hasonló fejfájást tapasztal, melyet aurajelenség nem kísér (Thomsen és Olesen 1997, Christiansen és mtsai., 2000). Érdekes módon egészségeseknél is kialakulhat késleltetett fejfájás NTG adása után, ha előzőleg fájdalmas mechanikai, ill. kémiai ingerlés érte őket a kraniofaciális területen (Gazerani és mtsai., 2019). A legtöbb migrénes beteg a fájdalom mellett a migrén egyéb kísérőtüneteit is mutatja az aurajelenséget leszámítva, mely ritka ilyen esetben (Sances és mtsai., 2004). A szumatriptán adása csillapítja a NTG okozta fejfájást (Iversen és Olesen 1996), és ennek a kezelésnek a hatékonysága korrelációt mutat a migrénes páciens plazmájában lévő CGRP csökkenésével (Juhász és mtsai., 2005). Valproáttal sikerült a NTG okozta migrént csillapítani (Thomaidés és mtsai., 2008) és megelőzni (Tvedskov és mtsai., 2004a), míg a propranolol nem volt hatékony ezen a téren (Tvedskov és mtsai., 2004b).

A NTG okozta agyi értágulat a migrénesekben kifejezettebb az egészséges kontrollokhoz viszonyítva (Thomsen és mtsai., 1993), melyet fokozottabb nitrát mediálta dilatációval lehet magyarázni (Yetkin és mtsai., 2007), és a NTG okozta roham alatt a cerebrális erekben áramló vér sebességének csökkenését triptánok adásával ellensúlyozni lehet (Thomaidés és mtsai., 2003). Pozitron emissziós tomográfias vizsgálatokkal hasonlóságot mutattak ki a NTG okozta és a spontán migrénes roham alatt lezajló regionális agyi keringés kapcsán, mely elsősorban csökkent occipitális területi vérátáramlásként mutatkozott (Bednarczyk és mtsai., 2002). A NTG okozta roham során az agytörzs aktiválódását is kimutatták (Afridi és mtsai., 2005, Bahra és mtsai., 2001), mely hasonlított a spontán migrénes roham kapcsán jelentkező változásokra (Weiller és mtsai., 1995), ráadásul prodróma szerű tünetek is kialakulhatnak (Afridi és mtsai., 2004), melynek hátterében hipotalamikus aktivációt feltételeznek (Maniyar és mtsai., 2014). Neurofiziológiai vizsgálatok alapján kimondható, hogy a NTG adása a spontán migrénes rohamhoz hasonlóan változtatja meg a trigeminális nociceptív reflexet és a kortikális kiváltott válaszokat (Di Clemente és mtsai., 2009), mely változások összességében a fájdalomérzés facilitációját okozzák migrénesekben (de Tommaso és mtsai., 2004, Perrotta és mtsai., 2011).

Ezek az adatok azt mutatják, hogy nagy átfedés van a spontán migrénes rohamok és a migrénesekben NTG okozta rohamok kórélettana és klinikuma között, mely ideális modellé teszi a NTG adását az elsődleges fejfájások modellezésében.

Állatkísérletek

A NTG-vel kapcsolatos humán vizsgálatok eredményei felvetették a lehetőségét annak, hogy kísérleti állatoknak NTG-t adva a migrénnek megfeleltethető eltérések jelentkezhetnek (Tassorelli és Joseph 1995, Tassorelli és mtsai., 1999), így a módszer elfogadott és széles körben alkalmazott állatkísérletes migrén modell lett, melyet elsősorban rágcsálók (patkány, egér) 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. Az ennél alacsonyabb dózis kisebb hatékonyságot mutathat (Tassorelli és mtsai., 2005a, Akerman és mtsai., 2019), míg a magasabb adag alkalmazása nem tűnik előnyösebbnek (Göloncsér és Sperlagh 2014). Érdekes módon ez a dózis sokszorosa a humán alkalmazásban megszokottnál, melynek az lehet a magyarázata, hogy a NTG átalakulása aktív metabolittá sokkal lassabban megy végbe a rágcsálók májában az emberhez viszonyítva (Sokolowska és mtsai., 2004).

A NTG-nek markáns érrendszeri hatása van, mely befolyásolja az agyi keringési paramétereket a kísérleti állatokban is. A durát övező erekben egy átmeneti vérátáramlás csökkenés után, hosszantartó, akár óráig jelentkező, növekedés detektálható, mellyel párhuzamosan a kortikális vérátáramlás is emelkedik (Greco és mtsai., 2011). A kezdeti perfúziócsökkenést a dura területén magyarázhatja a NTG szisztémás vérnyomáscsökkentő hatása, amivel szemben a cortex a bonyolult autoregulációs mechanizmusok révén védettebb. Az elhúzódóan jelentkező perfúzióemelkedést mind a dura mind a cortex tekintetében elsősorban indirekt folyamatnak tartják, melyben másodlagos szabályozó mechanizmusok, többek között az újonnan szintetizálódó NO is szerepet játszhat (Greco és mtsai., 2011), de felvetődik a megemelkedett neuronális aktivitás lehetősége is ebben a tekintetben.

A NTG egyetlen ismert hatása, hogy NO-t szabadít fel, de nem ismert pontosan, hogy a NO milyen módon tudja a késleltetett fejfájásos rohamot kiváltani. Ez akár a perifériás, akár a központi idegrendszer területén is végbemehet. Állatkísérletekben a NTG szisztémás adása után a TNC másodlagos érző neuronjainak aktiválódását figyelték meg (Tassorelli és Joseph 1995), ahová a legtöbb nociceptív afferens fut (Goadsby és Hoskin 1997), mely jelzi a NTG trigeminális rendszert érintő hatását. Érdekes módon olyan KIR-i struktúrák területén is tapasztaltak aktivációt, melyeknél peptiderg és adrenerg neuronok találhatóak. A hatás időbeli lefutását vizsgálva kiderül, hogy legkorábban 60 perc elteltével jelentkezik neuronális aktiváció elsősorban azon agyi területeken, ahol a kardiovaszkuláris szabályozás zajlik, azonban a nociceptív és integratív agyi struktúrákban a neuronális aktiváció maximuma 4 óra elteltével jelentkezik (Tassorelli és mtsai., 1997). Ez a fajta késleltetett aktivitás nincs összhangban a plazma NTG rövid féléletidejével, viszont illeszthető a NTG későbbi agyi felhalmozódásához, és nem utolsósorban a szer humán hatásaihoz: rövid, azonnali, enyhe fejfájás, mely a perifériás vazodilatációhoz kötött, ill. migrénes betegeknek az órákkal később jelentkező késleltetett roham, mely centrális hatást feltételez. Ezt megerősíti az a megfigyelés, hogy NTG adását követően mind a migrénesekben, mind az állatokban kialakulnak olyan tünetek, melyek egyértelműen a KIR-hez köthetőek (Maniyar és mtsai., 2014, Markovics és mtsai., 2012).

A NTG adása markáns viselkedési változásokat okozhat kísérleti állatokban, melyek párhuzamba állíthatók a humán vizsgálatok eredményeivel: megnöveli a nociceptív viselkedési válaszokat különböző állatkísérletekben (orofaciális formalin modell, plantáris formalin modell, tail-flick teszt) (Tassorelli és mtsai., 2003a, 2006, Greco és mtsai., 2015), mely jelenségek késleltetve, 2-4 órás latenciával

jelentkeznek és migrénelenes gyógyszerekkel kivédhetőek (Bates és mtsai., 2010, Pradhan és mtsai., 2014). A migrénben gyakran jellemző allodynia is megjelenik ilyenkor (Bates és mtsai., 2010) és szintén reagál a szumatriptán kezelésre. Emellett a NTG-el kezelt állatoknál fokozott fénykerülést is kimutattak, mely ugyancsak a migrén egyik klasszikus tünetének tekinthető (Sufka és mtsai., 2016).

Összefoglalva a NTG szisztémás adása kiváló lehetőséget biztosít a migrén modellezésére és vizsgálatára mind humán, mind állatkísérletes munkákban, mivel a betegséggel szorosan párhuzamba állítható változásokat okoz az alanyokban.

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

(Párdutz és mtsai., 2000)

Háttér

A NO egy gáz állagú neurotranszmitter, mely könnyedén átjut a sejtmembránokon, és endogén szintézise L-argininből a 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 hiperalgézia 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 a NO kiemelt szerepére utal a nociceptív feldolgozás során (Wang és mtsai., 1999, Wu és mtsai., 2000).

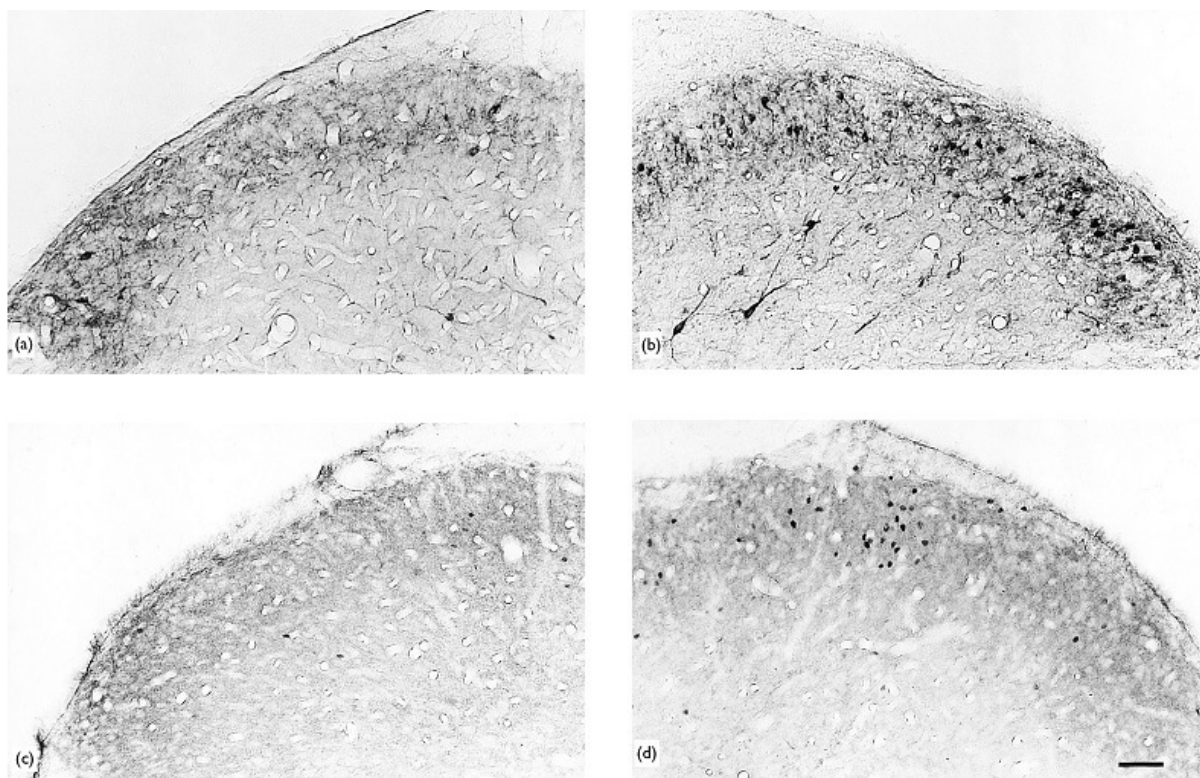
A nNOS megtalálható a durális hízósejtekben, a trigeminális idegvégződésekben (Berger és mtsai., 1994), a TG-ban (Zhang és mtsai., 1996) és a TNC területén is (Dohrn és mtsai., 1994). A NTG késleltetett migrénes rohamot kiváltó hatása arra utal, hogy a jelenség nem közvetlenül a NTG révén, hanem indirekt módon alakul ki. Ebben a folyamatban a NO perifériás és centrális hatása egyaránt lehetséges, melyben a nNOS szerepet kaphat.

Anyag és módszer

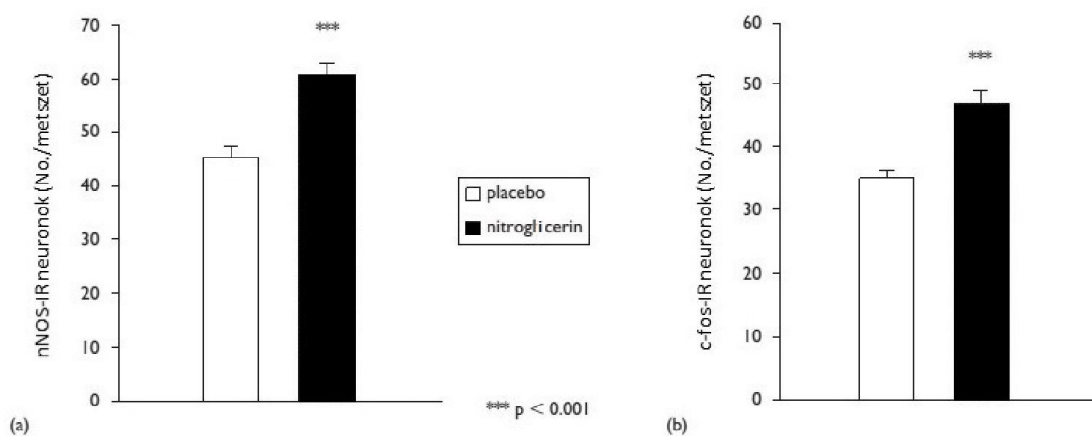
Felnőtt hím Wistar patkányok egyszeri s.c. NTG injekciót kaptak 10 mg/kg dózisban. Négy órával az injekciók adása után az állatokat perfundáltuk, a TNC-t és a Th1 gerincvelői szegmentumot eltávolítottuk nNOS és c-fos immunhisztokémiai (n=8 csoportonként) és nNOS Western blot (n=3 csoportonként) vizsgálatok céljából. A gerincvelői, egymástól 0,5 mm távolságra lévő sorozatmetszetek I-III rétegében látható nNOS- és c-fos-immunoreaktív (IR) sejteket megszámoltuk. Az nNOS esetében a citoplazmatikus, ill. dendritikus festődés esetén tekintettük pozitívnak a sejtet, míg a c-fos kapcsán egyértelmű magfestődés esetén. A TNC vizsgálatokor egy állatból 3 sorozatmetszetet számoltunk le és az értékeket átlagoltuk. A Th1 gerincvelői szakasznál egy állatból legalább 10 metszet adatainak átlagát vettük. A sejtszámok tekintetében nem volt különbség az adott gerincvelői szakasz különböző magasságai között. Minden kísérleti csoportban a normál eloszlást Kolgomorov teszttel igazoltuk, majd ezt követően kétmintás t-próbát alkalmaztunk a csoportok összehasonlítására. A Western blot eredmények optikai denzitásait kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze a csoportokban. Részletesebben lásd a 6.1.1., 6.3.1. és 6.3.2. fejezetekben.

Eredmények

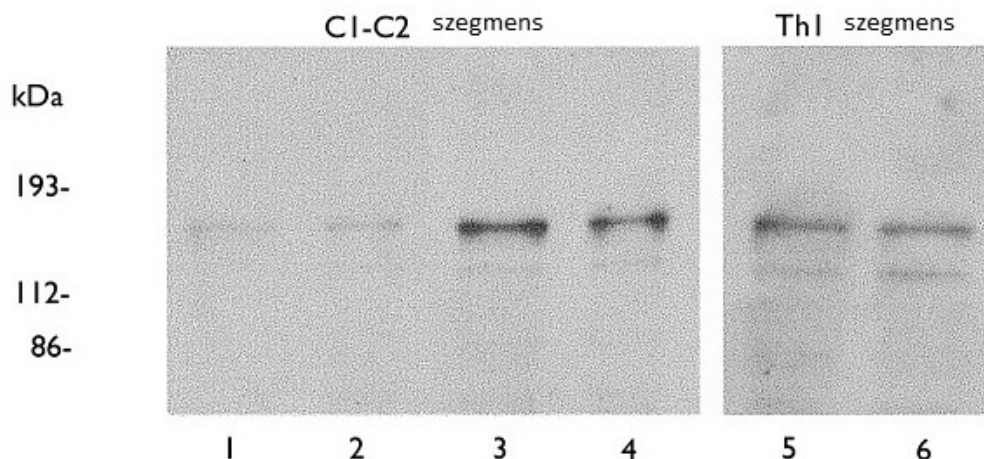
A TNC területén elvéve találtunk c-fos pozitív sejteket, viszont elég nagy számban észleltünk nNOS jelölődésű neuronokat (**1. ábra**). NTG hatására mindkét sejttípus száma szignifikánsan megemelkedett a TNC-ben (**2. ábra**). A torakális gerincvelő magasságában viszont nem észleltünk ilyen változást. A Western blot eredmények párhuzamba állíthatók az immunhisztokémiával. A 155 kDa-nál beazonosítható nNOS protein expressziója megemelkedett ugyanitt NTG adása után (**3. ábra**, relatív optikai denzitás kontroll: $103,7 \pm 2$, NTG-kezelt: $149,7 \pm 5,8$, $p < 0,01$), de nem változott a Th1 szegmentumban (kontroll: $107 \pm 4,3$, NTG-kezelt: $116,7 \pm 4,4$, n.sz.).



1. ábra. nNOS- (a, b) és c-fos- (c, d) IR sejtek a TNC transverzális metszetein. A sejtek száma megemelkedik NTG (10 mg/kg) adása után 4 órával (b, d) a placebohoz viszonyítva (a, c). **IR:** immunoreaktív, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag. Lépték: 50 μ m.



2. ábra. A NTG-vel kezelt patkányokban szignifikánsan megemelkedik a nNOS- (a) és a c-fos- (b) metszetenkénti átlagos IR sejtek száma a NTG kezelés hatására a placebohoz viszonyítva a TNC-ben (átlag + S.E.M, n=8). **IR:** immunoreaktív, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag.



3. ábra. nNOS Western blot patkány TNC-ből és a Th1 gerincvelői szegmentumokból. Az 1, 2 és 5 oszlopban placebo kezelés, míg a 3, 4 és 6 oszlopban NTG kezelés utáni állatok mintái láthatóak. S.c. NTG (10 mg/kg) kezelés után a nNOS szint (155 kDa) megemelkedik a C1-C2 szegmentumban, de a Th1 magasságában nem. **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag.

Megfigyeléseink jelentősége

Kísérleteink megmutatták, hogy a szisztémásan adott 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, és egybeesik azzal a területtel ahová a trigeminális nociceptív afferensek futnak. A NO és c-fos funkcionális kapcsolatát már igazolták a gerincvelő szintjén intradermalis kapszaicin (Wu és mtsai., 2000), ill. trigeminális s.c. formalin adása kapcsán (Leong és mtsai., 2000).

A TNC megemelkedett nNOS szintjének két oka lehet: csökkent felszabadulás, illetve fokozott szintézis. A jelenséggel párhuzamos, neuronális aktivitásra utaló c-fos emelkedés miatt elsősorban az utóbbi jön szóba magyarázatként.

A másodlagos trigeminális nociceptorok megemelkedett nNOS szintjét a NO háromféleképp okozhatja. Egyrésztől direkt hatást kifejtve ezekre a sejtekre, vagy a leszálló agytörzsi pályarendszerekre, illetve indirekt aktiváció kapcsán, melyet a NO a perifériás trigeminális A δ és C rostok révén alakít ki. Mivel a NTG nem okozott változást a nNOS szintjében a háti gerincvelő magasságában, ezáltal a direkt aktiváló hatás nem tűnik valószínűnek. Vannak kísérletes adatok, melyek szerint a NO lokálisan adva a PAG egyes neuronjait képes gátolni (Lovick és Key 1996), és ezáltal a leszálló pályák inhibíciója révén befolyásolhatja a trigeminális rendszer működését (Li és mtsai., 1996). Mégis 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 kísérleteinkben igazoltuk, hogy a formalin s.c. adása, mint szomatikus nociceptív stimulus képes hasonló változásokat létrehozni a trigeminális rendszerben (Párdutz és mtsai., 2000). Emellett kimutatták, 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 azt is, hogy a NOS inhibitor előzetes adása is hasonló moduláló hatással bír (Wu és mtsai., 2000).

Ezek az adatok kiemelt fontosságúak lehetnek a migrénes fájdalom megértésében. A TNC-ben megemelkedett nNOS magasabb helyi NO szintet eredményezhet, mely más neurotranszmitterek révén felelős lehet a c-fos emelkedéséért és a centrális szenzitizáció kialakulásáért. Ezen hatások szelektívnek tűnnek a trigeminális rendszerre, hisz nem észlelhetők a háti gerincvelői szintjén, azaz a trigeminális és perifériás nocicepció folyamatában különbségek lehetnek. Még nem tudni, hogy ezt a különbséget a preszinaptikusan eltérően elhelyezkedő receptorok okozzák, melyek pl. magyarázhatják a 5HT_{1B/D} agonista triptánok szelektív hatását a fejfájásokra (Buzzi és Moskowitz 1991), vagy egyéb tényezők kapcsán alakul ki. Mindenesetre 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 (Burststein és mtsai., 2000a).

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

(Párdutz és mtsai., 2002)

Háttér

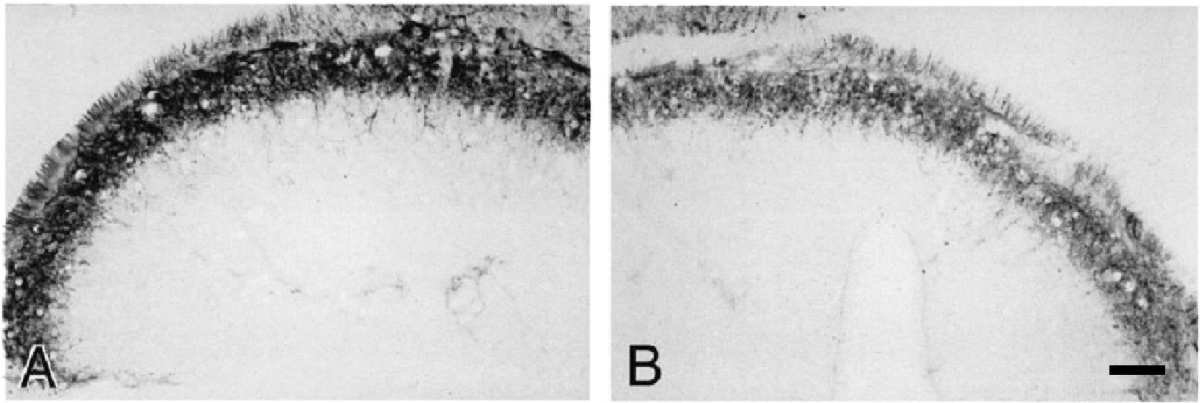
A CGRP kulcsfontosságú neurotranszmitter a fájdalomérzés folyamatában, mely NO közvetítése révén is felszabadulhat a terminálisokból (Garry és mtsai., 2000) és koncentrációja megemelkedik a jugularis vénában migrénes roham kapcsán (Goadsby és mtsai., 1990). A migrén egyik állatkíséreltes modelljében, 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

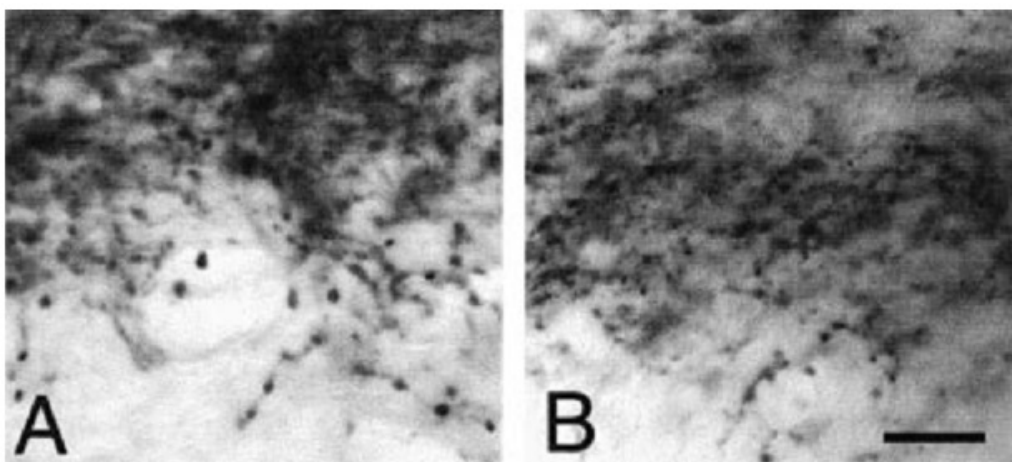
Felnőtt hím Wistar patkányok egyszeri s.c. NTG injekciót kaptak 10 mg/kg dózisban. Négy órával az injekciók adása után az állatokat perfundáltuk, a TNC-t és a Th1 gerincvelői szegmentumot eltávolítottuk CGRP immunhisztokémiai vizsgálatok céljából (n=8 csoportonként). A CGRP pozitív rostok által borított területet képanalizátorral határoztuk meg (Részletesebben lásd a metodika részben a 6.1.1., 6.3.1. és 6.3.4. fejezeteket). Minden állat mintáiból legalább 16 metszeten végeztünk mérést és az eredményt átlagoltuk. Nagyobb nagyítást alkalmazva vizsgáltuk a terminálisokban elhelyezkedő szinaptikus boutonok méretét is, itt legalább 450-500 boutonot mértünk le állatonként. Az adatokat varianciaanalízissel (ANOVA) vizsgáltuk, az egyedeken belüli szempont a gerincvelői lokalizáció, míg a független szempont pedig a kezelés volt, majd a páronkénti összehasonlításokor kétmintás t-próbát használtunk.

Eredmények

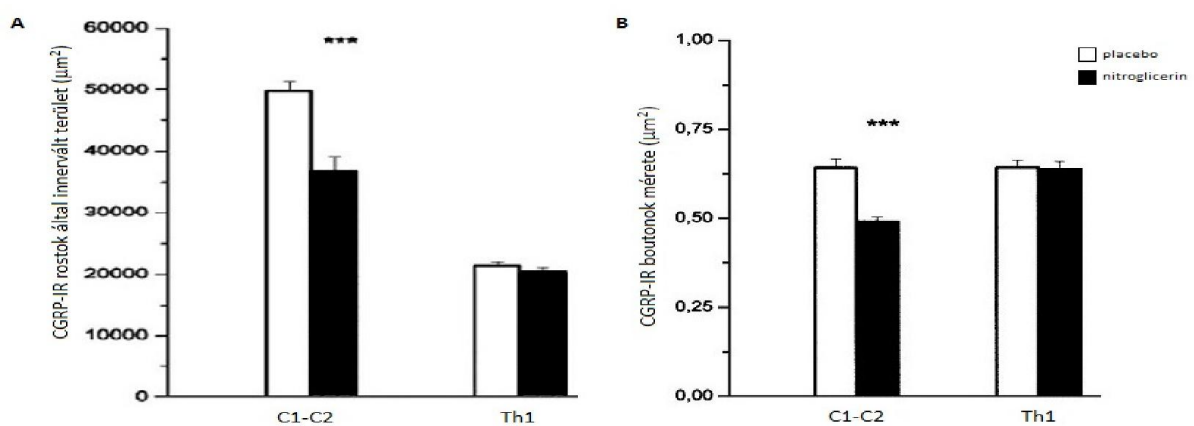
A TNC-ben és a Th1 gerincvelő hátsó szarvában gazdag CGRP pozitív rostfestődést figyeltünk meg. Az előbbiben a CGRP jelölődést mutató végződés által borított terület szignifikánsan kisebb volt 4 órával a NTG adása után (**4. ábra, 6. ábra**). A Th1 magasságában ez a különbség nem mutatkozott (**6. ábra**). A szinaptikus boutonok mérete szignifikánsan csökkent a NTG kezelés után a TNC területén, míg ez a paraméter sem mutatott változást a Th1 szinten (**5. ábra, 6. ábra**).



4. ábra. CGRP-immunoreaktivitás a TNC transzverzális metszetein. A NTG előkezelés (B) lecsökkenti a CGRP pozitív rostok mennyiségét a kontrollhoz képest (A) hím patkányokban. **CGRP**: kalcitonin génrelációs peptid, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag. Lépték: 50 μm .



5. ábra. A CGRP pozitív boutonok nagy nagyítású fénymikroszkópos képe a TNC-ben. A NTG kezelés után (B) a boutonok mérete kisebb a placebohoz viszonyítva (A). **CGRP**: kalcitonin génrelációs peptid, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag. Lépték: 10 μm .



6. ábra. (A) A TNC C1-C2, illetve Th1 gerincvelői szegmentum I-II rétegében megjelenő CGRP-IR rostok által fedett terület hím patkányokban 4 órával a placebo, illetve NTG adása után. A C1-C2 szegmentumban szignifikánsan csökkent a beidegzett terület NTG után, míg a Th1 területén ez nem változott. (B) A CGRP-IR boutonok mérete a TNC C1-C2 magasságában és Th1 gerincvelői szegmentumban. A NTG kezelés lecsökkenti a boutonok méretét a C1-C2 szegmentumban a placebohoz képest, míg ilyen különbség nincs a Th1 szakaszon ($n=8$, átlag + S.E.M, *** $p<0,001$). **CGRP**: kalcitonin génrelációs peptid, **IR**: immunoreaktív, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag.

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 patkány TNC-ben NTG adása után

(Párdutz és mtsai., 2002, Nagy-Grócz és mtsai., 2017)

Háttér

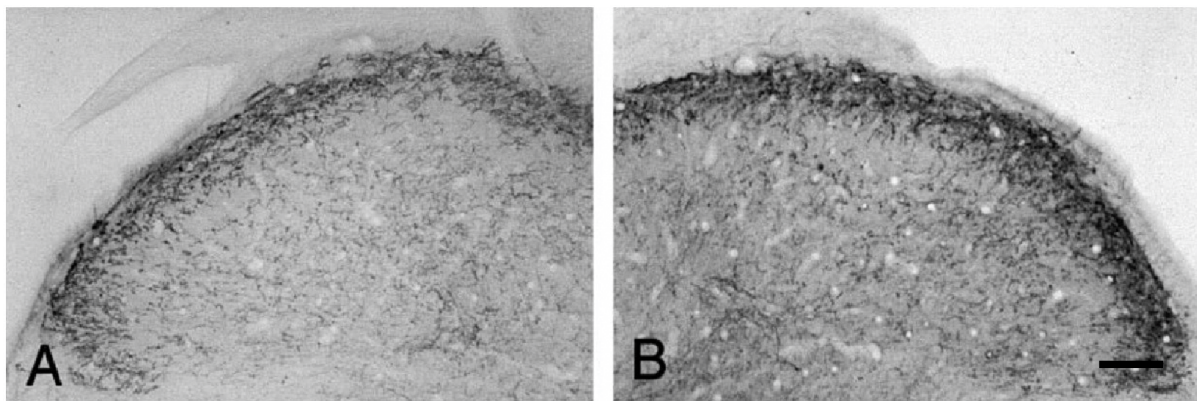
A szerotoninerg mechanizmusok alapvetőek mind a nocicepció szabályozásában (Roberts 1984, Fasmer és mtsai., 1985), mind a migrén patogenezisében (Sicuteri 1972, Ferrari és mtsai., 1989). Migrénes rohamok után a vizelet 5-hidroxi indolecetsav (5HIAA) tartalma megemelkedhet (Deanovic és mtsai., 1975), ill. és egyes vizsgálatok a roham alatt magasabb plazma 5HT és alacsony 5HIAA szintet találtak. A rohamok között ez visszajára fordult, alacsony plazma 5HT mellett megemelkedett az 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 vérlemezkék 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

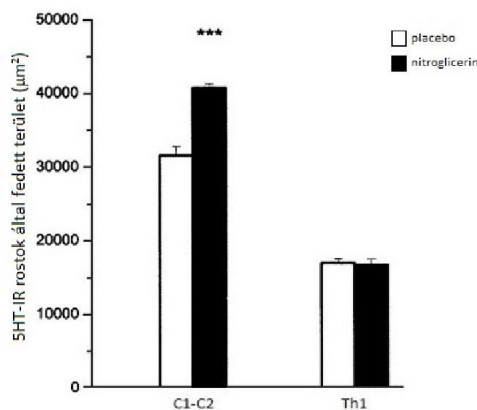
Felnőtt hím Wistar patkányok egyszeri s.c. NTG injekciót kaptak 10 mg/kg dózisban. Négy órával az injekciók adása után az állatokat perfundáltuk és a TNC-t eltávolítottuk 5HT és 5HTT immunhisztokémiai (n=8 csoportonként) és Western blot (n=6 csoportonként) vizsgálatok céljából. A 5HT esetében a Th1 gerincvelői mintákat is vizsgáltuk. Mindkét esetben a pozitív rostok által borított terület képanalizátorral elemeztük (Részletesebben lásd a metodika szekció 6.1.1., 6.3.1., 6.3.2. és 6.3.4. fejezeteiben). Minden állat mintáiból legalább 16 metszeten végeztünk mérést és az eredményt átlagoltuk. Nagyobb nagyítást alkalmazva analizáltuk a terminálisokban elhelyezkedő pozitív varikozitások méretét is, itt legalább 450-500 mérést végeztünk állatonként. Az adatok elemzését egyszempontos varianciaanalízissel végeztük, majd kétmintás t-próbát használtunk a páronkénti összehasonlításra.

Eredmények

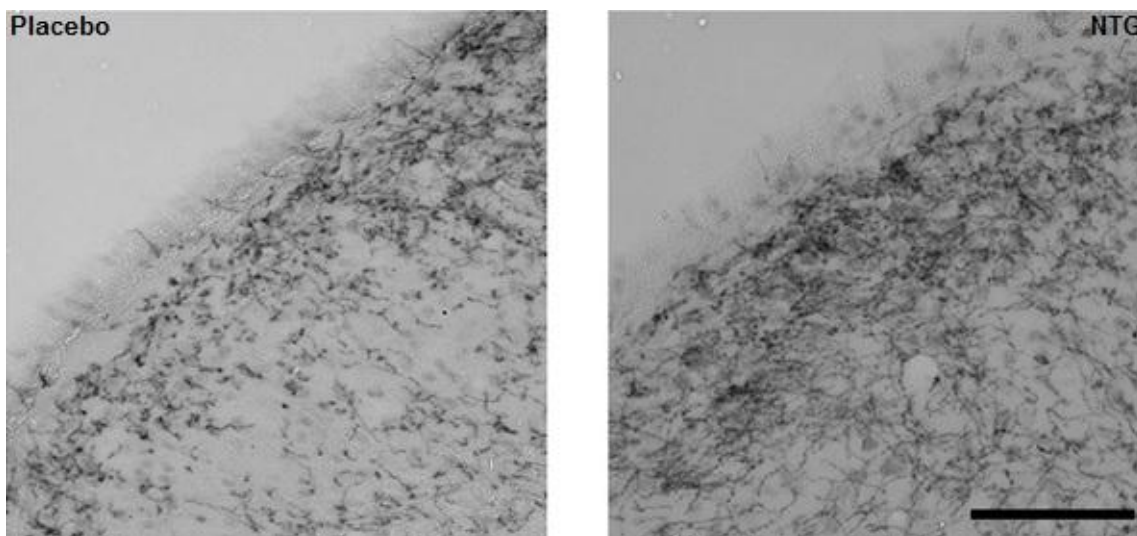
A TNC-ben jelentős mennyiségű 5HT és 5HTT pozitív rost észlelhető, melyek eloszlása - nem meglepően - nagyfokú hasonlóságot mutat. A TNC-ben mind a 5HT, mind a 5HTT jelölődést mutató végzések által borított terület szignifikánsan megemelkedett 4 órával a NTG adása után és a 5HTT pozitív varikozitások mérete is növekedett (**7-10. ábra**), míg a 5HT-IR boutonok mérete nem változott (nem tüntetjük fel). A Th1 magasságában a 5HT esetében nem okozott változást a NTG (**8. ábra**). A Western blot vizsgálatok szignifikáns 5HTT expresszió növekedést mutattak a TNC területén NTG adását követően (**11. ábra**).



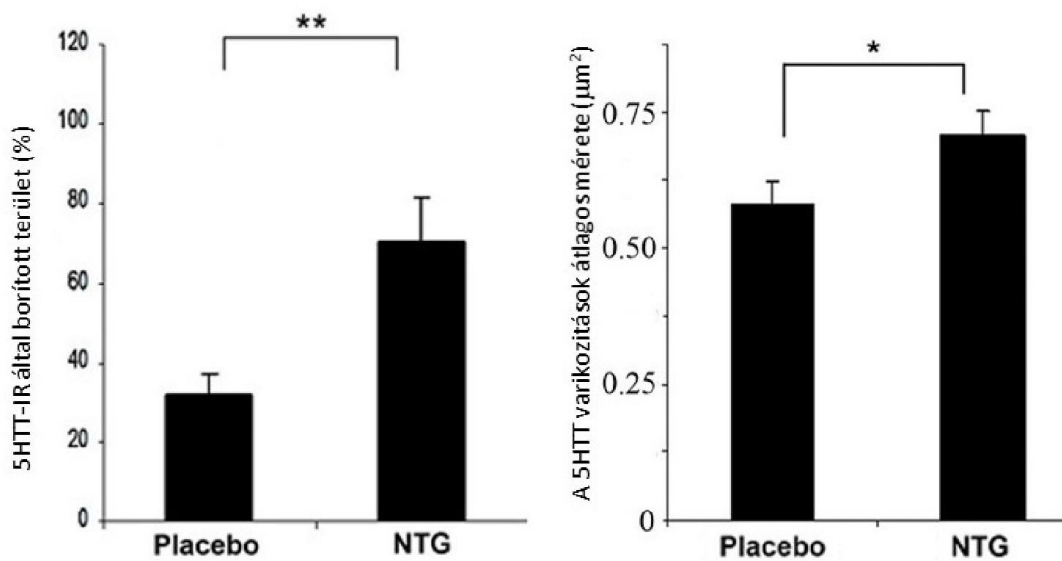
7. ábra. A 5HT-IR rostok a TNC transzverzális metszeteken felnőtt hím patkányokban. A NTG adása megemeli a 5HT megjelenését az I-II rétegben (B) a placebo kezelt állatokhoz képest (A). **5HT**: szerotonin, **IR**: immunoreaktív, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag. Lépték: 50 μ m.



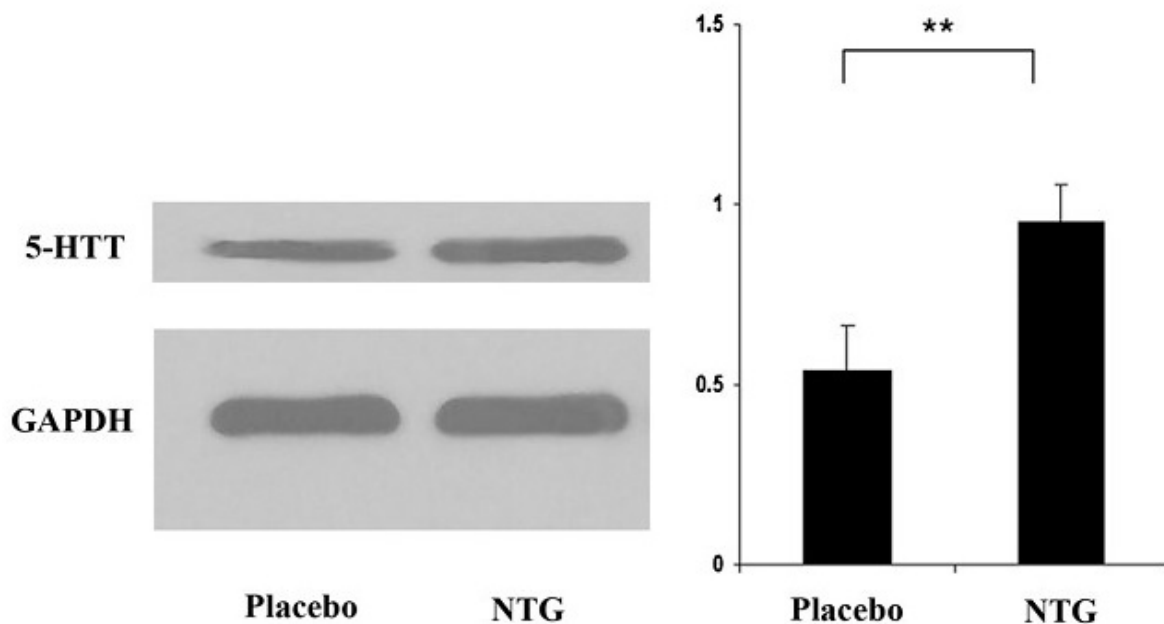
8. ábra. A TNC C1-C2, illetve Th1 gerincvelői szegmensum I-II rétegében megjelenő 5HT-IR rostok által fedett terület hím patkányokban 4 órával a placebo (világos oszlop), illetve NTG (sötét oszlop) adása után (átlag + S.E.M, n=8 csoportonként). A C1-C2 szegmensumban szignifikánsan emelkedik a beidegzett terület NTG után (***) $p < 0,001$), míg a Th1 területén ez nem változott. **5HT**: szerotonin, **IR**: immunoreaktív, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag.



9. ábra. A 5HTT-IR rostok a TNC transzverzális metszeteken felnőtt hím patkányokban. A NTG adása megemeli a 5HTT megjelenését a placebo kezelt állatokhoz képest. **5HTT**: szerotonin transzporter, **IR**: immunoreaktív, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag. Lépték: 50 μ m.



10. ábra. Hím patkányok TNC-jében a 5HTT-IR rostok által borított terület és a 5HTT varikozítások méretét ábrázoló hisztogram. A NTG kezelés mindkét értéket szignifikánsan megemelte a placebohoz viszonyítva (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként, * p<0,05, ** p<0,01). **5HTT**: szerotonin transzporter, **IR**: immunoreaktív, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag.



11. ábra. 5HTT Western blot a hím felnőtt patkányok TNC-jéből. A NTG kezelés szignifikánsan megemeli a 5HTT expresszióját a placeboval előkezelt állatokhoz képest (átlag + S.E.M, n=5 csoportonként, ** p<0,01). **5HTT**: szerotonin transzporter, **GAPDH**: glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag.

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 gerincvelő hátsó szarvában végződő szerotoninergerostok és nociceptív végződések komplex kapcsolatban állnak egymással. Többfajta 5HT receptor található itt (5HT_{1B}, 1D, 1F) (Castro és mtsai., 1997), melyeket ingerelve csökkenthető a nociceptív inger okozta c-fos expresszió (Hoskin és mtsai., 1996, Mitsikostas és Sanchez del Rio 2001). A 5HT₃ receptorok aktiválása viszont emeli a gyulladást követő spinális nocicepciót (Green és mtsai., 2000). A NTG kétféle módon befolyásolhatja a TNC 5HT tartalmát: lehetséges, hogy közvetlenül helyileg hatva modulálja a 5HT terminálisokat vagy indirekt módon befolyásolja a felsőbb szerotoninergerostokat. Formalin adása után megemelkedik a 5HT anyagcsere mind a gerincvelő megfelelő szegmentumában, mind a NRM területén (Puig és mtsai., 1992), ugyanakkor a karragenin okozta gyulladás is 5HT emelkedést okozott a gerincvelőben és a PAG-ban (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. 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 szerotoninergerost 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 CSD okozta 5HT depléciót részben NO mediált folyamatnak tartják (Saengjaroenham és mtsai., 2005).

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

(Párdutz és mtsai., 2006)

Háttér

A CamKII az idegrendszer teljes területén megtalálható és részt vesz az intracelluláris tér Ca⁺⁺ koncentrációjának szabályozásában (Hudmon és mtsai., 2002). Képes autofoszforylációra (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 NMDA receptorokhoz kötődve megemeli az NMDA és 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 expresszióját a megfelelő gerincvelői hátsó szarv területén (Fang és mtsai., 2002, Liang és mtsai., 2004), azaz vizsgálata releváns lehet a NTG modellben.

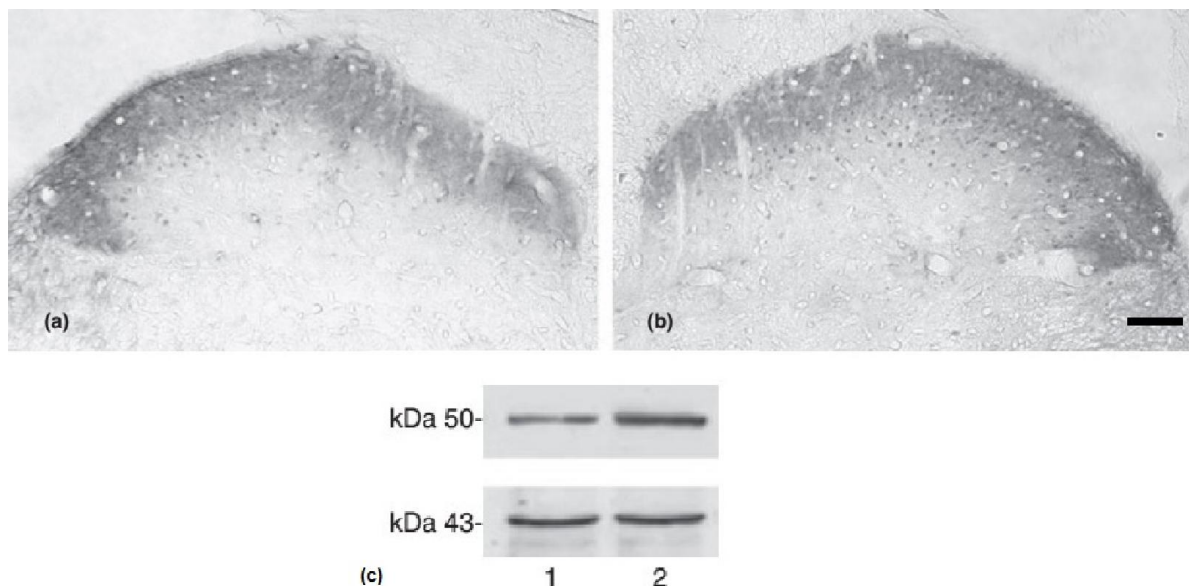
Anyag és módszer

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 Th1 gerincvelőt eltávolítottuk és CamKII immunhisztokémiai (n=6 csoportonként) és Western blot (n=4 csoportonként) vizsgálatokat végeztünk. A gerincvelői, egymástól 0,5 mm távolságra lévő sorozatmetszetek I-III rétegében látható nNOS és pozitív sejteket megszámoltuk. A számolás legalább 3 azonos magasságot képviselő metszeten történt és ezen eredményeket átlagoltuk, a blottok alapján protein expressziót mértünk. (Részletesebben a metodika fejezetben: 6.1.1., 6.3.1. és 6.3.2.)

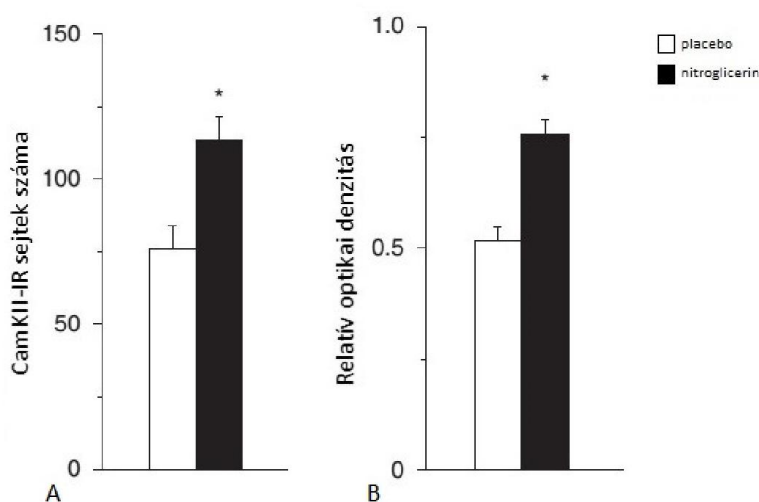
Az adatokat ANOVA-val vizsgáltuk, az egyedeken belüli szempont a gerincvelői lokalizáció, míg a független szempont pedig a kezelés volt, majd a páronkénti összehasonlítások kétmintás t-próbát használtunk Scheffe korrekcióval.

Eredmények

A TNC-ben jelentős mennyiségű CamKII pozitív sejt található. NTG adását követően szignifikánsan megemelkedett a festődést mutatott sejtek száma és a protein expresszió (12, 13. ábra). A Th1 szintjében nem volt változás ezekben a paraméterekben (ezen adatokat nem szerepeltetjük).



12. ábra. CamKII-immunoreaktivitás a TNC C1-C2 magasságában lévő transzverzális metszeteken felnőtt hím patkányokban. A NTG adása megemeli a CamKII pozitív sejtek számát (b) a placebo-kezelt állatokhoz képest (a). (c) CamKII (50 kDa) és β -aktin (43 kDa) Western blot a hím patkányok C1-C2 szegmentumából. A NTG adása (2) megemeli a CamKII expresszióját a kontrollhoz (1) képest. **CamKII**: kalmodulin-függő protein kináz II, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag. Lépték: 50 μ m.



13. ábra. CamKII-IR sejtek száma (A) és CamKII Western blot relatív optikai denzitás hím patkány TNC-ben. NTG kezelés után (sötét oszlop) mindkét érték szignifikánsan emelkedett a placebohoz képest (világos oszlop) (átlag + S.E.M, n=6, ill. 5, * p<0,05). **CamKII**: kalmodulin-függő protein kináz II, **IR**: immunoreaktív, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag.

Megfigyeléseink jelentősége

A NTG a c-fos és nNOS expresszióra gyakorolt hatáshoz 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 hatását (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). A formalin (Liang és mtsai., 2004) és kapszaicin (Fang és mtsai., 2002) topikális adása mellett a SP is megnöveli a gerincvelői CamKII aktivitását (Choi és mtsai., 2005). Fontos, hogy a fájdalomingerek kapcsán létrejövő CamKII emelkedést a migrénben is szerepet játszó peptiderg folyamatok közvetítik (Larsson és mtsai., 2006). 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 foszforilációja révén (Jung és mtsai., 2004). Sejttenyészetekben a CamKII képes a nNOS foszforiláció kereszttüli inaktiválására, ezért lehetséges, hogy a korábban észlelt NTG okozta nNOS aktivációt fékező mechanizmust látunk (Komeima és mtsai., 2000), de rágcsőkbán a CamKII többfajta adenilát cikláz is 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 patkány TNC-ben NTG adása után

(Nagy-Grócz és mtsai., 2015)

Háttér

A TRPV1 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).

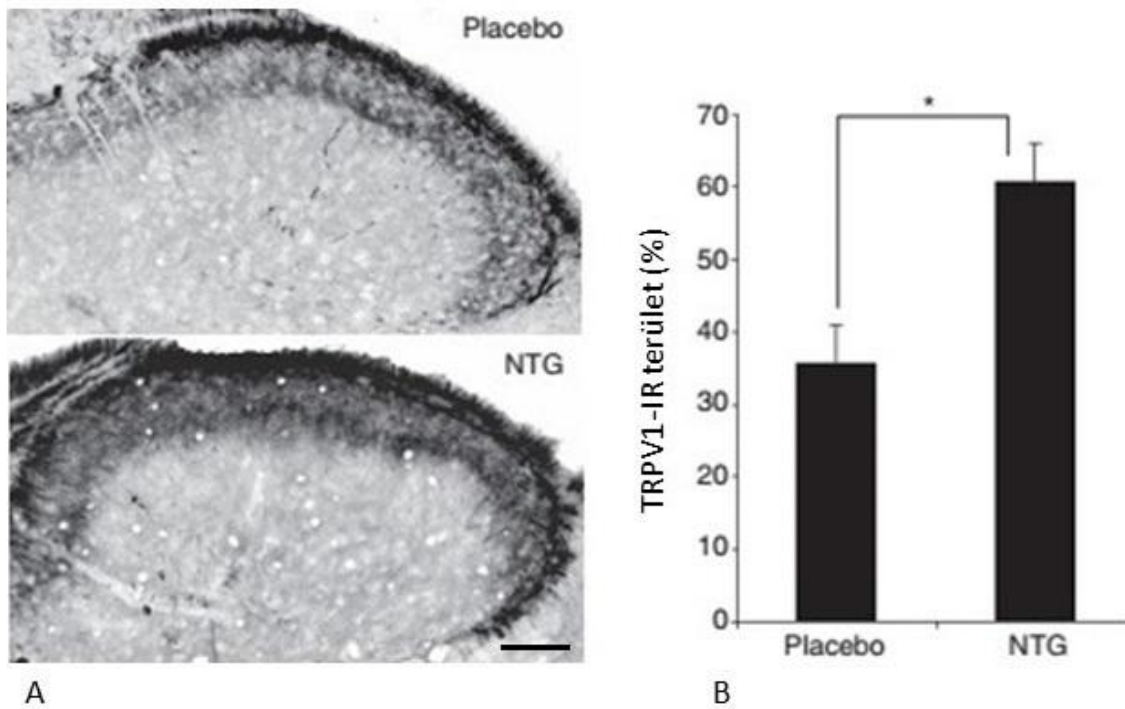
A nukleáris faktor kappa B (NFkB) - a minden állati sejtben kifejeződő, a DNS transzkripciót és a sejt túlélését szabályozó komplex molekula - komoly szereplő a gyulladásos folyamatok kialakulásában, mivel hatással van több citokin expressziójára, melyek igazoltan szerepet játszanak a fájdalom és a hiperalgédia kialakulásában (Kress és mtsai., 1996). A COX2 szintén megtalálható a gerincvelői hátsó szarv területén, részt vesz a nociceptív feldolgozásban (Beiche és mtsai., 1998, Mazarío és mtsai., 2001) és szintje megemelkedik a TNC területén az orofaciális fájdalominger alkalmazásakor (Gao és mtsai., 2010).

Anyag és módszer

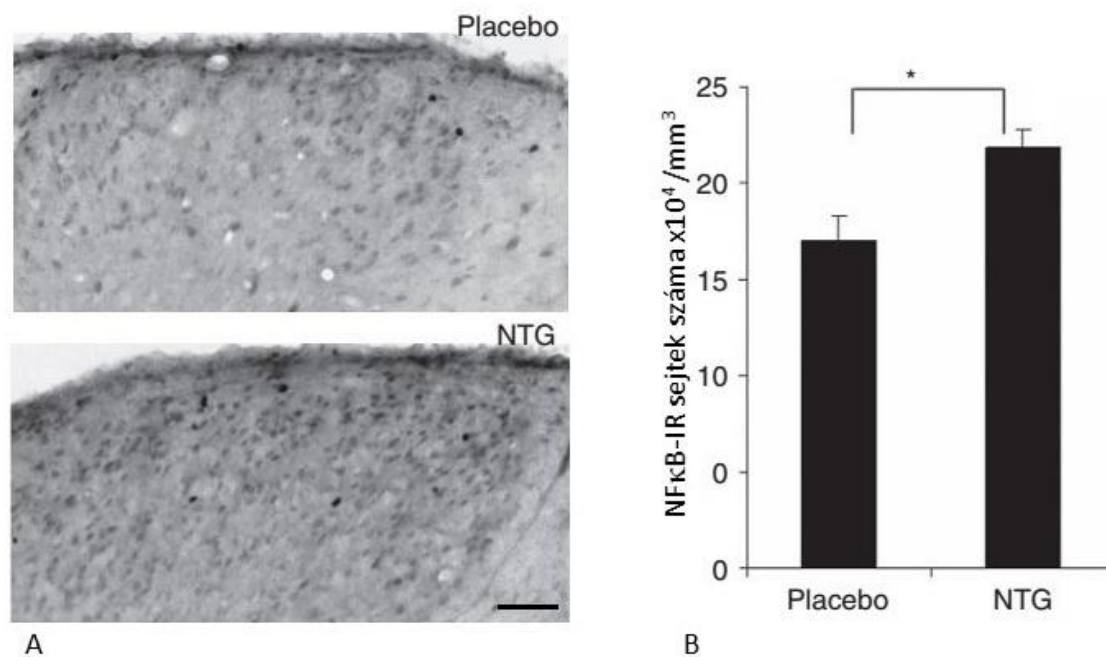
Felnőtt hím Wistar patkányok egyszeri s.c. NTG injekciót kaptak 10 mg/kg dózisban. 4 órával az injekciók adása után az állatokat perfundáltuk, a TNC-t eltávolítottuk, TRPV1 és NFkB immunhisztokémiai (n=6 csoportonként), valamint COX2 (n=5 csoportonként) Western blot vizsgálatokat végeztünk. A TRPV pozitív rostokat képanalizátorral vizsgáltuk, a NFkB festődést mutató sejteket megszámláltuk, ill. a blottok alapján protein expressziót mértünk. Az adatokat kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze. Pontosabban lásd a 6.1.1., 6.3.1., 6.3.2. és 6.3.4. fejezetben.

Eredmények

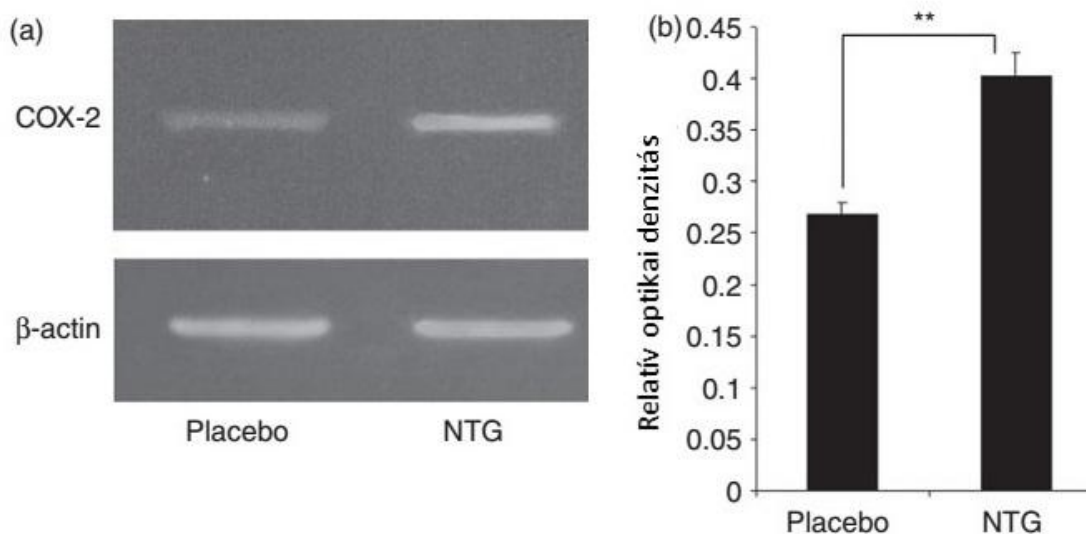
A NTG egyaránt megemelte a TRPV1, a COX2 és a NFkB expresszióját a TNC területén (**14-16. ábra**).



14. ábra. TRPV1-immunoreaktivitás a hím felnőtt patkány TNC transzverzális reprezentatív metszetén placebo és NTG kezelés után (A). A NTG kezelés szignifikánsan megnöveli itt a TRPV1-IR területet a placebohoz viszonyítva (B) (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként, * p<0,05). **IR:** immunoreaktív, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag, **TRPV1:** tranzien receptor potenciál vanilloid 1. Lépték: 100 μ m.



15. ábra. NFκB-immunoreaktivitás a hím felnőtt patkány TNC transzverzális reprezentatív metszetén placebo és NTG kezelés után (A). A NTG kezelés szignifikánsan megemeli a NFκB-IR sejtek számát a placebohoz viszonyítva (B) (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként, * p<0,05). **IR:** immunoreaktív, **NFκB:** nukleáris faktor kappa B, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag. Lépték: 50 μ m.



16. ábra. COX2 Western blot a hím patkány TNC-ből placebo és NTG kezelés után (a). Az NTG szignifikáns COX2 emelkedést okoz (b) a placebo kezelt állatokhoz képest (átlag + S.E.M, n=5, ** p<0,01). **COX2:** ciklooxygenáz-2, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag.

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 a receptor blokkolása (Kim és mtsai., 2014). Korábbról ismert, hogy a NO donorok képesek a TRPV1 expresszió megemelésére különböző sejt típusokban (Miyamoto és mtsai., 2009, Leonelli és mtsai., 2013), és a gyulladásos 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 BK 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 adása (Amaya és mtsai., 2003). A CGRP szisztémás adása is képes a TRPV1 expresszióját fokozni a patkány TG-ban, azaz a gyulladásos folyamatok mellett ez a direkt hatás is szerepet játszhat az észlelt változások létrejöttében (Chatchaisak és mtsai., 2013).

Eredményeink szerint a NO képes a NFκB szintjét is megemelni a TNC területén, melyhez hasonló hatást tudtak kimutatni korábban a durában is (Reuter és mtsai., 2002). A NFκB 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 NFκB funkcióját (Sappington és mtsai., 2008). Másrészt az is feltételezhető, hogy a megemelkedett nNOS fokozza a NFκB aktivitását (Parohova és mtsai., 2009). Ezek alapján a NFκB fontos eleme a NTG okozta trigeminális aktiváció és szenzitizáció folyamatának.

A vizsgálatainkban észlelt NTG okozta COX2 emelkedés létrejöhet a NFκB 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 az NSAID-ok, melyek hatását 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 kezelés után a hipotalamusz és az agytörzs területén (Tassorelli és mtsai., 2007).

3.1.6. A kinurenin útvonal a fejfájás NTG modelljében

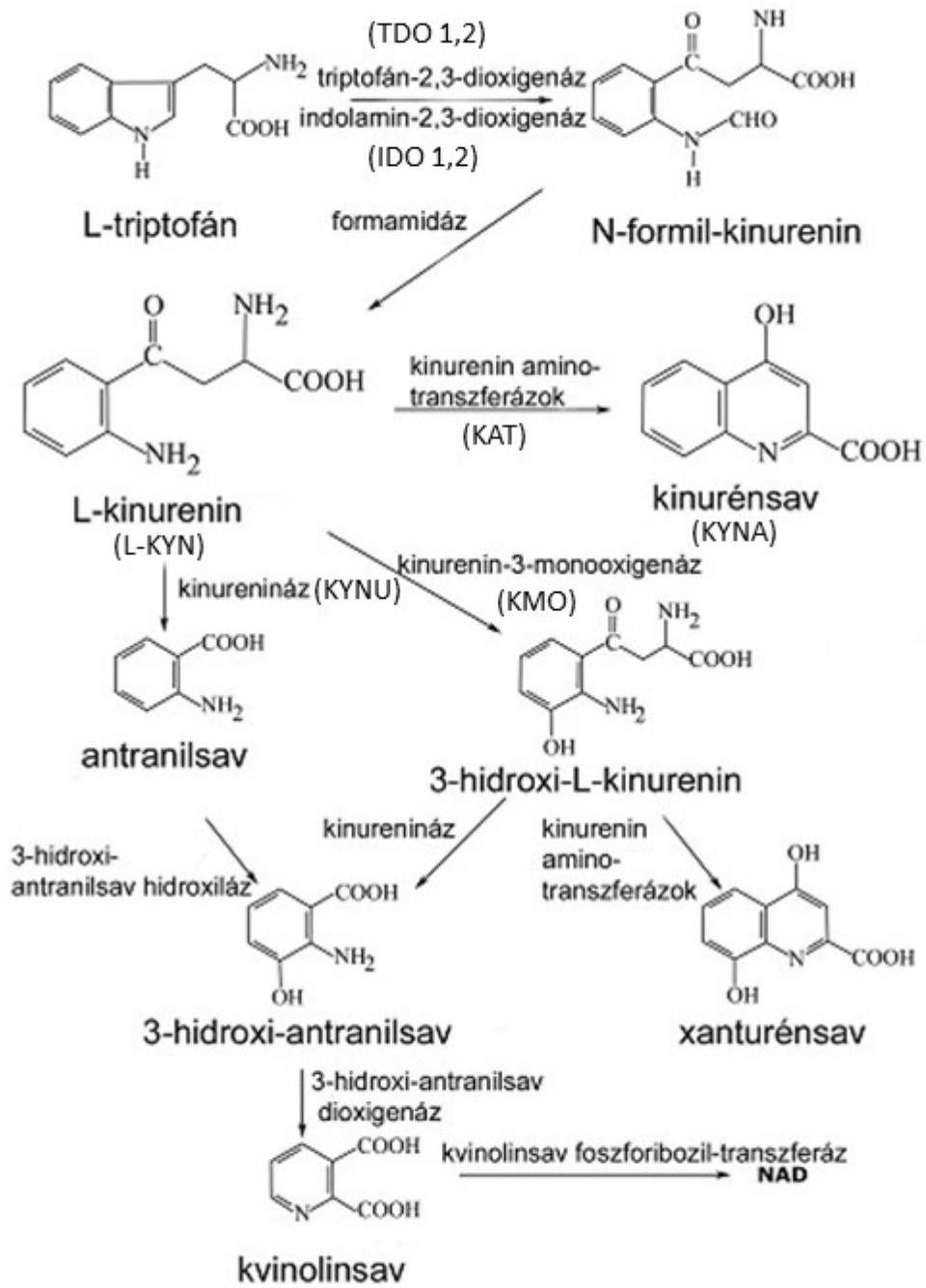
(Nagy-Grócz és mtsai., 2017)

Háttér

Az érző és nociceptív rendszerek szenzitizációs folyamataiban alapvető szerepet tulajdonítanak a glutamátnak és receptorainak, különösen az NMDA receptoroknak (Woolf és Salter 2000). A kinurénsav (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 hatása 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) (**17. ábra**).

Anyag és módszer

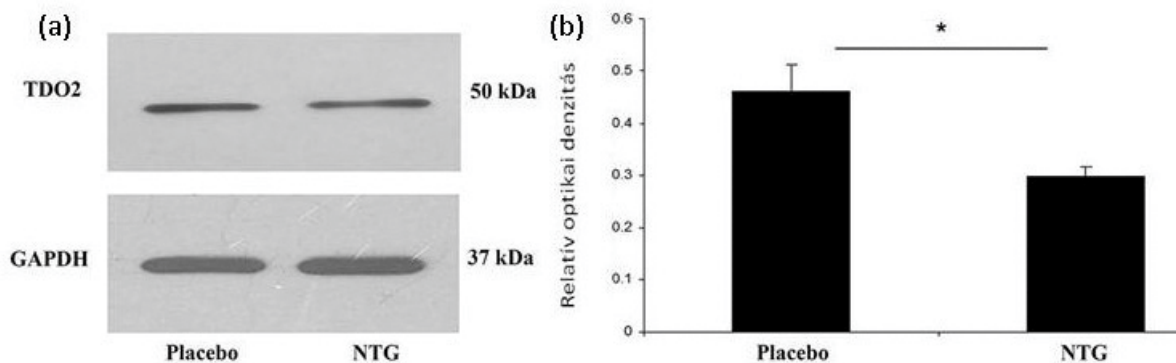
Felnőtt hím Wistar patkányok (n=5 csoportonként) egyszeri s.c. NTG injekciót kaptak 10 mg/kg dózisban, az állatok másik fele placebo kezelésben részesült. 4 órával az injekciók adása után az állatokat perfundáltuk, a TNC-t eltávolítottuk és Western blot vizsgálatokat végeztünk TDO2, IDO1, KAT, KYNU és KMO expressziót vizsgálva. Az eredményeket a glicerin aldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH), illetve a kinurenin aminotranszferáz 2 (KATII) esetében β -aktin csíkokra sztenderdizáltuk. Részletesebben megtalálható a metodika részben a 6.1.1. és 6.3.2. fejezetben. A normál eloszlást Kolgomorov-Smirnov teszttel ellenőriztük, majd az egyes csoportok átlagait kétmintás t-teszttel hasonlítottuk össze.



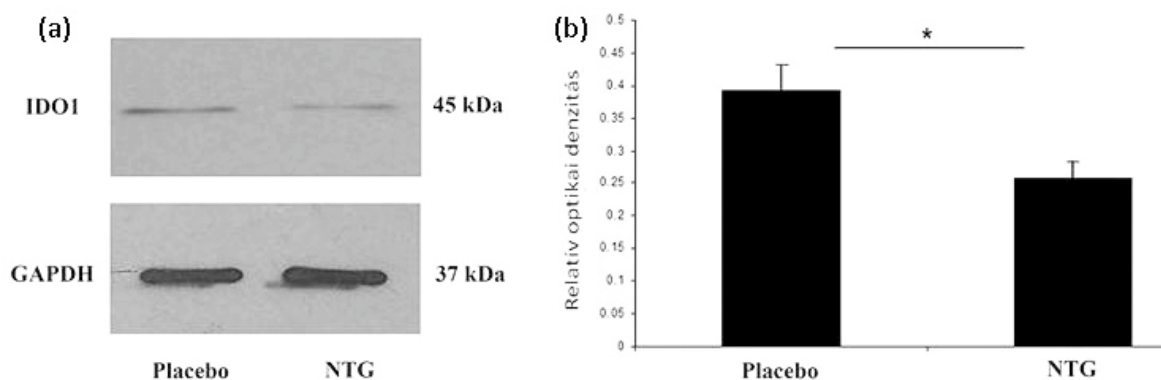
17. ábra. A kinurenin útvonal (Fejes és mtsai., 2011 alapján).

Eredmények

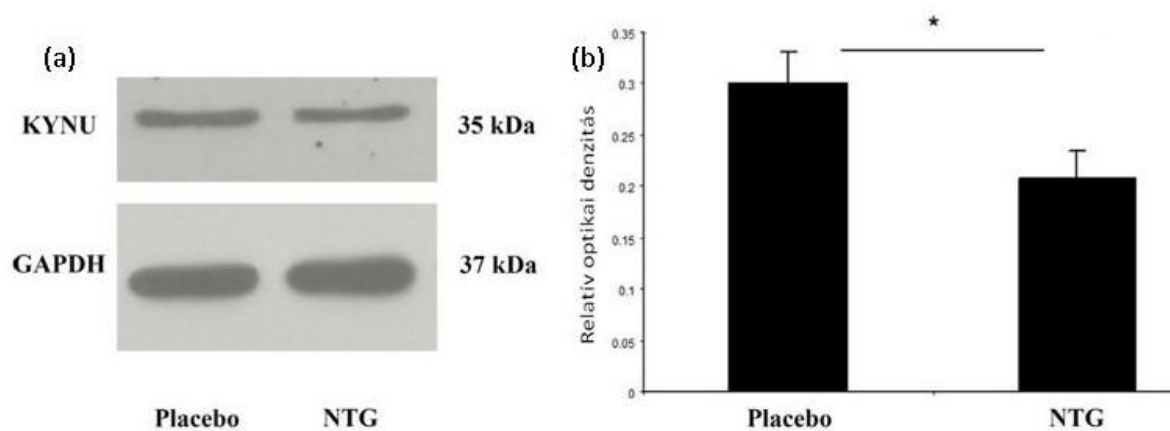
A NTG a kinurenin útvonal összes vizsgált enzimének expresszióját szignifikánsan csökkentette a patkány TNC-ben (18-22. ábra).



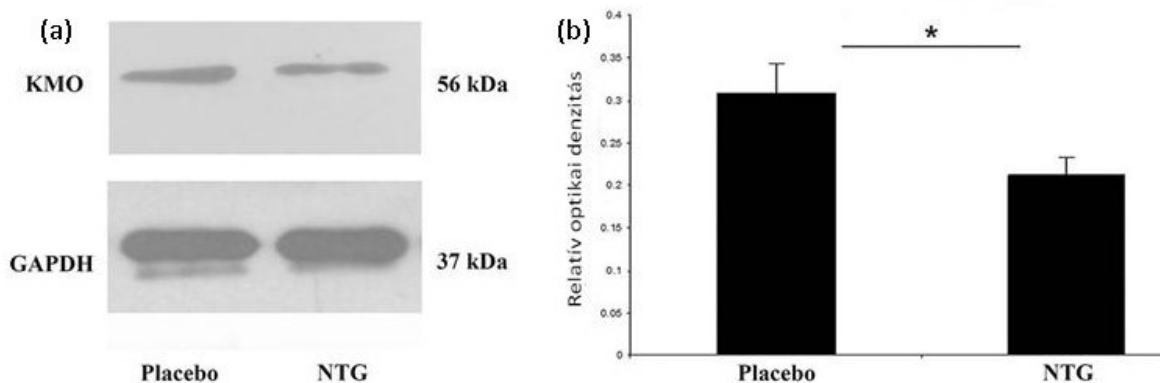
18. ábra. TDO2 Western blot a hím patkány TNC-ből placebo és NTG kezelés után (a). A NTG szignifikáns TDO2 csökkenést okoz (b) a placebo kezelt állatokhoz képest (átlag + S.E.M, n=5 csoportonként, * $p < 0,05$). **GAPDH**: gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz, **NTG**: nitroglicerín, **TDO2**: triptofán 2,3-dioxigenáz 2, **TNC**: kaudális trigeminális mag.



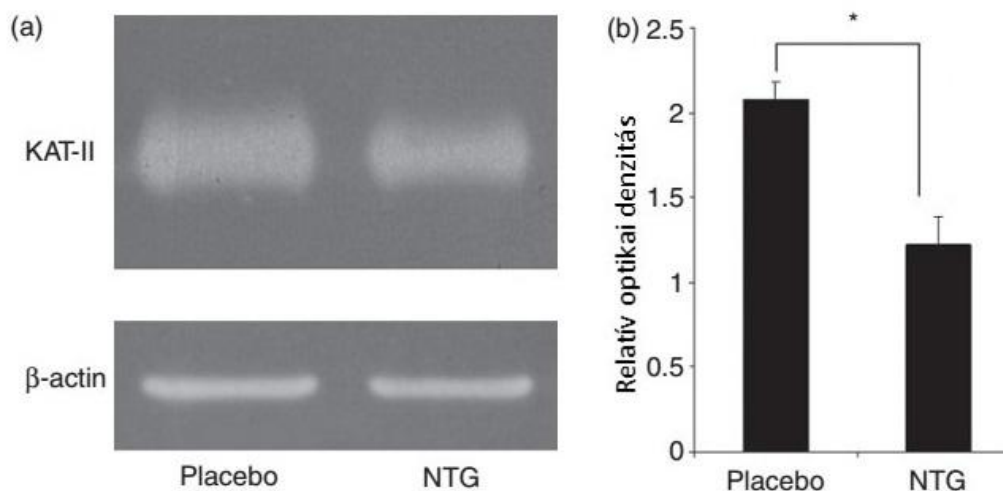
19. ábra. IDO1 Western blot a hím patkány TNC-ből placebo és NTG kezelés után (a). A NTG szignifikáns IDO1 csökkenést okoz (b) a placebo kezelt állatokhoz képest (átlag + S.E.M, n=5 csoportonként, * $p < 0,05$). **GAPDH**: gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz, **IDO1**: indolamin dioxigenáz 1 típus, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag.



20. ábra. KYNU Western blot a hím patkány TNC-ből placebo és NTG kezelés után (a). A NTG szignifikáns KYNU csökkenést okoz (b) a placebo kezelt állatokhoz képest (átlag + S.E.M, n=5 csoportonként, * $p < 0,05$). **GAPDH**: gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz, **KYNU**: kinurenináz, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag.



21. ábra. KMO Western blot a hím patkány TNC-ből placebo és NTG kezelés után (a). A NTG szignifikáns KMO csökkenést okoz (b) a placebo kezelt állatokhoz képest (átlag + S.E.M, n=5 csoportonként, * p<0,05). **GAPDH:** gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz, **KMO:** kinurenin monoxigenáz, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag.



22. ábra. KATII Western blot hím patkány TNC-ből placebo és NTG kezelés után (a). A NTG szignifikáns KATII csökkenést okoz (b) a placebo kezelt állatokhoz képest (átlag + S.E.M, n=5 csoportonként, * p<0,05). **KATII:** kinurenin aminotranszferáz 2, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag.

Megfigyeléseink jelentősége

Az érdekes kérdés az, hogy milyen módon csökkenti a NTG a kinurenin anyagcsere enzimeit. 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 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 gyulladásoos reakciók révén is megvalósulhat.

A vizsgálataink eredményei összevethetők azokkal a megfigyelésekkel, melyben migrénes és cluster fejfájásban szenvedő betegeknel a L-KYN és KYNA csökkent szintjét mérték szérumban, mely kapcsolható az ezen fejfájásokban feltételezett glutamáterg túlműködéshez (Curto és mtsai., 2015a,b), ami tükrözödhet a migrénes pácienseknél mért magasabb szérumban és liquor glutamát szintben (Cananzi és mtsai., 1995, Peres és mtsai., 2004). Ez a glutamáterg túlsúly az NMDA receptorok fokozott aktivitásával és esetlegesen alacsonyabb KYNA aktivitással kombinálódhat. 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.

3.2. Orofaciális formalin, mint a fejfájás állatkísérletes modellje

Az orofaciális régió a test egyik legsűrűbb érző beidegzéssel rendelkező területe, melynek innervációját a n. trigeminus adja, így 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 kísérleti állatokban. A formalin okozta 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 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 patkány orofaciális formalin modelljében

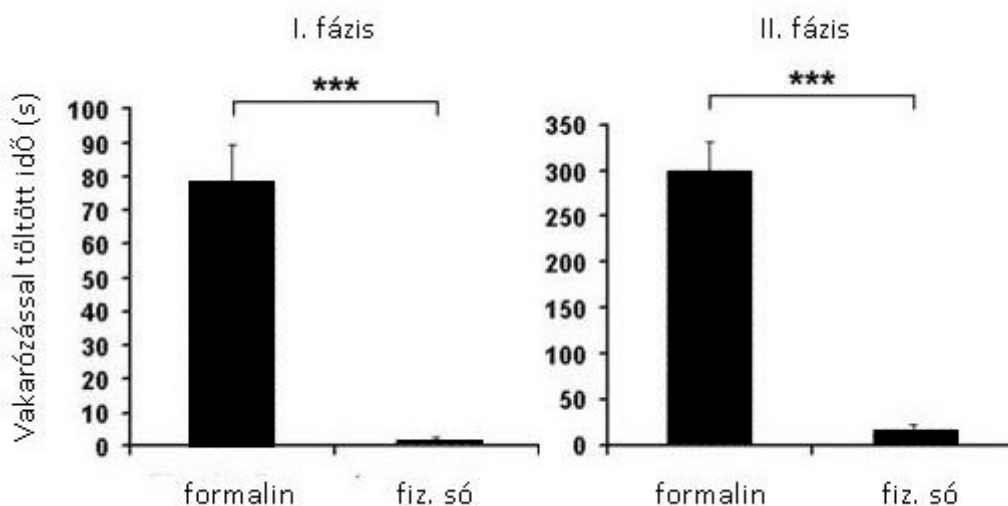
(Fejes-Szabó és mtsai., 2015)

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 fiziológias sóoldatot kapott (n=5 csoportonként). Az injekció után az állatokat azonnal egy 30x30x30 cm méretű tükörfalú terráriumba helyeztük, melyben a patkányok korábban habituációs időt töltöttek el. Az állatokat 45 percen át vizsgáltuk, a viselkedésükről videofilm készült. A vizsgálati időtartamot 15x3 perces blokkokra osztottuk, melyben az érintett oldal vakarásával töltött idő (másodpercben) adta az adott blokk nociceptív pontszámát. Az első fázis megfelelt az első blokknak, a második fázist az ötödik bloktól a tizenegyedikig számítottuk. Részletesebben lásd a 6.1.2. és 6.3.5. fejezet alatt. Az adatokat alcsoportok és blokkok szerint csoportosítva ismételt méréses ANOVA-val elemeztük, majd a páronkénti összehasonlításhoz Sidak-féle korrekciót végeztünk. Az első és második fázis alcsoportjai közötti szignifikáns különbség vizsgálatához az adatokat ismételt méréses ANOVA-val elemeztük, majd Tamhane posthoc tesztet használtuk.

Eredmények

A viselkedési válaszok megegyeztek a korábbi vizsgálatok eredményével, az injekciót követően a patkányok azonnal vakarni kezdték az érintett területet kb. 3-4 percen keresztül. Ezután 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 (23. ábra).



23. ábra. Az első, illetve második fázisban a vakarózással töltött időt ábrázoló hisztogram. Mindkét fázisban a trigeminális formalin injekciót kapott patkányok szignifikánsan több időt töltöttek vakarózással a fiziológiás sóoldatot kapott állatokhoz képest (átlag + S.E.M, n=5 csoportonként, *** p<0,001).

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

(Bohár és mtsai., 2015)

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 (n=13 csoportonként). Négy órával az injekciók adása

után az állatokat perfundáltuk, a TNC-t eltávolítottuk és CGRP immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk a TNC-ből készült sorozatmetszeteken (+1- -5 mm-ig az obextól). A CGRP pozitív rostok által borított területet képanalizátorral vizsgáltuk. Lásd még a 6.1.2., 6.3.1. és a 6.3.4. fejezetet. A TNC különböző magasságaiban mért CGRP által borított területeket kéttényezős ANOVA vizsgálattal hasonlítottuk össze. Amikor a Mauchly-féle szfericitási teszt szignifikánsnak bizonyult Greenhouse-Geisser kiegészítést alkalmaztunk. A páros átlagok összehasonlításakor Sidak korrekció történt.

Eredmények

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

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

(Párdutz és mtsai., 2000)

Háttér

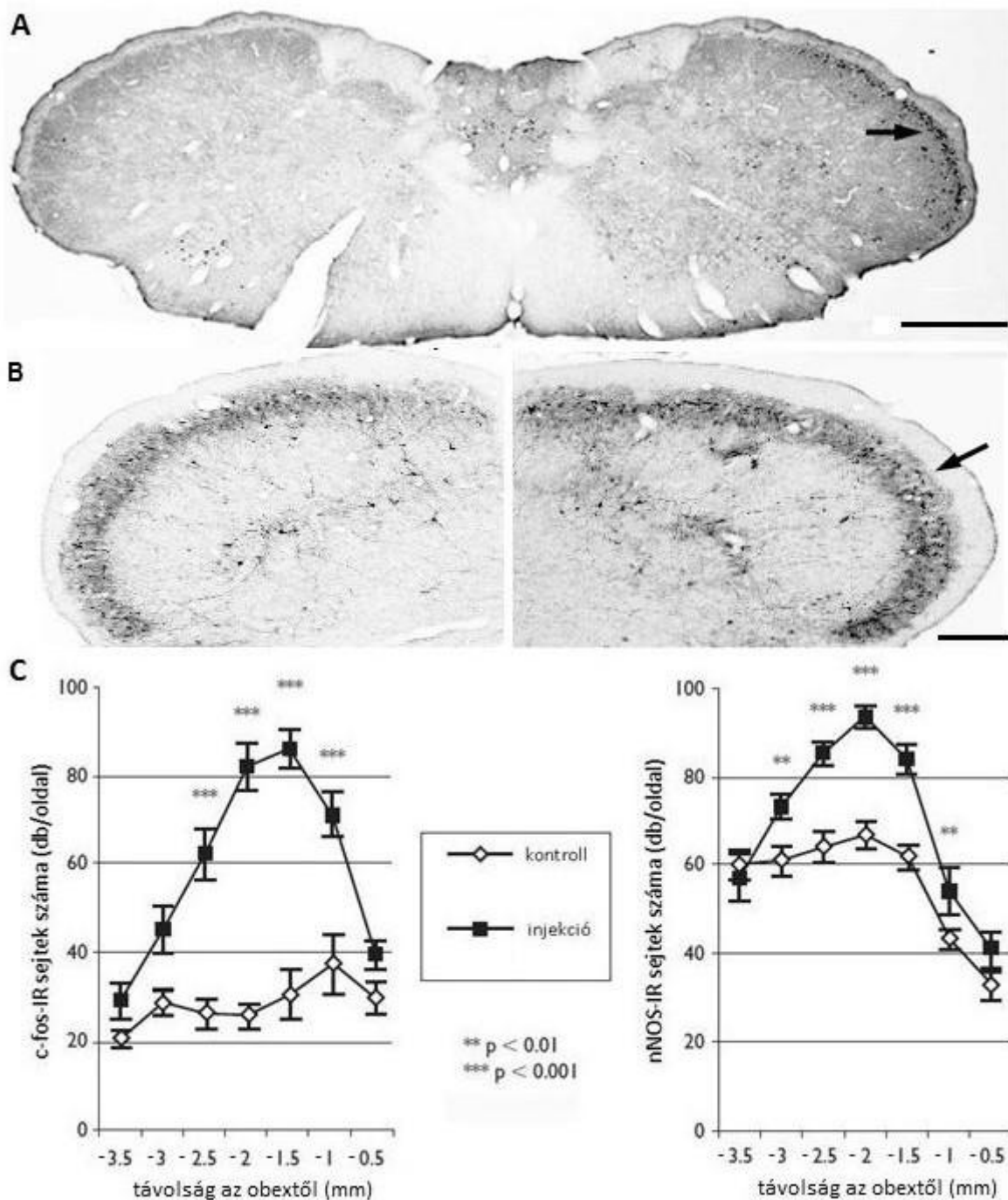
A c-fos protein a neuronális aktiváció kapcsán expresszálódik, a nNOS pedig szenzitizációs markernek tartható a trigeminovaskuláris rendszer területén, ezek a jelenségek az orofaciális formalin modell alkalmazása során is lezajlanak, ezért a vizsgálatuk fontos lehet.

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 (n=8 csoportonként). Négy órával az injekciók adása után az állatokat perfundáltuk és a TNC-t eltávolítottuk, majd sorozatmetszeteket készítettünk c-fos és nNOS immunhisztokémiai vizsgálatok céljából. A sorozatmetszetek TNC-beli helyét megállapítottuk, majd a festődő sejteket a mikroszkóp 10x-os objektíve alatt megszámláltuk az injekció oldalával ipszi- és kontralaterálisan. Részletesebben lásd a 6.1.2. és 6.3.1. fejezetekben. A sejtek számát az egymástól 0,5 mm-re lévő sorozatmetszeteken hasonlítottuk össze. Az adatokat alcsoportok és blokkok szerint csoportosítva ismételt méréses ANOVA-val elemeztük, majd a páronkénti összehasonlításhoz Sidak-féle korrekciót végeztünk. A szignifikancia szint $p < 0,05$ volt.

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 (**24. ábra**).



24. ábra. A: Patkány TNC reprezentatív transzverzális metszetei c-fos immunfestés után, a formalin injekció oldalán (nyíl) több c-fos-IR sejt látszik a felszínes rétegekben az ellenoldali kontrollhoz képest. Lépték: 500 μ m. B: Patkány TNC reprezentatív transzverzális metszetei nNOS immunfestés után, a formalin injekció oldalán (nyíl) több nNOS-IR sejt látszik a felszínes rétegekben az ellenoldali kontrollhoz képest. C: A TNC-ben található c-fos- és nNOS-IR sejtek számát ábrázoló hisztogram obextől csökkenő távolságra lévő 30 μ m vastagságú transzverzális metszeteken orofaciális formalin injekció után a kezelt és kontroll oldalon. A formalin szignifikánsan megemeli a pozitív sejtek számát a szomatotópiás eloszlásnak megfelelően (átlag \pm S.E.M, n=8 csoportonként). IR: immunoreaktív, nNOS: neuronális nitrogén-oxid szintáz, TNC: kaudális trigeminális mag. Lépték: 300 μ m.

Megfigyeléseink jelentősége

A korábbi vizsgálatokhoz hasonló eredményeket kaptunk, melyek igazolják, hogy más modellekhez hasonlóan (pl. a 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

(Bohár és mtsai., 2013)

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 középagyban (Weiller és mtsai., 1995), mely nem mutatható ki a fejre lokalizálódó más fájdalmas állapotoknál (May és mtsai., 1998). Ez arra utalhat, hogy az itt elhelyezkedő struktúrák – a PAG, NRM, DR és a 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 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) és a TNC innervációja mellett (Simpson és mtsai., 1997) az agyi érhálózatához is küld rostokat, ezáltal befolyásolhatja a migrénes roham alatti érrendszeri történéseket (Lance és mtsai., 1983).

A PAG elektromos ingerlése analgéziát válthat ki emberben (Hosobuchi és mtsai., 1977), de egyes a ventrolaterális PAG-hoz közel elhelyezkedő implantátumok migrénes rohamokat válthatnak ki (Raskin

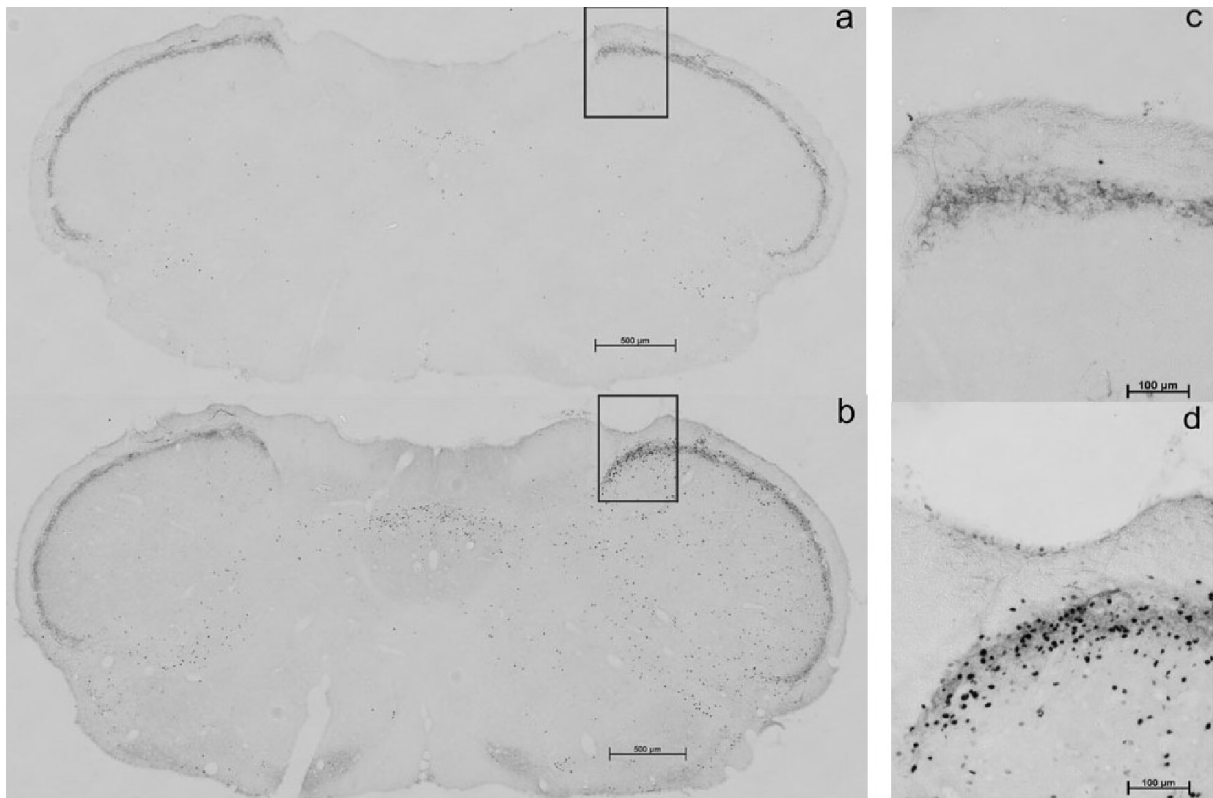
és mtsai., 1987), így ez a struktúra mind a fájdalom csillapításában, mind a migrén kialakulásában szerepet játszhat. A PAG-ot különböző funkciójú hosszanti kolumnákra lehet osztani, melyek a fájdalom feldolgozásában, vegetatív és emocionális szabályozásában játszhatnak szerepet (Behbehani 1995). A ventrolaterális 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

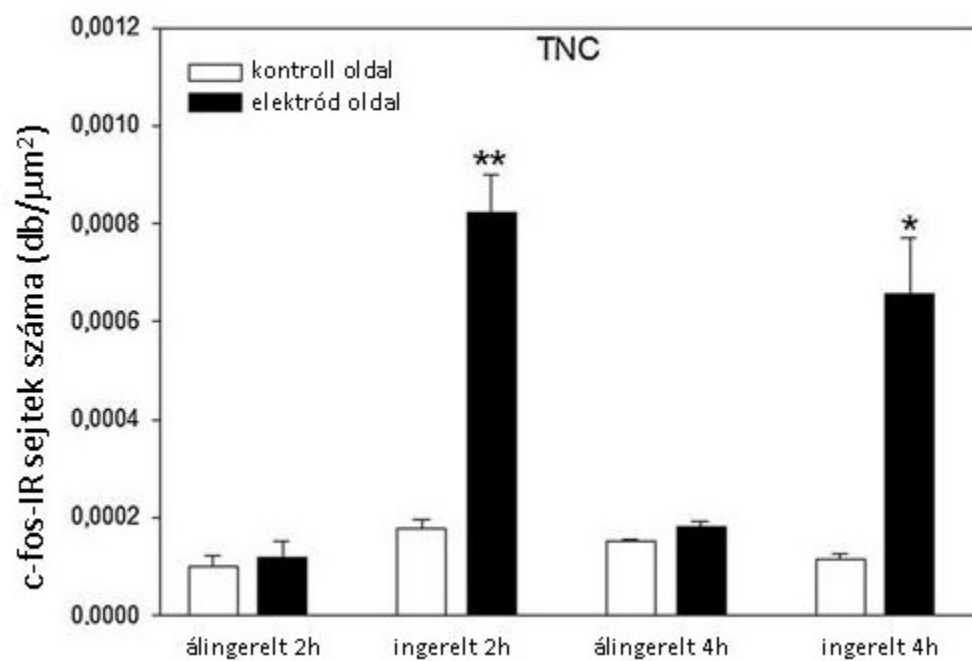
Felnőtt hím patkányok jobb oldali TG-ba koncentrikus bipoláris elektródát süllyesztettünk klorálhidrát anesztéziában. Az állatok felénél 30 percig 10 Hz, 0,5 mA-es elektromos ingerlést alkalmaztunk, míg a kontrollcsoportban nem történt ingerlés az elektróda behelyezése után. Kettő (n=7 csoportonként) és négy órával (n=6 csoportonként) 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 megszámoltuk a TNC, LC, NRM és DR területén a Paxinos Watson (Paxinos és mtsai., 2007) atlasz alapján, és a különböző területeken talált értékeket a képanalizátor (MozaiX, AXioVision, Zeiss, Németország) által meghatározott területet figyelembe véve μm^2 -re adtuk meg. A 6.1.3. és 6.3.1. fejezetben részletesebben megtalálható a metodika. A TNC esetében statisztikai értékelés ismételt méréses ANOVA-val, Games-Howell, illetve Scheffe post-hoc teszttel történt. A többi agytörzsi páros magnál az oldalak közötti különbséget páros t-próbával vizsgáltuk. Mivel oldalkülönbséget nem találtunk, az adatokat összevontuk és egyszempontos varianciaanalízist használtunk a csoportok összehasonlítására, majd Scheffe post hoc tesztet.

Eredmények

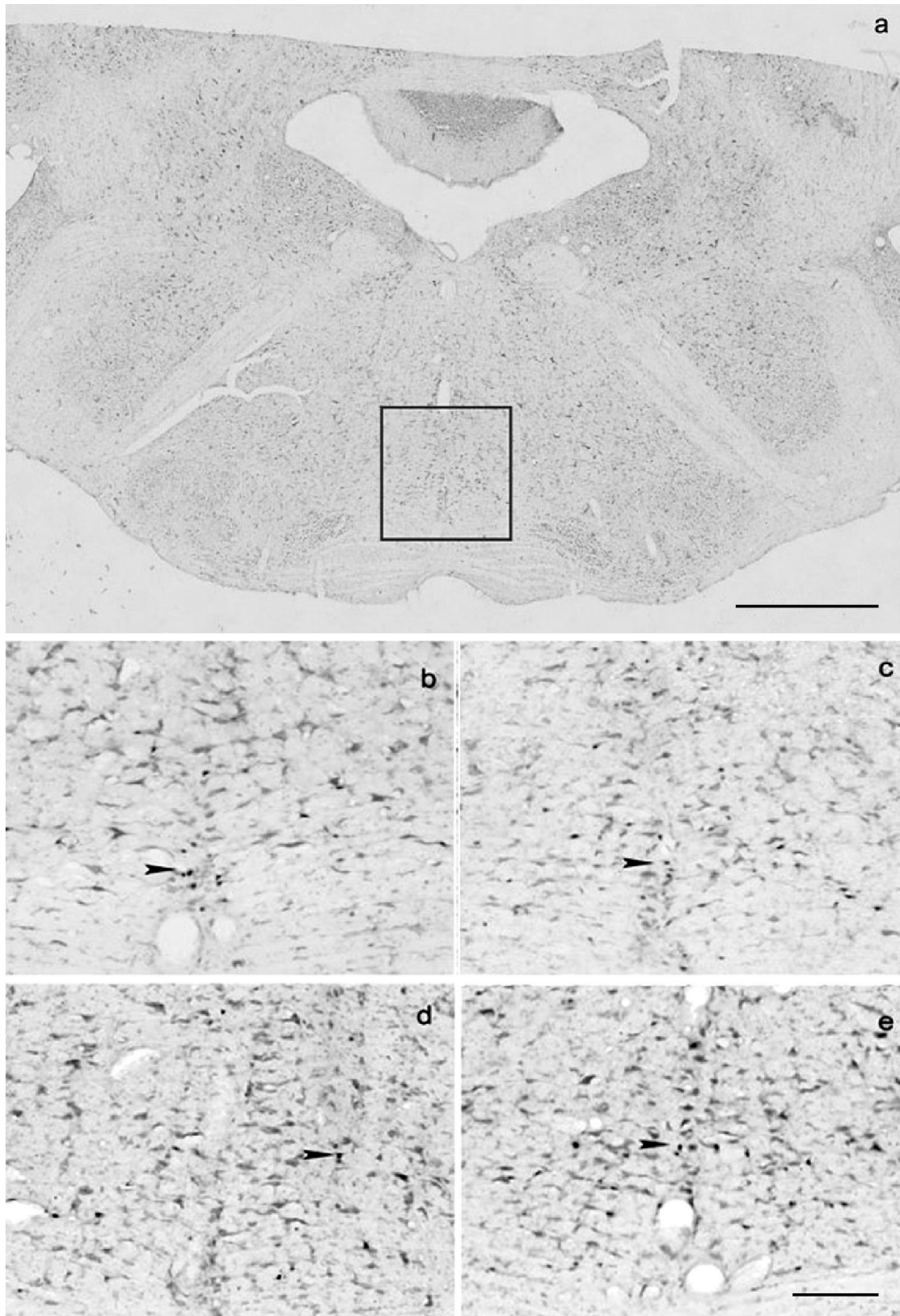
A TG elektromos ingerlése mindkét időintervallumban megemelte az azonos oldali TNC-ben a c-fos pozitív sejtek számát (**25, 26. ábra**). A NRM mindkét oldalán sejtszám emelkedést észleltünk ingerlés után. Nem változott szignifikánsan viszont a LC, DR és PAG c-fos pozitív sejtjeinek száma a stimulációt követően (**27, 28. ábra**).



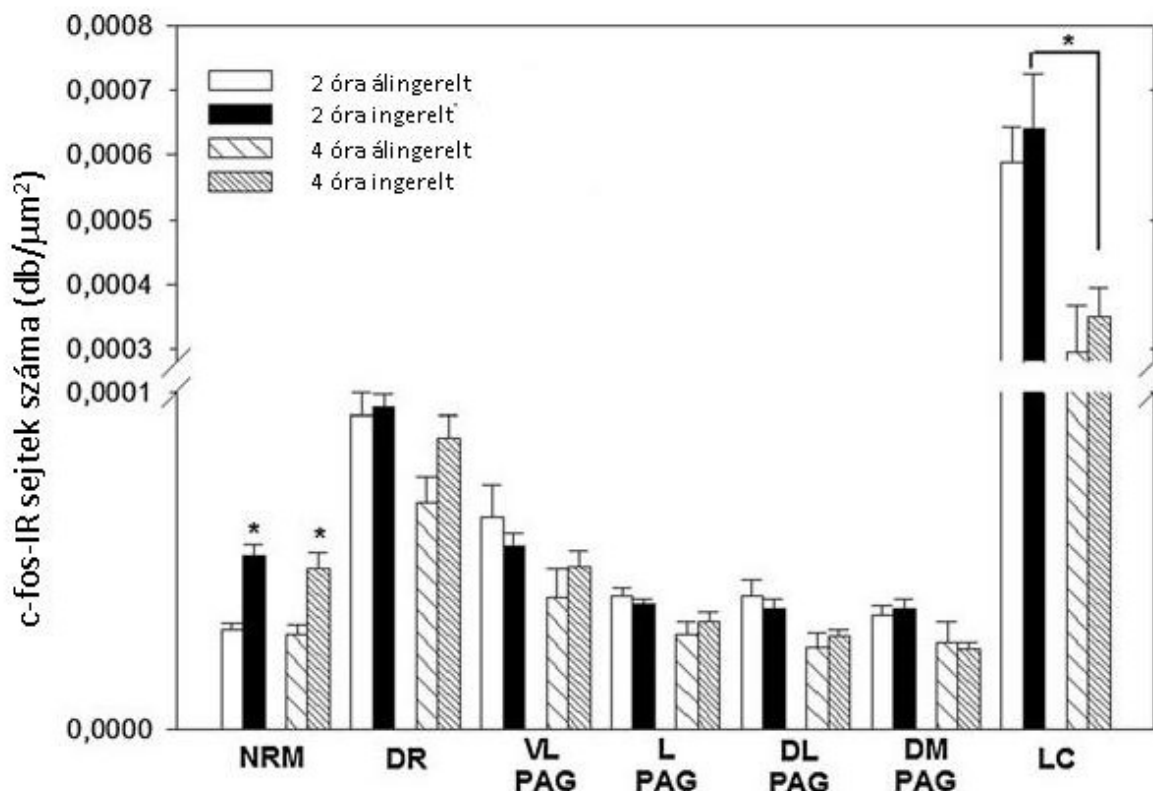
25. ábra. Reprezentatív metszetek a patkány TNC-ből az obextól kaudálisan 0,5 mm-re. Az álingerelt állatoknál (a, c) nincs lényeges c-fos változás az ingerlés oldalán, míg az elektromos stimuláció (b, d) megemeli a c-fos expressziót az ipsilaterális TNC-ben. A téglalapok az ingerlés oldalát és a nagyobb nagyítású képek helyét jelzik. TNC: kaudális trigeminális mag.



26. ábra. A μm^2 -ként mutató átlagos c-fos-IR sejtszám ábrázolása a patkány TNC-ben. Az álingerés nem okozott szignifikáns változást egyik túlélési idő esetén sem. Az elektromos ingerlés az elektróda oldalán szignifikánsan megemelte c-fos-IR sejtek számát az álingerelt állatok megfelelő oldalához képest (átlag + S.E.M, n=7, ill. 6 csoportonként, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). IR: immunoreaktív, TNC: kaudális trigeminális mag.



27. ábra. Reprezentatív metszetek a NRM-ből stimulált (a, c, e) és álingerelt (b, d) állatokból 2 órás (a, b, c) és 4 órás (d, e) túlélést követően. A nagyobb nagyítású képek a téglalapnak megfelelő területről készültek. A c-fos festődés (nyíl) gyakoribb a stimulált állatoknál. **NRM:** nucleus raphe magnus. Lépték 1000 ill. 200 μm



28. ábra. Az átlagos c-fos-IR sejtek száma μm^2 -ként az agytörzs különböző magcsoportjaiban. A NRM-ban az ingerlés után 2 és 4 órával is szignifikánsan megnőtt a c-fos-IR sejtek száma a kontrollhoz képest. A többi mag esetében ilyen változást nem tapasztaltunk (átlag + S.E.M, n=7, ill. 6 csoportonként, * $p<0,05$). DL: dorzolaterális, DM: dorzomediális, DR: dorzális raphe mag, IR: immunoreaktív, L: laterális, LC: locus ceruleus, NRM: nucleus raphe magnus, PAG: periaqueductalis szürkeállomány, VL: ventrolaterális. .

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 ipsilaterális TNC területén az ingerlésnek megfelelően. Ennek az aktivációnak kettős háttere lehet, egyrészt az elektromos áram direkt hatása az elsődleges érző neuronok centrális nyúlványain keresztül, másrészt a periférián létrejövő steril gyulladás kialakulása indirekt módon (Markowitz és mtsai., 1987).

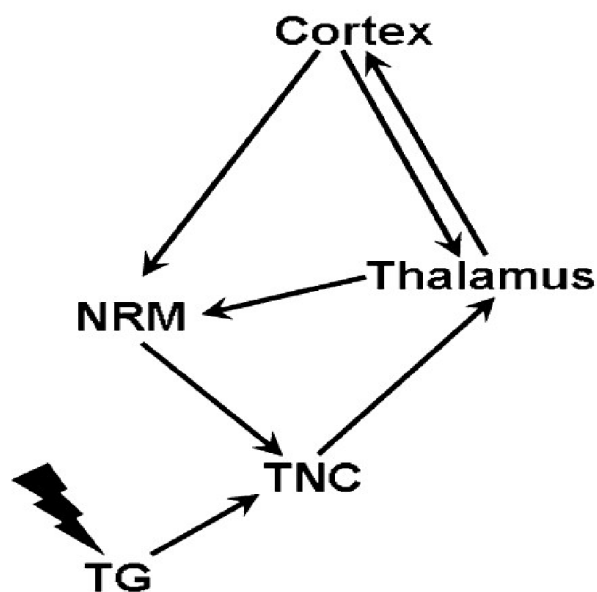
A NRM neuronjainak magasabb aktivitását észleltük az elektromos ingerlést követően 2, illetve 4 órával. Ezt a jelenséget feltehetőleg nem a TNC aktivációjának direkt hatása okozza, mivel a közvetlen kapcsolat a két magcsoport között gyenge, különösen a felszínes laminákat illetően (Hermann és mtsai., 1997, Sugiyo és mtsai., 2005). A legvalószínűbb az, hogy a NRM fokozott működése a leszálló fájdalomérző rendszer aktiválódása révén, indirekt módon jön létre a kortexen és talamuszon vagy a PAG-on keresztül (Hermann és mtsai., 1997) – lásd **29. ábra**.

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 kapcsolatról 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 fájdalomszabályozásban 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.



29. ábra. Az eredményeink alapján az aktiváció útvonalát mutató sémás ábra. Az elektromos ingerlés aktiválja a másodlagos érző neuronokat a TNC-ben, melyet a thalamus és a cortex aktivitása követ. A NRM-ban észlelhető fokozott aktivitás feltehetőleg másodlagos jelenség. **NRM:** nucleus raphe magnus, **TG:** trigeminális ganglion, **TNC:** kaudális trigeminális mag.

3.4. A dura kémiai ingerlésének hatása patkányban

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

(Laborc és mtsai., 2020)

Háttér

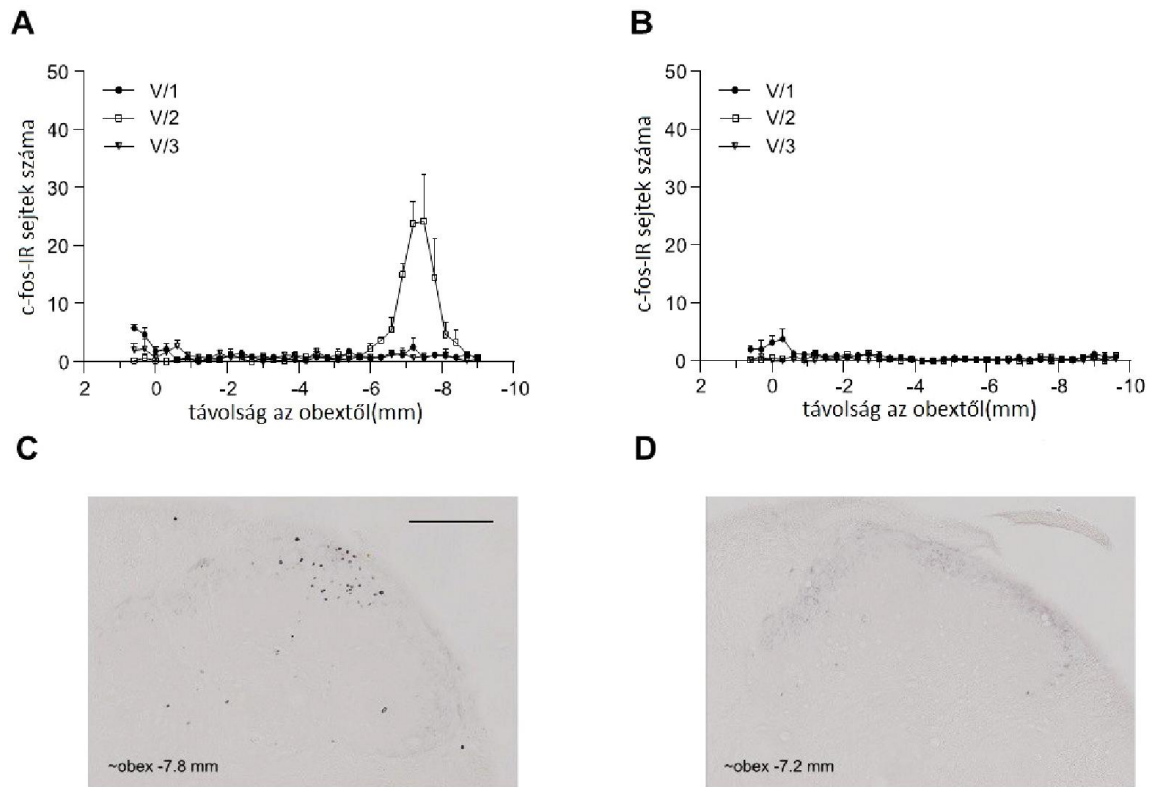
A migrén kapcsán jelentkező trigeminális aktivációban kiemelt lehet a trigeminális rendszer által gazdagon beidegzett dura mater és annak érrendszere (Hoffmann és mtsai., 2019). Emiatt kézenfekvő állatkísérletes modellnek tűnik a dura kémiai ingerlése, melyet elsősorban „gyulladásos levestel” (inflammatory 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

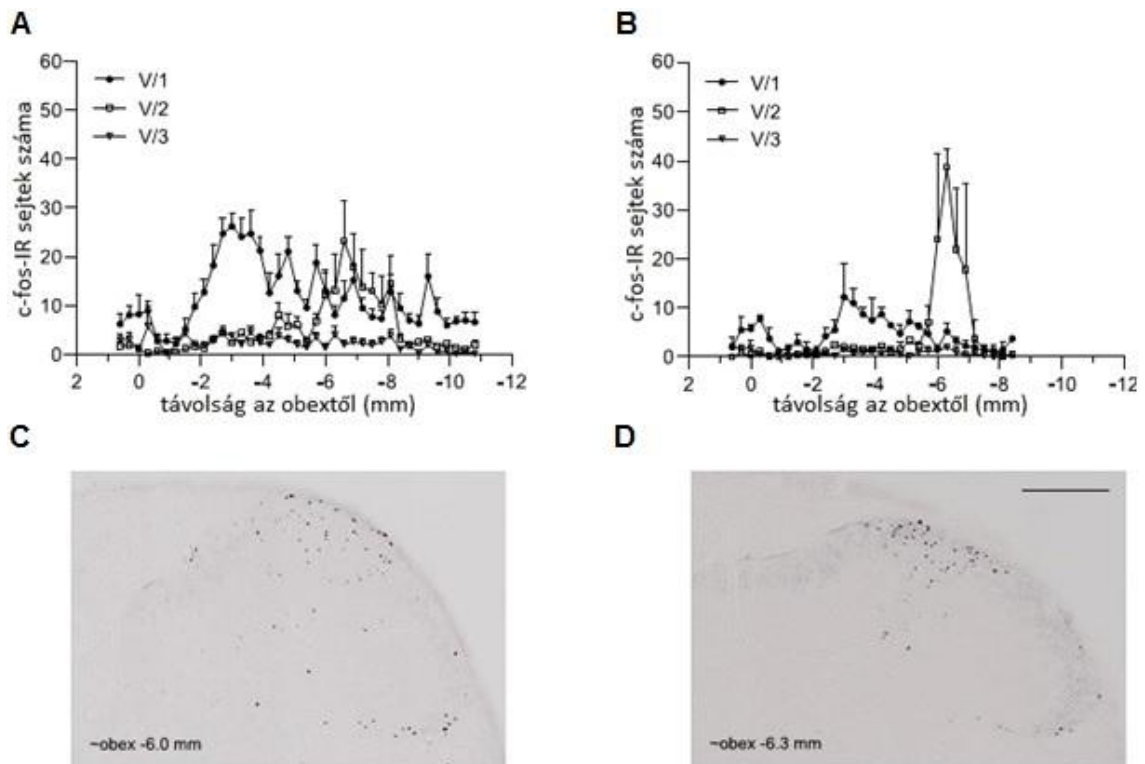
Altatás és sztereotaxiás rögzítés után patkányok koponyacsontját eltávolítottuk, majd a dura matert szabaddá téve jobb oldalra IS (1 mM bradikinin, 100 μ M prosztaglandin, 1 mM 5HT, 1 mM hisztamin, pH 5,0 10 mM HEPES pufferben), ill. CFA (Sigma-Aldrich, USA) oldatot vagy ezek oldószereit helyeztük. Fél óra múlva a területet lemostuk, majd 2 (2CFA) és 4 (4CFA) valamint 2,5 (2IS) és 4 óra múlva (4IS) az állatokat perfundáltuk. A kontroll csoportokban hasonló módon jártunk el a különbséggel, hogy a kezelést az oldószerekkel, CFA esetében fiziológiás sóoldattal (2PHYS és 4PHYS csoport), 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 (2SIF és 4SIF csoport), majd az előzőekben leírtak szerint az állatokat perfundáltuk (n=6 csoportonként). A TNC-t c-fos immunhisztokémiai festések céljából eltávolítottuk, kriosztáttal 30 μ m vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk: az obextől 1 mm-el rostralisán kezdve, minden tizedik metszetet használtuk fel egy sorozatban. Külön csoportokban vizsgáltuk az anesztézia, a perfúzió, a sztereotaxiás készülék és a műteti területen alkalmazott lokális lidokain kezelés esetleges moduláló hatását (n=3-4, ill. lidokain esetén n=2 csoportonként). A sejteket mikroszkóp alatt 10x objektívvel számoltuk a TNC I-II laminák területén. A sejteket a trigeminális ágak (V/1, 2, 3) TNC-beli szomatotópiás elhelyezkedésük szerint is megszámoztuk Strassman és Vos munkájára alapozva (Strassman és Vos 1993). A kezelés hatását az oldaliság függvényében, az agytörzs különböző magasságaiban mutatkozó c-fos sejtszámra ismételt méréses ANOVA segítségével végeztük, majd a páronkénti összehasonlításoknál Sidak-féle korrekciót használtunk. Az alacsony elemszámú csoportokban (n=2) nem végeztünk statisztikai analízist. Részletesebben lásd a 6.1.4. és 6.3.1. fejezetet.

Eredmények

Az általános anesztézia és a perfúzió nem befolyásolta a c-fos megjelenését a kísérleti összeállításunkban (az adatokat nem ábrázoljuk). A sztereotaxiás készülék használata a TNC V/2-es szomatotópiás területén okozott c-fos emelkedést (**30. ábra**), a műtét alatt alkalmazott lokális lidokain viszont mindegyik csoportban csökkenti a c-fos aktivitást az V/1-es területen (**31. ábra**).

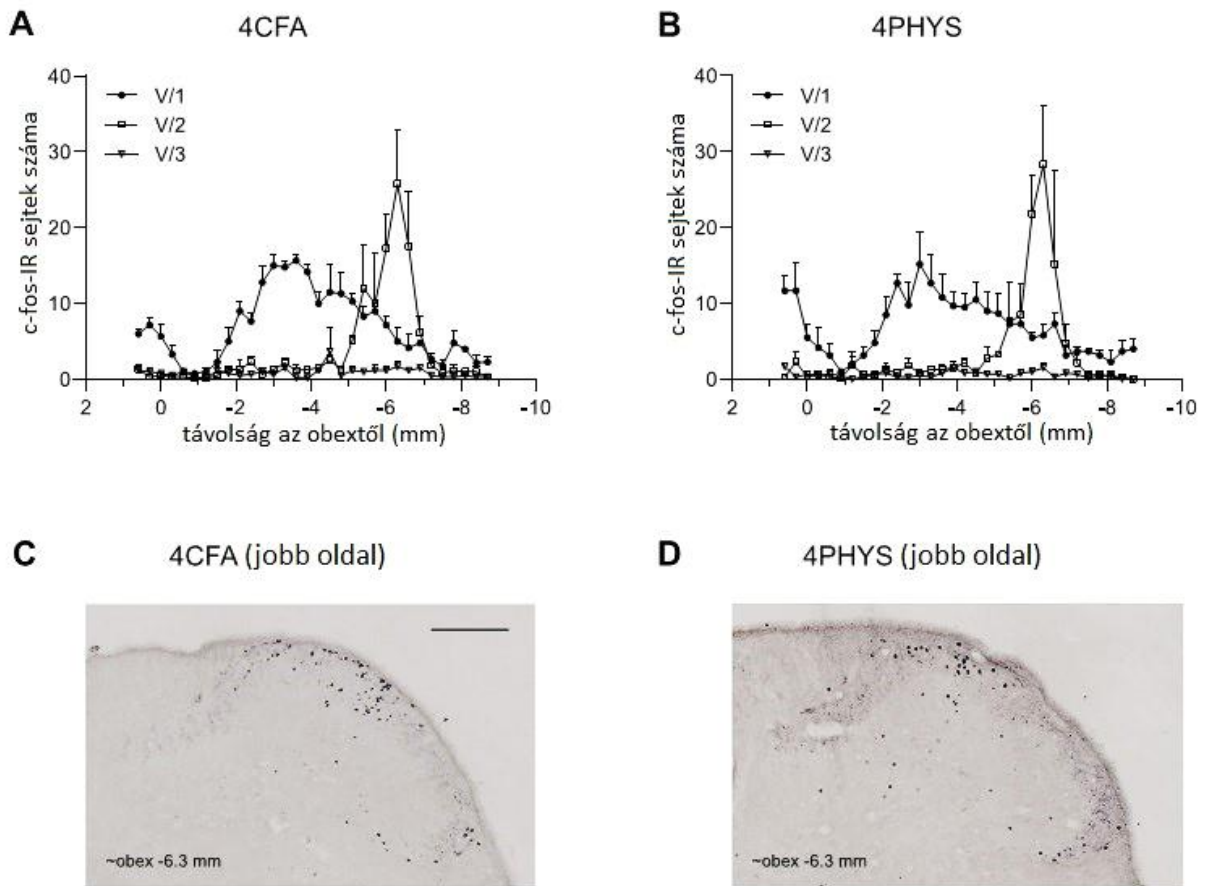


30. ábra. A c-fos-IR sejtek száma sztereotaxiás készülék használata után hisztogramon (A) és a TNC reprezentatív metszetén (C), a kontroll állatok adatai (B) és reprezentatív metszete mellett (D). A sztereotaxiás állvány használata megemelte a c-fos pozitív sejtek számát az V/2 területén (átlag + S.E.M). IR: immunoreaktív, TNC: kaudális trigeminális mag. Lépték: 200 μ m.

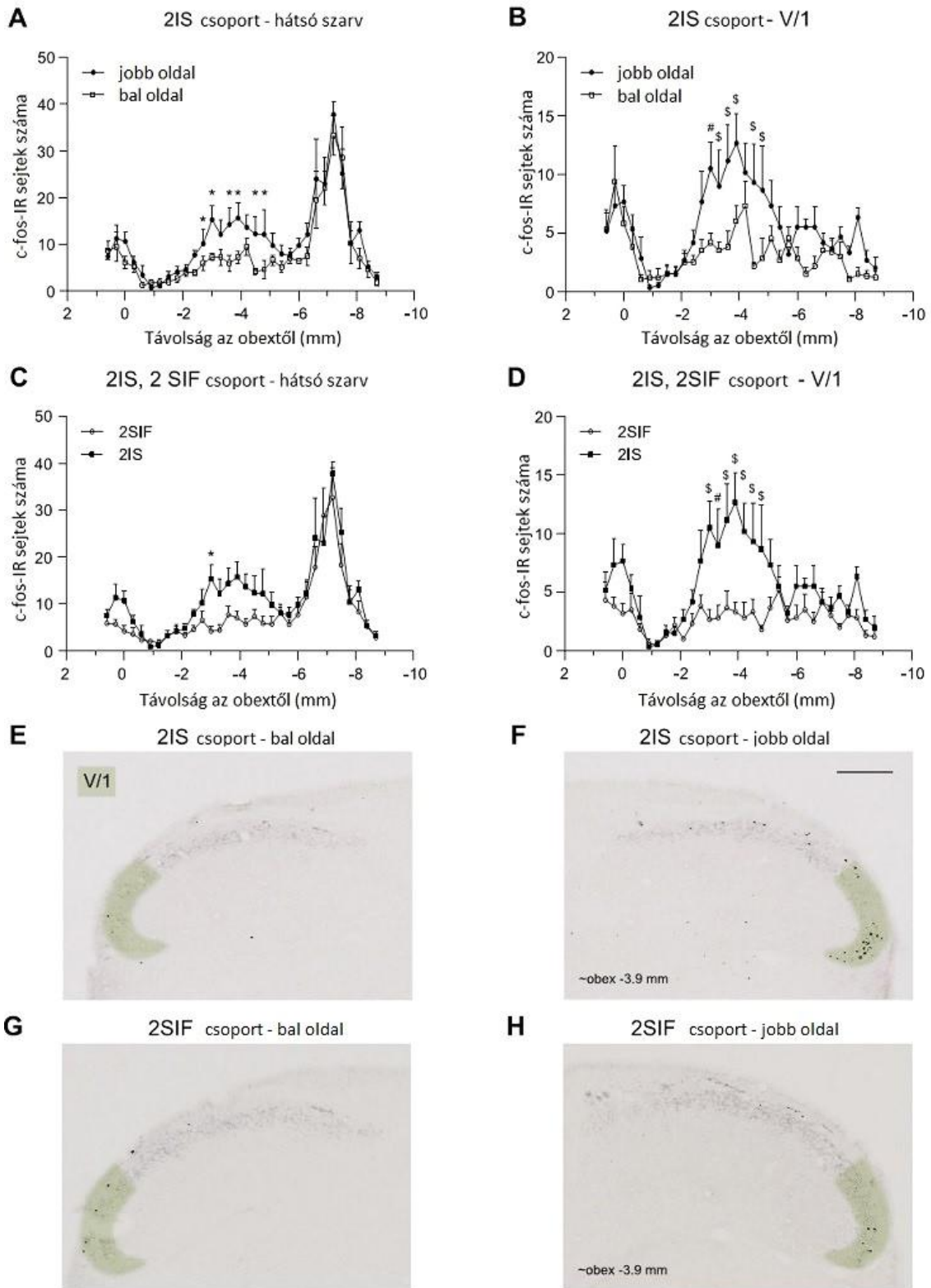


31. ábra. A lidokain kezelés csökkenti a műtét kapcsán kialakuló c-fos aktivitást a durális kezelést nem kapott, műtött állatokban (A, C) az V/1 szomatotópiás területen a lidokaint nem kapott patkányokhoz képest (B, D) (átlag + S.E.M). IR: immunoreaktív. Lépték: 200 μ m.

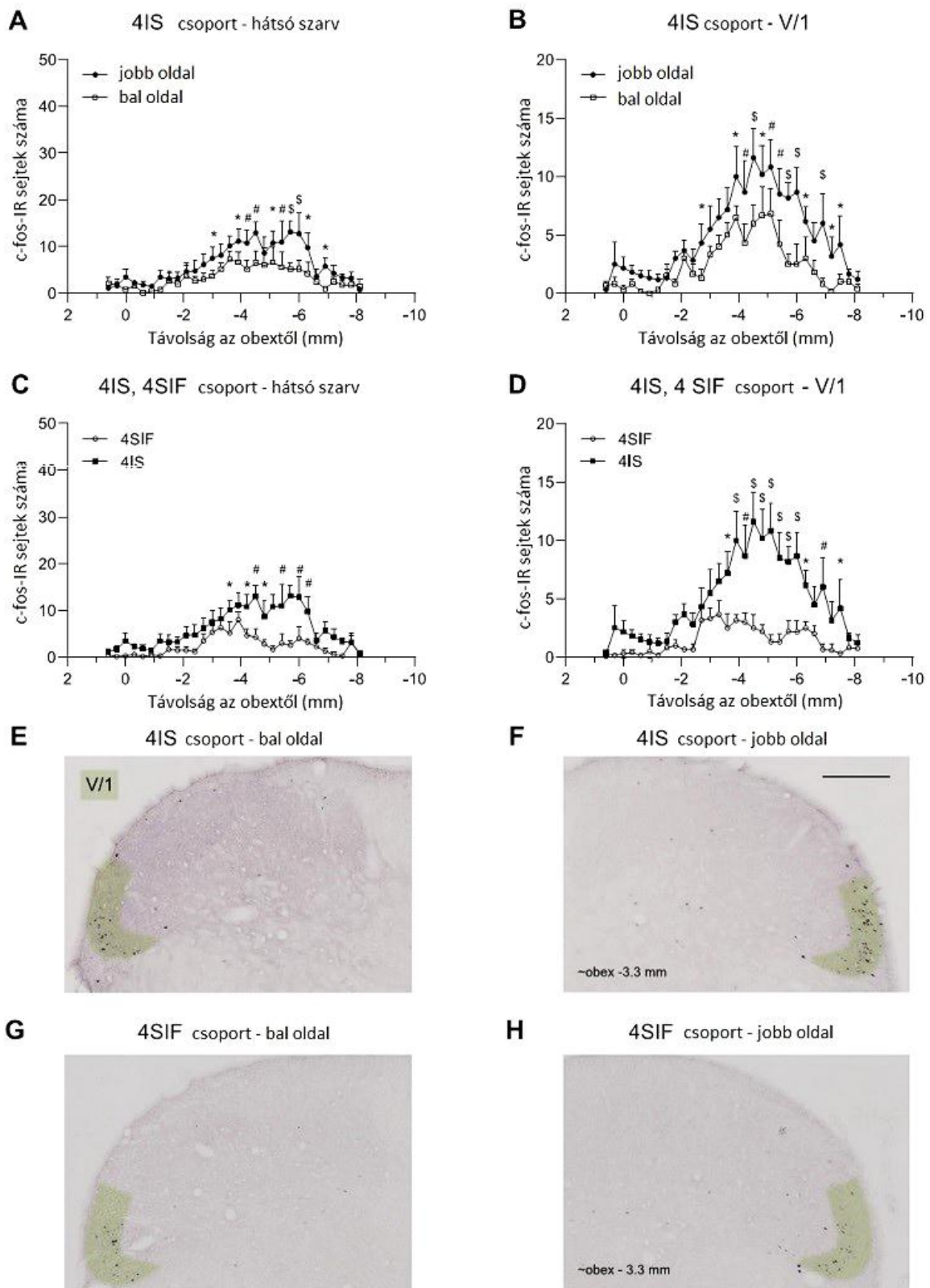
A CFA kezelés nem emelte meg szignifikánsan a c-fos pozitív sejtek számát sem a másik oldalhoz, sem a kontroll állatokhoz képest, sem 2, sem 4 óra elteltével (**32. ábra**). Ezzel szemben az IS alkalmazása szignifikánsan megnövelte az érintett oldal c-fos expresszióját, mind 2,5, mind 4 óra után. A különbség az V/1-es szomatotópiának megfelelően volt a legszámottevőbb (**33, 34. ábra**).



32. ábra. c-fos expresszió a patkány TNC-ben CFA kezelés után 4 órával (4CFA), mely nem okoz változást a fiziológiás sóoldatos kezeléshez viszonyítva (4PHYS) (átlag + S.E.M, n=3 csoportonként). **CFA:** complete Freund adjuváns, **IR:** immunoreaktív, **TNC:** kaudális trigeminális mag. Lépték: 200 μ m.



33. ábra. A TNC területén található c-fos-IR sejtek számát mutató diagram a teljes hátsó szarvban (A, C) és az V/1 áréában (B, D) 2,5 órával IS (A-D) és SIF (C, D) kezelés után. Reprezentatív fényképek a c-fos-IR sejtekről a hátsó szarvban 2IS (E, F) és 2SIF (G, H) csoportokból. A zöld háttér az V/1 áréát ábrázolja. Szignifikáns különbség mutatkozik a kezelt jobb oldal sejtjeiben a bal oldalhoz képest mind a teljes hátsó szarvat számolva, mind az V/1 áréát tekintve. A kontroll SIF kezeléshez képest az IS szignifikáns emelkedést okozott az V/1 területen (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként * $p < 0,05$, # $p < 0,01$, § $p < 0,001$). IR: immunoreaktív, IS: inflammatory soup, SIF: szintetikus intersticiális folyadék, TNC: kaudális trigeminális mag. Lépték 200 μm .



34. ábra. A TNC területén található c-fos-IR sejtek számát mutató diagram a teljes hátsó szarvban (A, C) és az V/1 áréában (B, D) 4 órával IS (A-D) és SIF (C, D) kezelés után. Reprezentatív fényképek a c-fos-IR sejtekről a hátsó szarvban 4IS (E, F) és 4SIF (G, H) csoportokból. A zöld háttér az V/1 áréát ábrázolja. Szignifikáns különbség mutatkozik a kezelt jobb oldal sejtjeiben a bal oldalhoz képest mind a teljes hátsó szarvat számolva, mind az V/1 áréát tekintve. A kontroll SIF kezeléshez képest az IS szignifikáns emelkedést okozott az V/1 területen (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként, * p<0,05, # p<0,01, \$ p<0,001). IR: immunoreaktív, IS: inflammatory soup, SIF: szintetikus intersticiális folyadék, TNC: kaudális trigeminális mag. Lépték 200 μ m.

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, ami 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. Mivel az extra- és intrakraniális érzőrendszer közös rosthálózattal működik (Kosaras és mtsai., 2009, Schueler és mtsai., 2013), ez alapján feltételezhető, hogy a fejbőrön és a periosteumon végzett műtéti beavatkozás elrejtheti a durából érkező stimulusok hatását, ezért a lidokain lokális alkalmazása javasolható ilyen esetekben.

Kísérleteinkben kétfajta gyulladós ágenst használtunk a dura ingerlésére. A CFA szub- vagy intadermális injekciója alkalmazható a gyulladós, illetve neuropátiás fájdalom modellezésére, beadva gyorsan ödémát és hiperalgéziát 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. A legkézenfekvőbb magyarázat erre, hogy a hatás kiteljesedéséhez nem állt rendelkezésre elég idő. A CFA s.c. adása ödémát és hiperalgéziát 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). Ki kell hangsúlyozni, hogy ezekben a kísérletekben a CFA tartósan jelen volt, míg a saját kísérleteinkben a CFA csak 20 percig maradt a dura felszínén, mely szintén csökkentette a rövid távú aktiválódás lehetőségét. Egy másik vizsgálatban a durán lokálisan, 20 percen át alkalmazott CFA gyulladós folyamatokat indított meg a TG területén 4-24 óra között, megemelkedett a CGRP és interleukin 1 β szintje a kontrollcsoportéhoz 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 gyulladós reakció időbeli lefolyásával, melyet a CFA elsődleges hatásának tartunk (Dvorak és Dvorak 1974). A lassabb hatáskezdet mellett a vegetatív idegrendszer működése is befolyásolhatja az eredményeket. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a szimpatikus idegrendszer működése hatással van a gyulladós folyamatok kialakulására: az immunsejtek alfa adrenerg receptorokat expresszálhatnak, melyek száma gyulladás után még magasabb lesz, ami fokozott citokin felszabadulást eredményezhet (Bao és mtsai., 2007, Grisanti és mtsai., 2011, Heijnen és mtsai., 1996, Schlereth és mtsai., 2008). A spinális protopátiás rendszer szimpatikus innervációja gazdagabb a trigeminális rendszerhez képest, ami csökkentheti a gyulladás kialakulásának sebességét ez utóbbiban (Schlereth és mtsai., 2008). Ezek alapján a CFA topikális adása inkább a migrén krónikussá válásának lehet a modellje (Edvinsson és mtsai., 2019). Ilyenkor az afferensek terminálsaiból felszabaduló CGRP lokális gyulladást idéz elő (Geppetti és mtsai., 2005), mely fenntartott aktivációt és szenzitizációt hoz létre (Haanes és Edvinsson 2019) és önerősítő folyamathoz vezethet. Ez a jelenség az ismétlődő migrénes rohamok által esetlegesen

kiváltott tartós neurogén gyulladáshoz hasonlítható, mely a krónikussá válás kialakulásában szerepet játszhat (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 (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. Más kísérletekben, amikor a katétert a ciszterna magnába helyezték nem lehetett oldalkülönbséget észlelni, mivel a terület beidegzése bilaterális, továbbá a gyulladást kiváltó anyag mindkét oldal felé diffundál (Nozaki és mtsai., 1992). 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 lefolyása 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 trigeminovaszkuláris rendszer aktiválódása, azaz inkább a krónikus állapot modellje lehet.

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

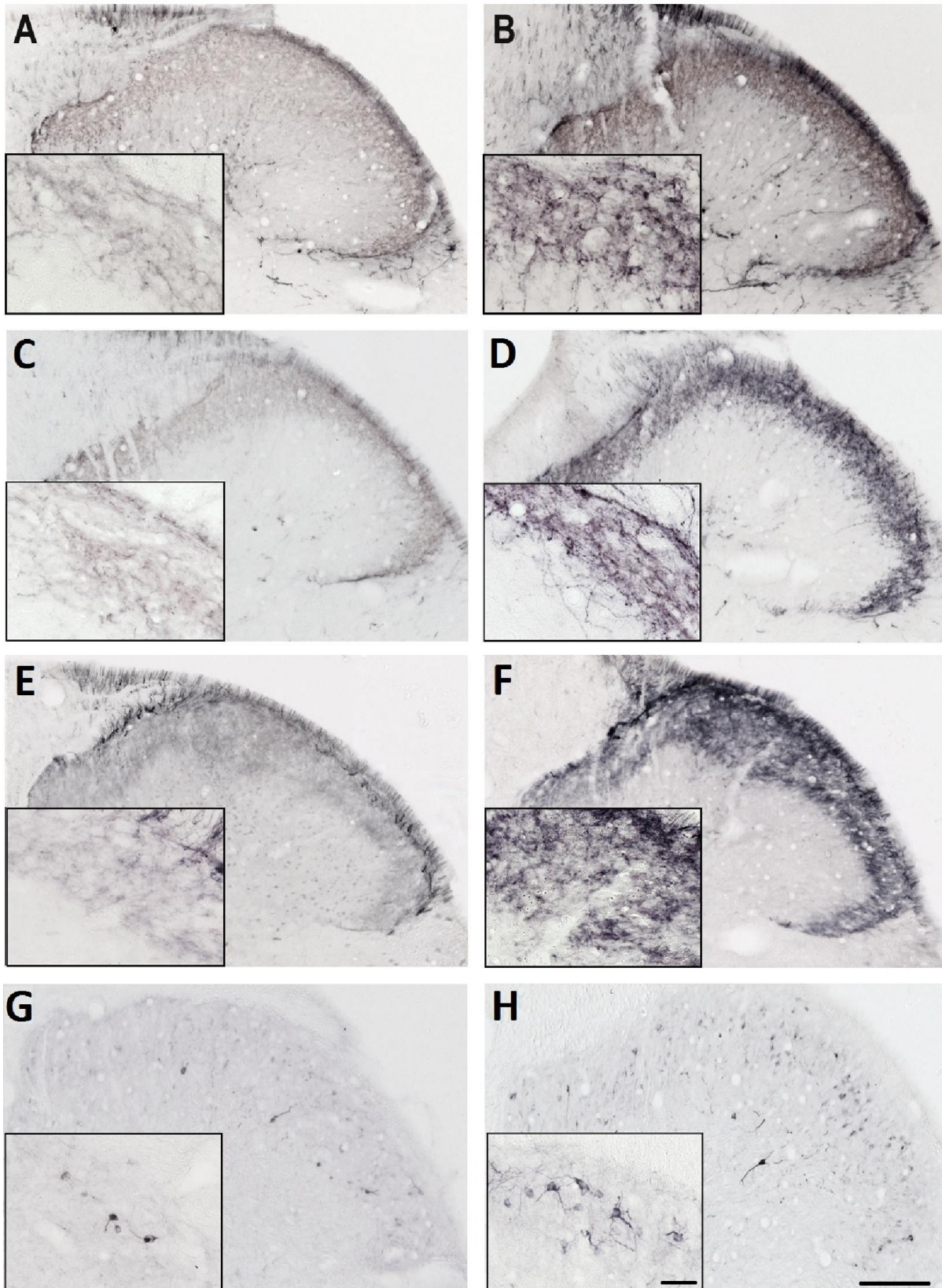
(Spekker és mtsai., 2021)

Anyag és módszer

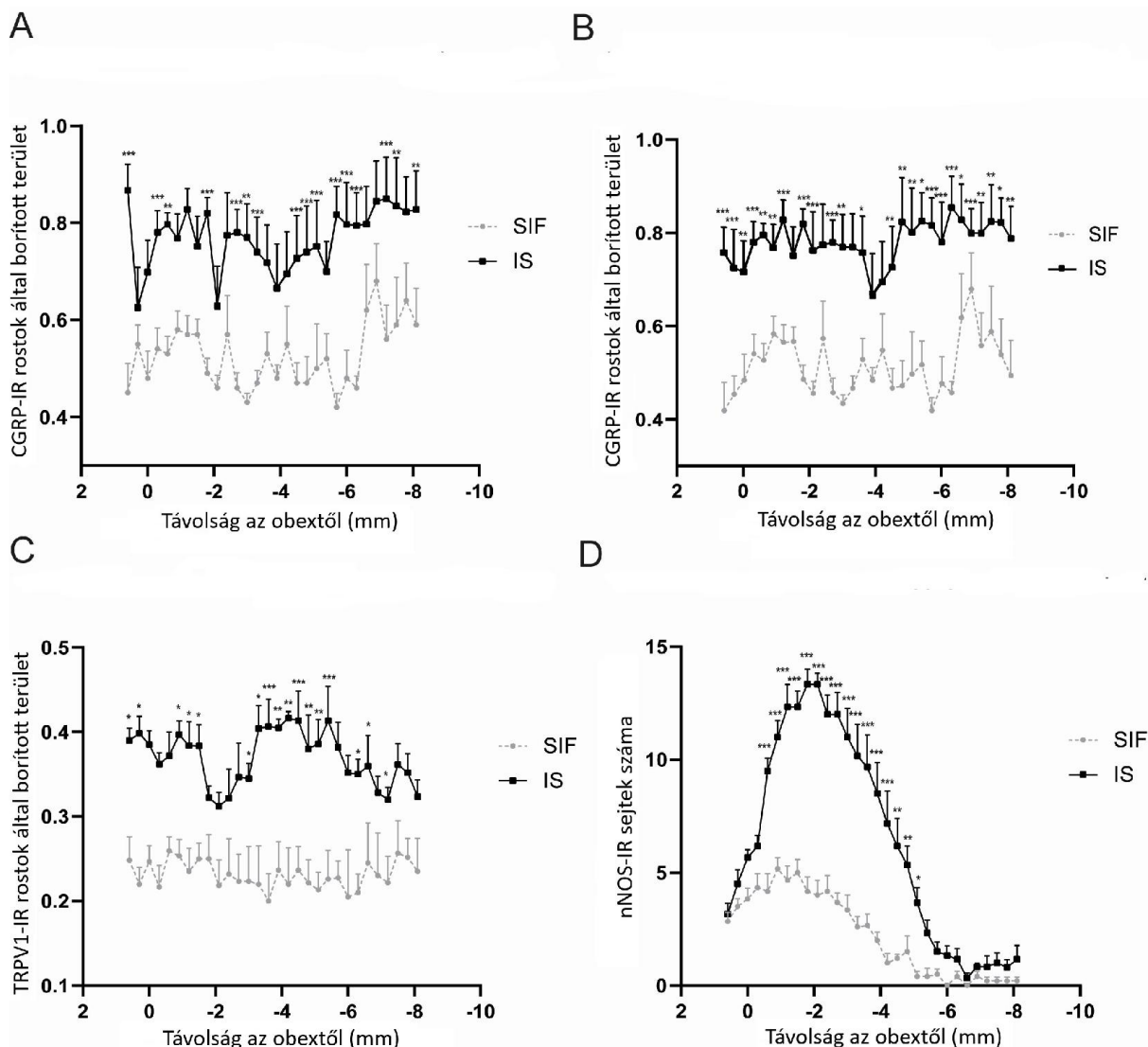
Altatás és sztereotaxiás rögzítés után patkányok koponyacsontját eltávolítottuk, majd a dura matert szabaddá téve jobb oldalra IS oldatot vagy ennek oldószerét (SIF) helyeztük. Fél órával később a területet lemostuk, majd 2,5 és 4 óra múlva az állatokat perfundáltuk (n=6 csoportonként) és a TNC-t CGRP, TRPV1 és nNOS immunhisztokémiai festések céljából eltávolítottuk. A CGRP és TRPV1 pozitív rostok által fedett területet képanalizátor segítségével, a terület százalékaként határoztuk meg, míg a nNOS pozitív sejteket megszámoztuk. Részletesebben lásd a 6.1.4, a 6.3.1. és 6.3.4. szakaszt. A csoportok és oldalak közötti különbség analízisét ismételt méréses ANOVA-val végeztük, majd Sidak korrekciót alkalmaztunk.

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 (**35,36. ábra**).



35. ábra. Reprezentatív transzverzális metszetek a TNC területéről IS (B, D, F, H) és SIF (A, C, E, G) kezelés után 2,5 (A, B) és 4 órával (C-H). Az aktív kezelés (IS) megemeli a CGRP (B, D), TRPV1 (F) és nNOS (H) expressziót a hátsó szarv területén a kontrollhoz (A, C, E, G) képest. Ez a nagyobb nagyítású képeken is jól észlelhető. Lépték: 200, ill. 50 μm . **CGRP:** kalcitonin génrelációs peptid, **IS:** inflammatory soup, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **SIF:** szintetikus intersticiális folyadék, **TNC:** kaudális trigeminális mag, **TRPV1:** tranziens receptor potenciál vanilloid 1. Lépték: 200, ill. 50 μm .



36. ábra. A CGRP (A, B), TRPV1 (C) és nNOS (D) expresszió a TNC-ben 2,5 (A) és 4 (B-D) órával az IS és SIF kezelést követően. Az IS hatására szignifikánsan emelkedik mind a 3 marker megjelenése a kontrollhoz (SIF) viszonyítva (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001). **CGRP**: kalcitonin génrelációs peptid, **IR**: immunoreaktív, **IS**: inflammatory soup, **nNOS**: neuronális nitrogén-oxid szintáz, **SIF**: szintetikus intersticiális folyadék, **TNC**: kaudális trigeminális mag, **TRPV1**: tranziens receptor potenciál vanilloid 1.

Megbeszélés

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

A TNC területén megemelkedett CGRP 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, mely szerint 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 hátsó szarvak területén. 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). Ezen felül farmakológiai vizsgálatok is alátámasztották a TRPV1 szerepét a sérüléseket követő hiperalgéria megjelenésében (Davis és mtsai., 2000). 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 állíthatók 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 kapcsolatos 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, továbbá lehetőséget biztosíthat az esetleges jövőbeli farmakológiai célpontok azonosításában.

4.1. COX gátlás hatása a migrén NTG modelljében

(Párdutz és mtsai., 2004, Varga és mtsai., 2007, Varga és mtsai., 2009)

Háttér

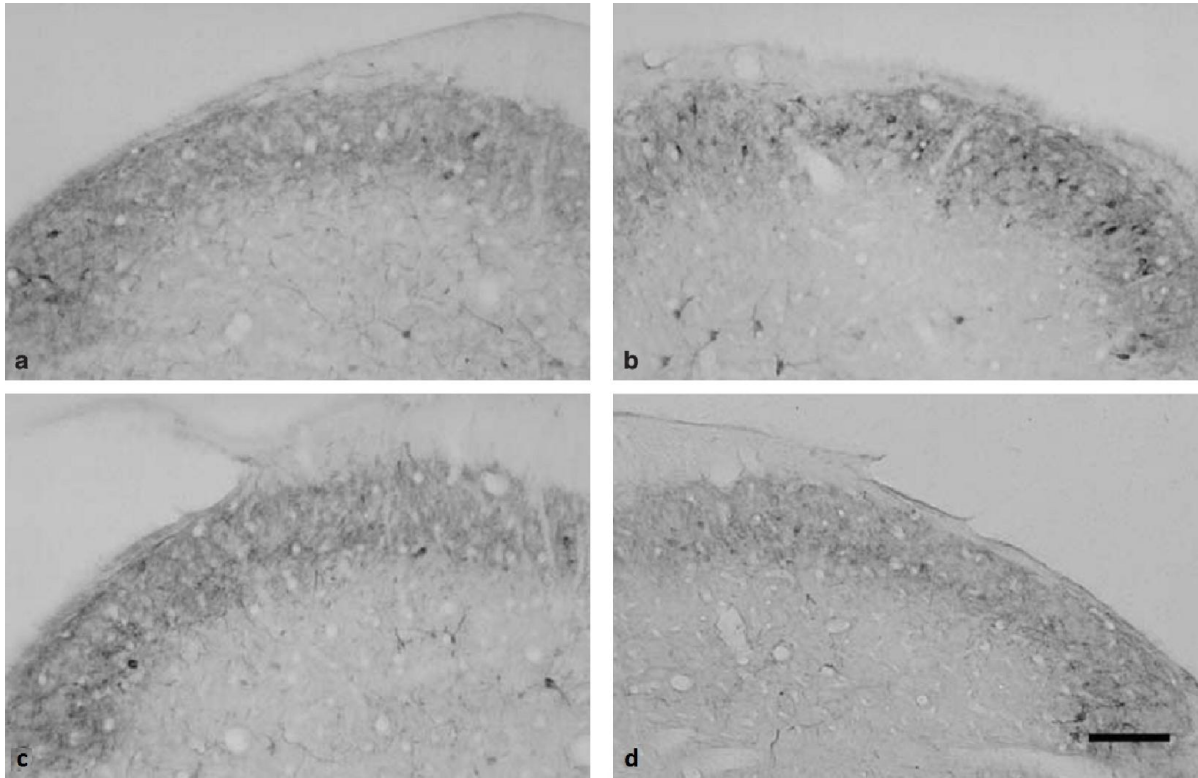
Korábbi kísérletek igazolták, hogy a NTG szisztémás adása késleltetett módon aktiválni képes az aktivációs és szenzitizációs markereknek tartott molekulákat a TNC területén, mely folyamatban feltehetőleg a prosztaglandinok játszanak szerepet. A COX gátló NSAID típusú szerek hatékonynak bizonyultak mind 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 expresszálandó ciklooxygenáz-1 (COX1), az indukálható COX2 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 gyulladásban (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

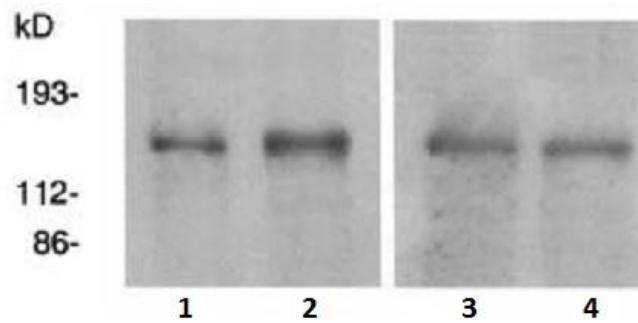
Kísérleteinkben felnőtt hím Wistar patkányokat használtunk. Előkezelés szempontjából több csoportot alkottunk: kontroll (előkezelés nélkül), lys-ASA – az állatok lizil-acetil-szalicilátot (Aspegic®, Sanofi-Synthelabo, Franciaország) kaptak 50 mg/kg dózisban (n=32), COX1 – a patkányok szelektív COX1 inhibitor, SC560-t kaptak többfajta dózisban (1, 3, 5 mg/kg, n=12, 12, 8) és COX2 gátló – NS398 előkezeléssel (1, 3, 5 mg/kg n=12, 12, 16 csoportonként). 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 (n=5 csoportonként). A statisztikai elemzés kétszemponos ANOVA-val és post-hoc Scheffe teszttel történt. Részletesebben a 6.1.1., 6.3.1. és 6.3.2. fejezetekben.

Eredmények

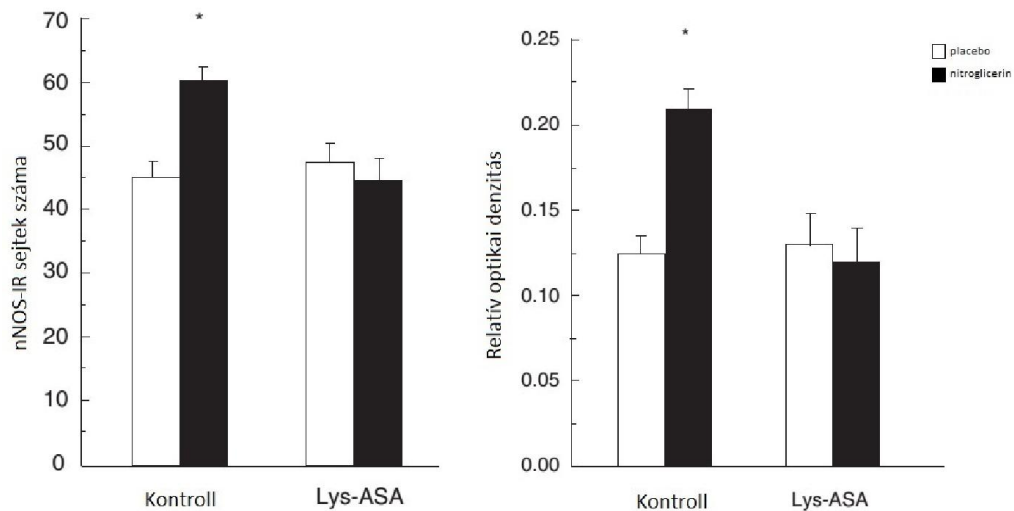
A korábbiakhoz hasonlóan a NTG kezelés szignifikánsan megemelte a nNOS és CamKII expresszióját, melyet a lys-ASA előkezelés ki tudott védeni a nNOS esetében (**37-39. ábra**). Hasonló hatása volt a COX2 inhibitor előkezelésnek, mely dóziszfüggő módon érvényesült mindkét marker esetében. A COX1 gátló nem volt hatással a NTG okozta változásokra (**40-43. ábra**).



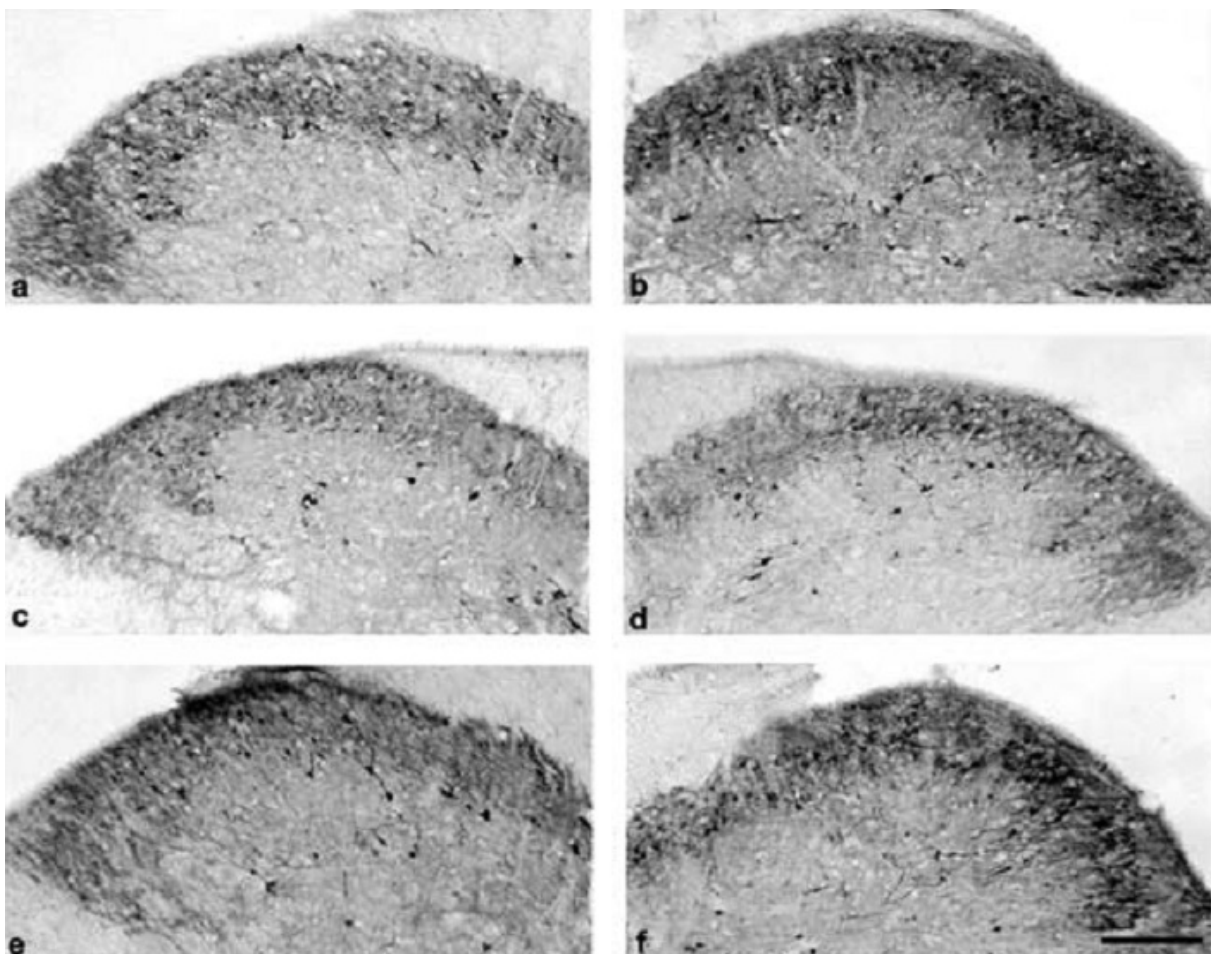
37. ábra. nNOS-IR a TNC transzverzális metszetein az obextól -6 mm-re nem előkezelt (a, b) és lys-ASA előkezelt (c, d) állatokban. Az oldószerhez viszonyítva (a, c) a NTG megemelte a nNOS sejtszámot a nem előkezelt csoportban (b), míg a lys-ASA előkezelt csoportban nem látunk ilyen hatást (d). **IR:** immunoreaktív, **lys-ASA:** lizil-acetil-szalicilát, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag. Lépték 50 µm.



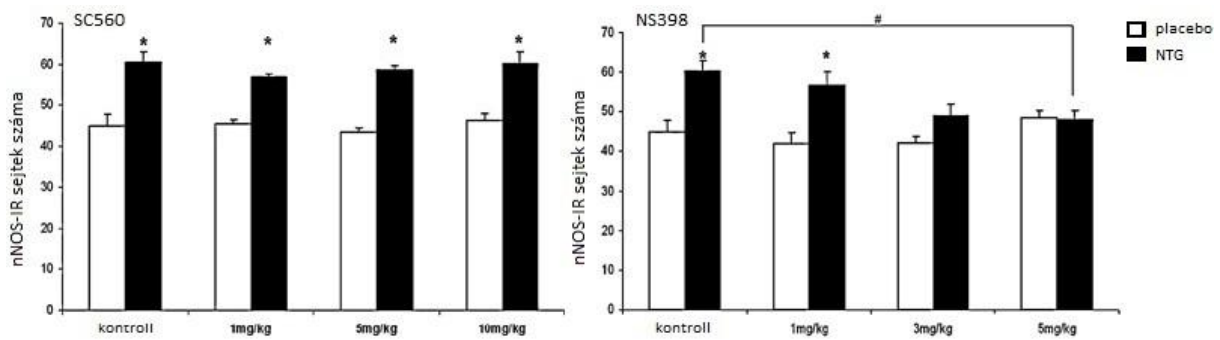
38. ábra. nNOS Westen blot a TNC-ből nem előkezelt (1, 2) és lys-ASA-val előkezelt (3, 4) állatokban. Az oldószerhez viszonyítva (1, 3) a NTG megemelte a nNOS mennyiségét a nem előkezelt csoportban (2), míg a lys-ASA csoportban nem látunk ilyen hatást (4). **lys-ASA:** lizil-acetil-szalicilát, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag.



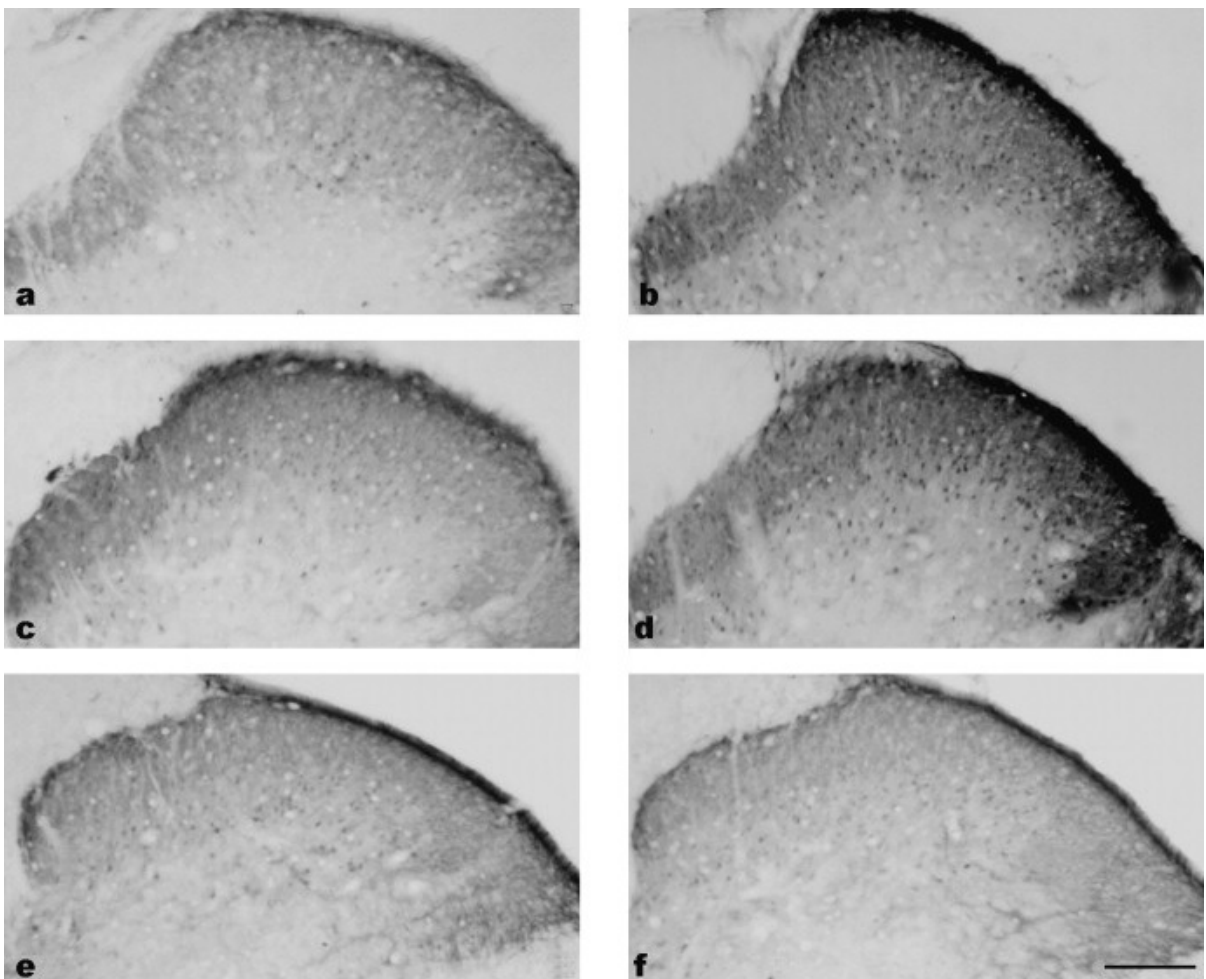
39. ábra. nNOS-IR sejtek számát és a Western blot optikai denzitását ábrázoló hisztogram a kontroll és lys-ASA előkezelést kapott hím patkányokban négy órával a NTG és placebo előkezelés után. A NTG szignifikánsan megemeli a nNOS-IR sejtek számát és mennyiségét, míg ezt a hatást a lys-ASA kivédi (átlag + S.E.M, n=8, illetve 5 csoportonként, * p<0,05). IR: immunoreaktív, **lys-ASA**: lizil-acetil-szalicilát, **nNOS**: neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag.



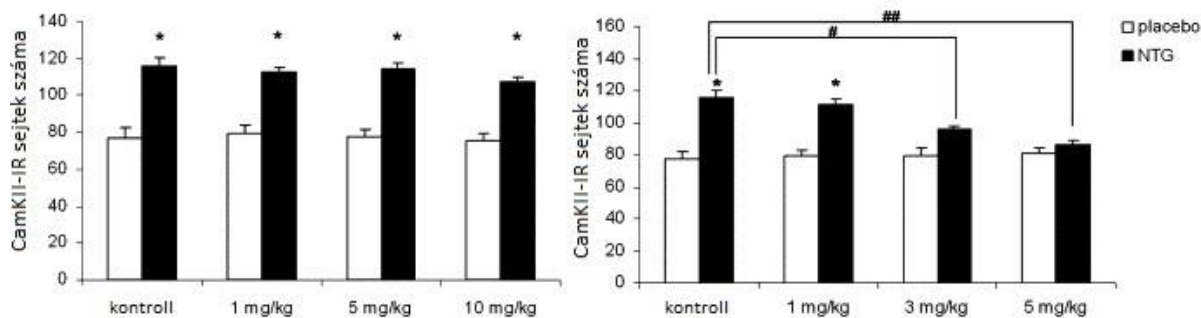
40. ábra. nNOS-IR sejtek a TNC-ben kontroll (a, b), COX2 inhibitor NS398 előkezelés (c, d) és COX1 gátló SC560 előkezelés (e, f) után, placebo (a, c, e) és NTG injekciókat (b, d, f) követően. A NS398 előkezelés kivédte a NTG okozta nNOS aktivációt. **COX**: ciklooxygenáz, **IR**: immunoreaktív, **nNOS**: neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag. Lépték: 50 μ m.



41. ábra. nNOS-IR sejtek számát ábrázoló hisztogram SC560, ill. NS398 előkezelés (COX1 és COX2 gátló) különböző dózisaival placebo, illetve NTG adása után a patkány TNC-ben. A SC560 előkezelésnél a NTG megemeli a nNOS expressziót, míg a NS398 esetében ez a hatás dóziszfüggő módon eltűnik (átlag + S.E.M, csoportonként, #, * $p < 0,05$). COX: ciklooxygenáz, IR: immunoreaktív, nNOS: neuronális nitrogén-oxid szintáz, NTG: nitroglicerín, TNC: kaudális trigeminális mag.



42. ábra. CamKII-IR sejtek a TNC-ben kontroll (a, b), NS398 (COX2 gátló) előkezelés (c, d) és SC560 (COX1 gátló) előkezelés (e, f) után placebo (a, c, e) és NTG injekciókat (b, d, f) követően. A NS398 előkezelés kivédte a NTG okozta CamKII aktivációt. CamKII: kalmodulin-függő protein kináz II, COX: ciklooxygenáz, IR: immunoreaktív, NTG: nitroglicerín, TNC: kaudális trigeminális mag. Lépték: 50 μ m.



43. ábra. A CamKII-IR sejtek számát ábrázoló hisztogram SC560 (COX1 gátló), ill. NS398 (COX2 gátló) előkezelés különböző dózisaival placebo, illetve NTG adása után a patkány TNC-ben. A SC560 előkezelésnél a NTG megemeli a CamKII expressziót, míg a NS398 esetében ez a hatás dóziszfüggő módon eltűnik (átlag + S.E.M., csoportonként, #, * p<0,05, ## p<0,01). **CamKII:** kalmodulin-függő protein kináz II, **COX:** ciklooxygenáz, **IR:** immunoreaktív, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag.

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., 2003b). A COX2 gátló celecoxibbal ellentétben a COX1 inhibitor SC560 nem tudta csökkenteni a karragenin okozta ödémát és hiperalgéziát (Smith és mtsai., 1998). Orális vagy intratekális SC560 adása nem befolyásolta a formalin teszt alatt kialakuló viselkedéses választ, míg a celecoxib és az indometacin igen (Yamamoto és mtsai., 2002). Összegezve tehát, 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

(Párdutz és mtsai., 2004)

Háttér

A triptánok a migrén specifikus rohamkezelésében leginkább alkalmazott farmakonok, melyek a 5HT_{1B/1D} receptorok agonistáiként csökkentik a trigeminális nocicepciót és igen hatékonyak a fejfájás

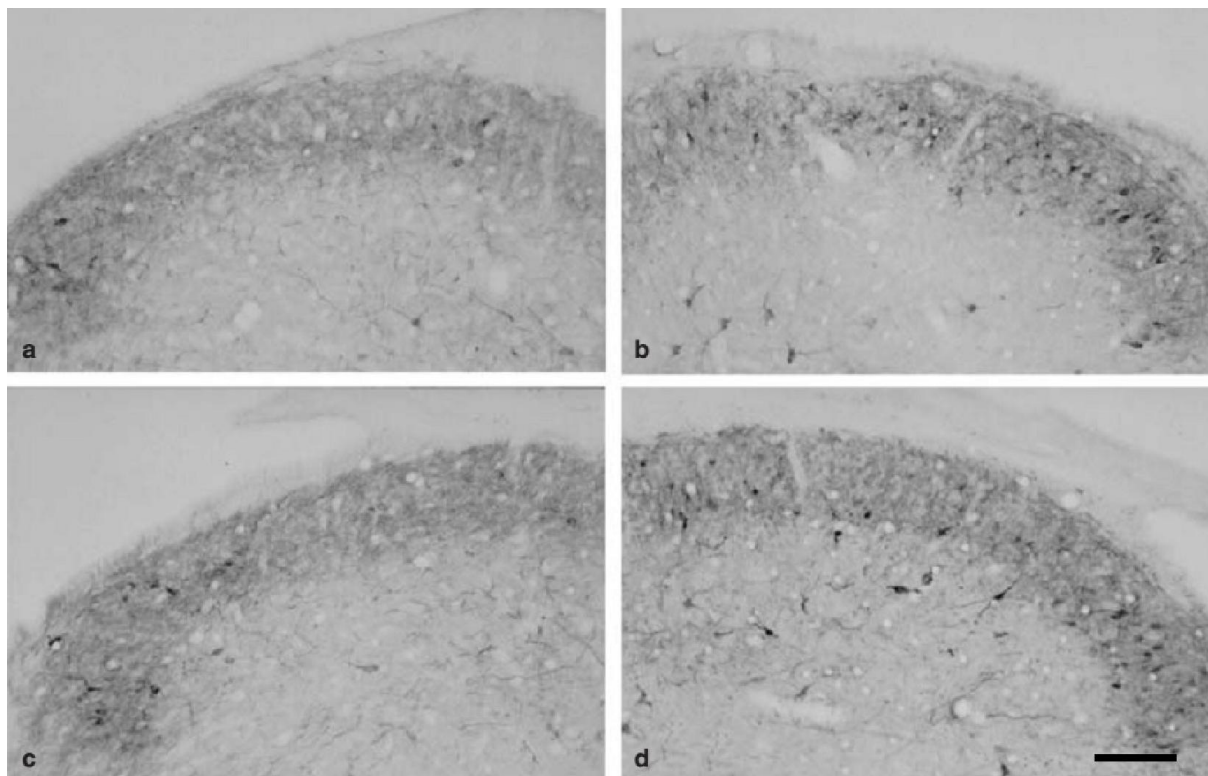
csillapításában (Buzzi és Moskowitz 1991). A NO donor NTG aktiváló és szenzitizációs hatásában elsősorban a trigeminális elsődleges érző neuronok centrális nyúlványai vehetnek részt, melyeken megtalálható a 5HT_{1D} receptor is (De Vries és mtsai., 1999, Hargreaves és Shephard 1999), ezért fontos lehet a triptánok vizsgálata a migrén állatkísérletes modelljeiben.

Anyag és módszer

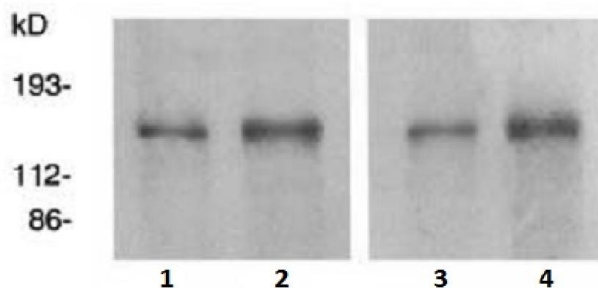
Hasonlóan a korábbiakhoz felnőtt hím patkányokat használtunk. Az előkezelés szempontjából az állatokat két csoportra osztottuk, az aktív előkezelést kapó csoportban a patkányok 0,6 mg/kg dózisú szumatriptán (Imitrex® GSK, Egyesült Királyság) injekciót kaptak. Tíz perccel később az állatok felét NTG-vel, míg a másik felét a NTG oldószerével kezeltük. Négy óra elteltével az állatokat perfundáltuk és a TNC-t eltávolítottuk nNOS immunhisztokémia (n=8 csoportonként) és Western blot céljából (n=5 csoportonként). A pozitív sejteket megszámoztuk és megmértük a blotok relatív optikai denzitását. A nNOS sejtszámok és a β -aktinra korrigált optikai denzitások statisztikai elemzését ANOVA-val és Scheffe post-hoc teszttel végeztük. Bővebben lásd a 6.1.1. a 6.3.1. és a 6.3.2. szakaszt.

Eredmények

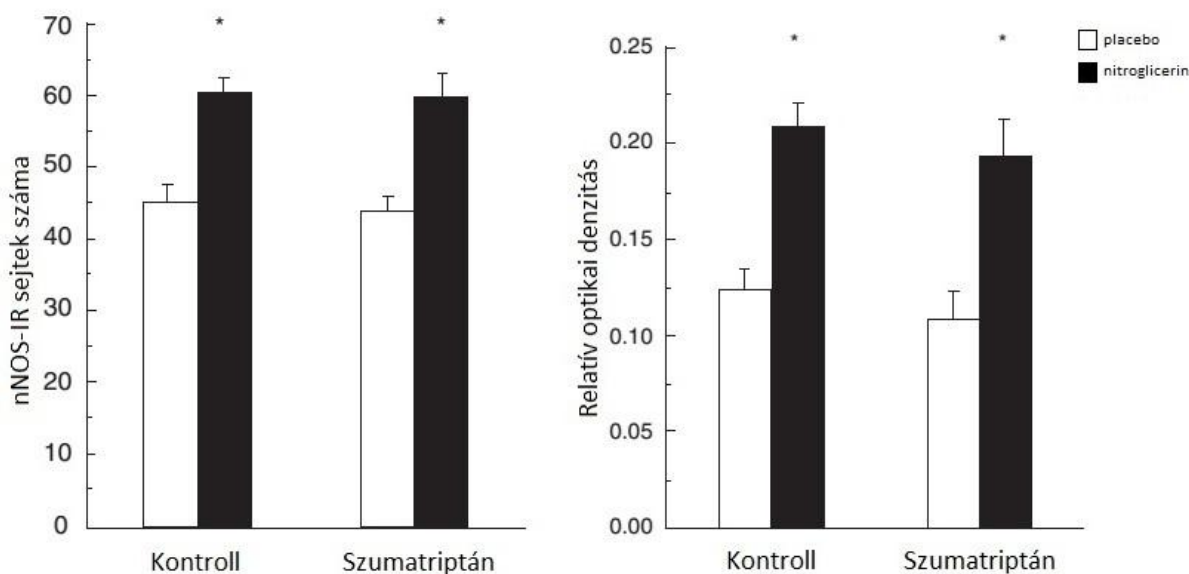
Mind az immunhisztokémiai, mind a Western blot analízis azt mutatta, hogy a NTG okozta nNOS expressziónövekedést nem védte ki a szumatriptán előkezelés (**44-46. ábra**).



44. ábra. nNOS-IR a TNC transzverzális metszetein az obektól -6 mm-re nem előkezelt (a, b) és szumatriptánnal előkezelt (c, d) állatokban. Az oldószerhez viszonyítva (a, c) a NTG megemelte a nNOS sejtszámot mind a nem előkezelt (b), mind a szumatriptánt kapott csoportban (d). **IR:** immunoreaktív, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag. Lépték 50 μ m.



45. ábra. nNOS Western blot a TNC-ből nem előkezelt (1, 2) és szumatriptánnal előkezelt (3, 4) állatokban. Az oldószerhez viszonyítva (1, 3) a NTG megemelte a nNOS mennyiségét a nem előkezelt csoportban (2), és a szumatriptán nem volt képes ezt a hatást kivédeni (4). **nNOS**: neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag.



46. ábra. nNOS-IR sejtek számát és Western blot optikai denzitását ábrázoló hisztogram a kontroll és szumatriptán előkezelést kapott hím patkányok TNC-jében négy órával a NTG és placebo előkezelés után. A NTG szignifikánsan megemeli a nNOS-IR sejtek számát, a nNOS expresszióját, és ezt a hatást a szumatriptán nem befolyásolja (átlag + S.E.M, n=8, illetve 5 csoportonként, * p<0,05). **IR**: immunoreaktív, **nNOS**: neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG**: nitroglicerín, **TNC**: kaudális trigeminális mag.

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 háttérében a centrális primer afferensek és a másodlagos érző neuronok közötti önerősítő folyamatot feltételezünk. Ebben az esetben a primer afferenseken megtalálható 5HT_{1B/D} agonista farmakon, a transzmitterfelszabadulás gátlása révén megszakíthatja ezt a folyamatot (Arvieu 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/D} 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 (Srikiatkachorn és mtsai., 2002). Ezek alapján a 5HT_{1B/D} 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 hidrophil vegyület, nehezen megy át a vér-agy gáton (Humphrey és mtsai., 1991), és nem képes hatékonyan modulálni a TNC-ben zajló önerősítő folyamatot. Ezzel párhuzamba állítható az a kísérleti eredmény, melyben a szumatriptán csak akkor volt hatékony a sinus sagittalis superior ingerlése után, ha az állatok előzőleg a vér-agy gátat károsító mannitol kezelést 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 ativalására (Jones és mtsai., 2001). Lehet, 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

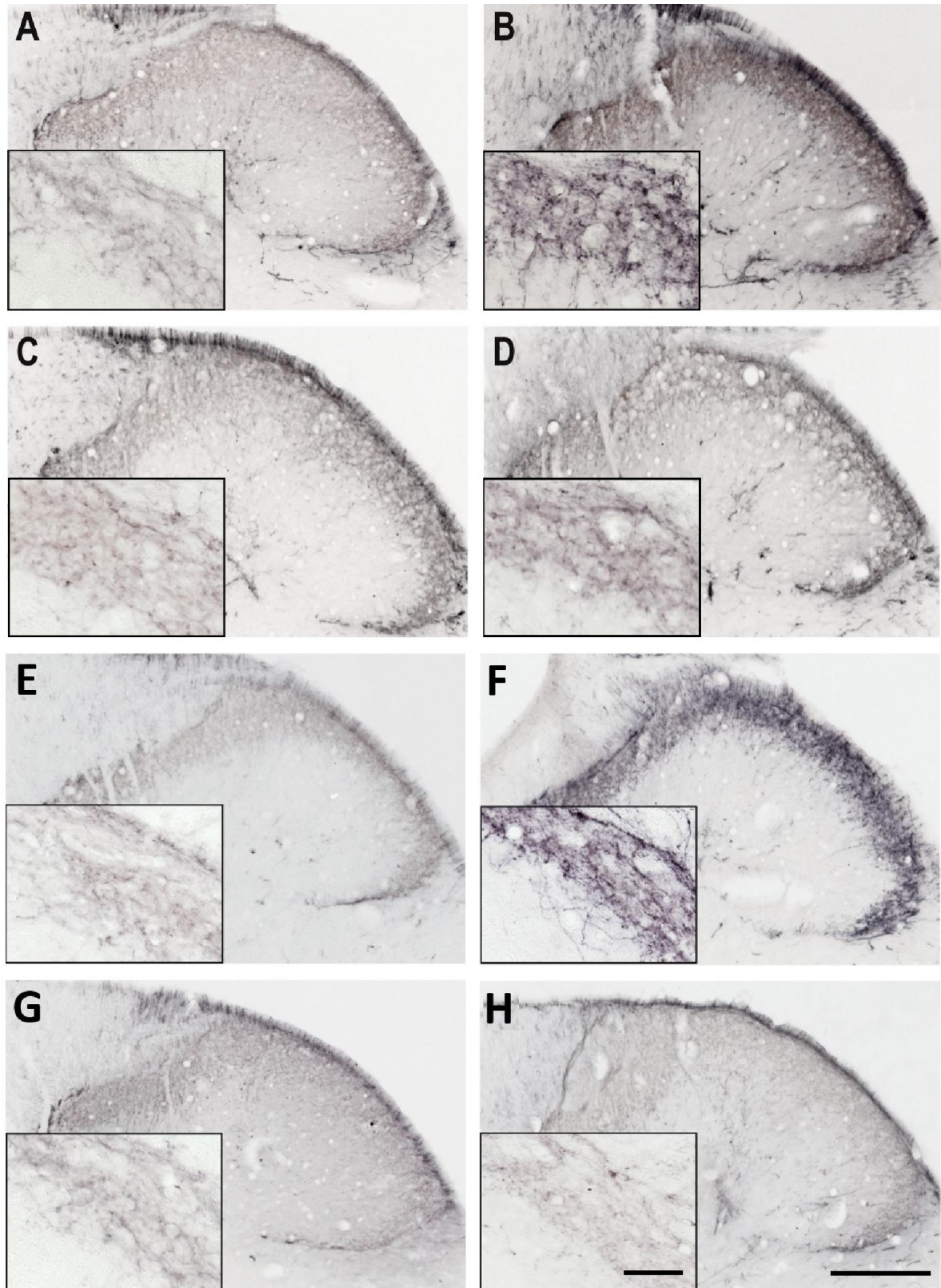
(Spekker és mtsai., 2021)

Anyag és módszer

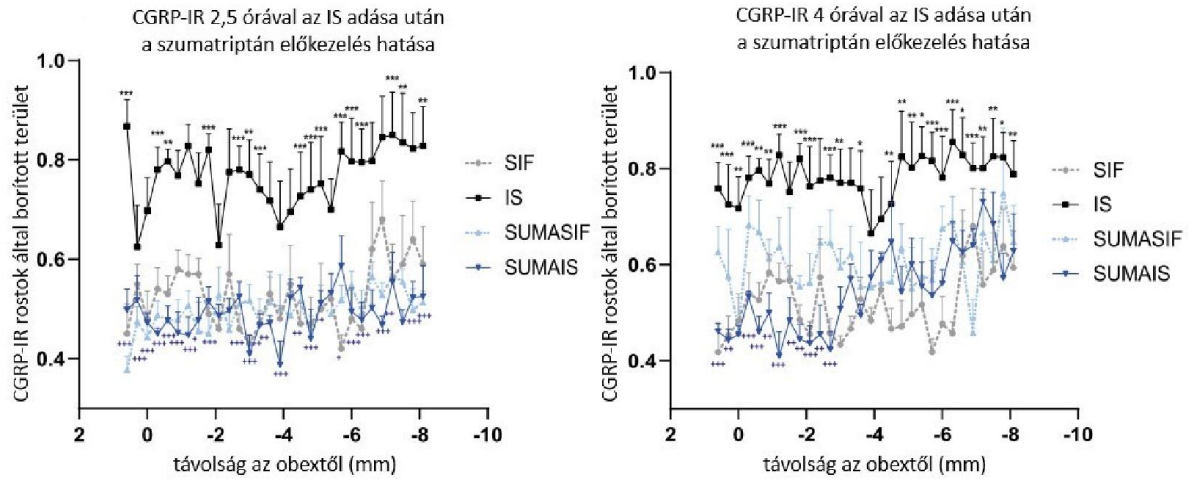
Az IS és SIF kezelés előtt 10 perccel az állatok fele szumatriptán (Imigran® GSK, Egyesült Királyság) injekciót kapott s.c. 0,6 mg/kg dózisban, ezt követően a korábbiakban leírtak szerint történt a dura IS és SIF kezelése. Kettő és fél, illetve 4 óra múlva az állatokat perfundáltuk és a TNC-t CGRP, TRPV1 és nNOS immunhisztokémiai festések céljából eltávolítottuk (n=6 csoportonként). A CGRP és TRPV1 pozitív rostok által fedett területet képanalizátor segítségével határoztuk meg, míg a nNOS pozitív sejteket megszámoztuk. Részletesebben a metodika szekció 6.1.1., 6.3.1. és 6.3.4. részében olvasható. Az obextől különböző távolságra lévő metszeteken mért és számolt adatokat az egyes csoportokban ismételt méréses ANOVA-val hasonlítottuk össze Holm-Sidak módszerrel kiegészítve.

Eredmények

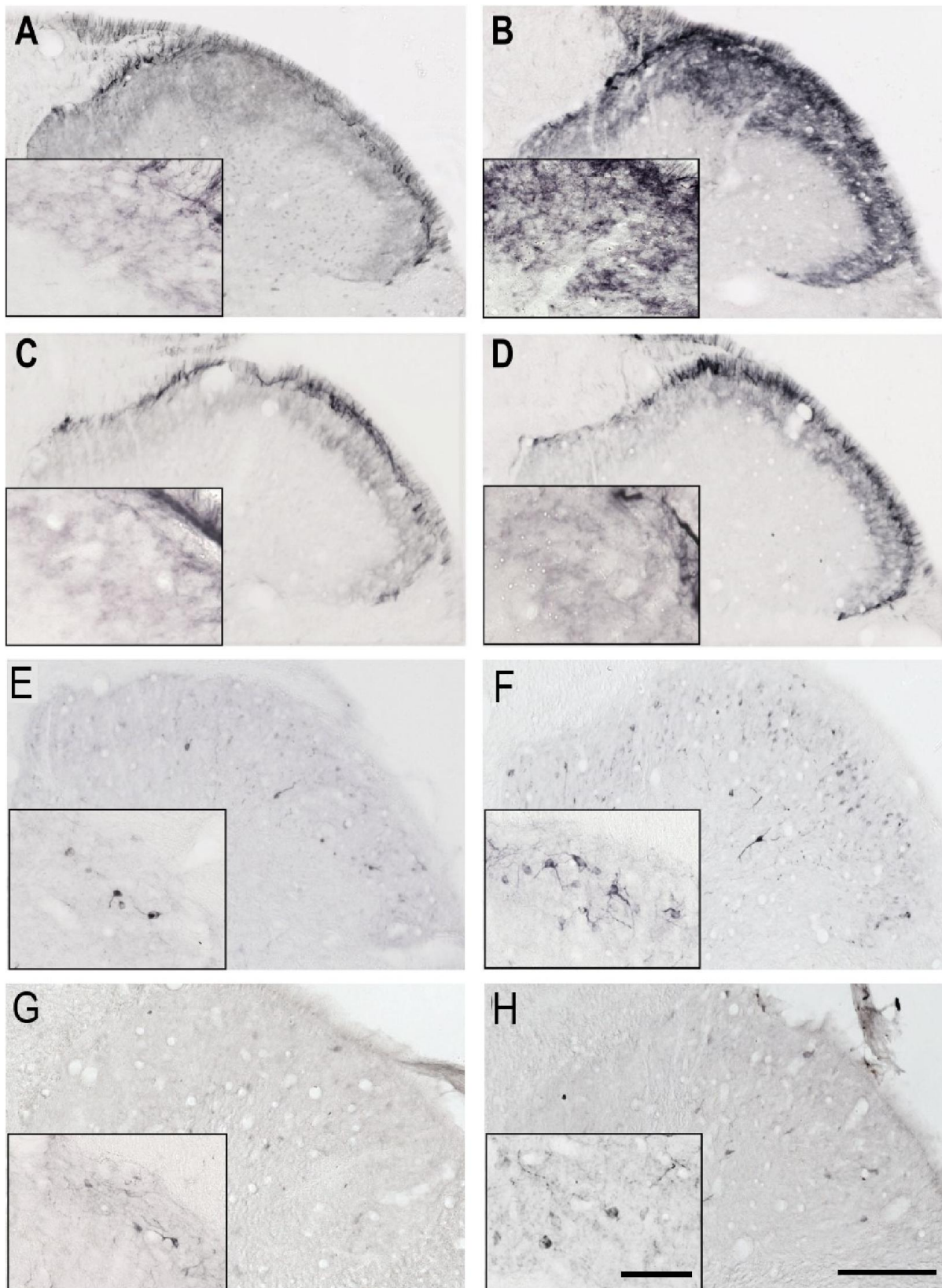
Az IS kezelt állatokban mind a 3 marker expressziója szignifikánsan magasabb volt (CGRP 2,5 és 4 óra után, TRPV1, nNOS 4 órát követően). A szumatriptán előkezelés ezen hatásokat képes volt szignifikáns módon csökkenteni (**47-50. ábra**).



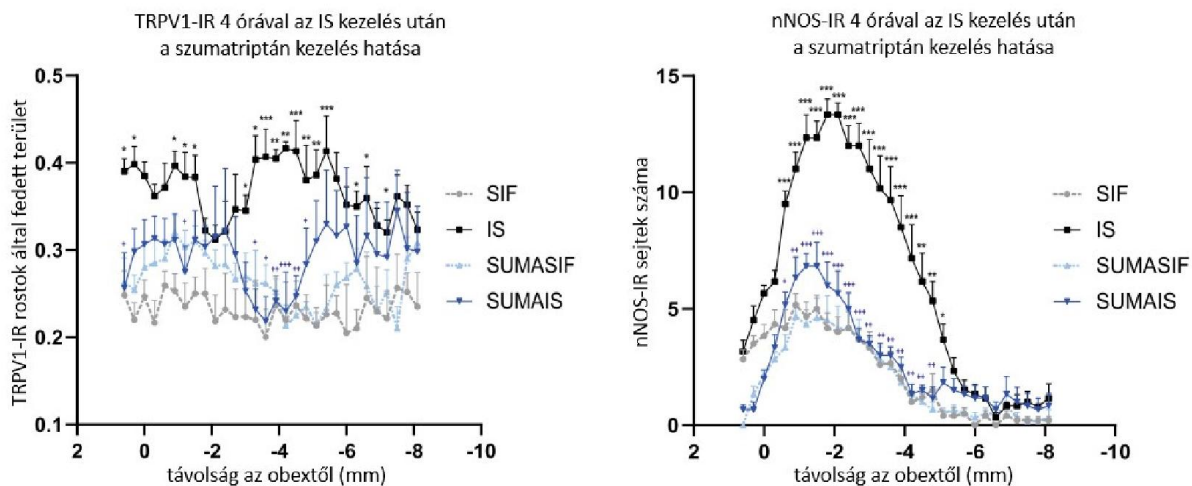
47. ábra. Reprezentatív transzverzális metszetek a patkány TNC területéről IS (B, D, F, H) és SIF (A, C, E, G) kezelés után 2,5 (A-D) és 4 órával (E-H). Az állatok fele (C, D, G, H) szumatriptán előkezelést kapott 0,6 mg/kg dózisban. Az aktív kezelés (IS) megemeli a CGRP (B, F), expressziót a hátsó szarv területén a kontrollhoz (A, E) képest. A szumatriptánt kapott állatoknál ilyen változás nem látható. Ez a nagyobb nagyítású képeken is jól észlelhető. **CGRP:** kalcitonin génrelációs peptid, **IS:** inflammatory soup, **SIF:** szintetikus intersticiális folyadék, **TNC:** kaudális trigeminális mag. Lépték: 200, ill. 50 μ m.



48. ábra. A CGRP expresszió a TNC-ben 2,5 és 4 órával az IS és SIF kezelést követően. Az IS hatására szignifikánsan emelkedik a CGRP a kontrollhoz (SIF) viszonyítva, míg a szumatriptán előkezelést kapott állatokban nincs különbség az aktív kezelt csoport (SUMAIS) és a kontroll (SUMASIF) között (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001). **CGRP:** kalcitonin génrelációs peptid, **IR:** immunoreaktív, **IS:** inflammatory soup, **SIF:** szintetikus intersticiális folyadék, **TNC:** kaudális trigeminális mag.



49. ábra. Reprezentatív transzverzális metszetek a patkány TNC területéről IS (B, D, F, H) és SIF (A, C, E, G) kezelés után 4 órával TRPV1 (A-D) és nNOS (E-H) immunhisztokémiai festéssel. Az állatok fele (C, D, G, H) szumatriptán előkezelést kapott 0,6 mg/kg dózisban. Az aktív kezelés (IS) megemeli a TRPV1 (B), és nNOS (F) expressziót a hátsó szarv területén a kontrollhoz (A, ill. E) képest. A szumatriptánt kapott állatoknál ilyen változás nem látható. Ez a nagyobb nagyítású képeken is jól észlelhető. **IS:** inflammatory soup, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **SIF:** szintetikus intersticiális folyadék, **TNC:** kaudális trigeminális mag, **TRPV1:** tranziens receptor potenciál vanilloid. Lépték: 200, ill. 50 μ m.



50. ábra. A TRPV1 és nNOS expresszió a TNC-ben 4 órával az IS és SIF kezelést követően. Az IS hatására szignifikánsan emelkedik a TRPV1 és nNOS a kontrollhoz (SIF) viszonyítva, míg a szumatriptán előkezelést kapott állatokban nincs különbség az aktív kezelt csoport (SUMAIS) és a kontroll (SUMASIF) között (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001). **IR:** immunoreaktív, **IS:** inflammatory soup, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **SIF:** szintetikus intersticiális folyadék, **TNC:** kaudális trigeminális mag, **TRPV1:** tranziens receptor potenciál vanilloid.

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 TRPV1-et moduláló hatása 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 peptidek 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 ösztradiol hatása a NTG modellben

Fejes-Szabó és mtsai., 2018, Párdutz és mtsai., 2002, Párdutz és mtsai., 2006)

Háttér

A fájdalom intenzitásának érzékelése és a fájdalomcsillapítókra adott válasz különbözhet a nemeknél; alacsonyabb fájdalomküszöb, érzékenyebb fájdalomdiskrimináció 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 arcidegszába, melyre a rövid, intenzív, visszatérő fájdalomérzés jellemző a trigeminus ágainak egyes területén (Katusic és mtsai., 1990).

A nemi hormonok, elsősorban az ösztradiol, lényegesen befolyásolják a primer fejfájások, így a migrén klinikai képét is. 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 nemi hormonok lényegesen befolyásolhatják a trigeminális fájdalomérzést.

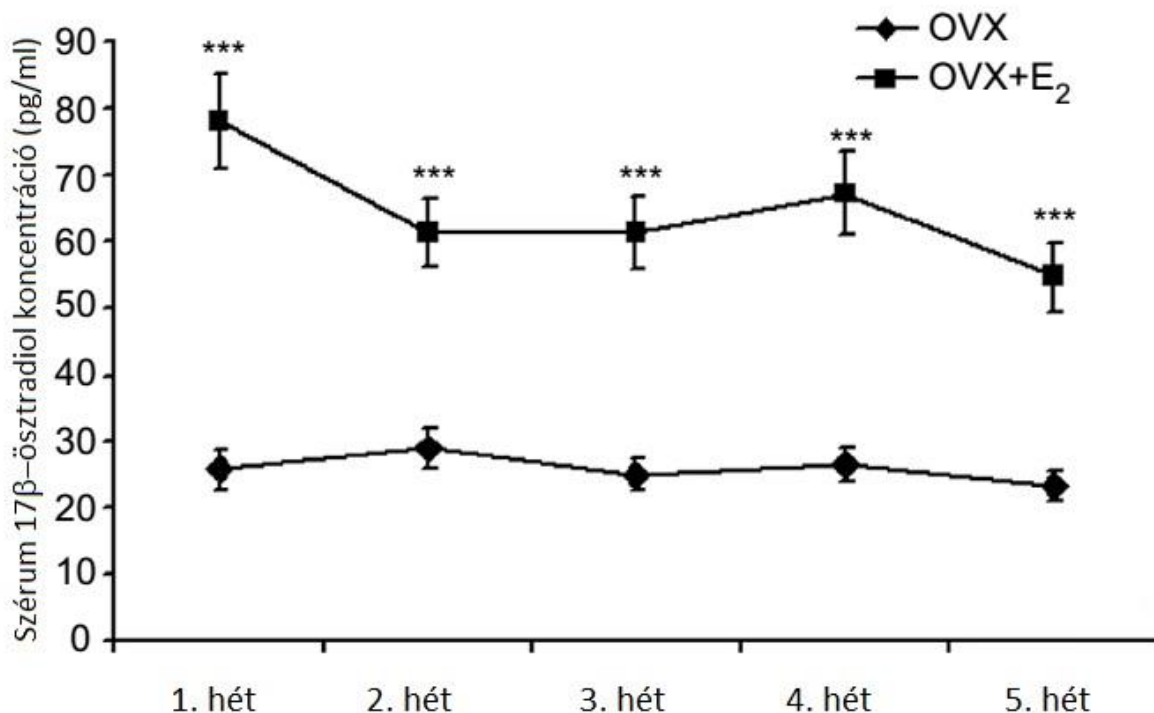
Az állatkísérletes eredmények is megerősítik a fájdalomérzésben fellelhető szexuális dimorfizmust, valamint a nemi hormonok moduláló hatását az orofaciális fájdalomérzés kapcsán (Cairns 2007), továbbá patkányoknál igazolt a nemi hormonok befolyása a lokalizációfüggő fájdalom esetében (Pajot és mtsai., 2003). A kraniofaciális fájdalomérzetet érintő nemi kettősség arra utal, hogy a trigeminális neuronok érzékenyek a nemi hormonokra, melyek módosíthatják a 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 ösztradiol kezelés hatását vizsgálni a patkány NTG modelljében.

Anyag és módszer

Két hónapos felnőtt nőtény Sprague-Dawley patkányokat mély anesztézia alkalmazásával ovariektomizáltunk. Az ösztrogénkezelt csoport állatainál 15 mm hosszú (3,18 mm külső és 1,57 mm belső átmérőjű) silastic kapszulát ültettünk a bőr alá, mely 17β -ösztradiol és koleszterol 1:1 arányú keverékével volt megtöltve (OVX+E₂). A hormonkezelést nem kapó állatok (OVX) csak koleszterolt tartalmazó kapszulát kaptak (n=5 csoportonként). Bővebben lásd a 6.2. fejezetben. A beültetést követően heti gyakorisággal, 5 alkalommal vért vettünk a farokvénából, majd centrifugálás után (12000 rpm, 10 percen át, 4°C hőmérsékleten) a szérumból ösztradiol szintet mértünk az Ösztradiol EIA Kit segítségével (Cayman Chemical Company, USA) a gyártó instrukciói alapján. Az adatokat ismételt mérés ANOVA-val hasonlítottuk össze, ahol a független szempont a kezelés volt, az egyedeken belüli szempont pedig a mérés ideje. Ezt követően a páronkénti összehasonlítás Holm-Sidak korrekcióval történt.

Eredmények

A mért ösztradiol 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. Érdekes módon az OVX állatoknál is mérhető sokkal alacsonyabb, de nem elhanyagolható ösztrogénszint a plazmában (**51. ábra**), mely extragonadális eredetűnek tartható (Zhao és mtsai., 2005).



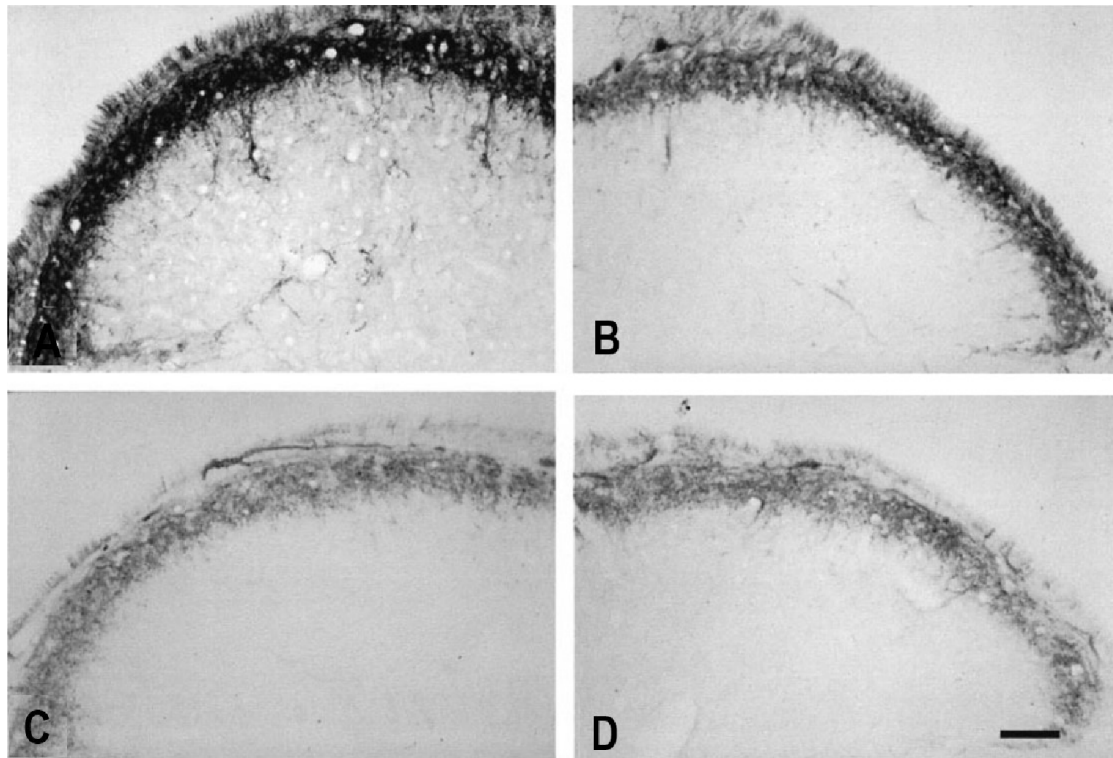
51. ábra. A 17 β -ösztadiol koncentrációja az ovariektomizált (OVX) és az ovariektomizált, ösztrogénkezelt (OVX+E₂) állatoknál a kapszulák beültetése utáni hetekben. Az ösztadiol tartalmú kapszula szignifikánsan megemelte a szérumban a 17 β -ösztadiol koncentrációját mindegyik vizsgált időpontban. (átlag \pm S.E.M, n=5 csoportonként, *** p<0,001).

Anyag és módszer

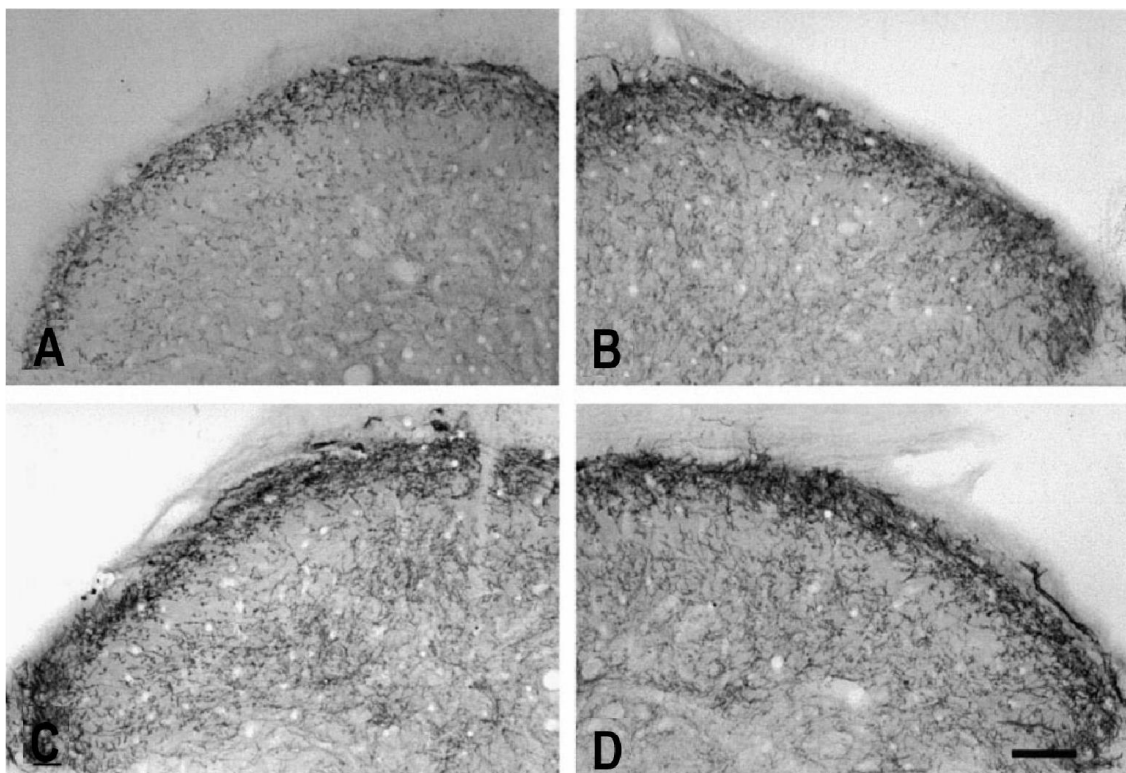
Felnőtt nőstény patkányok ovariektomiáját követően az állatok felénél 17 β -ösztadiol (OVX+E₂), másik felénél koleszterol (OVX) tartalmú kapszulát ültettünk a bőr alá a fentieknek megfelelően. Egy hónappal később az állatok fele egyszeri s.c. NTG injekciót kapott 10 mg/kg dózisban, míg a többi állatot a NTG oldószerével kezeltük. A kezelést követően négy órával a patkányokat (n=8 csoportonként) 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, 5HT) és a festődést mutató sejtek számát (CamKII) vizsgáltuk. A Western blot esetében a relatív optikai denzitásértékeket hasonlítottuk össze. Lásd a metodika rész 6.1.1., 6.2., 6.3.1., 6.3.2. és 6.3.4. szakaszát. Az adatokat ANOVA-val vizsgáltuk, az egyedeken belüli szempont a gerincvelői lokalizáció, míg a független szempont pedig a kezelés volt, majd a páronkénti összehasonlításkor kétmintás t-próbát használtunk.

Eredmények

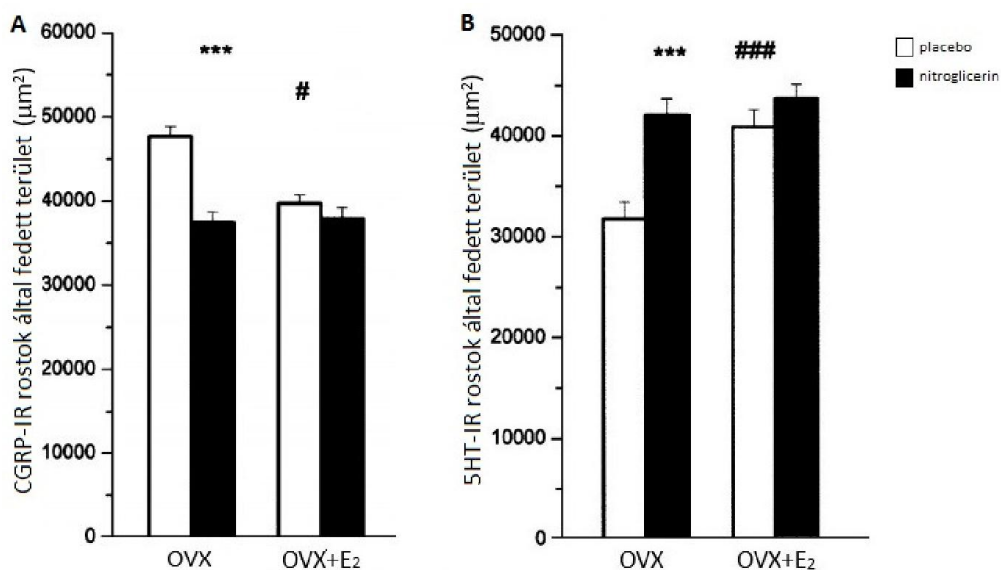
Az OVX állatokban a hímek eredményeihez hasonlóan a NTG kezelés markáns változásokat okozott. A CGRP-IR rostok által lefedett terület csökkent, míg a 5HT és a CamKII expresszió szignifikánsan emelkedett a NTG hatására a TNC területén. Az OVX+E₂ patkányoknál a NTG hatása nem érvényesült és az alap expresszió a CGRP esetén alacsonyabb, míg a 5HT esetében magasabb volt (52-57. ábra).



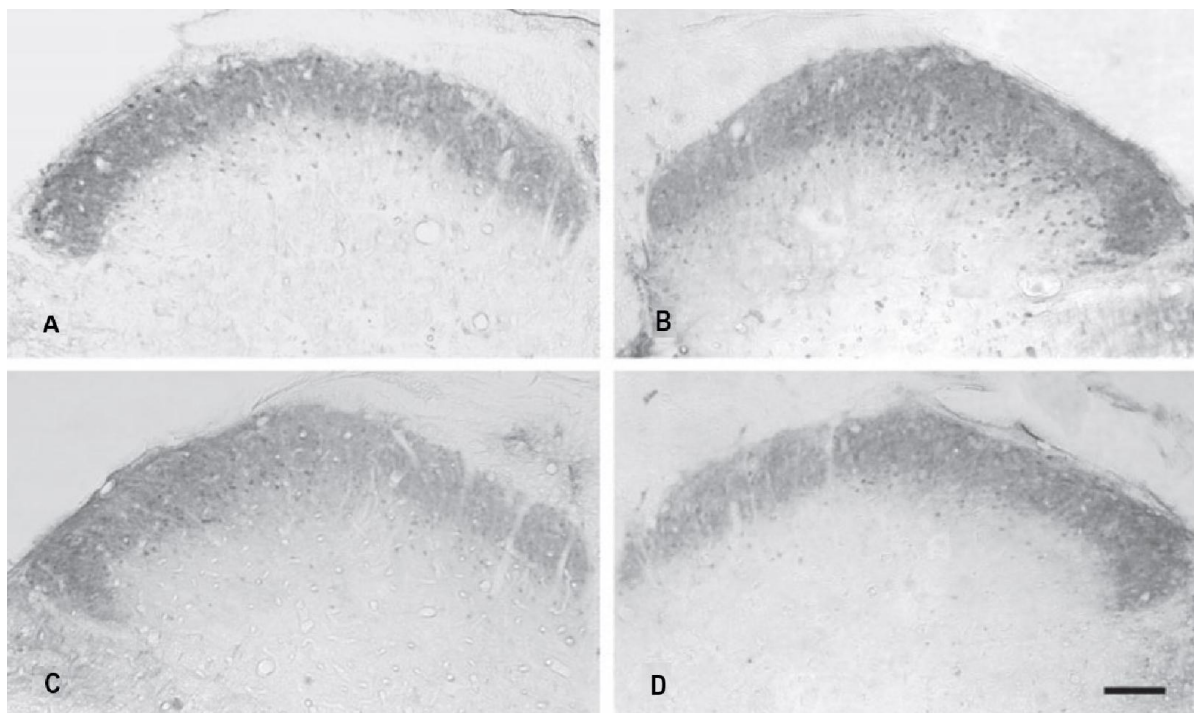
52. ábra. CGRP-IR nőstény patkány TNC transzverzális metszetein. OVX patkányokban a NTG előkezelés (B) lecsökkenti a CGRP pozitív rostok mennyiségét a kontrolhoz (A) képest, az OVX+E₂ csoportban (C,D) nem látunk ilyen hatást. **CGRP:** kalcitonin génrelációs peptid, **IR:** immunoreaktív, **NTG:** nitroglicerín, **OVX:** ovariectomizált, **OVX+E₂:** ovariectomizált, ösztrogénkezelt állatok, **TNC:** kaudális trigeminális mag. Lépték: 50 µm.



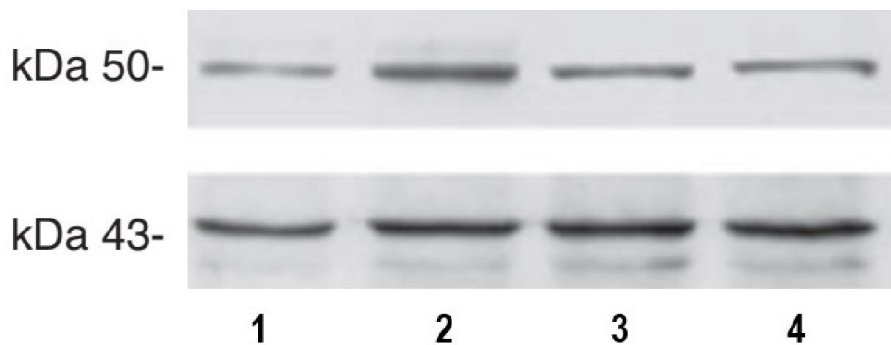
53. ábra. 5HT-IR nőstény patkány TNC transzverzális metszetein. A NTG előkezelés (B) megemeli a 5HT pozitív rostok mennyiségét a kontrollhoz képest (A) az OVX patkányokban, az OVX+E₂ csoportban nem látunk ilyen hatást (C, D). **5HT:** szerotonin, **IR:** immunoreaktív, **NTG:** nitroglicerín, **OVX:** ovariectomizált, **OVX+E₂:** ovariectomizált, ösztrogénkezelt állatok, **TNC:** kaudális trigeminális mag. Lépték: 50 µm.



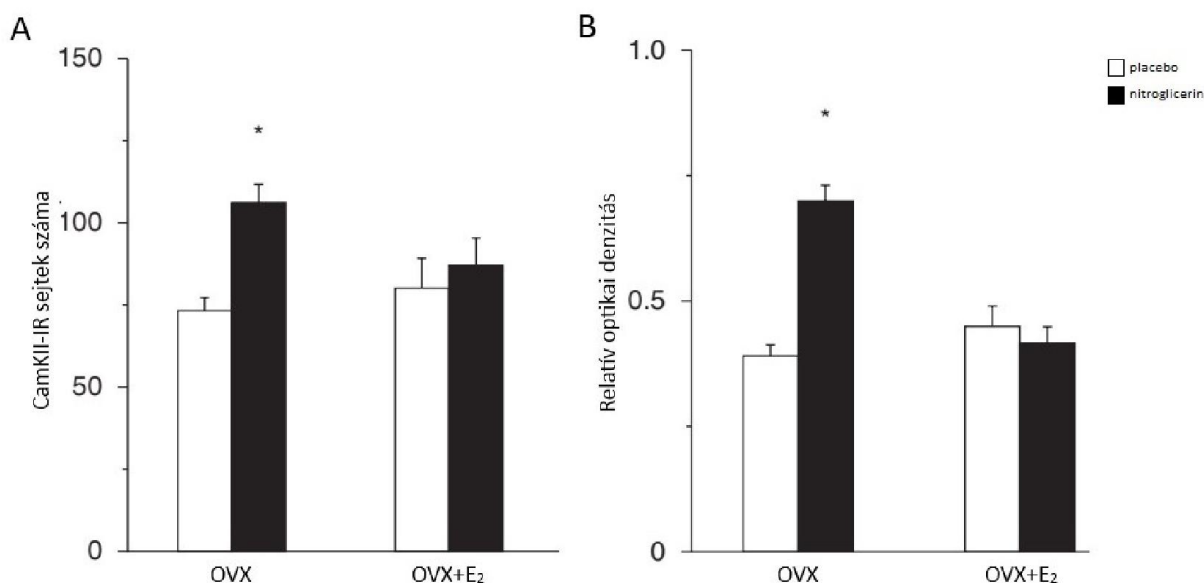
54. ábra. A: A TNC-ben megjelenő CGRP-IR rostok által fedett terület OVX és OVX+E₂ patkányokban 4 órával a placebo, illetve NTG adása után (átlag + S.E.M, n=8). Az OVX állatokban szignifikánsan csökkent a beidegzett terület NTG után (***) p<0,001), míg az OVX+E₂ állatokban nem. A placebokezelt csoportokban az OVX+E₂ állatokban a CGRP-IR rostok által fedett terület szignifikánsan alacsonyabb az OVX állatokhoz képest (# p<0,05). B: A TNC-ben megjelenő 5HT-IR rostok által fedett terület OVX és OVX+E₂ patkányokban 4 órával a placebo, illetve NTG adása után (átlag + S.E.M, n=8). Az OVX állatokban szignifikánsan emelkedett a beidegzett terület NTG után (***) p<0,001), míg az OVX+E₂ állatokban nem. A placebokezelt csoportokban az OVX+E₂ állatokban a 5HT rostok által fedett terület szignifikánsan magasabb az OVX állatokhoz képest (### p<0,001). **5HT:** szerotonin, **CGRP:** kalcitonin génrelációs peptid, **IR:** immunoreaktív, **NTG:** nitroglicerín, **OVX:** ovariectomizált, **OVX+E₂:** ovariectomizált, ösztrogénkezelt állatok, **TNC:** kaudális trigeminális mag.



55. ábra. CamKII-IR nőstény patkány TNC transzverzális metszetein. A NTG előkezelés (B) megemeli a CamKII pozitív sejtek mennyiségét a kontrollhoz képest (A) OVX állatokban, míg az OVX+E₂ csoportban (C, D) nem. **CamKII:** kalmodulin-függő protein kináz II, **IR:** immunoreaktív, **NTG:** nitroglicerín, **OVX:** ovariectomizált, **OVX+E₂:** ovariectomizált, ösztrogénkezelt állatok, **TNC:** kaudális trigeminális mag. Lépték: 50 µm.



56. ábra. CamKII (50 kDa) és β -aktin (43 kDa) Western blot nőstény patkányok TNC-jéből placebo (1, 3) és NTG (2, 4) előkezelés után. Az OVX (1, 2) állatokban a CamKII expresszió megnő NTG után, míg az OVX+E₂ (3, 4) állatok esetében nincs ilyen különbség. **CamKII:** kalmodulin-függő protein kináz II, **NTG:** nitroglicerín, **OVX:** ovariectomizált, **OVX+E₂:** ovariectomizált, ösztrogénkezelt állatok, **TNC:** kaudális trigeminális mag.



57. ábra. A TNC-ben megjelenő CamKII-IR sejtek száma (A) és CamKII optikai denzitása (B) OVX és OVX+E₂ patkányokban 4 órával a placebo, illetve NTG adása után (átlag + S.E.M, n=8, illetve n=5 csoportonként). Az OVX állatokban szignifikánsan magasabb a CamKII expresszió NTG után (* p<0,05), míg az OVX+E₂ állatokban ez nem észlelhető. **CamKII:** kalmodulin-függő protein kináz II, **IR:** immunoreaktív, **NTG:** nitroglicerín, **OVX:** ovariectomizált, **OVX+E₂:** ovariectomizált, ösztrogénkezelt állatok, **TNC:** kaudális trigeminális mag.

Megbeszélés

Kísérleti adataink igazolják, hogy az ösztradiol 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 (Moussaoui és mtsai., 1996), mind pedig az érző dúccok 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 ösztradiol plazmakoncentrációja magasabb, mely párhuzamba állítható a fenti, korábbi eredményekkel. Az ösztrogén receptorok jelen vannak a gerincvelői érző dúccok sejtjeiben (Yang

és mtsai., 1998, Taleghany és mtsai., 1999), valamint a gerincvelői szürkeállományban (Shughrue és mtsai., 1997). Az ösztradiol 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 ösztradiol 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 ösztradiol kezelés kivédi a NTG indukált CamKII emelkedést is. A hippocampusban, ahol a CamKII alapvető szerepet játszik a hosszú távú potenciációban, az ösztradiol 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 ösztradiol 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 ösztrogénszint 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 ösztradiol kezelés hatása az orofaciális formalin modellben

(Fejes-Szabó és mtsai., 2018)

Anyag és módszer

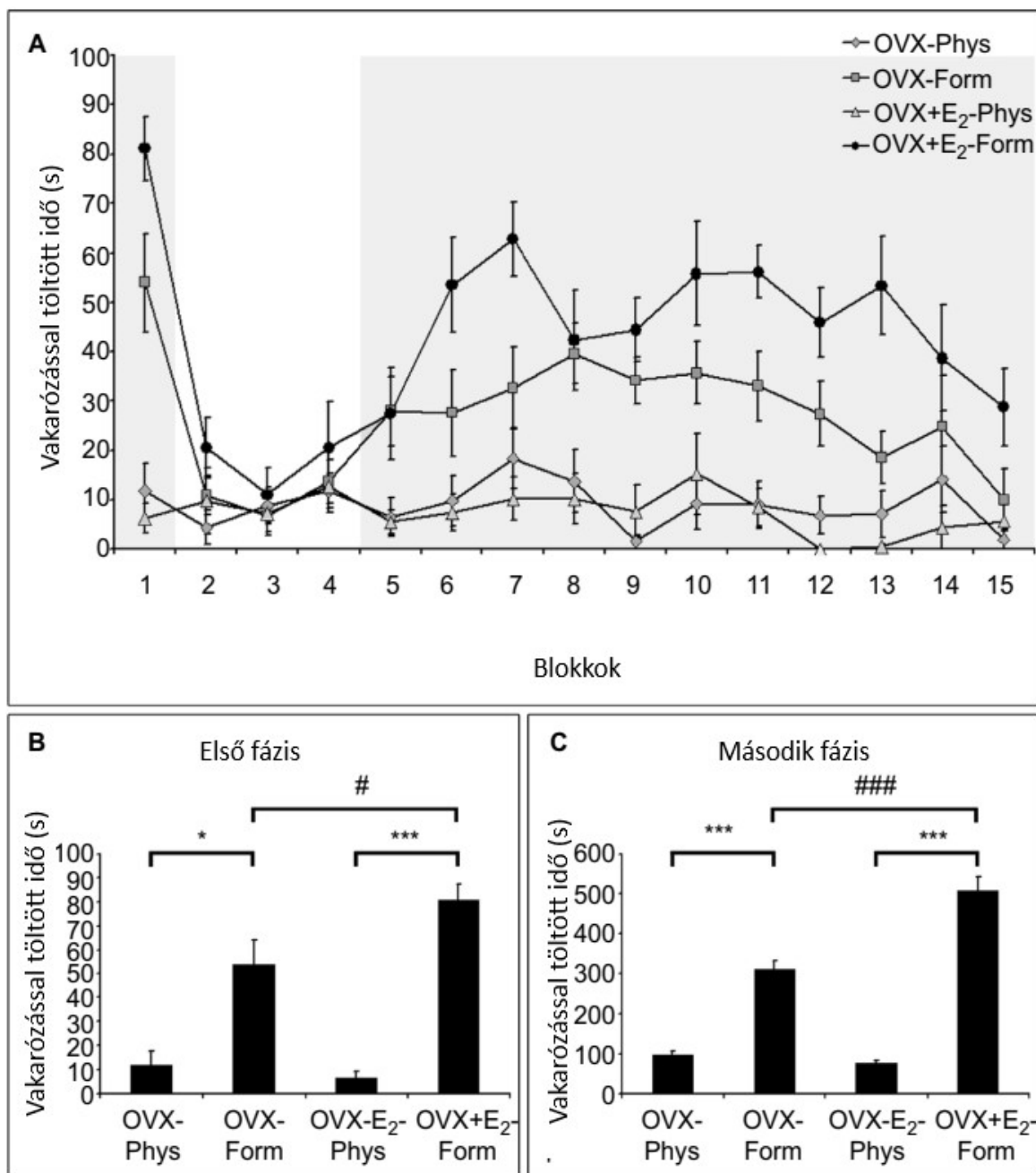
Felnőtt nőstény patkányok ovariectomiáját követően az állatok felénél ösztrogén (OVX+E₂), másik felénél koleszterol (OVX) tartalmú kapszulát ültettünk a bőr alá a korábbiakban leírtaknak megfelelően. 3 héttel később az állatokat két csoportba osztottuk: az első csoportban a patkányok egyszeri s.c. 50 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, n=10-12 csoportonként). A kezelést követően az állatok viselkedését tükörfalú terráriumban vizsgáltuk (30x30x30 cm), mely fölött 1 m-el kamerát helyeztünk el. 10 perces habituáció után az állatok megkapták az injekciót, majd 45 percig visszatettük őket. A 45 perces felvételt 3x15 perces blokkokra osztottuk, mely során egy független vizsgáló meghatározta, hogy mennyi időt töltöttek az állatok az injektált terület vakarásával. A viselkedésvizsgálatok adatait a korábban már leírtak szerint analizáltuk (Clavelou és mtsai., 1995). Bővebben megtalálható a 6.1.2., 6.2. és 6.3.5. fejezetekben. Az egyes csoportok közötti viselkedésbeli különbséget egytényezős ANOVA teszttel vizsgáltuk Tamhane post-hoc teszt segítségével. A szignifikancia szint p<0,05 volt.

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. Az obextől különböző

távolságra lévő metszeteken mért és számolt adatokat ismételt mérések ANOVA-val hasonlítottuk össze Sidak post-hoc teszttel kiegészítve. Részletesebben lásd a 6.3.1. szakaszt.

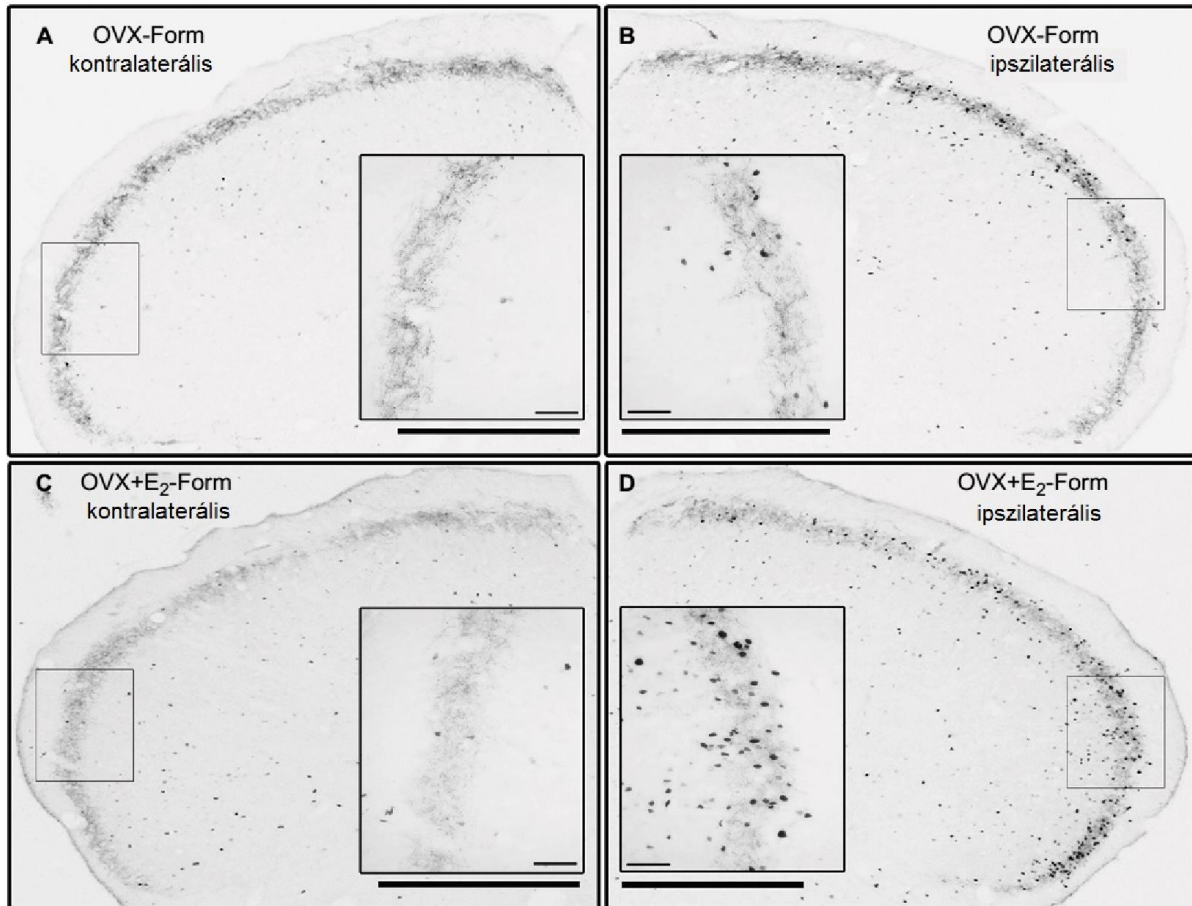
Eredmények

A viselkedési válasz követte a korábbi vizsgálatokban talált mintázatot. A fiziológias 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 (**58. ábra**).

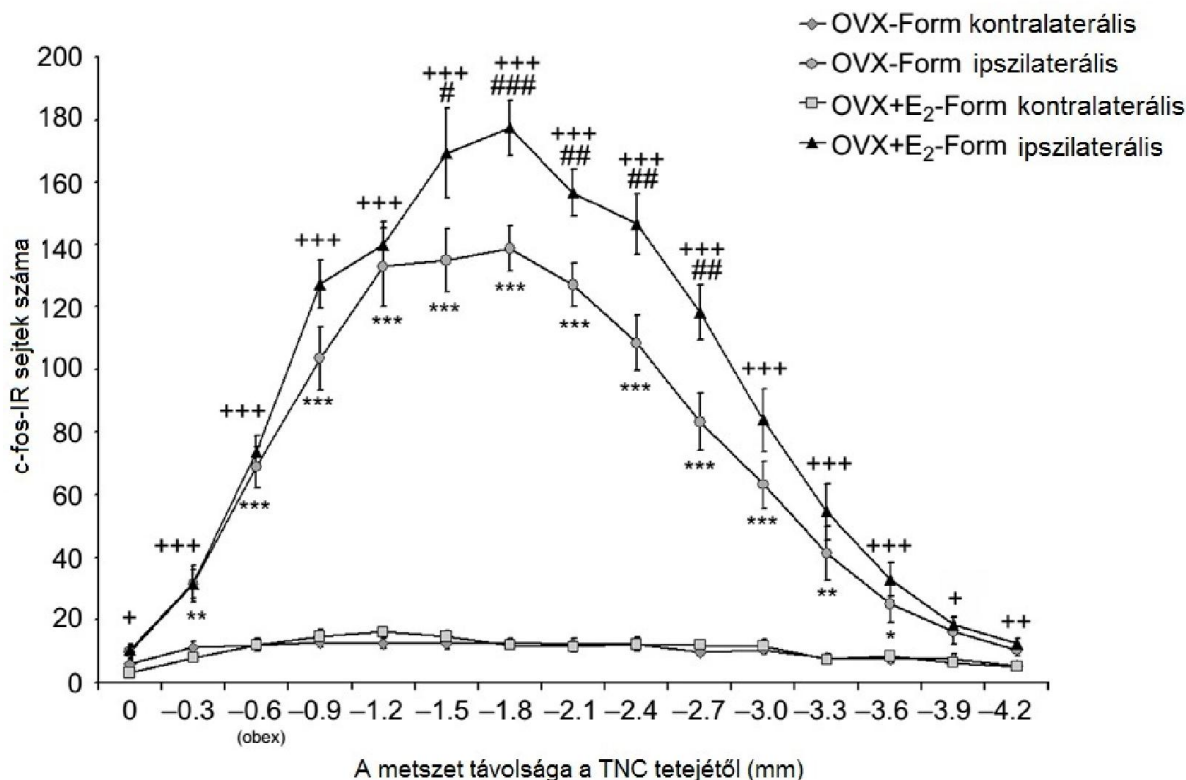


58. ábra. A fájdalommal összefüggő viselkedést mutató diagram az OVX-Phys, OVX+E₂-Phys, OVX-Form és OVX+E₂-Form csoportokban (átlag ± S.E.M, n=10-12 csoportonként). A teljes időtartam alatt vakarózással töltött idő ábrázolása 3 perces blokkokra osztva mind a négy állatcsoportot tekintve (A). Az OVX-Form és OVX+E₂-Form csoportokban a formalin hatás két fázisa jól látszik. Az első fázis (1. blokk, első szürke háttér) 3-4 percig tartott, melyet egy nyugalmi szakasz követett 9-10 percen keresztül (2-4. blokk, fehér háttér); a második fázis 30-33 percig tartott (5-15. blokk, második szürke háttér). A vakarózás kifejezettebb az OVX+E₂-Form csoportban az OVX+Form csoporthoz viszonyítva. Az OVX-Phys és OVX+E₂-Phys csoportban nem látszik a kétfázisú fájdalommal kapcsolatos viselkedésminta. A vakarózással töltött idő két fázisra bontva (B, C) mind a négy állatcsoportban (átlag + S.E.M, n=10-12 csoportonként). A formalin injekció (OVX-Form, OVX+E₂-Form) mind az első mind a második fázisban szignifikánsan megemelte a vakarózási időt a sóoldattal kezelt állatokhoz képest (OVX-Phys, OVX+E₂-Phys, * p<0,01, *** p<0,001). Az ösztadiol mindkét fázisban fokozta a formalin okozta viselkedésválaszt az OVX-Form csoporthoz viszonyítva (# p<0,05, ### p<0,001). **OVX-Form:** ovariectomizált állatok, melyek bajuszpárnájukba formalin injekciót kaptak, **OVX+E₂-Form:** ovariectomizált, ösztadiol kezelt állatok, melyek bajuszpárnájukba formalin injekciót kaptak, **OVX-Phys:** ovariectomizált állatok, melyek bajuszpárnájukba fiziológias sóoldatot injekciót kaptak, **OVX+E₂-Phys:** ovariectomizált, ösztadiol kezelt állatok, melyek bajuszpárnájukba fiziológias sóoldatot injekciót kaptak.

A c-fos expresszióban nem volt különbség a sóoldattal kezelt állatok ipszi- és kontralaterális oldala, valamint a formalinnal kezelt állatok kontralaterális oldalán mért értékek között. A formalin injekció hatására szignifikánsan megemelkedett az ipszilaterális c-fos expresszió a szomatotópiás eloszlásnak megfelelően a kontralaterális oldalhoz viszonyítva. Ez a hatás szignifikánsan kifejezettebb volt az OVX+E₂ állatoknál az OVX-hez viszonyítva (59., 60. ábra).



59. ábra. c-fos-IR sejtek a nőstény patkány TNC transzverzális metszetein 4 órával az orofaciális formalin kezelés után ovariectomizált (OVX-Form) és ovariectomizált, ösztradiol kezelt (OVX+E₂-Form) állatoknál. A formalin ipszilaterálisan megemeli a c-fos expressziót és ez kifejezettebb az OVX+E₂ állatokban. **IR:** immunoreaktív, **OVX-Form:** ovariectomizált állatok, melyek bajuszpárnájukba formalin injekciót kaptak, **OVX+E₂-Form:** ovariectomizált, ösztradiol kezelt állatok, melyek bajuszpárnájukba formalin injekciót kaptak, **TNC:** kaudális trigeminális mag. Lépték 500, ill. 50 µm.



60. ábra. c-fos-IR sejtek átlagos számának ábrázolása a patkány TNC különböző magasságaiban (átlag \pm S.E.M, n=10-12 csoportonként). A formalinkezelés ipszilaterálisan szignifikánsan megemeli a c-fos pozitív sejtek számát mind az OVX-Form (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001), mind az OVX+E₂-Form csoportban (+ p<0,05, ++ p<0,01, +++ p<0,001) a kontralaterális oldalhoz viszonyítva. A formalin hatása kifejezettebb volt az ösztrodiállal előkezelt állatokban (# p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001). A kontralaterális oldalon nem mutatkozik különbség. IR: immunoreaktív, **OVX-Form**: ovariektomizált állatok, melyek bajuszpárnájukba formalin injekciót kaptak, **OVX+E₂-Form**: ovariektomizált, ösztrodiol kezelt állatok, melyek bajuszpárnájukba formalin injekciót kaptak, **TNC**: kaudális trigeminális mag.

Megbeszélés

Az eredményeink azt mutatják, hogy esetünkben a krónikus β -ösztrodiol 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 gyulladásos 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 ezeket (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 receptorok 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 gyulladáshoz való 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-aminoajsav (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, Fáváro-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 aktiváció (Diogenes és mtsai., 2006), illetve tüzelési aktivitásának (Tashiro és mtsai., 2012) vagy a glutamáterg neurotranszmisszió (Gazerani és mtsai., 2010, Bereiter és Benetti 2006) a változásait mutatták ki. Az ovariectomizált állatok ösztradiol kezelése más kísérletekben fokozta az arc allodyniáját (Liverman és mtsai., 2009b). Hasonló, állatokban végzett tartósabb ösztrogénpótlás pedig erősítette a fájdalomérzettel kapcsolatos viselkedésmintázatot temporomandibuláris gyulladáshoz való reakcióban (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 ovariectomizált állatok s.c. karragenin okozta termális hiperalgéziáját, melyet a csökkent alfa kettő receptorális hatásnak tulajdonítottak (Nag és Mokha 2016). A proösztrogén 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 expresszió növekedésén és a Gasser dúc NF κ B és ERK utak modulálásán keresztül éri el.

4.6. KYNA moduláló hatása a NTG modellben

(Vámos és mtsai., 2009)

Háttér

A kinurenin útvonal a triptofán lebomlásának egyik kiemelt iránya az emlősök agyában, melynek végterméke a nikotin-adenin-dinukleotid (NAD) (Beadle és mtsai., 1947). Az anyagcsereút központi vegyülete a 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-hidrokinureninné, antranilsavvá, kvinolénsavvá és KYNA-vá, melyek cerebroventrikuláris adása viselkedési változásokat okoz rágcsálókban (Lapin 1978). A KYNA a kinurenin útvonal egy kiemelt neuroaktív molekulája, mely L-KYN-ből képződik a neuronokban és az asztrocitákban a KAT révén (Guidetti és mtsai., 1997). Egyike a kevés 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), dózisfüggően 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 (Santamaría és mtsai., 1996).

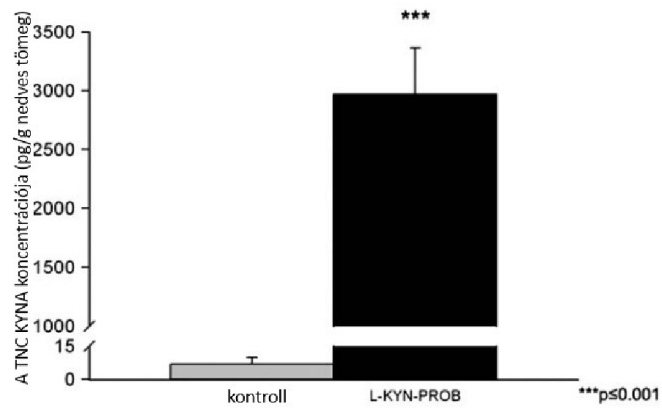
Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a L-KYN+PROB előkezelés kivédi a NTG okozta c-fos aktiválódást a TNC területén (Knyihár-Csillik és mtsai., 2007). Az elsődleges és másodlagos trigeminális érző neuronok közötti kapcsolat részben glutamáterg szinapszisok révén valósul meg (Goadsby és Classey 2000), és több adat arra utal, hogy az NMDA receptorok kulcsszerepet játszanak a centrális szenzitizációs mechanizmusokban (Haley és mtsai., 1990, Woolf és Thompson 1991). Állatkísérletes és humán adatok egyaránt arra utalnak, hogy 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

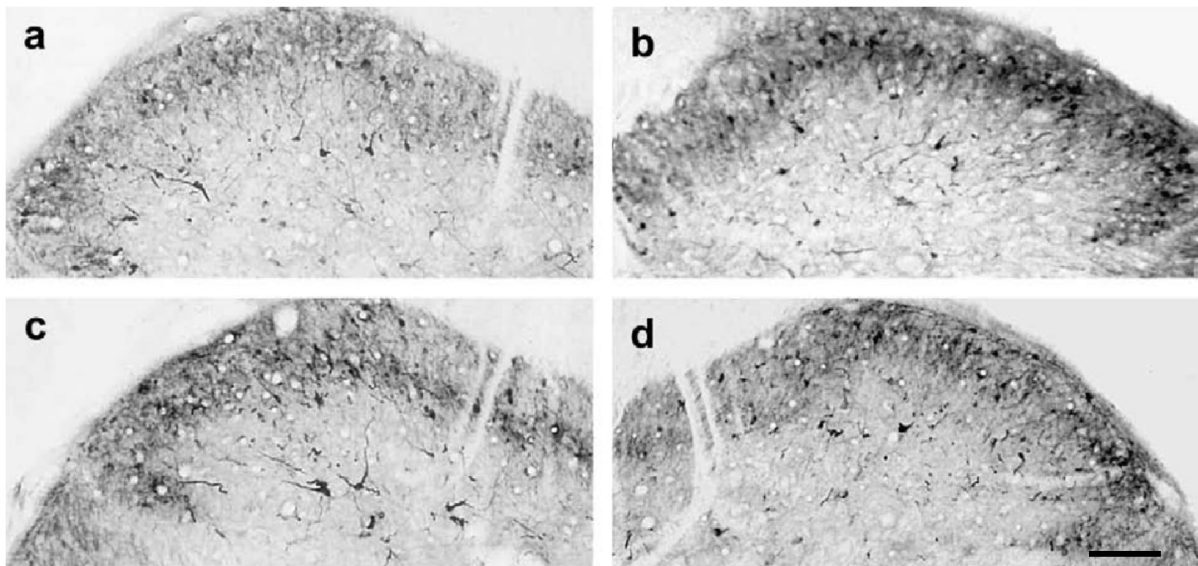
Felnőtt hím Sprague-Dawley patkányok fele L-KYN+PROB előkezelésben részesült (300 mg/kg és 200 mg/kg dózisban), míg az állatok másik fele oldószert kapott. Fél órával ezután az állatok egy részénél a TNC-t eltávolítottuk KYNA nagy teljesítményű folyadékromatográfia (HPLC) meghatározás céljából (n=6 csoportonként). 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 (n=4 csoportonként) és nNOS immunhisztokémiai vizsgálatok céljából (n=6 csoportonként). A HPLC adatokat kétmintás t-próbával, míg az immunhisztokémia és a Western blot eredményeit ANOVA-val és post-hoc Sheffe teszttel vizsgáltuk. A szignifikancia szint $p < 0,05$ volt. A részletesebb leírás a 6.1.1, 6.3.1, 6.3.2 és 6.3.3. fejezetekben található meg.

Eredmények

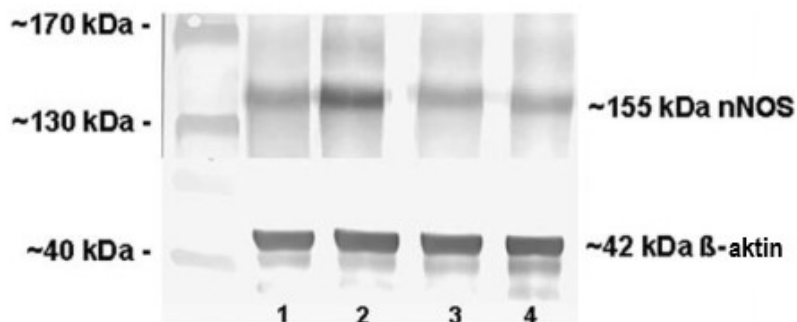
Fél órával a L-KYN+PROB kezelés után a TNC KYNA tartalma nagyságrendekkel, szignifikánsan emelkedett a kontroll állatokhoz képest (**61. ábra**). Az immunhisztokémiai vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a NTG szignifikánsan megemeli a nNOS pozitív sejtek számát a TNC-ben, míg a L-KYN+PROB kezelés ezt a hatást kivédi. A Western blot analízis is megerősítette az immunhisztokémiai vizsgálatok adatait (**62-64. ábra**).



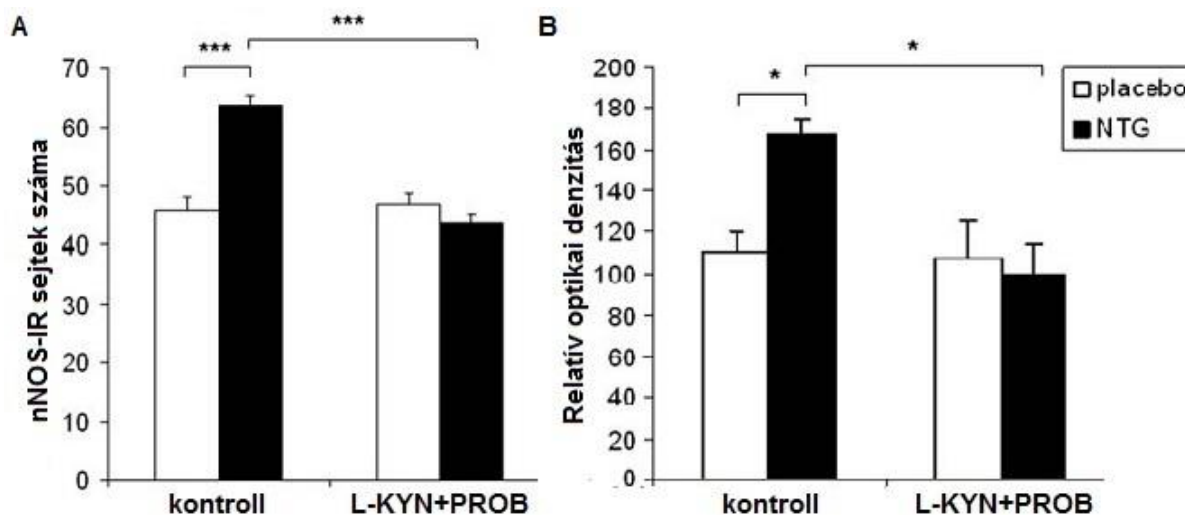
61. ábra. A TNC KYNA koncentrációjának átlaga a TNC-ben oldószer, ill. L-KYN+PROB kezelés után (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként). Ez utóbbi kezelés szignifikánsan megemeli a KYNA koncentrációját a kontrollhoz viszonyítva. **KYNA**: kinurénsav, **L-KYN**: l-kinurenin, **PROB**: probenecid, **TNC**: kaudális trigeminális mag.



62. ábra. nNOS-IR sejtek a patkány TNC-ben aktív előkezelés nélkül (a, b) és L-KYN+PROB előkezeléssel (c, d) NTG (b, d) és placebo (a, c) injekciók után 4 órával. Előkezelés nélkül a NTG megemeli a nNOS expressziót (b), a placebohoz (a) képest. Ilyen különbséget nem észlelünk a PROB+KYN előkezelés után (c, d). **IR**: immunoreaktív, **L-KYN**: l-kinurenin, **nNOS**: neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG**: nitroglicerinn, **PROB**: probenecid, **TNC**: kaudális trigeminális mag. Lépték 50 μ m.



63. ábra. nNOS Western blot a patkány TNC-ből, az előkezelést nem kapott (1, 2) és L-KYN+PROB előkezelésben részesült állatokból (3, 4). A placebo kezeléshez viszonyítva (1, 3) a NTG (2, 4) megemeli a nNOS expressziót az előkezelést nem kapott állatokban (2), de ilyen hatás nincs az L-KYN+PROB csoportban (4). Az ábra alsó részén a belső kontrollként alkalmazott β -aktin látszik. **L-KYN**: l-kinurenin, **nNOS**: neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG**: nitroglicerinn, **PROB**: probenecid, **TNC**: kaudális trigeminális mag.



64. ábra. A TNC-ben megjelenő nNOS-IR sejtek száma (A) és nNOS optikai denzitása (B) kontroll és L-KYN+PROB előkezelt patkányokban 4 órával a placebo, illetve NTG adása után (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként, * p<0,05, *** p<0,001). A kontroll állatokban szignifikánsan magasabb a nNOS expresszió NTG után, míg a L-KYN+PROB állatokban ez nem észlelhető. **IR:** immunoreaktív, **L-KYN:** l-kinurenin, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG:** nitroglicerín, **PROB:** probenecid, **TNC:** kaudális trigeminális mag.

Megbeszélés

A HPLC eredményeink megerősítik, hogy 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 blokádnak kivédeni a C-rost, ill. a bőr kémiai ingerlése okozta hátsó szarv centrális szenzitizációt (Davies és Lodge 1987, Haley és mtsai., 1990). Ráadásul több vizsgálat igazolta az NMDA és NO/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 hiperalgésia során (Gao és mtsai., 2005, Zou és mtsai., 2000). Intraciszternális kapszaicin adását követően mind az NMDA, mind a non-NMDA gátlás kivédeni 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 antagonistá (MK-801) mellett, a szintetikus AMPA antagonistá (GYKI-52466) is hatékonyan blokkolja a trigeminális nocicepciót (Storer és Goadsby 1999) és ugyanilyen hatással bír az NMDA és AMPA

antagonista LY293558 is. Összefoglalva a KYNA – elsősorban antiglutamáterg hatása révén- képes a trigeminális szenzitizáció blokkolására a migrén NTG modelljében, ezáltal a migrénelleses kezelések új támadáspontját adhatja.

4.7. KYNA moduláló hatása a durális IS modellben

(Spekker és mtsai., 2021)

Háttér

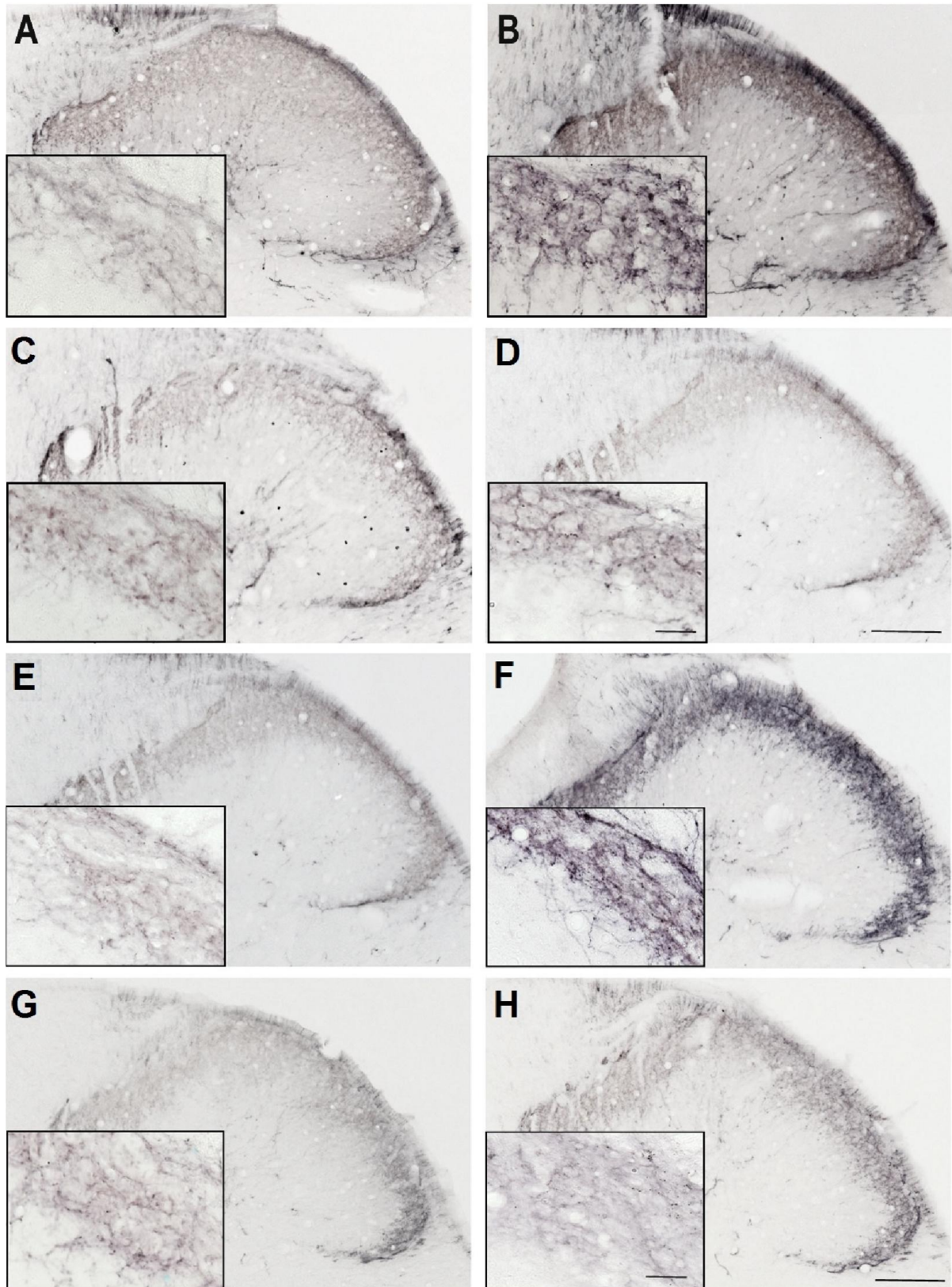
A KYNA, mint a triptofán anyagcsere neuroaktív metabolitja több receptoron hathat, mint az NMDA, az AMPA, a kainát és a GPR35, és befolyásolhatja a neurogén gyulladás kifejlődését (Vécsei és mtsai., 2013). Korábbi vizsgálatok szerint a KYNA antiinflammatoros hatással bír a trigeminális rendszerben (Csáti és mtsai., 2015), továbbá 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

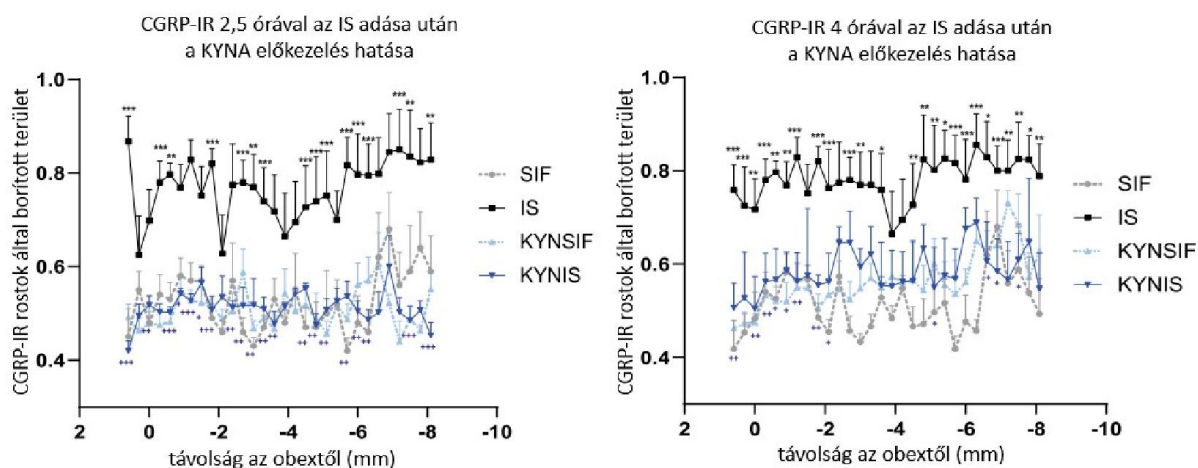
A felnőtt patkányok fele KYNA injekciót kapott s.c. 1 mmol/kg dózisban, majd ezt követően 1 órával a korábbiakban részletezett módon történt meg a dura IS és SIF kezelése. Kettő és fél, illetve 4 óra múlva az állatokat perfundáltuk és a TNC-t CGRP, TRPV1 és nNOS immunhisztokémiai festések céljából eltávolítottuk (n=6 csoportonként). A CGRP és TRPV1 pozitív rostok által fedett területet képanalizátor segítségével határoztuk meg, míg a nNOS pozitív sejteket megszámláltuk, melyet részletesebben a metodika rész 6.1.4, 6.3.1 és 6.3.4. szakaszában írunk le. Az obextől különböző távolságra lévő metszeteken mért és számolt adatokat az egyes csoportokban ismételt méréses ANOVA-val hasonlítottuk össze Holm-Sidak módszerrel kiegészítve.

Eredmények

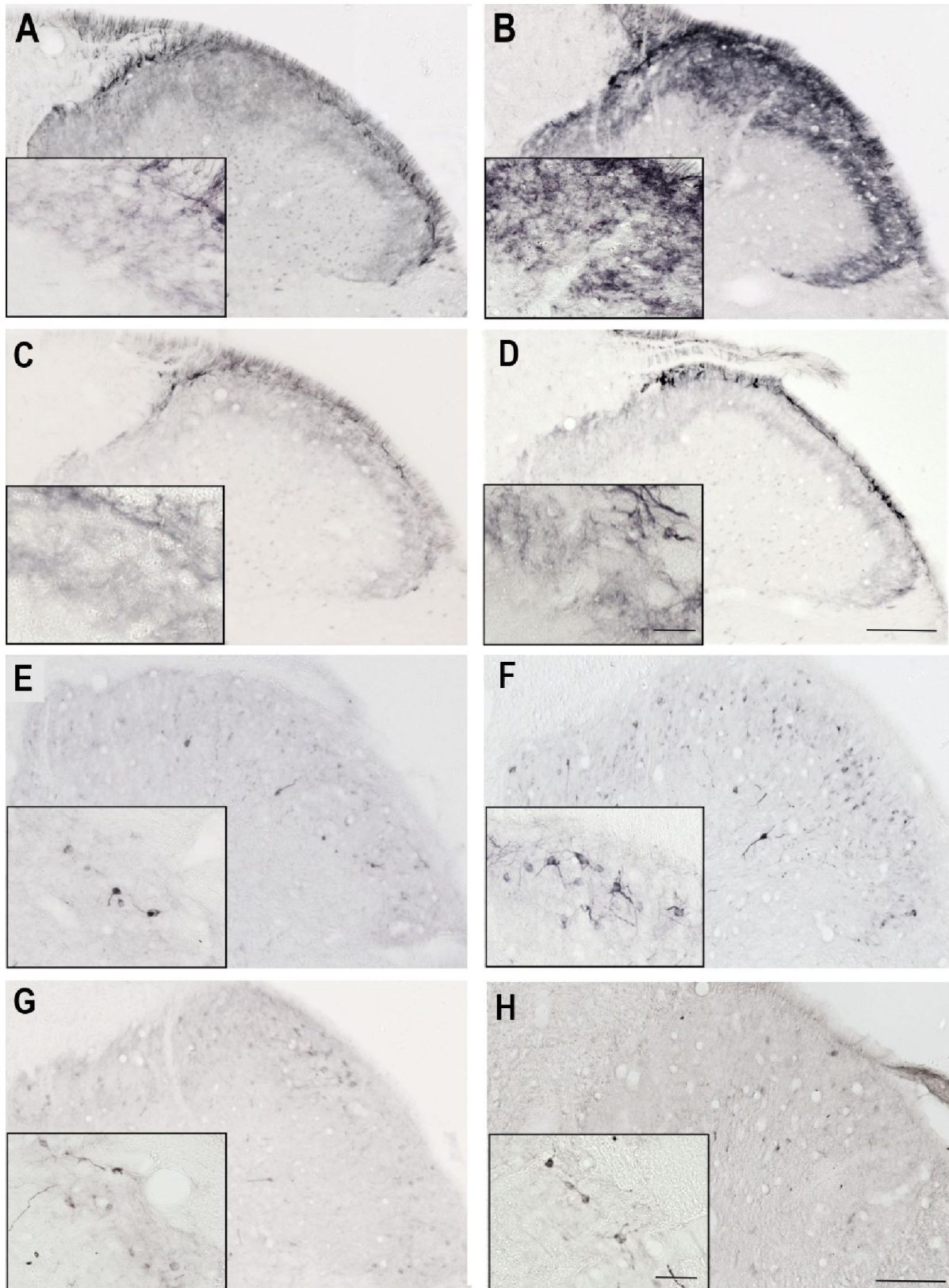
Az IS kezelt állatokban mind a 3 marker expressziója szignifikánsan magasabb volt: a CGRP esetében ez a hatás már 2,5 órás latenciával jelentkezett, míg a többieknél 4 óra elteltével észleltük ezen változásokat. A KYNA előkezelés ezeket az emelkedéseket képes volt szignifikáns módon csökkenteni (65-68. ábra).



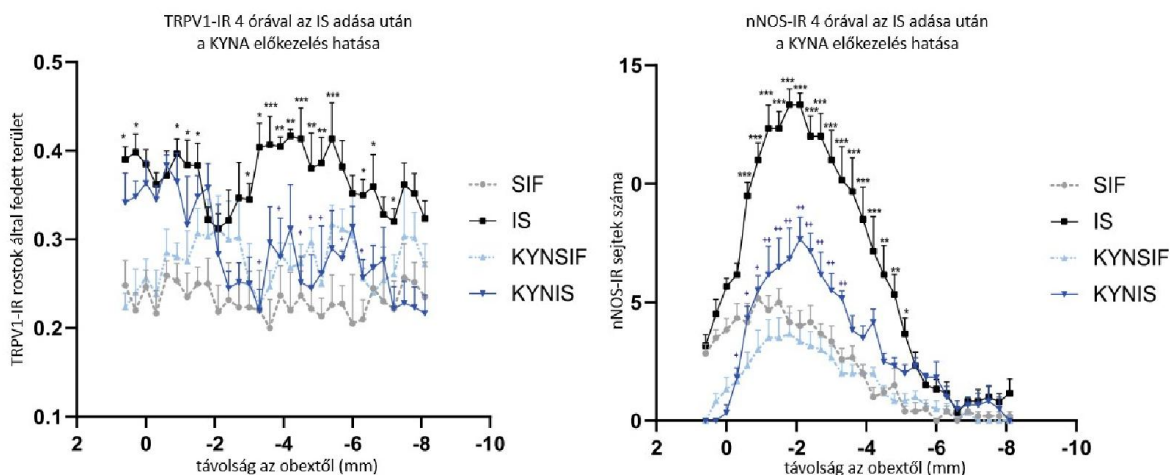
65. ábra. Reprezentatív transzverzális metszetek a patkány TNC területéről IS (B, D, F, H) és SIF (A, C, E, G) kezelés után 2,5 (A-D) és 4 órával (E-H). Az állatok fele (C, D, G, H) KYNA előkezelést kapott 1 mmol/kg dózisban. Az aktív kezelés (IS) megemeli a CGRP (B, F) expressziót a hátsó szarv területén a kontrollhoz (A, E) képest. A KYNA-t kapott állatoknál ilyen változás nem látható. Ez a nagyobb nagyítású képeken is jól észlelhető. **CGRP:** kalcitonin génrelációs peptid, **IS:** inflammatory soup, **KYNA:** kinurénsav, **SIF:** szintetikus intersticiális folyadék, **TNC:** kaudális trigeminális mag. Lépték: 200, ill. 50 μm .



66. ábra. A CGRP expresszió a TNC-ben 2,5 és 4 órával az IS és SIF kezelést követően. Az IS hatására szignifikánsan emelkedik a CGRP a kontrollhoz (SIF) viszonyítva, míg a KYNA előkezelést kapott állatokban nincs különbség az aktív kezelt csoport (KYNIS) és a kontroll (KYNASIF) között (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). **CGRP**: kalcitonin génrelációs peptid, **IR**: immunoreaktív, **IS**: inflammatory soup, **SIF**: szintetikus intersticiális folyadék, **TNC**: kaudális trigeminális mag.



67. ábra. Reprezentatív transzverzális metszetek a patkány TNC területéről IS (B, D, F, H) és SIF (A, C, E, G) kezelés után 4 órával TRPV1 (A-D) és nNOS (E-H) immunhisztokémiai festéssel. Az állatok fele (C, D, G, H) KYNA előkezelést kapott 1 mmol/kg dózisban. Az aktív kezelés (IS) megemeli a TRPV1 (B) és nNOS (F) expressziót a hátsó szarv területén a kontrollhoz (A, ill. E) képest. A KYNA-t kapott állatoknál ilyen változás nem látható. Ez a nagyobb nagyítású képeken is jól észlelhető. **IS:** inflammatory soup, **KYNA:** kinurénsav, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **SIF:** szintetikus intersticiális folyadék, **TNC:** kaudális trigeminális mag, **TRPV1:** tranziens receptor potenciál vanilloid 1. Lépték: 200, ill. 50 μ m.



68. ábra. A TRPV1 és nNOS expresszió a TNC-ben 4 órával az IS és SIF kezelést követően. Az IS hatására szignifikánsan emelkedik a TRPV1 és nNOS a kontrollhoz (SIF) viszonyítva, míg a KYNA előkezelést kapott állatokban nincs különbség az aktív kezelt csoport (KYNIS) és a kontroll (KYNASIF) között (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001). **IR:** immunoreaktív, **IS:** inflammatory soup, **KYNA:** kinurensav, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **SIF:** szintetikus intersticiális folyadék, **TNC:** kaudális trigeminális mag, **TRPV1:** tranziens receptor potenciál vanilloid 1.

Megbeszélés

A KYNA neuroaktív hatását elsősorban a glutamát receptorok blokkolásával és a GPR35 kötődés révén fejti 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 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). A perifériás fájdalom modellben a kainát receptorok aktiválódása mechanikus és termikus hiperalgéria, 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 glutamáterg neurotranszmisszió megváltozása felelős a CGRP expresszió modulálásáért.

A TRPV1 és az NMDA receptorok kolokalizációt mutatnak a TG-ban, és patkányban mechanikus hiperalgéria esetén a két receptor a CamKII és PKC 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 PKA 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-höz 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

(Chauvel és mtsai., 2012)

Háttér

A migrénes betegek 20-30%-ban 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 (Belay 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 kettes 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 (Granello és mtsai., 2000).

A KYNA endogén glutamát antagonistaként (Kessler és mtsai., 1989) képes a K^+ indukálta CSD kialakulását gátolni a patkány kortexben (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

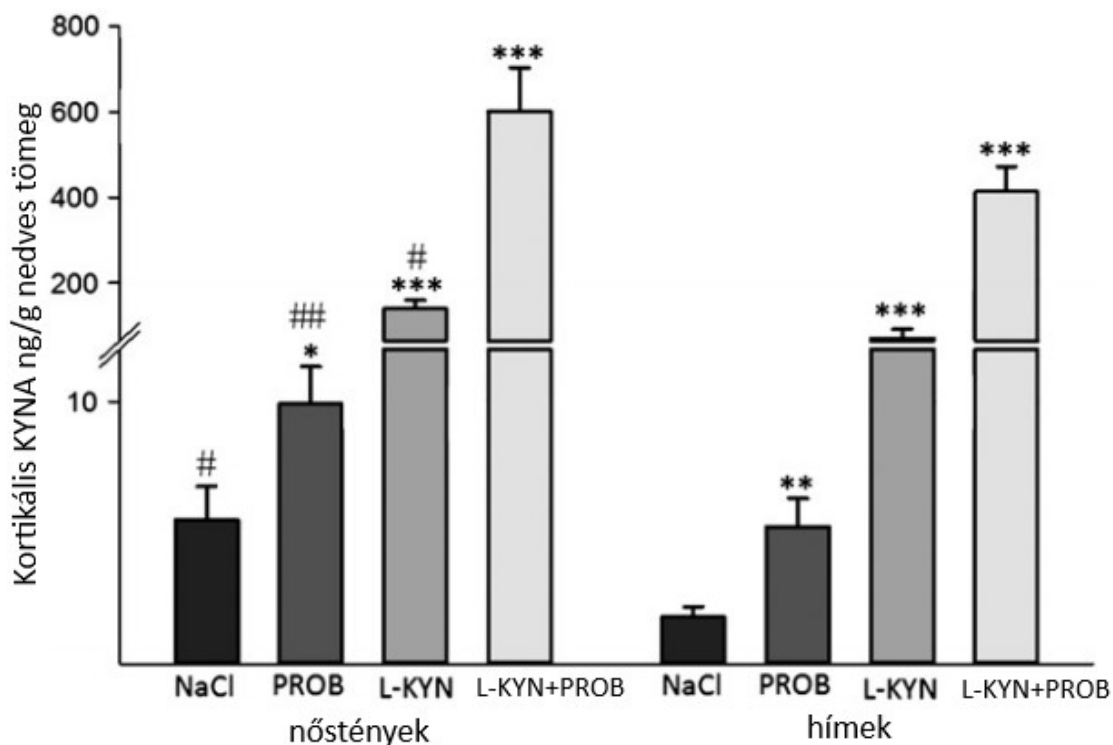
Felnőtt hím és nőstény patkányokat használtunk a kísérlethez. Az állatokat előkezelés szempontjából négy csoportra osztottuk. Az első csoport fiziológiás sóoldatot kapott, a második PROB kezelésben részesült (200 mg/kg), a harmadik csoport L-KYN injekciót kapott (300 mg/kg), míg a negyedik csoport állatai 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 (n=8 csoportonként).

A kezelések után fél órával a patkányok külön csoportjában, hím és nőstény állatokat felhasználva HPLC-vel meghatároztuk az agy KYNA koncentrációját (n=7 csoportonként).

A CSD kiváltásához és a regisztrációhoz kloráldihidráttal 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-kezelést egy órán keresztül megszámláltuk és kiszámoltuk a frekvenciát. Emellett az első és a második regisztrációs helyet vizsgálva következtettünk a CSD terjedési sebességére. Részletesebben lásd a metodika részt (6.1.5. és 6.3.3.) A kortikális KYNA szintek és a CSD frekvenciák összehasonlítását az egyes csoportokban ANOVA-val végeztük post hoc Dunnett teszttel. A KYNA szintek nemek közötti összehasonlítását Student t-próbával vizsgáltuk. A nemi ciklus hatását a CSD-re ANOVA-val teszteltük post hoc Scheffe teszttel. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

Eredmények

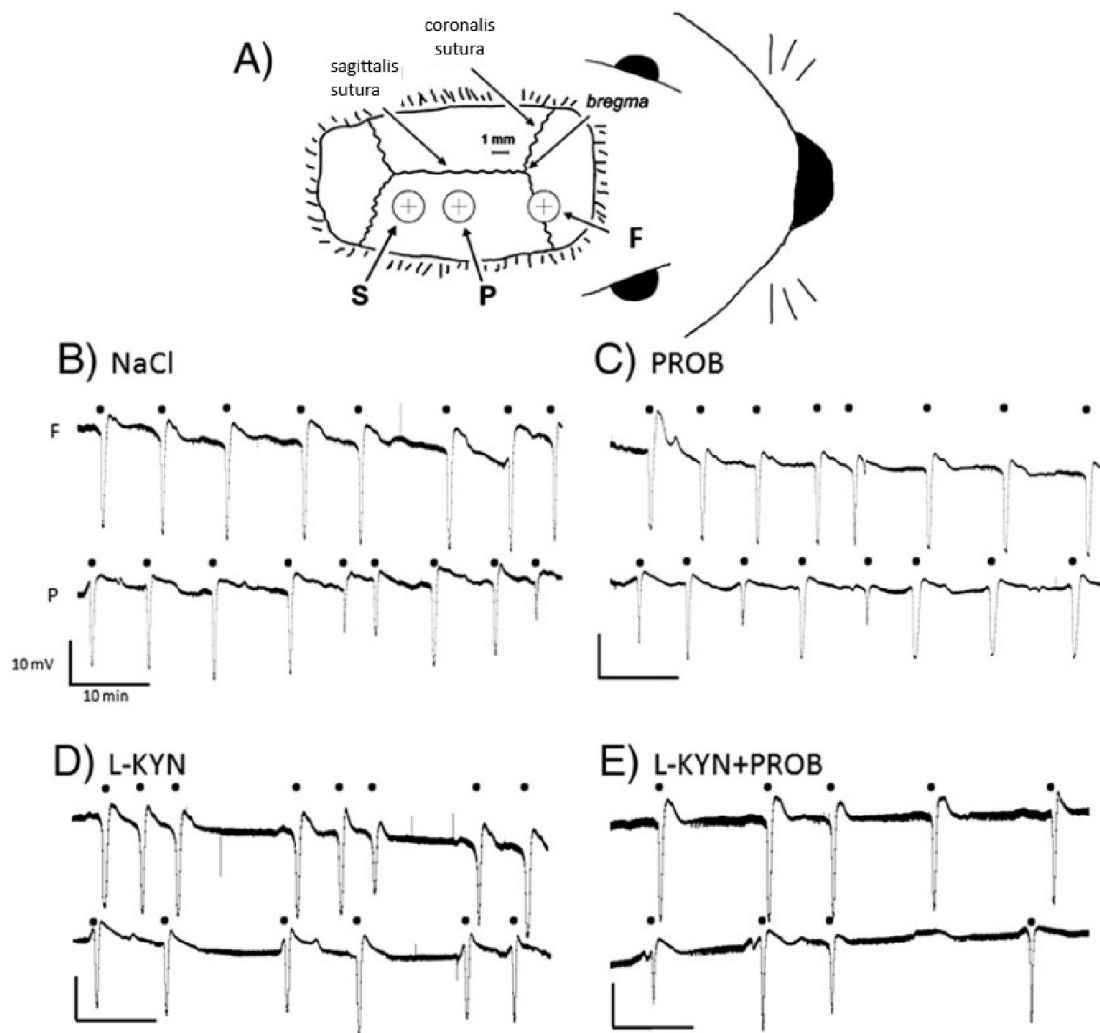
A L-KYN+PROB előkezelések két nagyságrenddel megemelték az agyi KYNA koncentrációját. Önmagában a PROB és a L-KYN kezelés is szignifikáns emelkedést hozott a kontroll állatokhoz képest. A nőstényeknél magasabb alap KYNA szint mutatkozott a hímekhez viszonyítva, és ez a különbség a PROB kezelést követően is megmaradt, de nem mutatkozott szignifikánsnak a többi előkezelésnél (69. ábra).



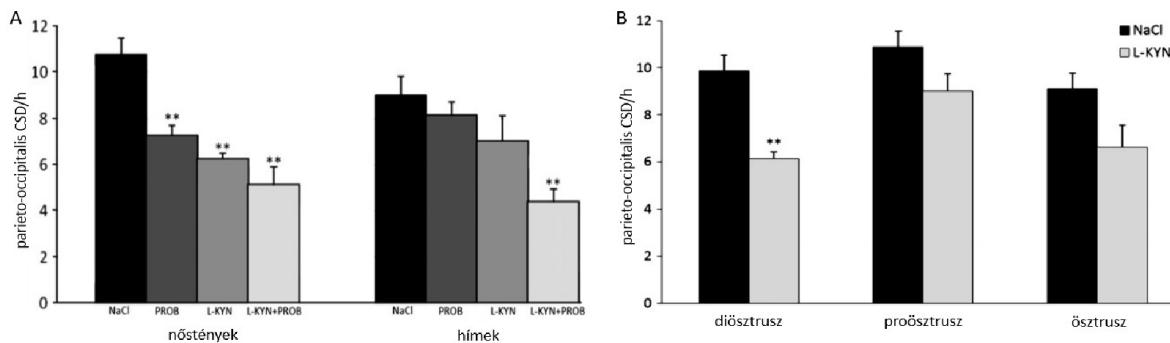
69. ábra. A kortikális KYNA szintek HPLC mérésekkel megállapított koncentrációja nőstény és hím patkányokban 30 perccel i.p. fiziológiás sóoldat (NaCl), PROB, L-KYN és L-KYN+PROB adása után (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kezelt csoportok a fiziológiás sóoldathoz képest, # $p < 0,05$ és ## $p < 0,01$ Student teszt nőstény és hím csoportok között, átlag + S.E.M, $n=7$ csoportonként). HPLC: nagy teljesítményű folyadékromatográfia, i.p.: intraperitonealis, KYNA: kinurénsav, L-KYN: kinurenin, L-KYN+PROB: l-kinurenin és probenecid, PROB: probenecid.

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. A CSD-k terjedési sebessége nem változott egyik csoportban sem szignifikánsan. Az aktív előkezelést nem kapott nőstény állatoknál a nemi

ciklus nem befolyásolta a CSD megjelenését. A L-KYN kezelést kapott nőstény állatok diösztuszában viszont szignifikánsan kisebb volt a CSD frekvencia (70-71. ábra).



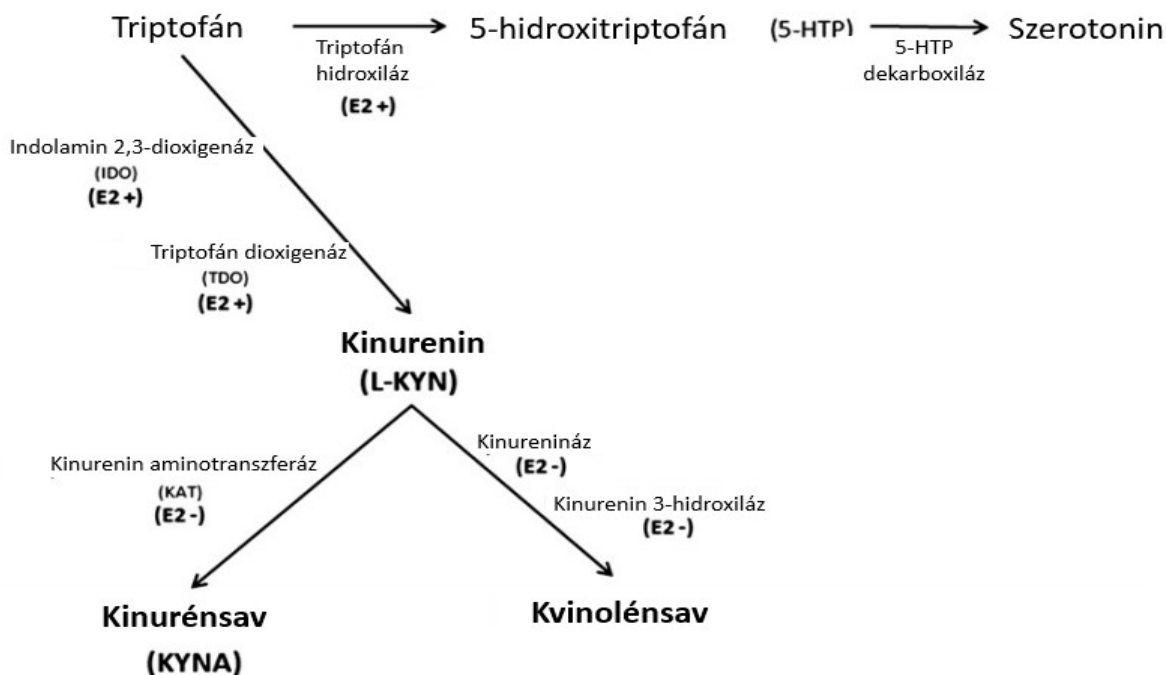
70. ábra. A: a patkány koponyájának sematikus ábrázolása a három fűrt lyukkal. S – stimulációs hely a KCl alkalmazásához, P – parietooccipitális regisztrációs hely, F- frontális regisztrációs hely. B-E: reprezentatív regisztrátumok hím patkányokban fiziológias sóoldat - NaCl (B), PROB (C), L-KYN (D) és kombinált kezelés (E) után. A pontok a CSD-eket jelölik. CSD: cortical spreading depression, L-KYN: kinurenin, L-KYN+PROB: l-kinurenin és probenecid, PROB: probenecid.



71. ábra. A: CSD óránkénti előfordulása parietooccipitálisan fiziológias sóoldat (NaCl), PROB, L-KYN, L-KYN+PROB előkezelés után nőstény és hím patkányokban. B: CSD frekvencia nőstény állatokban a nemi ciklus három fázisában NaCl és L-KYN előkezelést követően (átlag + S.E.M, ** p<0,01, n=8 csoportonként). CSD: cortical spreading depression, L-KYN: kinurenin, L-KYN+PROB: l-kinurenin és probenecid, PROB: probenecid.

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 (72. ábra).



72. ábra. Az ösztrogén hatása a triptofán anyagcserére (E+: serkentő hatás, E-: gátló hatás).

A TDO és az IDO a kezdő és sebességhatározó 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 betegségekben (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. A PROB ezen hatásának oka nem teljesen világos. Önmagában adva 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 például a pannexin 1 gátlása, ami az ATP felszabadulásban játszik szerepet (Silverman és mtsai., 2008) vagy a multidrog rezisztens protein blokkolása révén, illetve indirekt módon másodlagos hírvivőkre hatva (Taylor és mtsai., 1997). Másrészt a KYNA non-kompetitíven gátolja az $\alpha 7$ nikotinos acetilkolin 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 leginkább a ciklus diösztrusz 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 proösztruszban lévő állatoknál, amikor az ösztrogénszint magas (**71. ábra**). 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 dendrittűskék (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

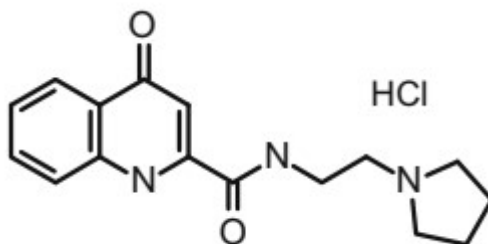
leginkább a L-KYN diosztruszban gyakorolt hatásának köszönhető és kisebb mértékben kapcsolható az ösztroshoz. A proösztroshoz ösztrogén-csúcsától távol eső, alacsonyabb diosztrusz alatti ösztrogénszint csökkenti a glutamához kapcsolódó ingerküszöböt és visszaállítja a magasabb KYNA szintézist, mely maximalizálja 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 diosztrusz alatt (Freeman 2006). A progeszteron csökkentheti az NMDA receptorok aktivitását és több módon elősegítheti a L-KYN okozta CSD csökkenést: antagonisták 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 diosztruszban észlelhető hatásában. Egyrészt a kontroll nőstény állatok CSD frekvenciája numerikusan alacsonyabb az ösztroshoz, amikor a progeszteronszint alacsony (**71. ábra**), mint diosztruszban, amikor a progeszteronszint emelkedik. Másrészt annak ellenére, hogy a progeszteronnak antikonvulzív hatást tulajdonítanak, in vitro kortikális preparátumokhoz adva az ösztroshoz 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 gonadális hormonok kinurenin anyagcseréjére 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

(Fejes-Szabó és mtsai., 2014)

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-pirrolidinilettil)-4-oxo-1H kvinolin-2-karboxamid hidroklorid (SZR81) hatását vizsgáltuk a trigeminovaskuláris aktiváció NTG modelljében, patkányokban.



73. ábra. Az N-(2-N-pirrolidiniletil)-4-oxo-1H kvinolin-2-karboxamid hidroklorid (SZR81).

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 (n=4) 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 (n=5+5), majd 1, illetve 5 órával később az állatokat perfundáltuk és a TNC-t eltávolítottuk KYNA meghatározás céljából. A statisztikai analízist nem parametrikus Kurskal-Wallis teszttel végeztük, melyet Mann-Whitney U poszt hoc vizsgálat követett. A szignifikanciaszint $p < 0,05$ volt.

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 (n=5 csoportonként). Négy órával később a perfúziós fixálás után a TNC-t eltávolítottuk, majd a gyorsfagyasztott blokkokból sorozatmetszeteket készítettünk, melyen CGRP, c-fos, nNOS és CamKII immunhisztokémiai festést végeztünk. A CGRP festődést képanalizátorral vizsgáltuk, a többi metszet esetén a pozitív sejteket megszámoztuk.

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 (n=5 csoportonként), 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 (n=10 csoportonként). Az adatok analízise ANOVA-val történt Tukey vagy Tamhane post hoc teszttel. A HPLC esetén Kruskal-Wallis próbát alkalmaztunk, majd a páronkénti összehasonlítást Mann-Whitney próbákkal végeztük, melyek értékeit korrigáltuk, ezen eredményeket a medián és IQR alapján rögzítettük. A fenti módszerekről részletesebben a 6.1.1., 6.3.1., 6.3.2., 6.3.3., 6.3.4. és 6.3.5. fejezetekben írunk.

Eredmények

KYNA koncentráció

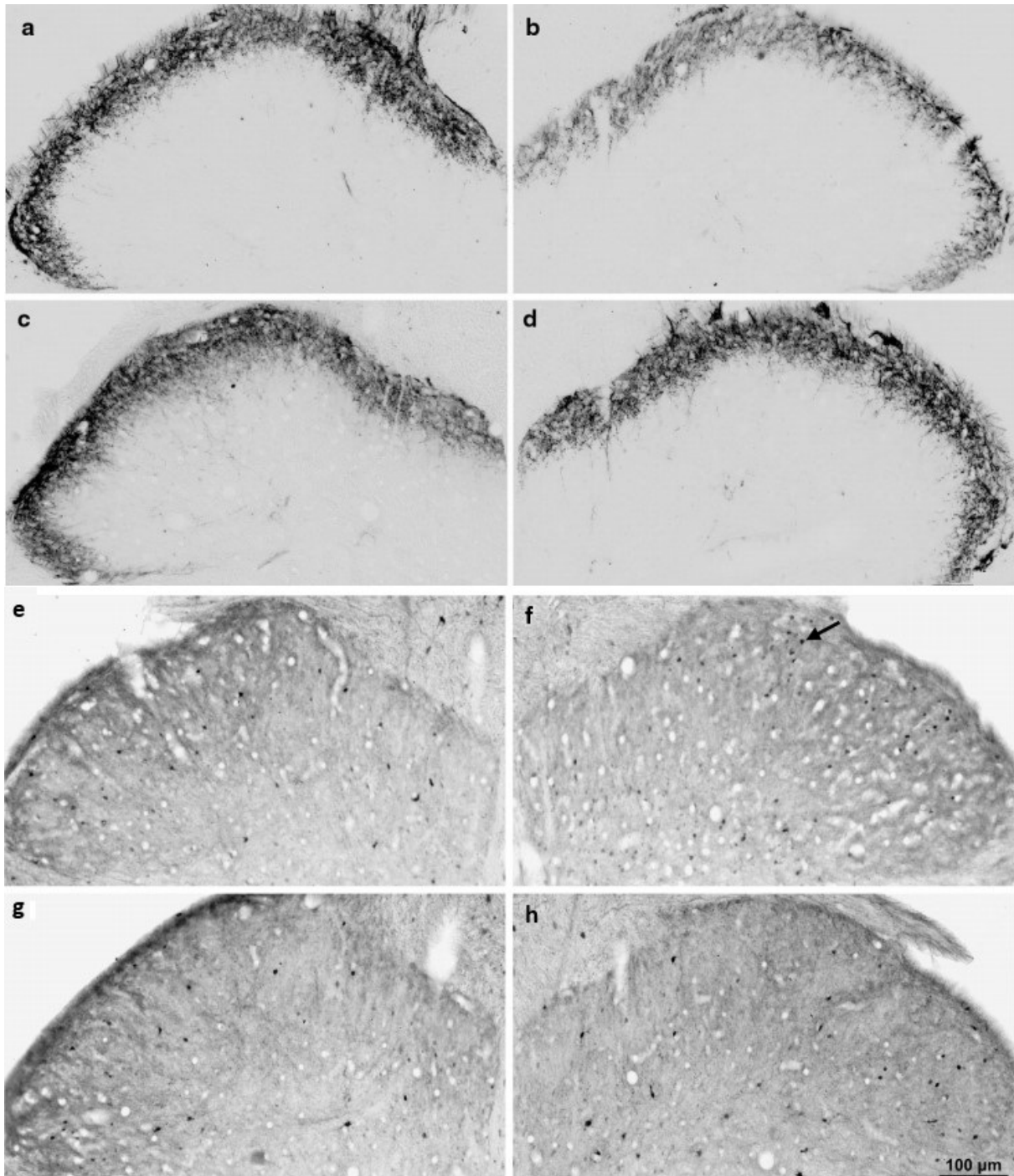
A HPLC mérések a TNC-ben egyértelmű KYNA emelkedést mutattak egy órával az SZR81 beadása után a kontrollcsoporthoz képest, mely 5 óra elteltével visszatért az alapszintre (**74. ábra**). Annak ellenére, hogy más validálást igényel, vizsgáltuk a plazma KYNA szintjét is, és előzetes eredményeink alapján itt sokkal kifejezettebb emelkedés tapasztalható (kb. 50x – ezt az adatot nem tüntettük fel).

Csoport		KYNA koncentráció (pmol/g nedves tömeg; medián + IQR)
Kontroll (salina) (n = 4)	60 min	11.48 (8.85–15.00)
1 mmol/tskg SZR81 (n=10)	60 min (n = 5)	25.38 (23.26–40.80)*
	300 min (n = 5)	9.02 (6.43–30.92)

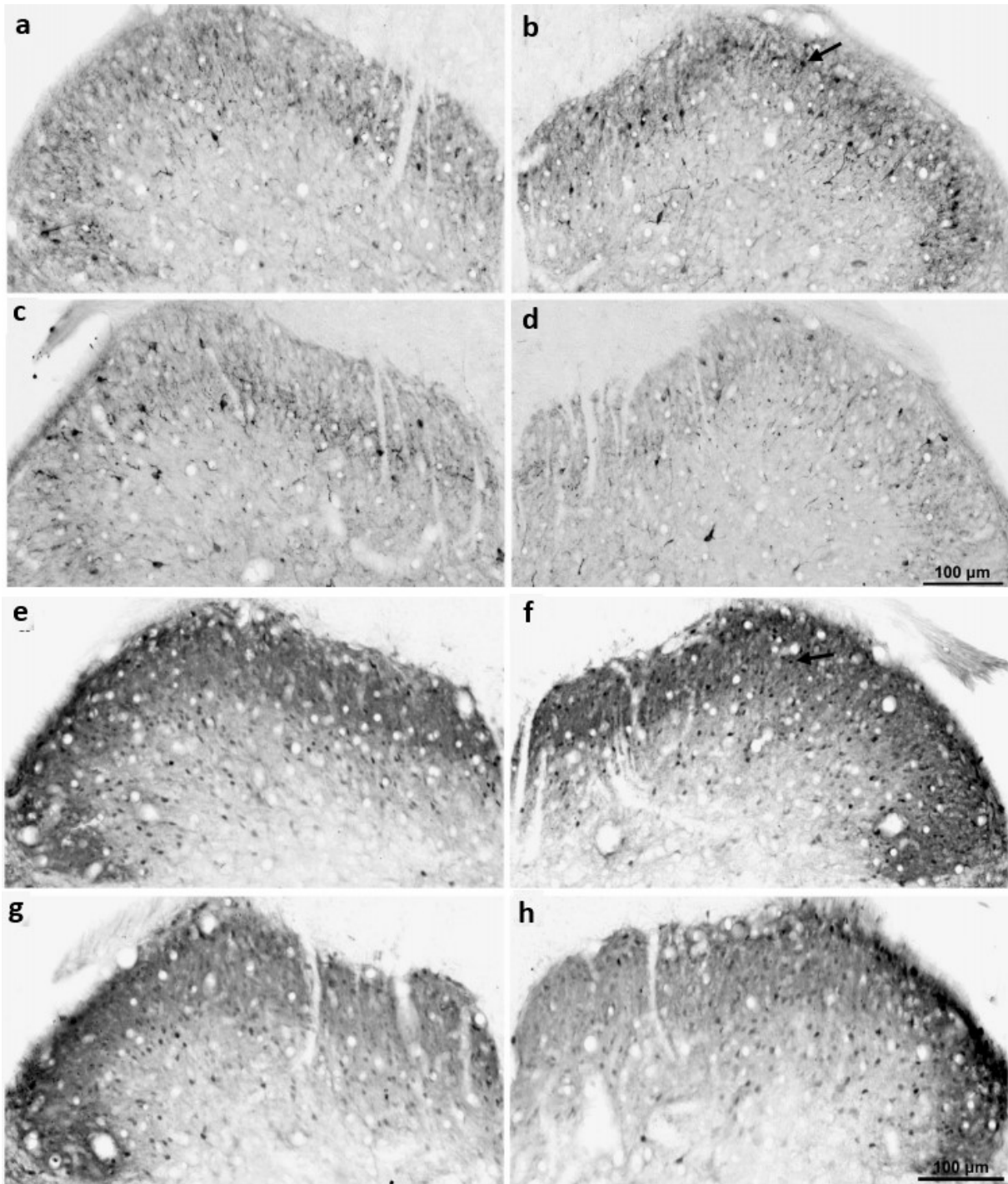
74. ábra. KYNA koncentráció SZR81 injekciók után a TNC-ben. 1 órával a kezelés után szignifikánsan emelkedik a kontrollhoz képest (* p<0,05). **KYNA:** kinurénsav, **SZR81:** szintetikus kinurénsav analóg, **TNC:** kaudális trigeminális mag.

Immunhisztokémia

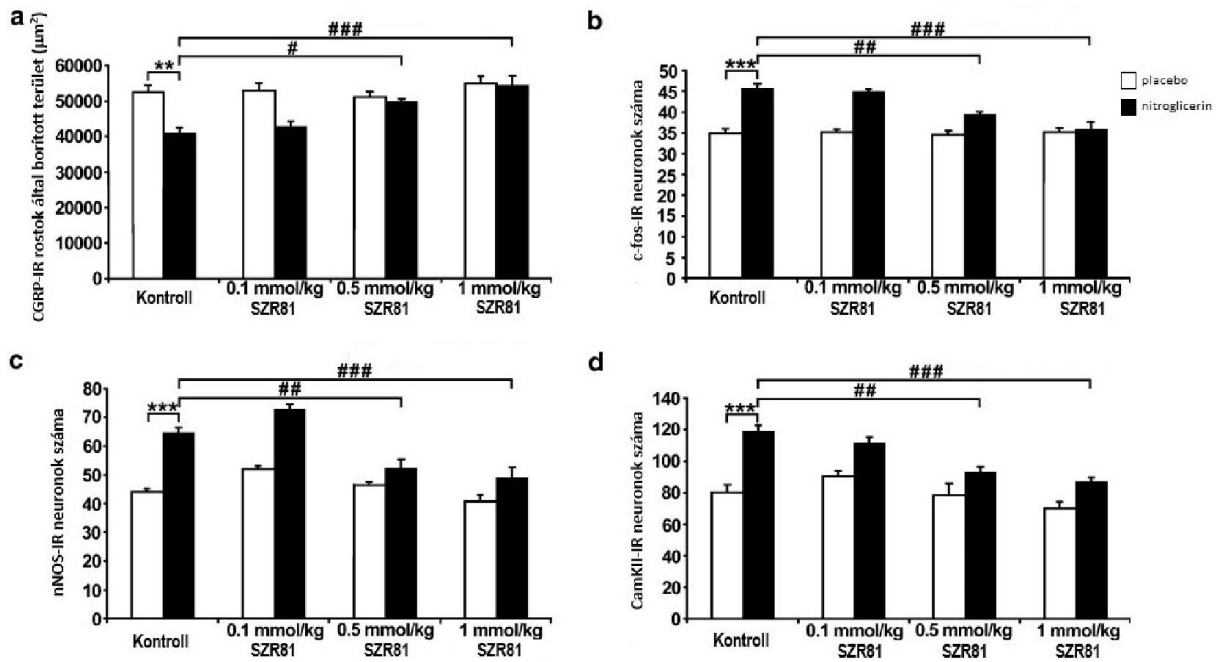
A TNC felszíni rétegeiben gazdag CGRP rosthálózat, valamint számos c-fos, nNOS és CamKII pozitív sejt található, melyek eloszlása homogén volt a vizsgált TNC szakasz teljes hosszán. A CGRP pozitív rostok által fedett terület szignifikánsan csökkent NTG kezelés után, ezzel szemben a c-fos, nNOS és CamKII 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 (**75-77. ábra**).



75. ábra. Reprezentatív transzverzális metszetek a patkány TNC területéről NTG (b, d, f, h) és placebo (a, c, e, g) kezelés után 4 órával CGRP (a-d) és c-fos (e-h) immunhisztokémiai festéssel. Öt órával korábban az állatok fele (c, d, g, h) SZR81 előkezelést kapott 1 mmol/kg dózisban. A NTG lecsökkenti a CGRP (b) és megemeli a c-fos (f) expressziót a hátsó szarv területén a kontrollhoz (a, ill. e) képest. Az SZR81-t kapott állatoknál ilyen változás nem látható. A nyíl c-fos immunpozitív sejtre mutat. **CGRP:** kalcitonin génrelációs peptid, **NTG:** nitroglicerín, **SZR81:** szintetikus kinurénsav analóg, **TNC:** kaudális trigeminális mag.



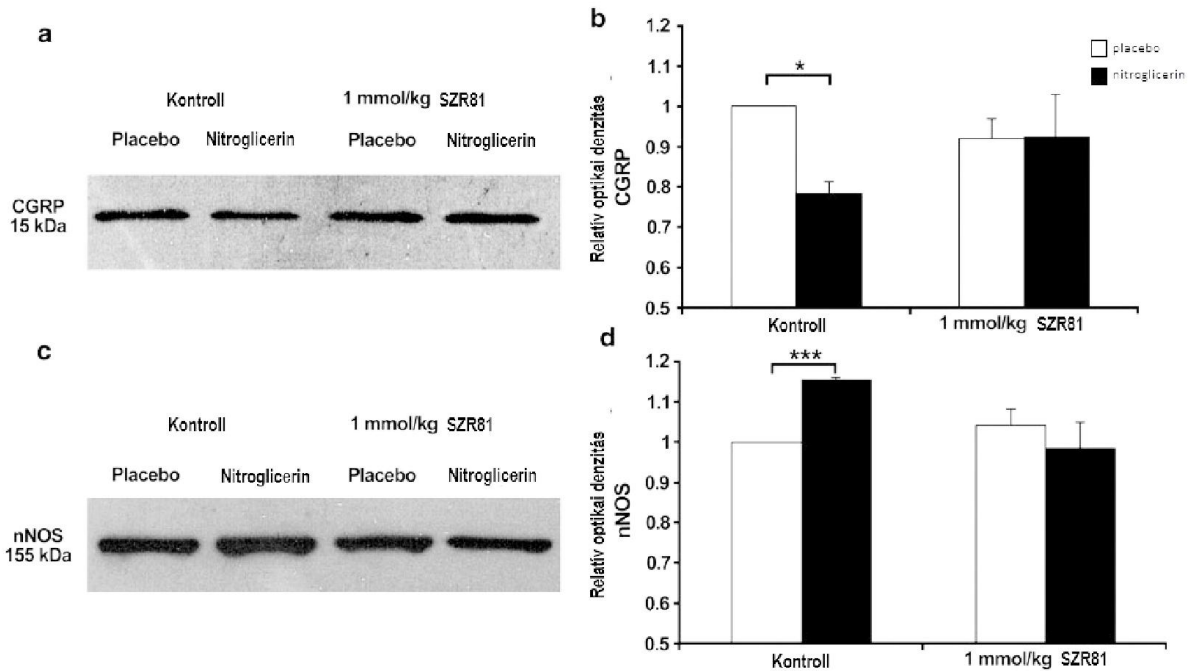
76. ábra. Reprezentatív transzverzális metszetek a patkány TNC területéről NTG (b, d, f, h) és placebo (a, c, e, g) kezelés után 4 órával nNOS (a-d) és CamKII (e-h) immunhisztokémiai festéssel. Öt órával korábban az állatok fele (c, d, g, h) SZR81 előkezelést kapott 1mmol/kg dózisban. A NTG megemeli a nNOS (b) és a CamKII (f) expressziót a hátsó szarv területén a kontrollhoz (a, ill. e) képest. Az SZR81-t kapott állatoknál ilyen változás nem látható. A nyilak immunpozitív sejtekre mutatnak. **CamKII:** kalmodulin-függő protein kináz II, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG:** nitroglicerín, **SZR81:** szintetikus kinurénsav analóg, **TNC:** kaudális trigeminális mag.



77. ábra. Az immunhisztokémiai eredményeket ábrázoló hisztogramok előkezelés nélküli, illetve különböző dóziszú SZR81-el előkezelte patkány TNC-ben NTG és placebo után (átlag + S.E.M, n=5 csoportonként). (a) a NTG szignifikánsan lecsökkenti a CGRP-IR területet és ezt a hatást az SZR81 dóziszfüggő módon kivédi. A NTG megemeli a c-fos (b), nNOS (c) és CamKII (d) expresszióját a TNC-ben, melyet az SZR81 előkezelés dóziszfüggő módon modulál (** p<0,01, *** p<0,001, # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001). **CamKII:** kalmodulin-függő protein kináz II, **CGRP:** kalcitonin génrelációs peptid, **IR:** immunoreaktív, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG:** nitroglicerín, **SZR81:** szintetikus kinurénsav analóg, **TNC:** kaudális trigeminális mag.

Western blot

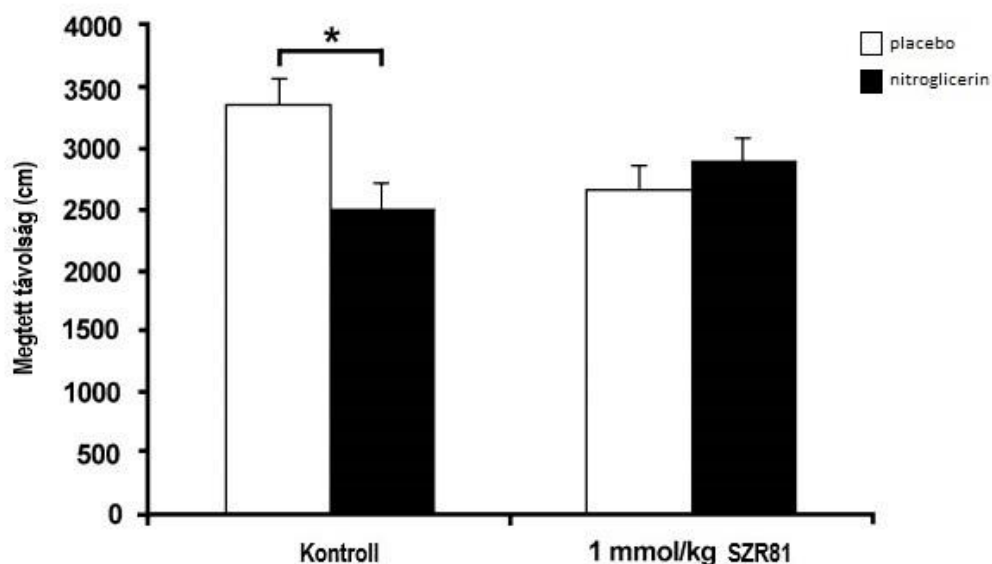
Az adataink alátámasztották az immunhisztokémia által mutatott eredményeket. A NTG szignifikánsan lecsökkentette a CGRP és megemelte a nNOS expressziót, míg a legnagyobb dóziszú SZR81 előkezelés ezt a hatást kivédte (78. ábra).



78. ábra. CGRP és nNOS Western blot patkány TNC-ből. A CGRP denzitása lecsökken (a, b), míg a nNOS (c, d) denzitása megemelkedik NTG kezelés után. Ezt a hatást 1 mmol/kg SZR81 előkezelés kivédi. (átlag + S.E.M, n=5 csoportonként, * p<0,05, *** p<0,001). **CGRP**: kalcitonin génrelációs peptid, **nNOS**: neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG**: nitroglicerín, **SZR81**: szintetikus kinurénsav analóg, **TNC**: kaudális trigeminális mag.

Viselkedésvizsgálatok

A patkányok által megtett távolság csökkent NTG kezelés hatására, ezt az SZR81 előkezelés ki tudta védeni (79. ábra). A mozgással töltött idő tekintetében és az ágaskodások számában nem volt különbség egyik csoport között sem.



79. ábra. Az open-field teszt eredményeit ábrázoló diagram. A NTG kezelés lecsökkentette a patkányok által megtett távolságot a placebo kezelést kapott állatokhoz képest. Az SZR81 előzetes adása 1 mmol/kg dózisban ezt a hatást kivédte (átlag + S.E.M, n=10, * p<0,05). **NTG**: nitroglicerín, **SZR81**: szintetikus kinurénsav analóg.

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 aktivitására utal (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 érzékenységgel (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 antagonisták képesek voltak 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, melyek 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 $\alpha 7$ nikotinos receptorok 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: a 0,5 mmol/kg és 1 mmol/kg dózis blokkolta a CGRP csökkenést és megakadályozta a c-fos, nNOS és CamKII emelkedést, mely a trigeminális aktiváció és szenzitizáció folyamatának gátlására utal. A Western blot vizsgálatoknál hasonló eredményt láttunk a CGRP és a nNOS esetében a legmagasabb dózisonál. 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 periférás 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 $\alpha 7$ nikotinos ACh receptorok 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 dűcot és a gerincvelőt is, és negatív módon csatolódik az érző dűc 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 allodynitiát ízületi gyulladáshoz vezető 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 KYNA és származékainak KIR-i hatását bizonyítja az a megfigyelés, hogy az intratekálisan adott KYNA és 7-klorokinurenin dózisfüggő módon fejtett ki analgetikus hatást egerekben (Näsström és mtsai., 1992) és patkányokban (Kristensen és mtsai., 1993) különböző modellekben. A hasonló módon bejuttatott 5,7 dikloro-kinurenin dózisfüggően csökkentette a hiperalgéziát patkányok esetében (Begon és mtsai., 2001). 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 csökkentt 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). Ezek a receptorok alapvető fontosságúak a széles, dinamikus sávú gerincvelői neuronok hosszú távú potenciációjának kialakulásában hosszantartó C afferens ingerlést követően (Svendsen és mtsai., 1998). Viselkedésvizsgálatokban az NMDA antagonistá LY235959 mind intratekálisan, mind s.c. adva csökkentette a formalin teszt második fázisában mutatott viselkedésválaszokat (Davis és Inturrisi 2001). Ezeket az eredményeket is figyelembe véve 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 azt mutatják, hogy az SZR81 előkezelt állatoknál nincs különbség a kontroll és a NTG csoport között, mely antinociceptív hatásra utalhat. Az előkezelt állatok esetében alacsonyabb a megtett távolság abszolút mértéke, melyet centrális mellékhatásnak tulajdoníthatunk, mivel a vér-agy gáton átjutó NMDA antagonisták hasonló hatásúnak bizonyultak korábbi vizsgálatokban (Christoph és mtsai., 2005).

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 folyamat - SZR81, KYNA átalakulás - tehető felelőssé, direkt és indirekt központi idegrendszeri mechanizmusok is feltételezhetők.

4.10. Az anandamid moduláló hatása patkányban szisztémás NTG adása után

(Nagy-Grócz és mtsai., 2016, 2017)

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

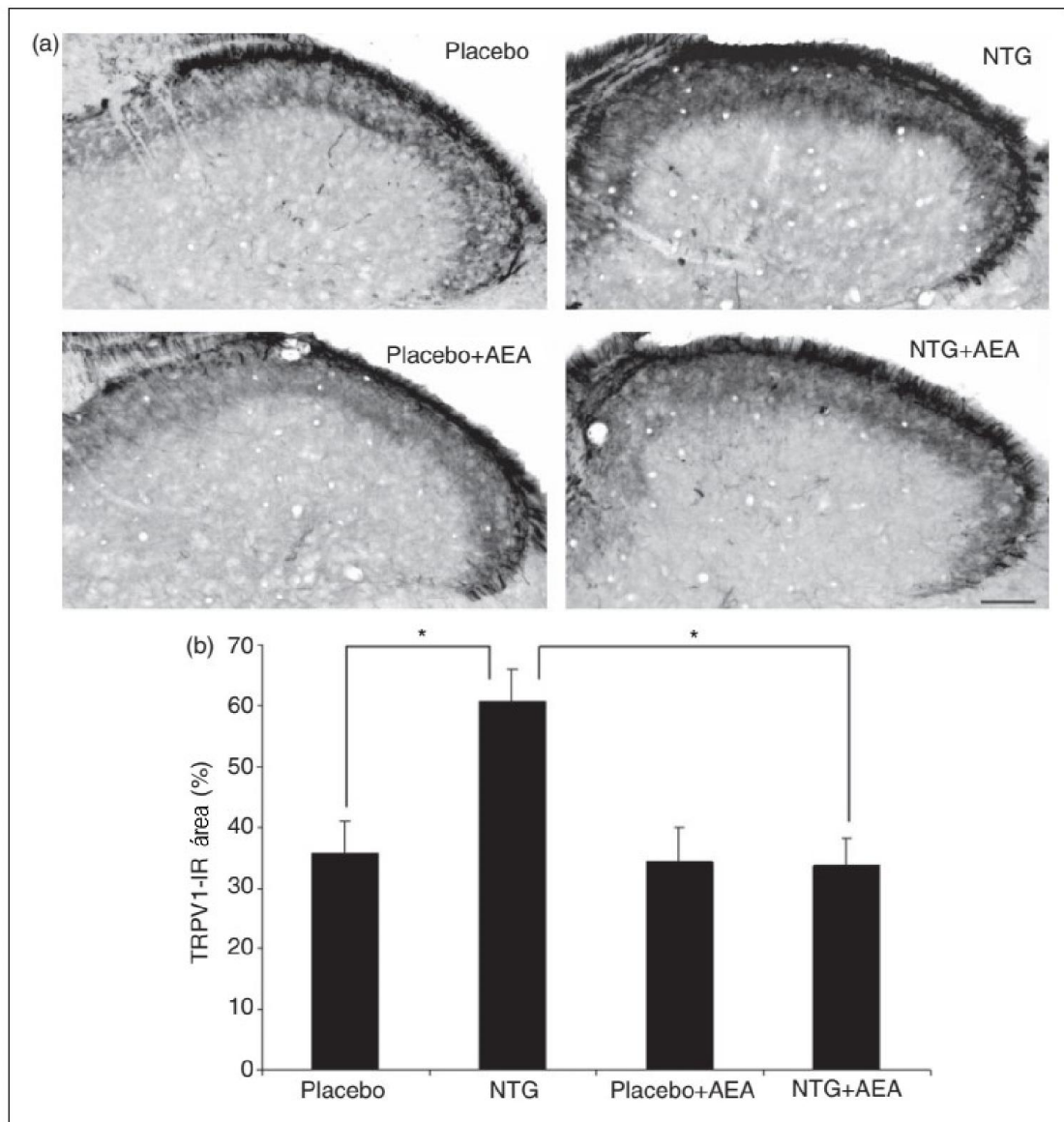
Első kísérletsorozatunkban arra kerestük a választ, hogy az AEA kezelés képes-e a trigeminális aktiváció, ill. szenzitizáció különböző markereit modulálni a patkány NTG modelljében. A TRPV1, nNOS és NFkB mellett a COX2 és a KATII expresszióját vizsgáltuk.

Anyag és módszer

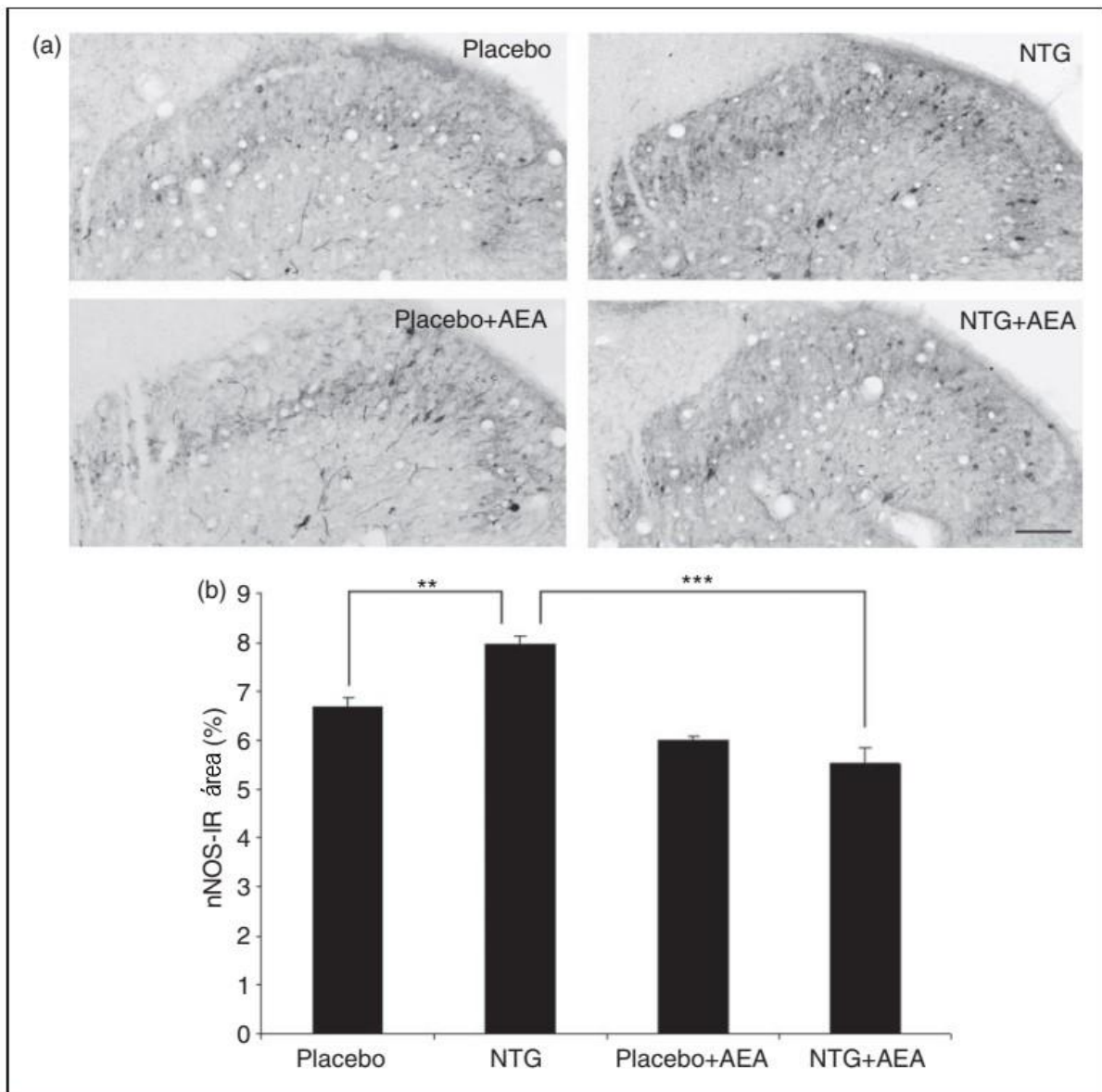
Kísérleteinkben felnőtt hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. Az állatokat négy csoportra osztottuk. Az első csoport volt az abszolút kontroll, az AEA és a NTG oldószerét kapták. A második csoport csak NTG kezelésben részesült (10 mg/kg i.p.). A harmadik és negyedik csoport két alkalommal kapott 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, NFkB, n=6 csoportonként) és Western blot (nNOS, COX-2, KATII, n=5 csoportonként) 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. A statisztikai analízis ANOVA-val történt, Tukey vagy Tamhane post-hoc teszttel. Bővebben lásd a 6.1.1., 6.3.1., és 6.3.2. fejezetben.

Eredmények

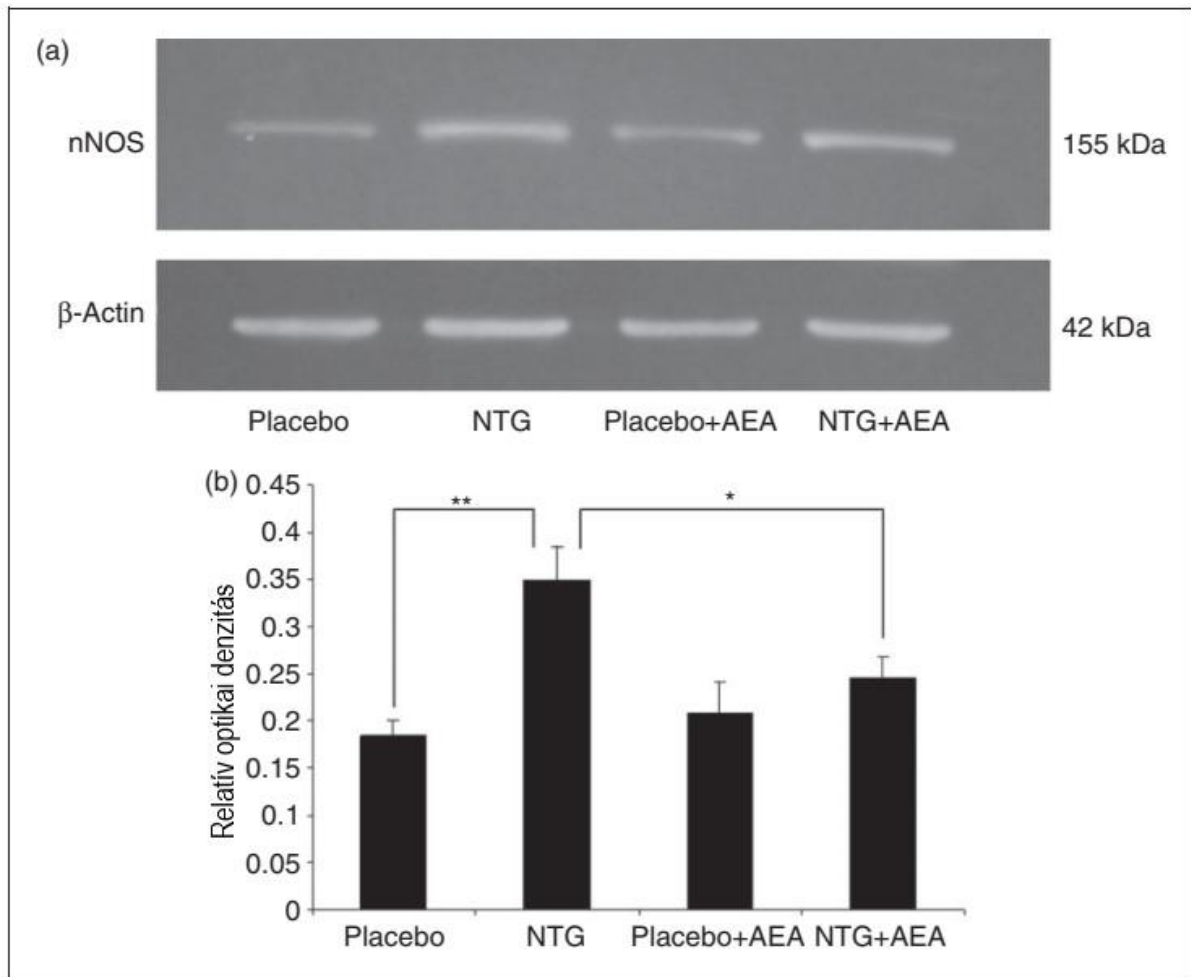
Az immunhisztokémiai vizsgálatok alapján kimutatható, hogy a NTG okozta TRPV1, nNOS és NFkB emelkedést az AEA kezelés képes volt kivédeni. A Western blot eredmények szerint a NTG okozta nNOS, COX2 emelkedést és a KATII csökkenést szintén kivédte az AEA adása (**80-85. ábra**).



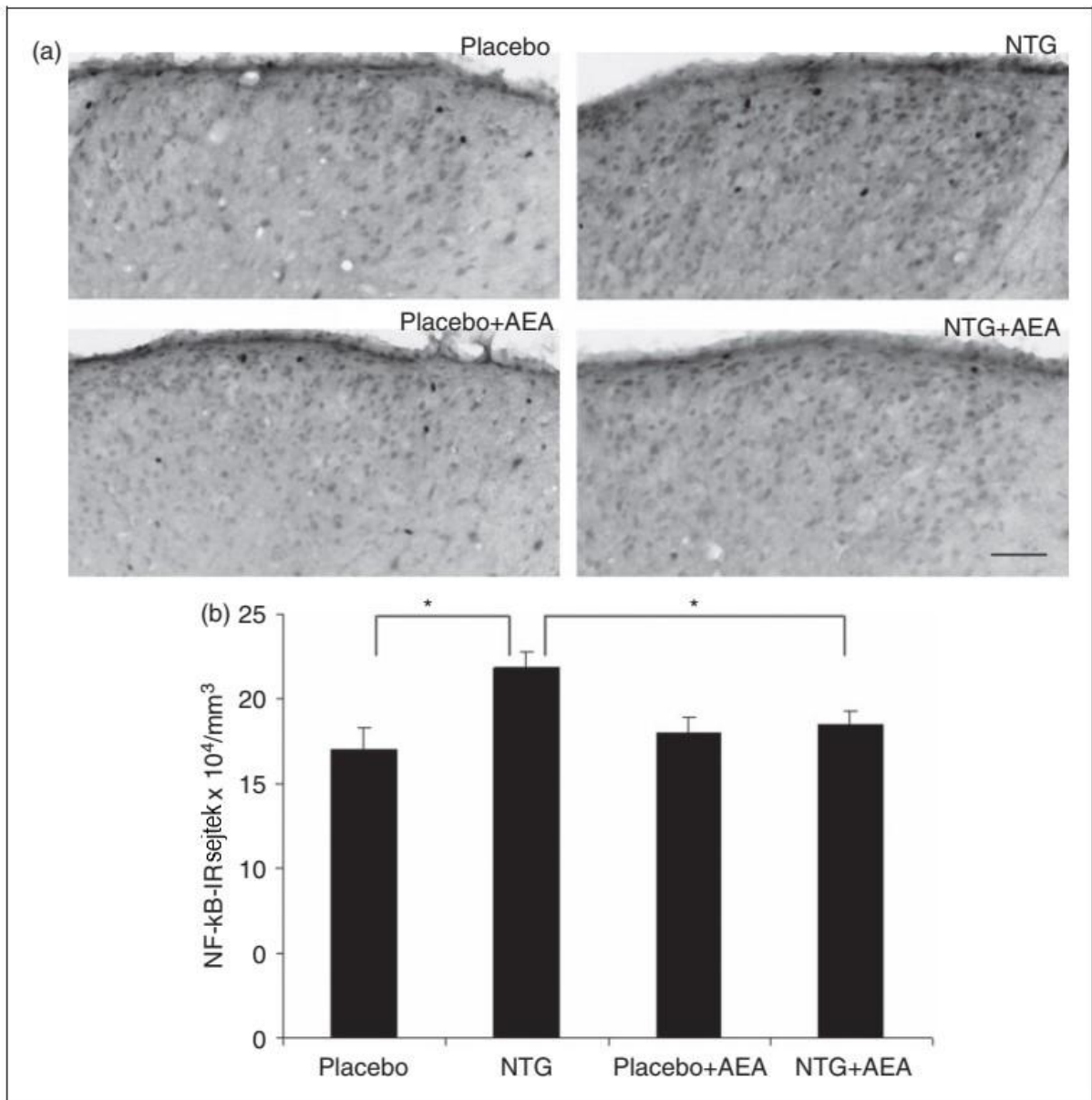
80. ábra. (a) Reprezentatív metszetek a patkány TNC-ből TRPV1 festéssel. (b) A TRPV1-IR rostok által fedett terület változása a TNC-ben, a NTG hatására szignifikánsan emelkedik a TRPV1 a placebohoz képest, míg az AEA adása ezt a változást kivédi (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként, * p<0,05). **AEA:** anandamid, **IR:** immunoreaktív, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag, **TRPV1:** tranziens receptor potenciál vanilloid 1. Lépték 100 µm.



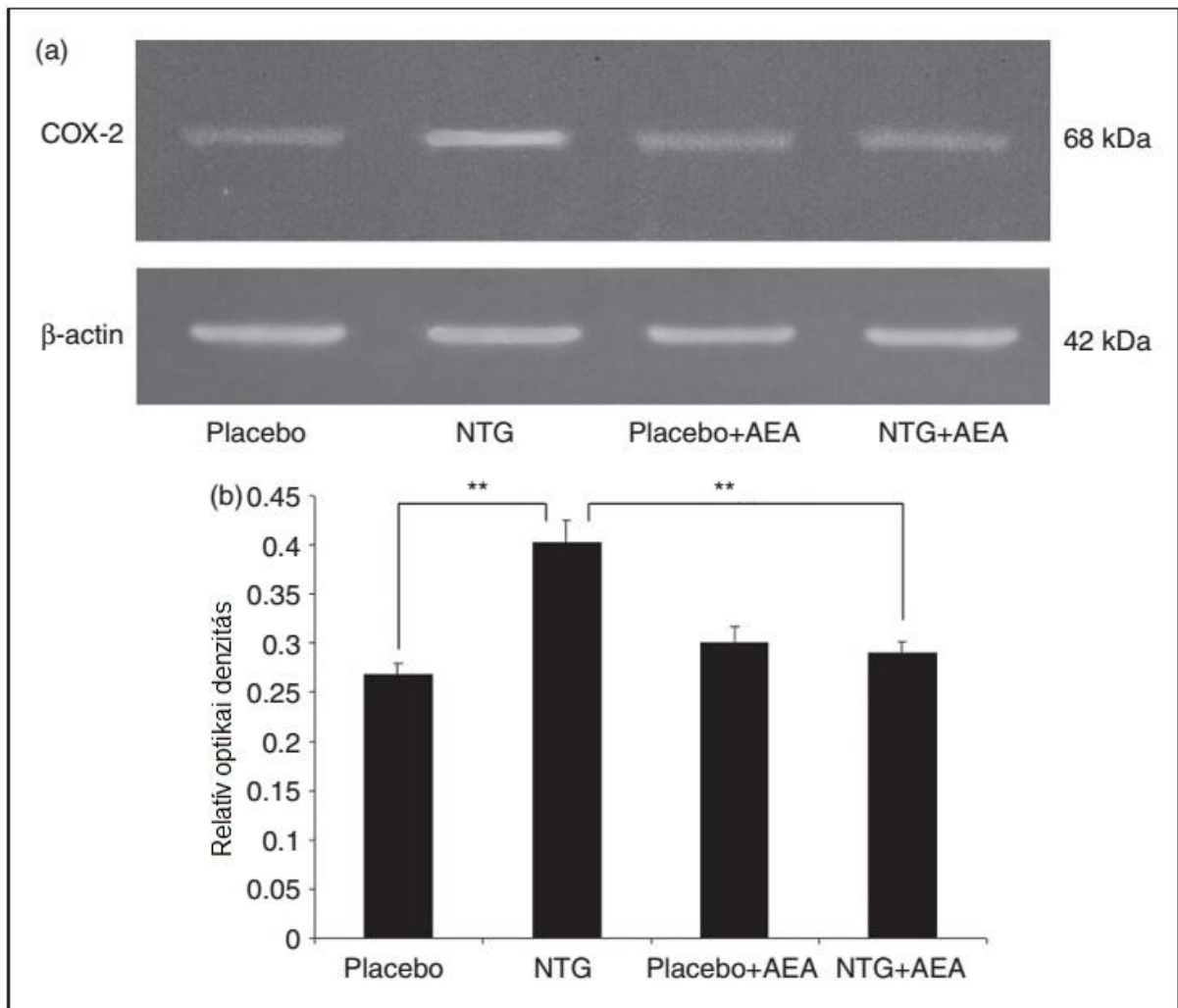
81. ábra. (a) Reprezentatív metszetek a patkány TNC-ből nNOS festéssel. (b) A nNOS-IR sejtek által fedett terület változása a TNC-ben, a NTG hatására szignifikánsan emelkedik a nNOS a placebohoz képest, míg az AEA adása ezt a változást kivédi (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). **AEA:** anandamid, **IR:** immunoreaktív, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag. Lépték 100 μm .



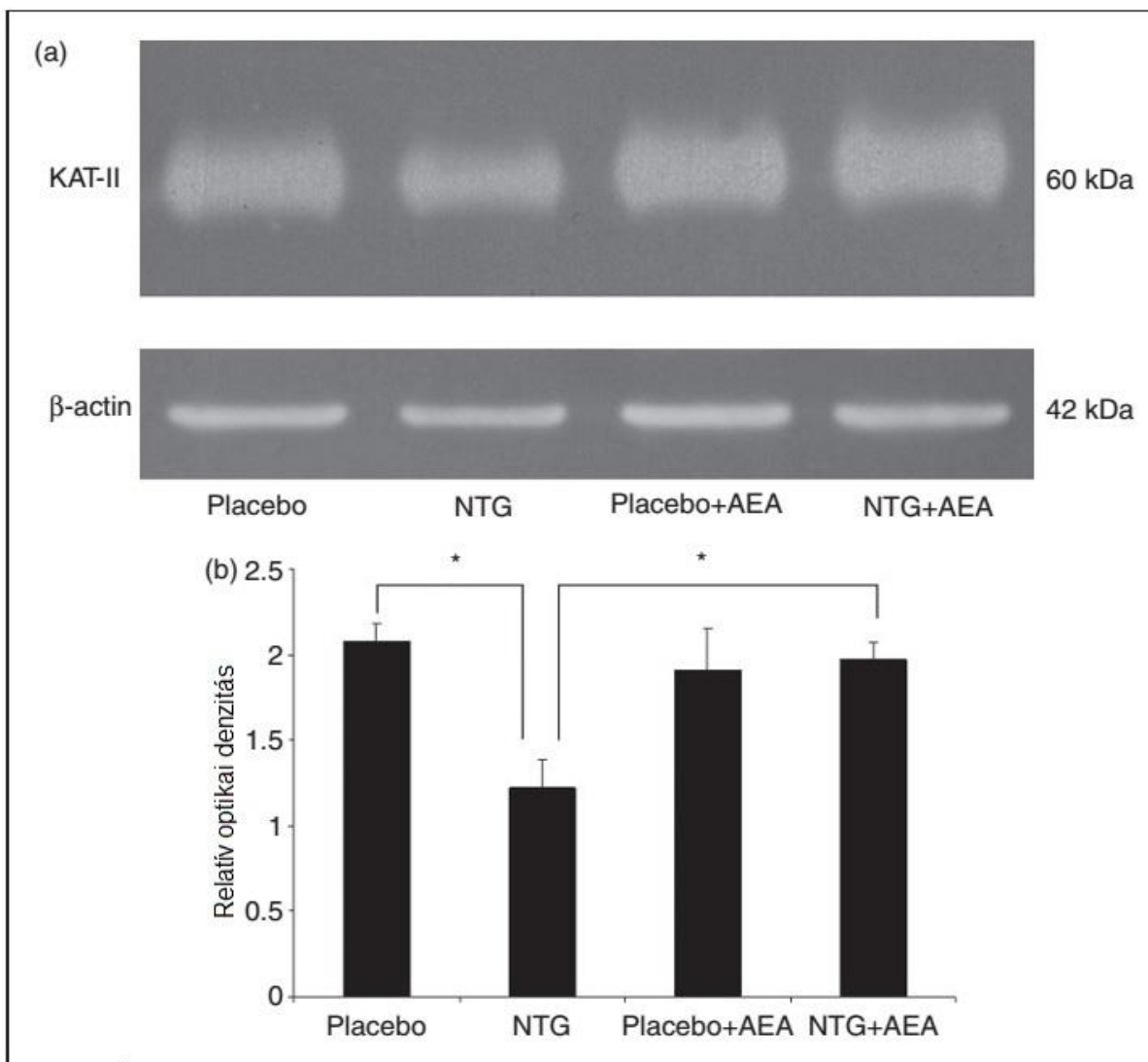
82. ábra. (a) nNOS és β -aktin Western blot expresszió a TNC-ben. (b) A kvantitatív elemzés alapján a NTG kezelés szignifikánsan megemeli a nNOS relatív optikai denzitását a placebo csoporthoz képest. Az AEA kezelés ezt a hatást kivédi (átlag + S.E.M, n=5 csoportonként, * p<0,05, ** p<0,01). **AEA:** anandamid, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag.



83. ábra. (a) Reprezentatív metszetek a patkány TNC-ből NFkB festéssel. (b) A NFkB-IR sejtek átlagos száma a TNC-ben. A NTG hatására szignifikánsan emelkedik a NFkB a placebohoz képest, míg az AEA adása ezt a változást kivédi (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként, * p<0,05). **AEA:** anandamid, **IR:** immunoreaktív, **NFkB:** nukleáris faktor kappá béta, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag. Lépték 100 µm.



84. ábra. (a) COX2 és β -aktin Western blot expresszió a patkány TNC-ben. (b) A kvantitatív elemzés alapján a NTG kezelés szignifikánsan megemeli a COX2 relatív optikai denzitását a placebo csoporthoz képest. Az AEA kezelés ezt a hatást kivédi (átlag + S.E.M, n=5 csoportonként, ** p<0,01). **AEA:** anandamid, **COX2:** ciklooxygenáz-2, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag.



85. ábra. (a) KATII és β -aktin Western blot expresszió a TNC-ben. (b) A kvantitatív elemzés alapján a NTG kezelés szignifikánsan lecsökkenti a KAT-II relatív optikai denzitását a placebo csoporthoz képest. Az AEA kezelés ezt a hatást kivédi (átlag + S.E.M, n=5 csoportonként, * p<0,05). **AEA:** anandamid, **KATII:** kinurenin aminosztransferáz 2, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag.

Megbeszélés

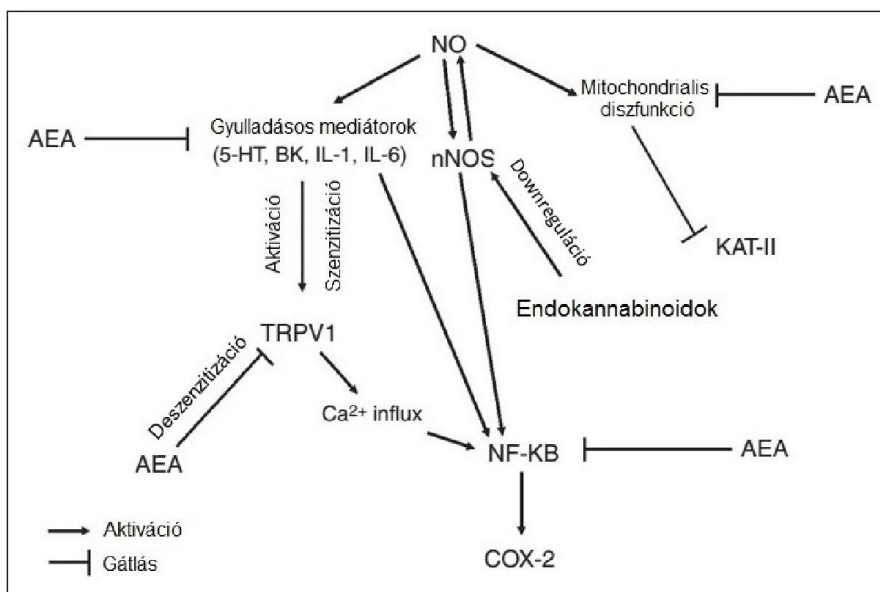
Megfigyeléseink azt mutatják, hogy a CB és TRPV1 agonista AEA kivédi a NTG TRPV1 expressziót fokozó hatását. Ez párhuzamba állítható azzal, hogy az ionotróp CB receptorok aktiválódása bizonyos fájdalom modellekben a nocicepció receptorainak gátlását, valamint a hiperalgészia csökkenését eredményezi (Akopian 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 posztszinaptikus 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 állhat, hogy képes a citokin kaszkádra hatva a tumor nekrosis faktor által mediált aktivációt gátolni (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., 2005b). 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 gyulladásos kaszkád gátlására is, és lehetséges, hogy ez eredményezi a COX2 csökkenő megjelenését.

A NTG okozta KATII csökkenést megakadályozza az AEA adása, mely 2-arachidonoil-glicerinhez 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. A NO által befolyásolt molekulákról és az AEA esetleges támadáspontjairól lásd a **86. ábrát**.



86. ábra. A NO által befolyásolt molekulák közötti kapcsolat sematikus ábrázolása. Az AEA lehetséges támadáspontjai. **5HT:** szerotonin, **AEA:** anandamid, **BK:** bradikinin, **COX2:** ciklooxygenáz-2, **IL:** interleukin, **KATII:** kinurenin aminosztransferáz 2, **NFkB:** nukleáris faktor kappa béta, **nNOS:** neuronális nitrogén-oxid szintáz, **NO:** nitrogén-monoxid, **TRPV1:** tranziens receptor potenciál vanilloid 1.

5HTT

Háttér

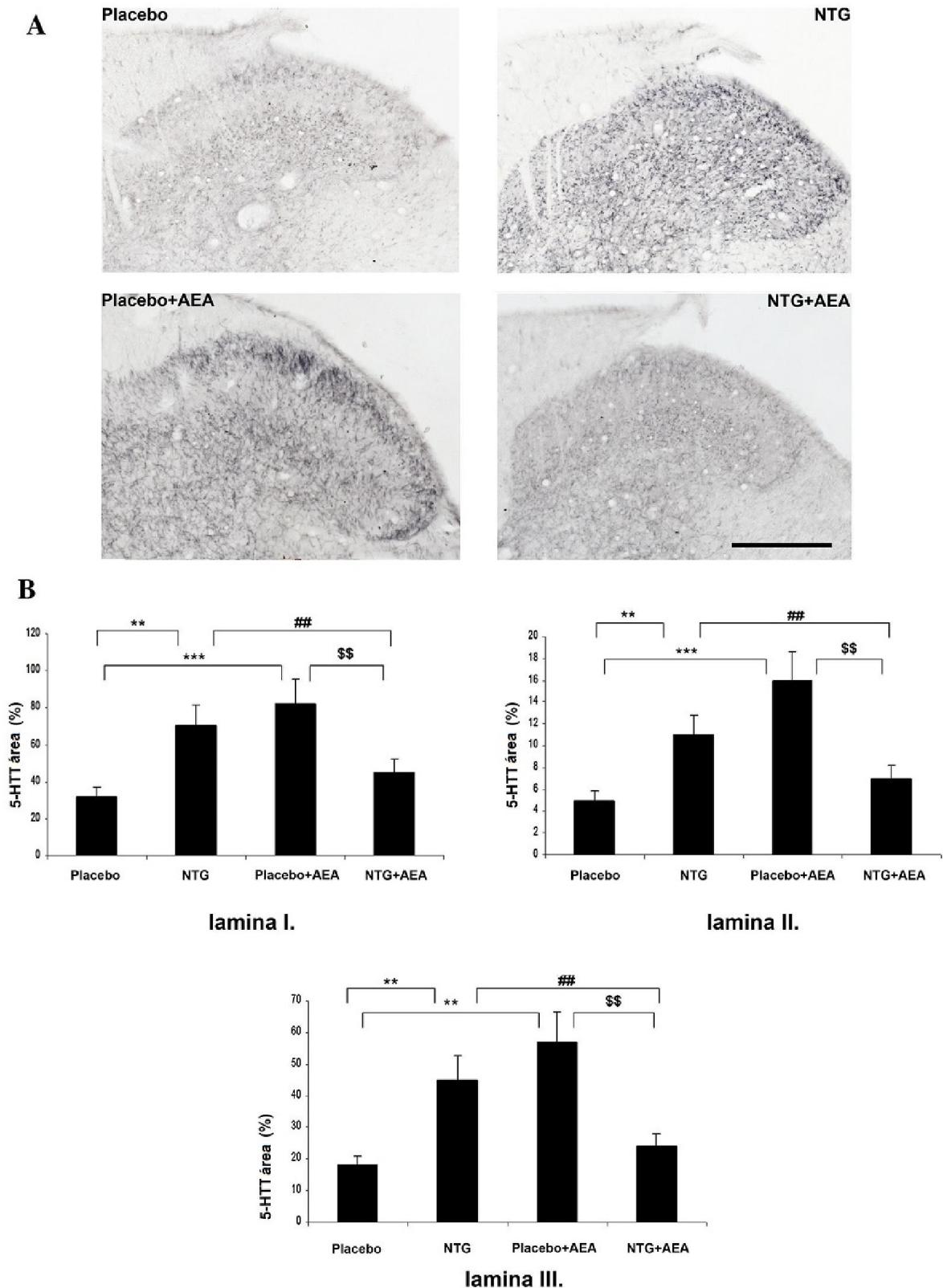
A kísérleti adatok szerint a migrén és a vérlemezkék 5HT homeosztázisa összefüggenek egymással (Danese és mtsai., 2014), és ez utóbbira hatással lehetnek kannabinoidok: a $\delta 1$ -tetrahidrokannabinol képes a 5HT vérlemezkékből történő felszabadulását gátolni (Volfe és mtsai., 1985), míg a 5HT felvétel többfajta kannabinoid is gátolni képes (Velenovska és Fisar 2007, Volfe és mtsai., 1985). A szerotoninerg rendszer és a kannabinoidok 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

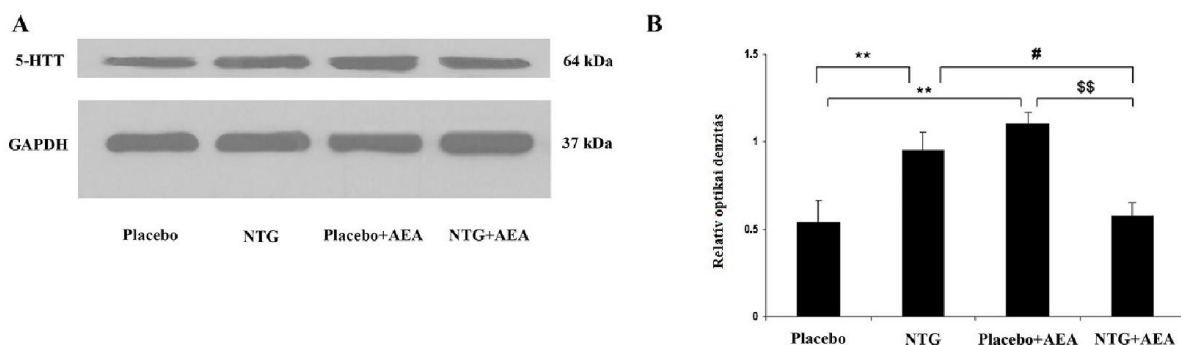
A vizsgálathoz felnőtt hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. A csoportok és az állatok kezelése megegyezett az előző fejezetben leírtakkal. Négy órával a NTG/placebo adását követően az állatokat perfundáltuk, a TNC-t eltávolítottuk immunhisztokémiai (n=6 csoportonként) és Western blot vizsgálatok (n=5 csoportonként) 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 GAPDH meghatározást használtunk. Az adatok statisztikai elemzése ANOVA-val történt LSD post-hoc teszttel, a szignifikancia szint $p < 0,05$ volt. Pontosabban a 6.1.1., 6.3.1., 6.3.2. és 6.3.4. fejezetben írunk a módszerekről.

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 (**87-88. ábra**).



87. ábra. A 5HTT immunhisztokémiai eredmények összefoglalása. (A) Reprezentatív metszetek a patkány TNC-ből 5HTT immunfestés után mindegyik állatcsoportból. Az I. és III. laminákban ábrázolódó rostok denzitása magasabb, mint a II. laminában. (B) A 5HTT tartalmú rostok által innervált területek a patkány TNC I-III. laminájában. A NTG és az AEA csoportban ez a terület szignifikánsan nagyobb, mint a placebo csoportban. A NTG+AEA kombinált kezelés kioltotta ezt a hatást (átlag + S.E.M, n=6 csoportonként, ## p<0,01, \$\$ p<0,01, ** p<0,01, *** p<0,001). **5HTT:** szerotonin transzporter, **AEA:** anandamid, **NTG:** nitroglicerín, **TNC:** kaudális trigeminális mag. Lépték: 100 μ m.



88. ábra. A Western blot adatok összefoglalása. (A) A 5-HTT és GAPDH Western blotjai a TNC-ből. (B) A NTG és az AEA csoportban az optikai denzitás szignifikánsan magasabb a placebo csoporthoz viszonyítva. A NTG+AEA kezelés ezt a hatást kivédte (átlag + S.E.M, n=5 csoportonként, # p<0,05, \$\$ p<0,01, ** p<0,01). **5HTT**: szerotonin transzporter, **AEA**: anandamid, **GAPDH**: gliceraldehid-3 foszfát dehidrogenáz, **NTG**: nitroglicerin, **TNC**: kaudális trigeminális mag.

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 gyulladási 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 expresszió növekedése 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 önerősítő 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 neurotransmisszió 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 szerotoninerg pályák fejfájásban betöltött szerepét erősíti.
4. A NTG megemelte mind a TRPV1, a COX2 és a NFκB expresszióját a TNC területén, melyek mind a gyulladáshoz kapcsolódó 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 ipsilaterális 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 ösztradiol hatása a trigeminális fájdalomra komplex folyamat, jelentősen függhet a stimulus minőségétől.

12. A glutamát antagonistá KYNÁ magasabb koncentrációja a központi idegrendszerben vagy a KYNÁ analógok alkalmazása kivédte a NTG okozta változásokat, azaz befolyásolja az aktivációs és szenzitizációs mechanizmusokat a trigeminális rendszerben.
13. A KYNÁ 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 KYNÁ, 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 KYNÁ 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 vesz részt 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 KYNÁ 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. ANYAG ÉS MÓDSZER

6.1 A migrén állatkísérletes modelljei

6.1.1. NTG szisztémás adása patkányban

A kísérletekhez felnőtt patkányokat használtunk (Wistar, Sprague-Dawley), a kezelésben részesülő állatok 10 mg/kg dózisu NTG injekciót kaptak s.c. (Nitrolingual® Pohl Boskamp GmbH, Németország oldatból készítve), a kontrollcsoport a gyógyszer gyári oldószerét kapta (Pohl Boskamp GmbH, Németország).

6.1.2. Patkány orofaciális formalin modellje

A felnőtt patkányok fele 50 µl 1,5%-os formalin oldatot (0,55% formaldehid tartalom) kapott 26 G-s injekcióstűvel s.c. a jobb oldali felső bajuszpárnába, míg a kontroll csoportnál 50 µl fiziológiás sóoldatot injekcióztunk.

6.1.3. A TG elektromos ingerlése patkányban

A kísérletekben felnőtt Sprague-Dawley patkányokat használtunk. Az állatokat mély klorálhidrát (Sigma-Aldrich, USA) altatásba helyeztük (400 mg/kg intraperitoneálisan – i.p. adott gyógyszer segítségével), majd sztereotaxiás állványba rögzítettük (Stoelting Co., USA). A bőrmetszés után egy fogorvosi fúróval lyukat vájtunk a bregmától 3,2-3,4 mm-re hátra és 2,8-3,2 mm-re laterálisan majd ezt követően egy koncentrikus bipoláris elektródát (FHC Inc., USA) süllyesztettünk a TG-ig. A kontrollcsoport nem kapott elektromos ingerlést, az elektróda 30 percen keresztül ebben a helyzetben volt. Az ingerelt csoport állatai 30 percen keresztül 10 Hz frekvenciájú, 0,5 mA áramerősségű és 5 ms impulzushosszúságú ingerlést kaptak (Electrostimulator ST3, Medicor Magyarország). Az ingerlés alatt jelentkező rágóizom aktivitás jelezte az elektróda jó helyzetét, mely utóbbit a TG feldolgozásánál is ellenőriztük.

Más kísérletekben enyhébb elektromos stimulációt is alkalmaztunk, ebben az esetben a kísérlet hasonlóan zajlott az előzőekben leírtakhoz, de az elektróda behelyezése 5 percig tartott, az ingerlés 5 Hz frekvenciával, 0,5 mA áramerősséggel és 5 ms impulzushosszúsággal történt.

6.1.4. A patkány dura mater kémiai ingerlése

A felnőtt patkányokat (Sprague-Dawley) 400 mg/kg klorálhidrát (Sigma-Aldrich, USA) i.p. adásával altattuk el, majd sztereotaxiás állványba rögzítettük őket (Stoelting Co., USA). A skalpot lidokain infiltrációval érzéstelenítettük (20 mg/ml; Egis, Magyarország, melyet 1 mg/ml koncentrációra hígítottunk) 4,5 mg/kg dózist alkalmazva. Fogászati fúróval 2x2 mm-es lyukat fúrtunk a koponyán (bregmától 5 mm-re hátra és a középvonaltól 3 mm-re oldalt a jobb félteke felett), melyet alacsony sebességgel és folyamatos fiziológiás sóoldatos hűtéssel végeztünk, ügyelve, hogy a dura ne sérüljön. Az

állatok egy részénél a durális felületre CFA-t adtunk, mely inaktivált *Mycobacterium bovis* olajos szuszpenziója (Sigma-Aldrich, USA), az állatok másik része IS-t kapott (1 mM bradikinin, 100 µM prosztaglandin, 1 mM 5HT, 1 mM hisztamin, pH: 5,0 20 mM HEPES pufferben). A kontrollcsoportok fiziológias sóoldat vagy SIF kezelést kaptak (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5mM CaCl₂, 10 mM glükóz 10 mM HEPES pufferben, pH: 7,3). Az oldatok oldalirányú áramlását megakadályozandó, az állatok fejét úgy pozícionáltuk, hogy a durális ablak vízszintes legyen. Hús perc után a területet fiziológias sóoldattal mostuk le.

6.1.5. A CSD kiváltása és regisztrációja kísérleti állatokban

A felnőtt Sprague-Dawley patkányokat klorálhidrát (Sigma-Aldrich, USA) segítségével altattuk el (400 mg/kg i.p.), majd ezt követően sztereotaxiás készülékben rögzítettük őket (David Kopf Instruments, USA), a rectalis testhőmérsékletet melegítő takaró segítségével (ATC 1000®, WPI Inc., USA) 36,5-37°C között tartottuk a beavatkozás során. A koponyán 3 db 1-2 mm átmérőjű fúrt lyukat készítettünk 2 mm-re a középvonaltól: 7 mm-el a bregma mögött (occipitális régió – stimulációs hely), 4 mm-el a bregma mögött (occipitoparietális regisztráló hely), 1 mm-el a bregma előtt (frontális regisztráló hely). A CSD-t 1 M KCl-al átítatott vattával váltottuk ki, melyet a stimulációs helyen a durára helyeztünk. A CSD hullámokat 1 órán át regisztráltuk és az 5 mV-nál nagyobb negatív potenciálváltozásokat figyelembe véve frekvenciát számoltunk (Ayata és mtsai., 2006). A két regisztrációs pont segítségével a CSD terjedési sebességét is meg tudtuk határozni, illetve kiszámítható volt az occipitoparietális – frontális CSD megjelenési arány is. A potenciálváltozásokat üveg, mesterséges cerebrospinalis folyadékot tartalmazó (NaCl 130 mM, MgSO₄ 1,25 mM, KCl 3,5 mM, NaH₂PO₄ 1,25 mM, CaCl₂ 2 mM, NaHCO₃ 24 mM, glucose 10 mM, pH 7,4) mikropipettákba helyezett Ag/AgCl elektródákkal detektáltuk, melyeket a kortexbe süllyesztettünk (átlagosan 800 µm-el a dura alá). A referencia elektródát a nyak szubkután szöveteibe vezettük. Az elektromos jeleket ISODAM-8A készülékkel erősítettük 10 kHz sáv szélességnél (WPI Inc., USA), a digitalizáció 200 Hz mintavételi frekvenciával történt, majd a tárolást és az elemzést a Micro1401 MKII és Spike2 szoftver segítette (CED Co., UK).

6.2. Ovariectómia és ösztrogénkezelés

A nőstény Sprague-Dawley patkányokat 2 hónapos korukban műtöttük 400 mg/kg dózisú i.p. klorálhidrát altatásban (Sigma-Aldrich, USA). A beavatkozás előtt az állatok hátát leborotváltuk, majd fertőtlenítés után az aseptikus körülményekre továbbra is ügyelve az állatok hátán kb. 3 cm hosszú középvonali vágást ejtettünk a hát alsó harmadában, ezt követően 1,5 cm hosszú peritoneális metszést ejtettünk és a hasüregben felkerestük a petefészkeket. Az erek lekötése után a petevezetéseket átvágtuk és a petefészkeket eltávolítottuk. Ezt követően az állatokat véletlenszerűen két csoportba osztottuk. Az OVX csoport állatainak bőre alá két darab koleszterollal (15 mg, Sigma-Aldrich, USA) töltött 15 mm hosszúságú szilikonkapszulát (3,18 mm külső átmérő és 1,57 mm belső átmérő, Dow Corning, USA) helyeztünk, míg az OVX+E₂ csoport állatai ugyanilyen kapszulákat kaptak, de azok ösztradiol (7,5 mg, Fluka, Sigma-Aldrich, USA) és koleszterol (7,5 mg) 1:1 arányú keverékével voltak megtöltve. A kapszulákat a lapockák közötti területre ültettük be, majd a hashártyát és a bőrt felszívódó varratokkal zártuk. A műteti eszközöket 70%-os etanolban fertőtlenítettük. Az állatok hőmérsékletét elektromos melegítő takaróval tartottuk fent. További fájdalomcsillapítás céljából az állatok carprofent (Rimadyl® Zoetis, Magyarország) kaptak 5 mg/kg dózisban s.c. a műtét napján 3 alkalommal, egyszer a beavatkozás előtt, majd azt követően kétszer (24, ill. 48 óra elteltével).

6.3. Vizsgálati módszerek

6.3.1. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az állatokat mély pentobarbital (Nembutal®, Sanofi-Synthelabo, Franciaország, 80 mg/kg) altatást követően transzkardiálisan perfundáltuk 100 ml fiziológias sóoldattal, majd 500 ml foszfát puffer sóoldatban (PBS) oldott 4%-os formalinnal. A megfelelő szövetmintákat (TNC, Th1 gerincvelői szegmentum, agytörzs többi része) eltávolítottuk és egy éjszakán át posztfixáltuk.

Krioprotekciót követően (10% majd 20%, illetve 30%-os szacharóz oldatban egy éjszakán keresztül) a szövetmintákból fagyasztott 30 µm sorozatmetszeteket készítettünk kriosztát segítségével. A metszeteket egymás után egy 18 lyukú sejt kultúra lemezbe gyűjtöttük össze 0,1 M-os PBS oldatban. Mivel a sorozatmetszetek egymás után kerültek a lyukakba, az egy helyen lévő metszetek közötti távolság 0,54 mm volt. A metszés előtt a blokkok elülső, releváns struktúráját nem tartalmazó oldalán a középvonaltól oldalra egy felszínes ferde metszést ejtettünk, mely segítette a metszetek későbbi sorrendbe rendezésében. A szabadon úszó metszeteket először 0,3% H₂O₂ oldattal kezeltük, hogy gátoljuk az endogén peroxidázokat, majd több alkalommal 0,1 M-os PBS 1%-os Triton X-100-t (Spektrum 3D Magyarország) (PBS-T) tartalmazó oldatban mostuk. Ezt követően a metszeteket inkubáltuk a megfelelő primer antitestekkel (1. Táblázat), majd ismételt többszöri mosás következett PBS-T oldatban. Ezt követően a mintákat a másodlagos antitesttel inkubáltuk a primer antitest speciesének megfelelő választva (1:600 hígításban szobahőn 2 órán át). Ismételt PBS-T-s mosások után az immunhisztokémiai reakciót Vectastain® (Vector Laboratories Inc., USA) avidin-biotin kittel (ABC) tettük láthatóvá nikkell-ammónium-szulfáttal felerősített 3',3' diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, USA) segítségével. A reakció specificitását az elsődleges antitest kihagyásával ellenőriztük. A metszeteket nagyító alatt a megfelelő sorrendben tárgylemezre vittük, majd száradás után DPX médiummal (Scharlau Chemie, Spanyolország) lefedtük őket. A metszeteket Nikon Phase Contrast (Nikon Corporation, Japán) vagy Zeiss Axioimager fénymikroszkóppal vizsgáltuk (Carl Zeiss Microscopy, Németország).

1.Táblázat. Az immunhisztokémiai festésekhez használt elsődleges antitestek részletes adatai

Antigén	Ellenanyag állatfaj	Hígítás	Inkubáció	Előállító cég
nNOS	nyúl	1:20000	2 éjszaka, 4°C (3.1.1. 3.2.3., 4.1., 4.2.,)	Euro-Diagnostica, Svédország B 220-1
nNOS	nyúl	1:5000	1 éjszaka szobahőn (4.9.) 2 éjszaka, 4°C (3.4.2, 4.3, 4.6. 4.7, 4.10)	EuroProxima, Hollandia 2263B220-1
c-fos	nyúl	1:3000 1:2000 1:1000 1:1000 1: 2000	3 éjszaka, 4°C (3.1.1.,3.2.3.) 2 éjszaka 4°C (3.3.1.) 2 éjszaka 4°C (3.3.1.) 1 nap szobahőn (4.9.) 1 nap szobahőn (3.4.1. 4.5.)	Santa-Cruz Biotechnology, USA sc-52-G Santa-Cruz Biotechnology, USA sc-7202
CGRP	nyúl	1:20000	2 éjszaka 4°C (3.1.2., 4.4.)	Amersham Biosciences AB, Svédország; RPN. 1842
CGRP	nyúl	1:20000	2 éjszaka 4°C (3.2.2., 3.4.2., 4.3., 4.7., 4.9.)	Sigma, Németország, C-8198
5HT	nyúl	1:200000	2 éjszaka 4°C (3.1.3., 4.4.)	DiaSorin Inc., USA, 20080
5HTT	nyúl	1:100000	2 éjszaka 4°C (3.1.3., 4.10.)	Merck Millipore, USA ab9726
CamKII	egér	1:2000	3-4 éjszaka 4°C (3.1.4., 4.1., 4.4., 4.9.)	Sigma Chemical Co., USA, C265
TRPV1	nyúl	1:500 1:1000	1 nap szobahőn (3.1.5., 4.10.) 1 nap szobahőn (3.4.2.,4.3.,4.7.)	Santa Cruz Biotechnology, USA, s.c.28759
NFkB	nyúl	1:100	2 éjszaka 4°C (3.1.5., 4.10.)	Abcam, Egyesült Királyság ab97726

6.3.2. Western blot

Az állatokat mély pentobarbital (Nembutal®, Sanofi-Synthelabo, Franciaország, 80 mg/kg) altatást követően transzkardiálisan perfundáltuk 200 ml fiziológias sóoldattal, majd a megfelelő szövetrészeket (TNC, Th1 gerincvelői szegmentum, agytörzs egyes részei) sztereomikroszkóp alatt izolálva eltávolítottuk. Az így kapott minták tömegét megmértük, majd jéghideg lízispufferben egy percig ultrahangos szonikátorral homogenizáltuk 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Igepal, 0,1% kólsav, 2 µg/ml leupeptin, 2 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatin, 2 mM EDTA és 0,1% SDS oldatban. Ezután a mintákat 12000 rpm-en, 10 percig, 4°C-on centrifugáltuk, majd a fehérjét tartalmazó felülúszót felhasználásig - 20°C-on tároltuk. A fehérjekoncentrációkat Bradford (Bradford 1976) vagy BCA Protein Assay Kit (Millipore, USA) segítségével határoztuk meg. Az azonos mennyiségű fehérjét (20 µg/sor) tartalmazó mintákat SDS-PAGE protokoll szerint futtattuk 200V feszültséget alkalmazva 1 órán keresztül, 10%-os Tris-glicin géllal, míg a CGRP esetén 15%-os gélt alkalmazva. Az elektrotranszfer Immobilon P (Millipore, USA) vagy Amersham Hybond ECL (GE Healthcare Life Sciences, Magyarország) membránra történt. A transzfert blokkolás követte 5%-os zsírmentes tejpor oldatban, és ezután a membránokat a megfelelő protein és belső kontroll fehérje primer antitest oldatában inkubáltuk (2. Táblázat). A másodlagos antitest hozzáadása után a fehérjecsíkokat ECL Western blot analízis készlettel (Amersham Biosciences AB, Svédország) vagy Super-Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, USA) rendszerrel vizualizáltuk, a kvantitatív vizsgálatot lézer denzitométerrel végeztük (Pharmacia LKB, Svédország). A specifikus csíkok optikai denzitását megmértük és ugyanazon minta belső kontroll fehérjéjének denzitásával korrigáltuk.

2.Táblázat: A Western blothoz használt elsődleges antitestek részletes adatai

Antigén	Ellenanyag állatfaj	Hígítás	Előállító cég
nNOS	egér	1:1000 (3.1.1., 4.1., 4.2.)	Transduction Laboratories, USA N31020
nNOS	egér	1:2500 (4.4.9., 4.6.) 1:2000 (4.10.)	BD Biosciences, USA, 610308
CamKII	egér	1:1000 (3.1.4., 4.4.)	Sigma Chemical Co., USA, C265
CGRP	nyúl	1:2000 (4.9.)	Sigma-Aldrich, Németország, C-8198
5HTT	nyúl	1:2000 (3.1.3., 4.10.)	Merck Millipore, USA, ab9726
COX2	nyúl	1:1000 (3.1.5, 4.10.)	Proteintech, USA, 12375-1-AP
KATII	egér	1:10000 (3.1.6., 4.10.)	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-67376
TDO	nyúl	1:500 (3.1.6.)	LifeSpan BioSciences, USA, LS-C111058
IDO	nyúl	1:500 (3.1.6.)	Abcam, Egyesült Királyság, ab106134
KYNU	nyúl	1:500 (3.1.6.)	Abcam, Egyesült Királyság, ab96365
KMO	nyúl	1:4000 (3.1.6.)	Abcam, Egyesült Királyság, ab83929
β -aktin	egér	1:4000 (3.1.4., 4.1., 4.2., 4.4.)	Sigma Chemical Co., USA, A5441
β -aktin	egér	1:2000 (4.6.) 1:10000 (4.9.) 1:100000 (3.1.5., 3.1.6., 3.1.8. 4.10.)	Calbiochem, USA, CP01
GAPDH	nyúl	1:1000 (3.1.6 4.10.)	Cell Signaling Technology, USA, 8884

6.3.3. HPLC

Az állatokat klorálhidrát altatást követően (0,4 g/kg, Sigma-Aldrich) 5 percen keresztül PBS-el transzkardiálisan perfundáltuk. A mintákat eltávolítottuk, majd az analízisig -70 °C-on tároltuk, később 250 µl desztillált vízben homogenizáltuk és 62,5 µl 8%-os perklórsavval deproteináltuk őket. Az Eppendorf csövek tartalmát 10 percen át 4°C-on 12000 rpm fordulatszámom centrifugáltuk és a felülúszót fecskendőhöz kapcsoltan (Millipore, Bedford, USA, SLHV 013 NL) szűrtük át.

A minták KYNA koncentrációját Agilent 1000 HPLC rendszerrel (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) határoztuk meg fluoreszcens detektálással (excitációs és emissziós hullámhossz 344, illetve 398 nm). Az 50 µl térfogatú mintákat Hypersil ODS HPLC oszlopra vittük (150 mm x 4 mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, 30105-154030). Izokratikus kromatográfia történt 0,2 M cink acetátot és 5% acetonitritet tartalmazó mobil fázissal (pH =6,2), 1 ml/perc áramlási sebességgel. A KYNA retenciós ideje kb. 6 percnél bizonyult, az értékeket pmol/g nedves tömegben fejeztük ki.

6.3.4 Képanalízis

A hátsó szarvban a CGRP- és 5HT-IR rostok által borított területet képanalizátorral határoztuk meg Image Pro Plus 4.0 rendszer segítségével (Media, Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). A metszeteket átmenőfényes mikroszkópiával vizsgáltuk 10x vagy 4x nagyítású objektív segítségével. A képeket egy SONY 950-PP CCD kamerával (Sony Corporation, Japán) vettük fel és a kép digitalizálása után kijelöltük azt a határértéket, mely segítségével meghatározható az IR rostok által fedett terület (diszkriminációs lépés). Mivel a manuális határérték beállítás hibás méréseket eredményezhet, ezért ezt igyekeztünk objektívizálni és automatizálni: a program először denzitás hisztogramot hozott létre és a határértéket ott jelezte, ahol a hisztogram lapos része (sötétebb – denz, pixelek) meredeken emelkedni kezdett. A program kiszámolta a határértéknél sötétebb pixelek által fedett területet, mely megfelel a rostok által fedett területnek. Kalibrációként ismert területű különböző alakú képeket használtunk. A méréseket vakon végeztük, legalább 16 metszetet vizsgáltunk minden állatcsoportnál és az értékeket átlagoltuk.

A fentiekhez hasonlóan jártunk el további kísérleteinkben, amikor a 5HTT-, a TRPV1- és a nNOS-IR által fedett területet határoztuk meg a hátsó szarv területén. A képeket AxioCam MRc Rev. 3 kamerával (Carl Zeiss Microscopy, Németország) készítettük, majd Image Pro Plus 6.2 rendszer segítségével (Media, Cybernetics, USA) elemeztük. A pixel-denzitás hisztogram alapján a program meghatározta a határértéket és kiszámolta az IR által fedett terület százalékos arányát. A NFkB sejtek számát optikai disszektor módszerrel határoztuk meg (Gundersen és mtsai., 1988) és térfogategységre adtuk meg.

Az CGRP- és 5HT/5HTT-IR boutonok méretét ugyanezzel a felszereléssel 40x nagyítású objektív használatával határoztuk meg. Ezen nagyítás mellett egy metszeten belül különböző optikai síkokkal is történhetett a mérés. Beazonosítottuk a fókuszban lévő boutonokat és ezt követően a program ezek méretét, mint egyedi objektumokét meghatározta. Minden állatcsoportban 450-500 boutonot mértünk le.

6.3.5. Viselkedésvizsgálatok

Viselkedésvizsgálatok NTG szisztémás adása után

Az open-field teszt előtt az állatokat egy félhomályos, csendes helyiségben 30 percen keresztül szoktattuk. A méréseket világosban végeztük délelőtt 11 és délután 4 óra között. Elkerülendő a NTG kardiovaszkuláris hatásai kapcsán kialakuló viselkedésváltozásokat (Markovics és mtsai., 2012) a

teszteket 3 órával és 40 perccel a NTG vagy placebo beadása után kezdtük. Az állatokat az open-field dobozba helyeztük (48 x 48 x 40 cm, Experimetria Ltd., Magyarország), majd 15 percen keresztül rögzítettük a járkálási időt és távolságot és az ágaskodások számát. Ezeket az adatokat Conducta 1.0 viselkedésanalizáló programmal elemeztük ki (Experimetria Ltd., Magyarország). Az állatok nem kaptak élelmet vagy vizet a kísérlet alatt és minden vizsgálat után fertőtlenítettük a dobozt.

Viselkedésvizsgálatok az orofaciális formalin modellben

A viselkedésvizsgálatokat nappal végeztük (reggel 8 és délután 2 óra között) zajmentes körülmények között egy 30x30x30 cm-es tükörfalú terráriumban, melyet a doboz felett 1 méterrel elhelyezkedő videokamerával rögzítettünk (Logitech HD Webcam C615; Logitech Inc., Newark, NJ, USA). Tíz perces habituáció után a patkányok jobb oldali bajuszpárnáiba 50 µl formalin vagy fiziológiás sóoldatot injektáltunk. Ezt követően az állatokat azonnal visszatettük a dobozba, ahol 45 percen keresztül vizsgáltuk őket. A patkányok ez idő alatt nem kaptak enni- vagy innivalót, minden vizsgálat után fertőtlenítettük a terráriumot, és a felvételeket egy, a kísérletektől független személy értékelte ki. A 45 perces időtartamot 15x3 perces blokkokra osztottuk, és a beoltott terület vakarásával töltött összes idő másodpercben adta meg az adott blokk nociceptív pontszámát. Kontrollként a fiziológiás sóoldatot kapott állatok viselkedésválaszát alkalmaztuk, mint ahogy ezt a korábbi tanulmányokban leírták (Clavelou és mtsai., 1995).

6.4. Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzéseket vagy az SAS (Version 6.12 for Windows; SAS Institute, Cary, NC, USA) vagy az SPSS (version 11.00, 17.00, 20.0, 24.00 for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, USA/ IBM Corp, Armonk, NY, USA) vagy StatView (Version 4.57 for Windows, Abacus Concepts Inc., Berkley, NC, USA) statisztikai elemzőprogrammal végeztük. A szignifikanciaszint $P < 0,05$ volt.

7. 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. PubMed PMID: 11043526.

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. PubMed PMID: 12081660.

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. PubMed PMID: 15154853.

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. PubMed PMID: 17212683.

Varga H, **Párdutz Á**, Vamos 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. PubMed PMID: 17927648.

Varga H, **Párdutz Á**, Vamos E, Bohar 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. doi: 10.1016/j.neulet.2008.12.038. Epub 2008 Dec 25. PubMed PMID: 19121366.

Vámos E, **Párdutz Á**, Varga H, Bohár Z, Tajti J, Fülöp F, Toldi J, Vécsei 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. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.06.033. Epub 2009 Jul 4. PubMed PMID: 19580819.

Chauvel V, Vamos 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. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.05.002. Epub 2012 May 14. PubMed PMID: 22587906.

Bohár Z, Fejes-Szabó A, Tar L, Varga H, Tajti J, **Párdutz Á**, Vécsei L. Evaluation of c-Fos immunoreactivity in the rat brainstem nuclei relevant in migraine pathogenesis after electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Neurol Sci*. 2013 Sep;34(9):1597-604. doi: 10.1007/s10072-013-1292-1. Epub 2013 Jan 25. PubMed PMID: 23354602.

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**, Vécsei 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. doi: 10.1007/s00702-013-1146-2. Epub 2014 Jan 3. PubMed PMID: 24385076.

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. PubMed PMID: 25106627.

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. PubMed PMID: 26512068.

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. doi: 10.3389/fneur.2017.00278. Erratum in: Front Neurol. 2020 Sep 24;11:1049. PMID: 28659861; PMCID: PMC5469907.

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. doi: 10.1016/j.jchemneu.2017.06.002. Epub 2017 Jun 15. PMID: 28625856.

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. doi: 10.2147/JPR.S165969. PMID: 30310305; PMCID: PMC6165783.

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. doi: 10.1186/s10194-020-01169-4. PMID: 32799798; PMCID: PMC7429748.

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.

8. 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, aki odafigyelésével nagyon sokat segített 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.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abbadie C, Besson JM. c-fos expression in rat lumbar spinal cord during the development of adjuvant-induced arthritis. *Neuroscience*. 1992 Jun;48(4):985-93. doi: 10.1016/0306-4522(92)90287-c. PMID: 1630632.
2. Abrams J. Pharmacology of nitroglycerin and long-acting nitrates. *Am J Cardiol*. 1985 Jul 10;56(2):12A-18A. doi: 10.1016/0002-9149(85)91200-7. PMID: 3925750.
3. Adams J, Collaço-Moraes Y, de Belleruche J. Cyclooxygenase-2 induction in cerebral cortex: an intracellular response to synaptic excitation. *J Neurochem*. 1996 Jan;66(1):6-13. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.66010006.x. PMID: 8522990.
4. Addae JJ, Ali N, Stone TW. Effects of AMPA and clomethiazole on spreading depression cycles in the rat neocortex in vivo. *Eur J Pharmacol*. 2011 Feb 25;653(1-3):41-6. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.11.021. Epub 2010 Dec 11. PMID: 21147095.
5. Afridi KS, Kaube H, Goadsby PJ. Glyceryl trinitrate triggers premonitory symptoms in migraineurs. *Pain*. 2004 Aug;110(3):675-680. doi: 10.1016/j.pain.2004.05.007. PMID: 15288408.
6. Afridi SK, Matharu MS, Lee L, Kaube H, Friston KJ, Frackowiak RS, Goadsby PJ. A PET study exploring the laterality of brainstem activation in migraine using glyceryl trinitrate. *Brain*. 2005 Apr;128(Pt 4):932-9. doi: 10.1093/brain/awh416. Epub 2005 Feb 10. PMID: 15705611.
7. Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL, Zeilhofer HU. PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci*. 2002 Jan;5(1):34-40. doi: 10.1038/nn778. PMID: 11740501.
8. Akerman S, Kaube H, Goadsby PJ. Anandamide is able to inhibit trigeminal neurons using an in vivo model of trigeminovascular-mediated nociception. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Apr;309(1):56-63. doi: 10.1124/jpet.103.059808. Epub 2004 Jan 12. PMID: 14718591.
9. Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. Cannabinoid (CB1) receptor activation inhibits trigeminovascular neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Jan;320(1):64-71. doi: 10.1124/jpet.106.106971. Epub 2006 Oct 3. PMID: 17018694.
10. Akerman S, Holland PR, Summ O, Lasalandra MP, Goadsby PJ. A translational in vivo model of trigeminal autonomic cephalalgias: therapeutic characterization. *Brain*. 2012 Dec;135(Pt 12):3664-75. doi: 10.1093/brain/aws249. Epub 2012 Oct 11. PMID: 23065481.
11. Akerman S, Holland PR, Lasalandra MP, Goadsby PJ. Endocannabinoids in the brainstem modulate dural trigeminovascular nociceptive traffic via CB1 and "triptan" receptors: implications in migraine. *J Neurosci*. 2013 Sep 11;33(37):14869-77. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0943-13.2013. PMID: 24027286; PMCID: PMC3771033.
12. Akerman S, Karsan N, Bose P, Hoffmann JR, Holland PR, Romero-Reyes M, Goadsby PJ. Nitroglycerine triggers triptan-responsive cranial allodynia and trigeminal neuronal hypersensitivity. *Brain*. 2019 Jan 1;142(1):103-119. doi: 10.1093/brain/awy313. PMID: 30596910; PMCID: PMC6308314.
13. Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Patwardhan A, Hargreaves KM. Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia. *Trends Pharmacol Sci*. 2009 Feb;30(2):79-84. doi: 10.1016/j.tips.2008.10.008. Epub 2008 Dec 11. PMID: 19070372; PMCID: PMC2863326.
14. Alvarez FJ, Villalba RM, Carr PA, Grandes P, Somohano PM. Differential distribution of metabotropic glutamate receptors 1a, 1b, and 5 in the rat spinal cord. *J Comp Neurol*. 2000 Jul 3;422(3):464-87. doi: 10.1002/1096-9861(20000703)422:3<464::aid-cne11>3.0.co;2-#. PMID: 10861520.
15. Amandusson A, Blomqvist A. Estrogen receptor-alpha expression in nociceptive-responsive neurons in the medullary dorsal horn of the female rat. *Eur J Pain*. 2010 Mar;14(3):245-8. doi: 10.1016/j.ejpain.2009.05.008. Epub 2009 Jun 13. PMID: 19525133.
16. Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*. 1982 Jul 15;298(5871):240-4. doi: 10.1038/298240a0. PMID: 6283379.
17. Amara SG, Arriza JL, Leff SE, Swanson LW, Evans RM, Rosenfeld MG. Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science*. 1985 Sep 13;229(4718):1094-7. doi: 10.1126/science.2994212. PMID: 2994212.
18. Amaya F, Oh-hashii K, Naruse Y, Iijima N, Ueda M, Shimosato G, Tominaga M, Tanaka Y, Tanaka M. Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. *Brain Res*. 2003 Feb 14;963(1-2):190-6. doi: 10.1016/s0006-8993(02)03972-0. PMID: 12560124.

19. Anderson LE, Seybold VS. Calcitonin gene-related peptide regulates gene transcription in primary afferent neurons. *J Neurochem*. 2004 Dec;91(6):1417-29. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02833.x. PMID: 15584918.
20. Antal M, Fukazawa Y, Eördögh M, Muszil D, Molnár E, Itakura M, Takahashi M, Shigemoto R. Numbers, densities, and colocalization of AMPA- and NMDA-type glutamate receptors at individual synapses in the superficial spinal dorsal horn of rats. *J Neurosci*. 2008 Sep 24;28(39):9692-701. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1551-08.2008. PMID: 18815255; PMCID: PMC3844880.
21. Arulmani U, Gupta S, VanDenBrink AM, Centurión D, Villalón CM, Saxena PR. Experimental migraine models and their relevance in migraine therapy. *Cephalalgia*. 2006 Jun;26(6):642-59. doi: 10.1111/j.1468-2982.2005.01082.x. PMID: 16686903.
22. Arvieu L, Mauborgne A, Bourgoin S, Oliver C, Feltz P, Hamon M, Cesselin F. Sumatriptan inhibits the release of CGRP and substance P from the rat spinal cord. *Neuroreport*. 1996 Aug 12;7(12):1973-6. doi: 10.1097/00001756-199608120-00023. PMID: 8905706.
23. Ashina S, Babenko L, Jensen R, Ashina M, Magerl W, Bendtsen L. Increased muscular and cutaneous pain sensitivity in cephalic region in patients with chronic tension-type headache. *Eur J Neurol*. 2005 Jul;12(7):543-9. doi: 10.1111/j.1468-1331.2005.01023.x. PMID: 15958095.
24. Averill S, McMahon SB, Clary DO, Reichardt LF, Priestley JV. Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur J Neurosci*. 1995 Jul 1;7(7):1484-94. doi: 10.1111/j.1460-9568.1995.tb01143.x. PMID: 7551174; PMCID: PMC2758238.
25. Ayata C, Jin H, Kudo C, Dalkara T, Moskowitz MA. Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Ann Neurol*. 2006 Apr;59(4):652-61. doi: 10.1002/ana.20778. PMID: 16450381.
26. Ayata C, Moskowitz MA. Cortical spreading depression confounds concentration-dependent pial arteriolar dilation during N-methyl-D-aspartate superfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 May;290(5):H1837-41. doi: 10.1152/ajpheart.01102.2005. Epub 2005 Nov 18. PMID: 16299263.
27. Ayata C. Spreading depression: from serendipity to targeted therapy in migraine prophylaxis. *Cephalalgia*. 2009 Oct;29(10):1095-114. doi: 10.1111/j.1468-2982.2009.01982.x. PMID: 19735536.
28. Baba H, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. Direct activation of rat spinal dorsal horn neurons by prostaglandin E2. *J Neurosci*. 2001 Mar 1;21(5):1750-6. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-05-01750.2001. PMID: 11222664; PMCID: PMC6762949.
29. Babenko V, Svensson P, Graven-Nielsen T, Drewes AM, Jensen TS, Arendt-Nielsen L. Duration and distribution of experimental muscle hyperalgesia in humans following combined infusions of serotonin and bradykinin. *Brain Res*. 2000 Jan 24;853(2):275-81. doi: 10.1016/s0006-8993(99)02270-2. PMID: 10640624.
29. Bahra A, Matharu MS, Buchel C, Frackowiak RS, Goadsby PJ. Brainstem activation specific to migraine headache. *Lancet*. 2001 Mar 31;357(9261):1016-7. doi: 10.1016/s0140-6736(00)04250-1. PMID: 11293599.
30. Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*. 2004 Mar 25;41(6):849-57. doi: 10.1016/s0896-6273(04)00150-3. PMID: 15046718.
31. Bao JY, Huang Y, Wang F, Peng YP, Qiu YH. Expression of alpha-AR subtypes in T lymphocytes and role of the alpha-ARs in mediating modulation of T cell function. *Neuroimmunomodulation*. 2007;14(6):344-53. doi: 10.1159/000129670. Epub 2008 May 7. PMID: 18463421.
32. Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci*. 1984;7:309-38. doi: 10.1146/annurev.ne.07.030184.001521. PMID: 6143527.
33. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009 Oct 16;139(2):267-84. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028. PMID: 19837031; PMCID: PMC2852643.
34. Bates EA, Nikai T, Brennan KC, Fu YH, Charles AC, Basbaum AI, Ptáček LJ, Ahn AH. Sumatriptan alleviates nitroglycerin-induced mechanical and thermal allodynia in mice. *Cephalalgia*. 2010 Feb;30(2):170-8. doi: 10.1111/j.1468-2982.2009.01864.x. PMID: 19489890; PMCID: PMC4854191.
35. Baulmann J, Spitznagel H, Herdegen T, Unger T, Culman J. Tachykinin receptor inhibition and c-Fos expression in the rat brain following formalin-induced pain. *Neuroscience*. 2000;95(3):813-20. doi: 10.1016/s0306-4522(99)00478-9. PMID: 10670449.
36. Beadle GW, Mitchell HK, Nyc JF. Kynurenine as an Intermediate in the Formation of Nicotinic Acid from Tryptophane by Neurospora. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1947 Jun;33(6):155-8. doi: 10.1073/pnas.33.6.155. PMID: 16588735; PMCID: PMC1079015.

37. Bednarczyk EM, Wack DS, Kassab MY, Burch K, Trinidad K, Haka M, Gona J. Brain blood flow in the nitroglycerin (GTN) model of migraine: measurement using positron emission tomography and transcranial Doppler. *Cephalalgia*. 2002 Nov;22(9):749-57. doi: 10.1046/j.1468-2982.2002.00440.x. PMID: 12421161.
38. Begon S, Pickering G, Eschaliér A, Mazur A, Rayssiguier Y, Dubray C. Role of spinal NMDA receptors, protein kinase C and nitric oxide synthase in the hyperalgesia induced by magnesium deficiency in rats. *Br J Pharmacol*. 2001 Nov;134(6):1227-36. doi: 10.1038/sj.bjp.0704354. PMID: 11704642; PMCID: PMC1573046.
39. Behan WM, McDonald M, Darlington LG, Stone TW. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br J Pharmacol*. 1999 Dec;128(8):1754-60. doi: 10.1038/sj.bjp.0702940. PMID: 10588931; PMCID: PMC1571800.
40. Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol*. 1995 Aug;46(6):575-605. doi: 10.1016/0301-0082(95)00009-k. PMID: 8545545.
41. Beiche F, Klein T, Nüsing R, Neuhuber W, Goppelt-Strüebe M. Localization of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 receptor EP3 in the rat lumbar spinal cord. *J Neuroimmunol*. 1998 Aug 14;89(1-2):26-34. doi: 10.1016/s0165-5728(98)00061-7. PMID: 9726822.
42. Bellamy J, Bowen EJ, Russo AF, Durham PL. Nitric oxide regulation of calcitonin gene-related peptide gene expression in rat trigeminal ganglia neurons. *Eur J Neurosci*. 2006 Apr;23(8):2057-66. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04742.x. PMID: 16630053; PMCID: PMC1486900.
43. Ben Aissa M, Tipton AF, Bertels Z, Gandhi R, Moye LS, Novack M, Bennett BM, Wang Y, Litosh V, Lee SH, Gaisina IN, Thatcher GR, Pradhan AA. Soluble guanylyl cyclase is a critical regulator of migraine-associated pain. *Cephalalgia*. 2018 Jul;38(8):1471-1484. doi: 10.1177/0333102417737778. Epub 2017 Oct 12. PMID: 29022756; PMCID: PMC5916516.
44. Benarroch EE. CGRP: sensory neuropeptide with multiple neurologic implications. *Neurology*. 2011 Jul 19;77(3):281-7. doi: 10.1212/WNL.0b013e31822550e2. PMID: 21768598.
45. Berdyshev EV, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH. Activation of PAF receptors results in enhanced synthesis of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in immune cells. *FASEB J*. 2001 Oct;15(12):2171-8. doi: 10.1096/fj.01-0181com. PMID: 11641243.
46. Bereiter DA, Cioffi JL, Bereiter DF. Oestrogen receptor-immunoreactive neurons in the trigeminal sensory system of male and cycling female rats. *Arch Oral Biol*. 2005 Nov;50(11):971-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2005.03.010. PMID: 15893734.
47. Bereiter DA, Benetti AP. Amino acid release at the spinomedullary junction after inflammation of the TMJ region in male and female rats. *Pain*. 2006 Dec 15;126(1-3):175-83. doi: 10.1016/j.pain.2006.06.030. Epub 2006 Aug 9. PMID: 16901647.
48. Berger RJ, Zuccarello M, Keller JT. Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat dura mater. *Neuroreport*. 1994 Jan 12;5(4):519-21. doi: 10.1097/00001756-199401120-00039. Erratum in: *Neuroreport*. 2002 Dec;122(12):576. PMID: 7516199.
49. 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. Animal models of migraine: looking at the component parts of a complex disorder. *Eur J Neurosci*. 2006 Sep;24(6):1517-34. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05036.x. PMID: 17004916.
50. Bethea CL, Mirkes SJ, Shively CA, Adams MR. Steroid regulation of tryptophan hydroxylase protein in the dorsal raphe of macaques. *Biol Psychiatry*. 2000 Mar 15;47(6):562-76. doi: 10.1016/s0006-3223(99)00156-0. PMID: 10715363.
51. Bethea CL, Reddy AP, Tokuyama Y, Henderson JA, Lima FB. Protective actions of ovarian hormones in the serotonin system of macaques. *Front Neuroendocrinol*. 2009 Jul;30(2):212-38. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.04.003. Epub 2009 Apr 24. PMID: 19394356; PMCID: PMC2704571.
52. Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW 4th. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*. 2002 Aug 15;35(4):721-31. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00802-4. PMID: 12194871.
53. Bhave G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW 4th. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 14;100(21):12480-5. doi: 10.1073/pnas.2032100100. Epub 2003 Oct 1. PMID: 14523239; PMCID: PMC218783.
54. Boillat A, Alijevic O, Kellenberger S. Calcium entry via TRPV1 but not ASICs induces neuropeptide release from sensory neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2014 Jul;61:13-22. doi: 10.1016/j.mcn.2014.04.007. Epub 2014 Apr 30. PMID: 24794232.
55. Boissel JP, Bros M, Schröck A, Gödtel-Armbrust U, Förstermann U. Cyclic AMP-mediated upregulation of the expression of neuronal NO synthase in human A673 neuroepithelioma cells results in a decrease in the level of bioactive NO production: analysis of the signaling mechanisms that are involved. *Biochemistry*. 2004 Jun 8;43(22):7197-206. doi: 10.1021/bi0302191. PMID: 15170357.

56. Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med.* 2002 Feb;8(2):136-42. doi: 10.1038/nm0202-136. PMID: 11821897.
57. Bose P, Goadsby PJ. The migraine postdrome. *Curr Opin Neurol.* 2016 Jun;29(3):299-301. doi: 10.1097/WCO.0000000000000310. PMID: 26886356.
58. Borsook D, May A, Goadsby P, Hargreaves R. *The migraine brain.* 2012 New York: Oxford UP
59. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999. PMID: 942051.
60. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature.* 1985 Jan 3-9;313(5997):54-6. doi: 10.1038/313054a0. PMID: 3917554.
61. Brain SD, Williams TJ. Interactions between the tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of oedema formation and blood flow in rat skin. *Br J Pharmacol.* 1989 May;97(1):77-82. doi: 10.1111/j.1476-5381.1989.tb11926.x. PMID: 2470460; PMCID: PMC1854478.
62. Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev.* 2004 Jul;84(3):903-34. doi: 10.1152/physrev.00037.2003. PMID: 15269340.
63. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 1990 Oct 25;347(6295):768-70. doi: 10.1038/347768a0. PMID: 1700301.
64. Brenchat A, Romero L, García M, Pujol M, Burgueño J, Torrens A, Hamon M, Baeyens JM, Buschmann H, Zamanillo D, Vela JM. 5-HT7 receptor activation inhibits mechanical hypersensitivity secondary to capsaicin sensitization in mice. *Pain.* 2009 Feb;141(3):239-247. doi: 10.1016/j.pain.2008.11.009. Epub 2008 Dec 31. PMID: 19118950.
65. Brennan KC, Romero Reyes M, López Valdés HE, Arnold AP, Charles AC. Reduced threshold for cortical spreading depression in female mice. *Ann Neurol.* 2007 Jun;61(6):603-6. doi: 10.1002/ana.21138. PMID: 17474110.
66. Brinton RD, Proffitt P, Tran J, Luu R. Equilin, a principal component of the estrogen replacement therapy premarin, increases the growth of cortical neurons via an NMDA receptor-dependent mechanism. *Exp Neurol.* 1997 Oct;147(2):211-20. doi: 10.1006/exnr.1997.6619. PMID: 9344546.
67. Brown RR, Thornton MJ, Price JM. The effect of vitamin supplementation on the urinary excretion of tryptophan metabolites by pregnant women. *J Clin Invest.* 1961 Apr;40(4):617-23. doi: 10.1172/JCI104292. PMID: 16695856; PMCID: PMC290765.
68. Buckley TL, Brain SD, Rampart M, Williams TJ. Time-dependent synergistic interactions between the vasodilator neuropeptide, calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of inflammation. *Br J Pharmacol.* 1991 Jun;103(2):1515-9. doi: 10.1111/j.1476-5381.1991.tb09819.x. PMID: 1884106; PMCID: PMC1908382.
69. Budas GR, Disatnik MH, Mochly-Rosen D. Aldehyde dehydrogenase 2 in cardiac protection: a new therapeutic target? *Trends Cardiovasc Med.* 2009 Jul;19(5):158-64. doi: 10.1016/j.tcm.2009.09.003. PMID: 20005475; PMCID: PMC2856486.
70. Buldyrev I, Tanner NM, Hsieh HY, Dodd EG, Nguyen LT, Balkowiec A. Calcitonin gene-related peptide enhances release of native brain-derived neurotrophic factor from trigeminal ganglion neurons. *J Neurochem.* 2006 Dec;99(5):1338-50. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04161.x. Epub 2006 Oct 25. PMID: 17064360; PMCID: PMC2440676.
71. Burstein R, Yamamura H, Malick A, Strassman AM. Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons. *J Neurophysiol.* 1998 Feb;79(2):964-82. doi: 10.1152/jn.1998.79.2.964. PMID: 9463456.
72. Burstein R, Yarnitsky D, Goor-Aryeh I, Ransil BJ, Bajwa ZH. An association between migraine and cutaneous allodynia. *Ann Neurol.* 2000a May;47(5):614-24. PMID: 10805332.
73. Burstein R, Cutrer MF, Yarnitsky D. The development of cutaneous allodynia during a migraine attack clinical evidence for the sequential recruitment of spinal and supraspinal nociceptive neurons in migraine. *Brain.* 2000b Aug;123 (Pt 8):1703-9. doi: 10.1093/brain/123.8.1703. PMID: 10908199.
74. Burstein R, Jakubowski M. Analgesic triptan action in an animal model of intracranial pain: a race against the development of central sensitization. *Ann Neurol.* 2004 Jan;55(1):27-36. doi: 10.1002/ana.10785. PMID: 14705109.
75. Burstein R, Levy D, Jakubowski M. Effects of sensitization of trigeminovascular neurons to triptan therapy during migraine. *Rev Neurol (Paris).* 2005 Jul;161(6-7):658-60. doi: 10.1016/s0035-3787(05)85109-4. PMID: 16141951.
76. Burstein R, Jakubowski M. Unitary hypothesis for multiple triggers of the pain and strain of migraine. *J Comp Neurol.* 2005 Dec 5;493(1):9-14. doi: 10.1002/cne.20688. PMID: 16258903.

77. Burstein R, Nosedá R, Borsook D. Migraine: multiple processes, complex pathophysiology. *J Neurosci*. 2015 Apr 29;35(17):6619-29. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0373-15.2015. PMID: 25926442; PMCID: PMC4412887.
78. Buzzi MG, Moskowitz MA. Evidence for 5-HT_{1B/1D} receptors mediating the antimigraine effect of sumatriptan and dihydroergotamine. *Cephalalgia*. 1991 Sep;11(4):165-8. doi: 10.1046/j.1468-2982.1991.1104165.x. PMID: 1660351.
79. Buzzi MG, Carter WB, Shimizu T, Heath H 3rd, Moskowitz MA. Dihydroergotamine and sumatriptan attenuate levels of CGRP in plasma in rat superior sagittal sinus during electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Neuropharmacology*. 1991 Nov;30(11):1193-200. doi: 10.1016/0028-3908(91)90165-8. PMID: 1663596.
80. Buzzi MG, Moskowitz MA. The trigemino-vascular system and migraine. *Pathol Biol (Paris)*. 1992 Apr;40(4):313-7. PMID: 1379707.
81. Cady RK, Saper J, Dexter K, Cady RJ, Manley HR. Long-term efficacy of a double-blind, placebo-controlled, randomized study for repetitive sphenopalatine blockade with bupivacaine vs. saline with the Tx360 device for treatment of chronic migraine. *Headache*. 2015 Apr;55(4):529-42. doi: 10.1111/head.12546. Epub 2015 Mar 31. PMID: 25828648; PMCID: PMC6681144.
82. Cairns BE. The influence of gender and sex steroids on craniofacial nociception. *Headache*. 2007 Feb;47(2):319-24. doi: 10.1111/j.1526-4610.2006.00708.x. PMID: 17300382.
83. Cananzi AR, D'Andrea G, Perini F, Zamberlan F, Welch KM. Platelet and plasma levels of glutamate and glutamine in migraine with and without aura. *Cephalalgia*. 1995 Apr;15(2):132-5. doi: 10.1046/j.1468-2982.1995.015002132.x. PMID: 7641248.
84. Cameron C, Kelly S, Hsieh SC, Murphy M, Chen L, Kotb A, Peterson J, Coyle D, Skidmore B, Gomes T, Clifford T, Wells G. Triptans in the Acute Treatment of Migraine: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Headache*. 2015 Jul-Aug;55 Suppl 4:221-35. doi: 10.1111/head.12601. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26178694.
85. Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*. 2006 Oct 5;52(1):77-92. doi: 10.1016/j.neuron.2006.09.021. PMID: 17015228; PMCID: PMC1810425.
86. Campos F, Sobrino T, Pérez-Mato M, Rodríguez-Osorio X, Leira R, Blanco M, Mirelman D, Castillo J. Glutamate oxaloacetate transaminase: a new key in the dysregulation of glutamate in migraine patients. *Cephalalgia*. 2013 Oct;33(14):1148-54. doi: 10.1177/0333102413487444. Epub 2013 May 14. PMID: 23674828.
87. Capuano A, De Corato A, Lisi L, Tringali G, Navarra P, Dello Russo C. Proinflammatory-activated trigeminal satellite cells promote neuronal sensitization: relevance for migraine pathology. *Mol Pain*. 2009 Aug 6;5:43. doi: 10.1186/1744-8069-5-43. PMID: 19660121; PMCID: PMC2731738.
88. Carlton SM, Leichnetz GR, Young EG, Mayer DJ. Supramedullary afferents of the nucleus raphe magnus in the rat: a study using the transcanula HRP gel and autoradiographic techniques. *J Comp Neurol*. 1983 Feb 10;214(1):43-58. doi: 10.1002/cne.902140105. PMID: 6841675.
89. Carney ST, Lloyd ML, MacKinnon SE, Newton DC, Jones JD, Howlett AC, Norford DC. Cannabinoid regulation of nitric oxide synthase I (nNOS) in neuronal cells. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2009 Sep;4(3):338-49. doi: 10.1007/s11481-009-9153-7. Epub 2009 Apr 14. PMID: 19365734; PMCID: PMC2719736.
90. Carpenedo R, Pittaluga A, Cozzi A, Attucci S, Galli A, Raiteri M, Moroni F. Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release. *Eur J Neurosci*. 2001 Jun;13(11):2141-7. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01592.x. PMID: 11422455.
91. Carstens E, Simons CT, Dessirier JM, Carstens MI, Jinks SL. Role of neuronal nicotinic-acetylcholine receptors in the activation of neurons in trigeminal subnucleus caudalis by nicotine delivered to the oral mucosa. *Exp Brain Res*. 2000 Jun;132(3):375-83. doi: 10.1007/s002210000351. PMID: 10883386.
92. Carvalho AL, Duarte CB, Carvalho AP. Regulation of AMPA receptors by phosphorylation. *Neurochem Res*. 2000 Oct;25(9-10):1245-55. doi: 10.1023/a:1007644128886. PMID: 11059799.
93. Castro ME, Pascual J, Romón T, del Arco C, del Olmo E, Pazos A. Differential distribution of [³H]sumatriptan binding sites (5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} and 5-HT_{1F} receptors) in human brain: focus on brainstem and spinal cord. *Neuropharmacology*. 1997 Apr-May;36(4-5):535-42. doi: 10.1016/s0028-3908(97)00061-0. PMID: 9225278.
94. Catanzaro G, Rapino C, Oddi S, Maccarrone M. Anandamide increases swelling and reduces calcium sensitivity of mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct 16;388(2):439-42. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.08.037. Epub 2009 Aug 11. PMID: 19679102.
95. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997 Oct 23;389(6653):816-24. doi: 10.1038/39807. PMID: 9349813.

96. Chacur M, Matos RJ, Alves AS, Rodrigues AC, Gutierrez V, Cury Y, Britto LR. Participation of neuronal nitric oxide synthase in experimental neuropathic pain induced by sciatic nerve transection. *Braz J Med Biol Res.* 2010 Apr;43(4):367-76. doi: 10.1590/S0100-879X2010007500019. Epub 2010 Mar 19. PMID: 20445952.
97. Chanrion B, Mannoury la Cour C, Bertaso F, Lerner-Natoli M, Freissmuth M, Millan MJ, Bockaert J, Marin P. Physical interaction between the serotonin transporter and neuronal nitric oxide synthase underlies reciprocal modulation of their activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 8;104(19):8119-24. doi: 10.1073/pnas.0610964104. Epub 2007 Apr 23. PMID: 17452640; PMCID: PMC1876581.
98. Chapman V, Dickenson AH. The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. *Eur J Pharmacol.* 1992 Sep 4;219(3):427-33. doi: 10.1016/0014-2999(92)90484-I. PMID: 1425970.
99. Charles A, Pozo-Rosich P. Targeting calcitonin gene-related peptide: a new era in migraine therapy. *Lancet.* 2019 Nov 9;394(10210):1765-1774. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32504-8. Epub 2019 Oct 23. PMID: 31668411.
100. Chatchaisak D, Srikiatkachorn A, Maneesri-le Grand S, Govitrapong P, Chetsawang B. The role of calcitonin gene-related peptide on the increase in transient receptor potential vanilloid-1 levels in trigeminal ganglion and trigeminal nucleus caudalis activation of rat. *J Chem Neuroanat.* 2013 Jan;47:50-6. doi: 10.1016/j.jchemneu.2012.09.005. Epub 2012 Nov 2. PMID: 23123284.
101. Chen BS, Roche KW. Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology.* 2007 Sep;53(3):362-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.05.018. Epub 2007 Jun 2. PMID: 17644144; PMCID: PMC2001266.
102. Chen N, Su W, Cui SH, Guo J, Duan JC, Li HX, He L. A novel large animal model of recurrent migraine established by repeated administration of inflammatory soup into the dura mater of the rhesus monkey. *Neural Regen Res.* 2019 Jan;14(1):100-106. doi: 10.4103/1673-5374.243715. PMID: 30531083; PMCID: PMC6262984.
103. Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 11;99(12):8306-11. doi: 10.1073/pnas.122225199. Epub 2002 Jun 4. PMID: 12048254; PMCID: PMC123063.
104. Chiarugi A, Carpenedo R, Molina MT, Mattoli L, Pellicciari R, Moroni F. Comparison of the neurochemical and behavioral effects resulting from the inhibition of kynurenine hydroxylase and/or kynureninase. *J Neurochem.* 1995 Sep;65(3):1176-83. doi: 10.1046/j.1471-4159.1995.65031176.x. PMID: 7643095.
105. Choi IS, Cho JH, An CH, Jung JK, Hur YK, Choi JK, Jang IS. 5-HT(1B) receptors inhibit glutamate release from primary afferent terminals in rat medullary dorsal horn neurons. *Br J Pharmacol.* 2012 Sep;167(2):356-67. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01964.x. PMID: 22462474; PMCID: PMC3481043.
106. Choi SS, Seo YJ, Kwon MS, Shim EJ, Lee JY, Ham YO, Lee HK, Suh HW. Increase of phosphorylation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase-II in several brain regions by substance P administered intrathecally in mice. *Brain Res Bull.* 2005 May 15;65(5):375-81. doi: 10.1016/j.brainresbull.2005.01.016. PMID: 15833591.
107. Chopra B, Giblett S, Little JG, Donaldson LF, Tate S, Evans RJ, Grubb BD. Cyclooxygenase-1 is a marker for a subpopulation of putative nociceptive neurons in rat dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci.* 2000 Mar;12(3):911-20. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00979.x. PMID: 10762321.
108. Christiansen I, Thomsen LL, Daugaard D, Ulrich V, Olesen J. Glyceryl trinitrate induces attacks of migraine without aura in sufferers of migraine with aura. *Cephalalgia.* 1999 Sep;19(7):660-7; discussion 626. doi: 10.1046/j.1468-2982.1999.019007660.x. PMID: 10524660.
109. Christiansen I, Daugaard D, Lykke Thomsen L, Olesen J. Glyceryl trinitrate induced headache in migraineurs - relation to attack frequency. *Eur J Neurol.* 2000 Jul;7(4):405-11. doi: 10.1046/j.1468-1331.2000.00094.x. PMID: 10971600.
110. Christoph T, Reissmüller E, Schiene K, Englberger W, Chizh BA. Antiallodynic effects of NMDA glycine(B) antagonists in neuropathic pain: possible peripheral mechanisms. *Brain Res.* 2005 Jun 28;1048(1-2):218-27. doi: 10.1016/j.brainres.2005.04.081. PMID: 15922311.
111. Clavelou P, Dallel R, Orliaguet T, Woda A, Raboisson P. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. *Pain.* 1995 Sep;62(3):295-301. doi: 10.1016/0304-3959(94)00273-H. PMID: 8657429.
112. Coggeshall RE. Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol.* 2005 Dec;77(5):299-352. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.11.002. Epub 2005 Dec 13. PMID: 16356622.
113. Correa F, Docagne F, Clemente D, Mestre L, Becker C, Guaza C. Anandamide inhibits IL-12p40 production by acting on the promoter repressor element GA-12: possible involvement of the COX-2 metabolite prostamide E(2). *Biochem J.* 2008 Feb 1;409(3):761-70. doi: 10.1042/BJ20071329. PMID: 17961121.

114. Cosi C, Mannaioni G, Cozzi A, Carlà V, Sili M, Cavone L, Maratea D, Moroni F. G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: Studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. *Neuropharmacology*. 2011 Jun;60(7-8):1227-31. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.11.014. Epub 2010 Nov 24. PMID: 21110987.
115. Craig AD. Spinal and trigeminal lamina I input to the locus coeruleus anterogradely labeled with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) in the cat and the monkey. *Brain Res*. 1992 Jul 3;584(1-2):325-8. doi: 10.1016/0006-8993(92)90915-v. PMID: 1515950.
116. Crawley JN, Corwin RL, Robinson JK, Felder CC, Devane WA, Axelrod J. Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993 Dec;46(4):967-72. doi: 10.1016/0091-3057(93)90230-q. PMID: 7906042.
117. Csáti A, Edvinsson L, Vécsei L, Toldi J, Fülöp F, Tajti J, Warfvinge K. Kynurenic acid modulates experimentally induced inflammation in the trigeminal ganglion. *J Headache Pain*. 2015;16:99. doi: 10.1186/s10194-015-0581-x. Epub 2015 Dec 1. PMID: 26627709; PMCID: PMC4666855.
118. Curto M, Lionetto L, Negro A, Capi M, Fazio F, Giamberardino MA, Simmaco M, Nicoletti F, Martelletti P. Altered kynurenine pathway metabolites in serum of chronic migraine patients. *J Headache Pain*. 2015a;17:47. doi: 10.1186/s10194-016-0638-5. Epub 2016 Apr 29. PMID: 27130315; PMCID: PMC4851673.
119. Curto M, Lionetto L, Negro A, Capi M, Perugino F, Fazio F, Giamberardino MA, Simmaco M, Nicoletti F, Martelletti P. Altered serum levels of kynurenine metabolites in patients affected by cluster headache. *J Headache Pain*. 2015b;17(1):27. doi: 10.1186/s10194-016-0620-2. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27000870; PMCID: PMC4801826.
120. Cyr M, Ghribi O, Di Paolo T. Regional and selective effects of oestradiol and progesterone on NMDA and AMPA receptors in the rat brain. *J Neuroendocrinol*. 2000 May;12(5):445-52. doi: 10.1046/j.1365-2826.2000.00471.x. PMID: 10792584.
121. Danese E, Montagnana M, Lippi G. Platelets and migraine. *Thromb Res*. 2014 Jul;134(1):17-22. doi: 10.1016/j.thromres.2014.03.055. Epub 2014 Apr 12. PMID: 24767953.
122. Davies SN, Lodge D. Evidence for involvement of N-methylaspartate receptors in 'wind-up' of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. *Brain Res*. 1987 Oct 27;424(2):402-6. doi: 10.1016/0006-8993(87)91487-9. PMID: 2823998.
123. Davis AM, Inturrisi CE. Attenuation of hyperalgesia by LY235959, a competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *Brain Res*. 2001 Mar 9;894(1):150-3. doi: 10.1016/s0006-8993(00)03325-4. PMID: 11245826.
124. Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*. 2000 May 11;405(6783):183-7. doi: 10.1038/35012076. PMID: 10821274.
125. Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:203-36. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.203. PMID: 11264456.
126. de Tommaso M, Guido M, Libro G, Losito L, Sciriuichio V, Monetti C, Puca F. Abnormal brain processing of cutaneous pain in migraine patients during the attack. *Neurosci Lett*. 2002 Nov 15;333(1):29-32. doi: 10.1016/s0304-3940(02)00967-9. PMID: 12401553.
127. de Tommaso M, Libro G, Guido M, Difruscolo O, Losito L, Sardaro M, Cerbo R. Nitroglycerin induces migraine headache and central sensitization phenomena in patients with migraine without aura: a study of laser evoked potentials. *Neurosci Lett*. 2004 Jun 17;363(3):272-5. doi: 10.1016/j.neulet.2004.04.029. PMID: 15182958.
128. De Vries P, Villalón CM, Saxena PR. Pharmacological aspects of experimental headache models in relation to acute antimigraine therapy. *Eur J Pharmacol*. 1999 Jun 30;375(1-3):61-74. doi: 10.1016/s0014-2999(99)00197-1. Erratum in: *Eur J Pharmacol* 1999 Nov 19;384(2-3):243-4. PMID: 10443565.
129. Deanović Z, Iskrić S, Dupelj M. Fluctuation of 5-hydroxy-indole compounds in the urine of migrainous patients. *Biomedicine*. 1975 Nov 10;23(9):346-9. PMID: 1231931.
130. Denenberg VH. Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci*. 1969 Jul 30;159(3):852-9. doi: 10.1111/j.1749-6632.1969.tb12983.x. PMID: 5260302.
131. Demirpence S, Kurul SH, Kiray M, Tugyan K, Yilmaz O, Köse G. The effect of sumatriptan on nitric oxide synthase enzyme production after iatrogenic inflammation in the brain stem of adolescent rats: A randomized, controlled, experimental study. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2009 Apr;70(2):129-35. doi: 10.1016/j.curtheres.2009.04.003. PMID: 24683224; PMCID: PMC3967298.
132. Di Clemente L, Coppola G, Magis D, Gérardy PY, Fumal A, De Pasqua V, Di Piero V, Schoenen J. Nitroglycerin sensitises in healthy subjects CNS structures involved in migraine pathophysiology: evidence from a study of nociceptive blink reflexes

- and visual evoked potentials. *Pain*. 2009 Jul;144(1-2):156-61. doi: 10.1016/j.pain.2009.04.018. Epub 2009 May 19. PMID: 19457613
133. Diogenes A, Patwardhan AM, Jeske NA, Ruparel NB, Goffin V, Akopian AN, Hargreaves KM. Prolactin modulates TRPV1 in female rat trigeminal sensory neurons. *J Neurosci*. 2006 Aug 2;26(31):8126-36. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0793-06.2006. PMID: 16885226; PMCID: PMC6673790.
134. Dohrn CS, Mullett MA, Price RH, Beitz AJ. Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive interneurons in the spinal trigeminal nucleus. *J Comp Neurol*. 1994 Aug 15;346(3):449-60. doi: 10.1002/cne.903460308. PMID: 7527808.
135. Dohrn CS, Beitz AJ. NMDA receptor mRNA expression in NOS-containing neurons in the spinal trigeminal nucleus of the rat. *Neurosci Lett*. 1994 Jul 4;175(1-2):28-32. doi: 10.1016/0304-3940(94)91070-7. PMID: 7526293.
136. Dodick DW. A Phase-by-Phase Review of Migraine Pathophysiology. *Headache*. 2018 May;58 Suppl 1:4-16. doi: 10.1111/head.13300. PMID: 29697154.
137. Dodick DW, Lipton RB, Ailani J, Lu K, Finnegan M, Trugman JM, Szegedi A. Ubrogепant for the Treatment of Migraine. *N Engl J Med*. 2019 Dec 5;381(23):2230-2241. doi: 10.1056/NEJMoa1813049. PMID: 31800988.
138. Dominguez R, Liu R, Baudry M. 17-Beta-estradiol-mediated activation of extracellular-signal regulated kinase, phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B-Akt and N-methyl-D-aspartate receptor phosphorylation in cortical synaptoneuroosomes. *J Neurochem*. 2007 Apr;101(1):232-40. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04360.x. Epub 2007 Jan 22. PMID: 17250656; PMCID: PMC3182115.
139. Dou W, Jiao Y, Goorha S, Raghov R, Ballou LR. Nociception and the differential expression of cyclooxygenase-1 (COX-1), the COX-1 variant retaining intron-1 (COX-1v), and COX-2 in mouse dorsal root ganglia (DRG). *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2004 Oct;74(1-4):29-43. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2004.06.001. PMID: 15560114.
140. Dougherty PM, Palecek J, Paleckova V, Sorkin LS, Willis WD. The role of NMDA and non-NMDA excitatory amino acid receptors in the excitation of primate spinothalamic tract neurons by mechanical, chemical, thermal, and electrical stimuli. *J Neurosci*. 1992 Aug;12(8):3025-41. doi: 10.1523/JNEUROSCI.12-08-03025.1992. PMID: 1353793; PMCID: PMC6575659.
141. Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth*. 1995 Aug;75(2):125-31. doi: 10.1093/bja/75.2.125. PMID: 7577246.
142. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*. 2010 Nov;120(11):3760-72. doi: 10.1172/JCI42843. Epub 2010 Nov 1. PMID: 21041958; PMCID: PMC2964977.
143. Dvorak AM, Dvorak HF. Structure of Freund's complete and incomplete adjuvants. Relation of adjuvanticity to structure. *Immunology*. 1974 Jul;27(1):99-114. PMID: 4605156; PMCID: PMC1445602.
144. 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. Medullary pain facilitating neurons mediate allodynia in headache-related pain. *Ann Neurol*. 2009 Feb;65(2):184-93. doi: 10.1002/ana.21537. PMID: 19259966; PMCID: PMC2772103.
145. Edvinsson L, Goadsby PJ. Neuropeptides in the cerebral circulation: relevance to headache. *Cephalalgia*. 1995;15(4):272-6. doi: 10.1046/j.1468-2982.1995.1504272.x. PMID: 7585922.
146. Edvinsson L, Haanes KA, Warfvinge K. Does inflammation have a role in migraine? *Nat Rev Neurol*. 2019 Aug;15(8):483-490. doi: 10.1038/s41582-019-0216-y. Epub 2019 Jul 1. PMID: 31263254.
147. Eftekhari S, Salvatore CA, Calamari A, Kane SA, Tajti J, Edvinsson L. Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human trigeminal ganglion. *Neuroscience*. 2010 Aug 25;169(2):683-96. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.05.016. Epub 2010 May 22. Erratum in: *Neuroscience*. 2010 Nov 10;170(4):1346. PMID: 20472035.
148. Eikermann-Haerter K, Dileköz E, Kudo C, Savitz SI, Waeber C, Baum MJ, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, Moskowitz MA, Ayata C. Genetic and hormonal factors modulate spreading depression and transient hemiparesis in mouse models of familial hemiplegic migraine type 1. *J Clin Invest*. 2009 Jan;119(1):99-109. doi: 10.1172/JCI36059. Epub 2008 Dec 22. PMID: 19104150; PMCID: PMC2613474.
149. Ellrich J, Messlinger K, Chiang CY, Hu JW. Modulation of neuronal activity in the nucleus raphé magnus by the 5-HT(1)-receptor agonist naratriptan in rat. *Pain*. 2001 Feb 15;90(3):227-231. doi: 10.1016/S0304-3959(00)00405-X. PMID: 11207394.
150. 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. Kynurenamines as neural nitric oxide synthase inhibitors. *J Med Chem*. 2005 Dec 29;48(26):8174-81. doi: 10.1021/jm050740o. PMID: 16366599.

151. Ernberg M, Lundeberg T, Kopp S. Pain and allodynia/hyperalgesia induced by intramuscular injection of serotonin in patients with fibromyalgia and healthy individuals. *Pain*. 2000a Mar;85(1-2):31-9. doi: 10.1016/s0304-3959(99)00233-x. PMID: 10692600.
152. Ernberg M, Voog U, Alstergren P, Lundeberg T, Kopp S. Plasma and serum serotonin levels and their relationship to orofacial pain and anxiety in fibromyalgia. *J Orofac Pain*. 2000b Winter;14(1):37-46. PMID: 11203736.
153. Ernberg M, Hedenberg-Magnusson B, Kurita H, Kopp S. Effects of local serotonin administration on pain and microcirculation in the human masseter muscle. *J Orofac Pain*. 2006 Summer;20(3):241-8. PMID: 16913434.
154. Evers S, Bauer B, Suhr B, Husstedt IW, Grottemeyer KH. Cognitive processing in primary headache: a study on event-related potentials. *Neurology*. 1997 Jan;48(1):108-13. doi: 10.1212/wnl.48.1.108. PMID: 9008504.
155. Evers S, Afra J, Frese A, Goadsby PJ, Linde M, May A, Sándor PS; European Federation of Neurological Societies. EFNS guideline on the drug treatment of migraine--revised report of an EFNS task force. *Eur J Neurol*. 2009 Sep;16(9):968-81. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02748.x. PMID: 19708964.
156. Fabricius M, Jensen LH, Lauritzen M. Microdialysis of interstitial amino acids during spreading depression and anoxic depolarization in rat neocortex. *Brain Res*. 1993 May 28;612(1-2):61-9. doi: 10.1016/0006-8993(93)91644-8. PMID: 8330214.
157. Fang L, Wu J, Lin Q, Willis WD. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II contributes to spinal cord central sensitization. *J Neurosci*. 2002 May 15;22(10):4196-204. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-10-04196.2002. PMID: 12019337; PMCID: PMC6757653.
158. Fasmer OB, Berge OG, Hole K. Changes in nociception after lesions of descending serotonergic pathways induced with 5,6-dihydroxytryptamine. Different effects in the formalin and tail-flick tests. *Neuropharmacology*. 1985 Aug;24(8):729-34. doi: 10.1016/0028-3908(85)90006-1. PMID: 3841806.
159. Fávaro-Moreira NC, Torres-Chávez KE, Fischer L, Tambeli CH. Peripheral estradiol induces temporomandibular joint antinociception in rats by activating the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway. *Neuroscience*. 2009 Dec 1;164(2):724-32. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.08.012. Epub 2009 Aug 11. PMID: 19679171.
160. Feine JS, Bushnell CM, Miron D, Duncan GH. Sex differences in the perception of noxious heat stimuli. *Pain*. 1991 Mar;44(3):255-262. doi: 10.1016/0304-3959(91)90094-E. PMID: 2052394.
170. Fejes A, Párdutz A, Toldi J, Vécsei L. Kynurenine metabolites and migraine: experimental studies and therapeutic perspectives. *Curr Neuropharmacol*. 2011 Jun;9(2):376-87. doi: 10.2174/157015911795596621. PMID: 22131946; PMCID: PMC3131728.
171. Fenzi F, Rizzuto N. Estrogen receptors localization in the spinal trigeminal nucleus: an immunohistochemical study in humans. *Eur J Pain*. 2011 Nov;15(10):1002-7. doi: 10.1016/j.ejpain.2011.05.003. Epub 2011 Jun 2. PMID: 21640622.
172. Ferrari MD, Odink J, Tapparelli C, Van Kempen GM, Pennings EJ, Bruyn GW. Serotonin metabolism in migraine. *Neurology*. 1989 Sep;39(9):1239-42. doi: 10.1212/wnl.39.9.1239. PMID: 2475821.
173. Fischer M, Wille G, Klien S, Shanib H, Holle D, Gaul C, Broessner G. Brain-derived neurotrophic factor in primary headaches. *J Headache Pain*. 2012 Aug;13(6):469-75. doi: 10.1007/s10194-012-0454-5. Epub 2012 May 15. PMID: 22584531; PMCID: PMC3464472.
174. Flake NM, Bonebreak DB, Gold MS. Estrogen and inflammation increase the excitability of rat temporomandibular joint afferent neurons. *J Neurophysiol*. 2005 Mar;93(3):1585-97. doi: 10.1152/jn.00269.2004. Epub 2004 Nov 3. PMID: 15525813; PMCID: PMC2838234.
175. Flores CA, Shughrue P, Petersen SL, Mokha SS. Sex-related differences in the distribution of opioid receptor-like 1 receptor mRNA and colocalization with estrogen receptor mRNA in neurons of the spinal trigeminal nucleus caudalis in the rat. *Neuroscience*. 2003;118(3):769-78. doi: 10.1016/s0306-4522(02)01000-x. PMID: 12710984.
176. Fitzgerald M, Woolf CJ. Axon transport and sensory C-fibre function. In: Chahl CA, Szolcsanyi J, Lembeck F (eds) *Neurogenic inflammation*. Akademiai Kiado, Budapest, 1984; pp 119–140.
177. 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.
178. 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.
179. Frye CA. Effects and mechanisms of progestogens and androgens in ictal activity. *Epilepsia*. 2010 Jul;51 Suppl 3:135-40. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02628.x. PMID: 20618419.

180. Fukui S, Schwarcz R, Rapoport SI, Takada Y, Smith QR. Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J Neurochem*. 1991 Jun;56(6):2007-17. doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb03460.x. PMID: 1827495.
181. Fusayasu E, Kowa H, Takeshima T, Nakaso K, Nakashima K. Increased plasma substance P and CGRP levels, and high ACE activity in migraineurs during headache-free periods. *Pain*. 2007 Apr;128(3):209-214. doi: 10.1016/j.pain.2006.09.017. Epub 2006 Nov 22. PMID: 17123735.
182. Fusco BM, Barzoi G, Agrò F. Repeated intranasal capsaicin applications to treat chronic migraine. *Br J Anaesth*. 2003 Jun;90(6):812. doi: 10.1093/bja/aeg572. PMID: 12765904.
183. Gao X, Kim HK, Chung JM, Chung K. Enhancement of NMDA receptor phosphorylation of the spinal dorsal horn and nucleus gracilis neurons in neuropathic rats. *Pain*. 2005 Jul;116(1-2):62-72. doi: 10.1016/j.pain.2005.03.045. PMID: 15936881.
184. Gao Y, Duan YZ. Increased COX2 in the trigeminal nucleus caudalis is involved in orofacial pain induced by experimental tooth movement. *Anat Rec (Hoboken)*. 2010 Mar;293(3):485-91. doi: 10.1002/ar.21078. PMID: 20091889.
185. García-Segura LM, Chowen JA, Párducz A, Naftolin F. Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol*. 1994 Oct;44(3):279-307. doi: 10.1016/0301-0082(94)90042-6. PMID: 7886228.
186. Garry MG, Walton LP, Davis MA. Capsaicin-evoked release of immunoreactive calcitonin gene-related peptide from the spinal cord is mediated by nitric oxide but not by cyclic GMP. *Brain Res*. 2000 Apr 10;861(2):208-19. doi: 10.1016/s0006-8993(99)02448-8. Erratum in: *Brain Res* 2001 Dec 13;922(1):163. PMID: 10760483.
187. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*. 1988 Nov 24;336(6197):385-8. doi: 10.1038/336385a0. PMID: 2904125.
188. Gatti G, Barzaghi N, Attardo Parrinello G, Vitiello B, Perucca E. Pharmacokinetics of salicylic acid following administration of aspirin tablets and three different forms of soluble aspirin in normal subjects. *Int J Clin Pharmacol Res*. 1989;9(6):385-9. PMID: 2517497.
189. Gazerani P, Dong X, Wang M, Kumar U, Cairns BE. Sensitization of rat facial cutaneous mechanoreceptors by activation of peripheral N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res*. 2010 Mar 10;1319:70-82. doi: 10.1016/j.brainres.2010.01.018. Epub 2010 Jan 19. PMID: 20080077.
190. Gazerani P, Cairns BE, Yassin H, Yousefi JT, Sherzaman AR, Nedergaard BS, Boldsen SK. Amplification of glyceryl trinitrate-induced headache features by noxious craniofacial stimuli in pain-free healthy humans. *Pain Manag*. 2019 Jan 1;9(1):17-35. doi: 10.2217/pmt-2018-0035. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30501556.
191. Gazzaley AH, Weiland NG, McEwen BS, Morrison JH. Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus. *J Neurosci*. 1996 Nov 1;16(21):6830-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-21-06830.1996. PMID: 8824322; PMCID: PMC6579267.
192. Geaney DP, Rutterford MG, Elliott JM, Schächter M, Peet KM, Grahame-Smith DG. Decreased platelet 3H-imipramine binding sites in classical migraine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1984 Jul;47(7):720-3. doi: 10.1136/jnnp.47.7.720. PMID: 6086845; PMCID: PMC1027901.
193. Geppetti P, Capone JG, Trevisani M, Nicoletti P, Zagli G, Tola MR. CGRP and migraine: neurogenic inflammation revisited. *J Headache Pain*. 2005 Apr;6(2):61-70. doi: 10.1007/s10194-005-0153-6. Epub 2005 Apr 8. PMID: 16362644; PMCID: PMC3452316.
194. Geppetti P, Rossi E, Chiarugi A, Benemei S. Antidromic vasodilatation and the migraine mechanism. *J Headache Pain*. 2012 Mar;13(2):103-11. doi: 10.1007/s10194-011-0408-3. Epub 2011 Dec 27. PMID: 22200764; PMCID: PMC3274576.
195. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol*. 1990 Aug;28(2):183-7. doi: 10.1002/ana.410280213. PMID: 1699472.
196. Goadsby PJ, Edvinsson L. The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann Neurol*. 1993 Jan;33(1):48-56. doi: 10.1002/ana.410330109. PMID: 8388188.
197. Goadsby PJ, Hoskin KL. Inhibition of trigeminal neurons by intravenous administration of the serotonin (5HT)1B/D receptor agonist zolmitriptan (311C90): are brain stem sites therapeutic target in migraine? *Pain*. 1996 Oct;67(2-3):355-9. doi: 10.1016/0304-3959(96)03118-1. PMID: 8951929.
198. Goadsby PJ, Hoskin KL. The distribution of trigeminovascular afferents in the nonhuman primate brain *Macaca nemestrina*: a c-fos immunocytochemical study. *J Anat*. 1997 Apr;190 (Pt 3)(Pt 3):367-75. doi: 10.1046/j.1469-7580.1997.19030367.x. PMID: 9147223; PMCID: PMC1467617.

199. Goadsby PJ, Knight Y. Inhibition of trigeminal neurones after intravenous administration of naratriptan through an action at 5-hydroxy-tryptamine (5-HT(1B/1D)) receptors. *Br J Pharmacol.* 1997 Nov;122(5):918-22. doi: 10.1038/sj.bjp.0701456. PMID: 9384509; PMCID: PMC1565012.
200. Goadsby PJ, Classey JD. Glutamatergic transmission in the trigeminal nucleus assessed with local blood flow. *Brain Res.* 2000 Sep 1;875(1-2):119-24. doi: 10.1016/S0006-8993(00)02630-5. PMID: 10967305.
201. Goadsby PJ, Wietecha LA, Dennehy EB, Kuca B, Case MG, Aurora SK, Gaul C. Phase 3 randomized, placebo-controlled, double-blind study of lasmiditan for acute treatment of migraine. *Brain.* 2019 Jul 1;142(7):1894-1904. doi: 10.1093/brain/awz134. PMID: 31132795; PMCID: PMC6620826.
202. Göbel H, Weigle L, Kropp P, Soyka D. Pain sensitivity and pain reactivity of pericranial muscles in migraine and tension-type headache. *Cephalalgia.* 1992 Jun;12(3):142-51. doi: 10.1046/j.1468-2982.1992.1203142.x. PMID: 1623508.
203. Gölöncsér F, Sperlágh B. Effect of genetic deletion and pharmacological antagonism of P2X7 receptors in a mouse animal model of migraine. *J Headache Pain.* 2014 May 1;15(1):24. doi: 10.1186/1129-2377-15-24. PMID: 24885962; PMCID: PMC4016653.
204. Graham JR, Wolff HG. Mechanism of migraine headache and action of ergotamine tartarate. *Arch Neurol Psychiatry* 1938; 39:737-63.
205. Granello F, Sances G, Pucci E, Nappi RE, Ghiotto N, Napp G. Migraine with aura and reproductive life events: a case control study. *Cephalalgia.* 2000 Oct;20(8):701-7. doi: 10.1111/j.1468-2982.2000.00112.x. PMID: 11167898.
206. Grant AD, Tam CW, Lazar Z, Shih MK, Brain SD. The calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor antagonist BIBN4096BS blocks CGRP and adrenomedullin vasoactive responses in the microvasculature. *Br J Pharmacol.* 2004 Aug;142(7):1091-8. doi: 10.1038/sj.bjp.0705824. Epub 2004 Jul 5. PMID: 15237099; PMCID: PMC1575178.
207. Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature.* 1996 Oct 24;383(6602):713-6. doi: 10.1038/383713a0. PMID: 8878480.
208. Green MG, Scarth J, Dickenson A. An excitatory role for 5-HT in spinal inflammatory nociceptive transmission; state-dependent actions via dorsal horn 5-HT(3) receptors in the anaesthetized rat. *Pain.* 2000 Dec 15;89(1):81-88. doi: 10.1016/S0304-3959(00)00346-8. PMID: 11113296.
209. Greenberg ME, Ziff EB. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature.* 1984 Oct 4-10;311(5985):433-8. doi: 10.1038/311433a0. PMID: 6090941.
210. Greco R, Tassorelli C, Cappelletti D, Sandrini G, Nappi G. Activation of the transcription factor NF-kappaB in the nucleus trigeminalis caudalis in an animal model of migraine. *Neurotoxicology.* 2005 Oct;26(5):795-800. doi: 10.1016/j.neuro.2005.02.005. Epub 2005 Jun 3. PMID: 15936821.
211. Greco R, Tassorelli C, Sandrini G, Di Bella P, Buscone S, Nappi G. Role of calcitonin gene-related peptide and substance P in different models of pain. *Cephalalgia.* 2008 Feb;28(2):114-26. doi: 10.1111/j.1468-2982.2007.01468.x. PMID: 18197882.
212. Greco R, Gasperi V, Sandrini G, Bagetta G, Nappi G, Maccarrone M, Tassorelli C. Alterations of the endocannabinoid system in an animal model of migraine: evaluation in cerebral areas of rat. *Cephalalgia.* 2010 Mar;30(3):296-302. doi: 10.1111/j.1468-2982.2009.01924.x. Epub 2010 Feb 1. PMID: 19515121.
213. Greco R, Meazza C, Mangione AS, Allena M, Bolla M, Amantea D, Mizoguchi H, Sandrini G, Nappi G, Tassorelli C. Temporal profile of vascular changes induced by systemic nitroglycerin in the meningeal and cortical districts. *Cephalalgia.* 2011 Jan;31(2):190-8. doi: 10.1177/0333102410379887. Epub 2010 Aug 6. PMID: 20693231.
214. Greco R, Bandiera T, Mangione AS, Demartini C, Siani F, Nappi G, Sandrini G, Guijarro A, Armirotti A, Piomelli D, Tassorelli C. Effects of peripheral FAAH blockade on NTG-induced hyperalgesia--evaluation of URB937 in an animal model of migraine. *Cephalalgia.* 2015 Oct;35(12):1065-76. doi: 10.1177/0333102414566862. Epub 2015 Jan 21. PMID: 25608877.
215. Grilli M, Raiteri L, Patti L, Parodi M, Robino F, Raiteri M, Marchi M. Modulation of the function of presynaptic alpha7 and non-alpha7 nicotinic receptors by the tryptophan metabolites, 5-hydroxyindole and kynurenate in mouse brain. *Br J Pharmacol.* 2006 Nov;149(6):724-32. doi: 10.1038/sj.bjp.0706914. Epub 2006 Oct 3. PMID: 17016503; PMCID: PMC2014664.
216. Grisanti LA, Perez DM, Porter JE. Modulation of immune cell function by $\alpha(1)$ -adrenergic receptor activation. *Curr Top Membr.* 2011;67:113-38. doi: 10.1016/B978-0-12-384921-2.00006-9. PMID: 21771488; PMCID: PMC3624728.
217. Guedes RC, de Oliveira JA, Amâncio-Dos-Santos A, García-Cairasco N. Sexual differentiation of cortical spreading depression propagation after acute and kindled audiogenic seizures in the Wistar audiogenic rat (WAR). *Epilepsy Res.* 2009 Feb;83(2-3):207-14. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2008.11.003. Epub 2008 Dec 19. PMID: 19101119.

218. Guidetti P, Okuno E, Schwarcz R. Characterization of rat brain kynurenine aminotransferases I and II. *J Neurosci Res*. 1997 Nov;150(3):457-65. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19971101)50:3<457::AID-JNR12>3.0.CO;2-3. PMID: 9364331.
219. Guidetti P, Schwarcz R. 3-Hydroxykynurenine potentiates quinolinate but not NMDA toxicity in the rat striatum. *Eur J Neurosci*. 1999 Nov;11(11):3857-63. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00806.x. PMID: 10583474.
220. Guindon J, Hohmann AG. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2009 Dec;8(6):403-21. doi: 10.2174/187152709789824660. PMID: 19839937; PMCID: PMC2834283.
221. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988 Oct;96(10):857-81. doi: 10.1111/j.1699-0463.1988.tb00954.x. PMID: 3056461.
222. Guo S, Ashina M, Olesen J, Birk S. The effect of sodium nitroprusside on cerebral hemodynamics and headache in healthy subjects. *Cephalalgia*. 2013 Apr;33(5):301-7. doi: 10.1177/0333102412475239. Epub 2013 Feb 12. PMID: 23405018.
223. Gupta S, McCarson KE, Welch KM, Berman NE. Mechanisms of pain modulation by sex hormones in migraine. *Headache*. 2011 Jun;51(6):905-22. doi: 10.1111/j.1526-4610.2011.01908.x. PMID: 21631476.
224. Haanes KA, Edvinsson L. Pathophysiological Mechanisms in Migraine and the Identification of New Therapeutic Targets. *CNS Drugs*. 2019 Jun;33(6):525-537. doi: 10.1007/s40263-019-00630-6. PMID: 30989485.
225. 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. Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr 10;98(8):4687-92. doi: 10.1073/pnas.071582498. Epub 2001 Apr 3. PMID: 11287655; PMCID: PMC31895.
226. Haghiri H, Kovac S, Speckmann EJ, Zilles K, Gorji A. Patterns of neurotransmitter receptor distributions following cortical spreading depression. *Neuroscience*. 2009 Nov 10;163(4):1340-52. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.07.067. Epub 2009 Aug 6. PMID: 19665048.
227. Haley JE, Sullivan AF, Dickenson AH. Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. *Brain Res*. 1990 Jun 4;518(1-2):218-26. doi: 10.1016/0006-8993(90)90975-h. PMID: 1975214.
228. Hansen JM, Thomsen LL, Marconi R, Casari G, Olesen J, Ashina M. Familial hemiplegic migraine type 2 does not share hypersensitivity to nitric oxide with common types of migraine. *Cephalalgia*. 2008 Apr;28(4):367-75. doi: 10.1111/j.1468-2982.2008.01542.x. Epub 2008 Feb 22. PMID: 18294248.
229. Hansen JM, Hauge AW, Olesen J, Ashina M. Calcitonin gene-related peptide triggers migraine-like attacks in patients with migraine with aura. *Cephalalgia*. 2010 Oct;30(10):1179-86. doi: 10.1177/0333102410368444. Epub 2010 May 12. PMID: 20855363.
230. Hara T, Ogasawara N, Akimoto H, Takikawa O, Hiramatsu R, Kawabe T, Isobe K, Nagase F. High-affinity uptake of kynurenine and nitric oxide-mediated inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in bone marrow-derived myeloid dendritic cells. *Immunol Lett*. 2008 Feb 15;116(1):95-102. doi: 10.1016/j.imlet.2007.11.016. Epub 2007 Dec 26. PMID: 18179826.
231. Hardingham GE, Bading H. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci*. 2003 Feb;26(2):81-9. doi: 10.1016/S0166-2236(02)00040-1. PMID: 12536131.
232. Hargreaves RJ, Shephard SL. Pathophysiology of migraine--new insights. *Can J Neurol Sci*. 1999 Nov;26 Suppl 3:S12-9. doi: 10.1017/s031716710000147. PMID: 10563228.
233. Harris JA. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull*. 1998;45(1):1-8. doi: 10.1016/s0361-9230(97)00277-3. PMID: 9434195.
234. Hassanain HH, Chon SY, Gupta SL. Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor. *J Biol Chem*. 1993 Mar 5;268(7):5077-84. PMID: 8444884.
235. Havanka-Kanniainen H, Tolonen U, Myllylä VV. Autonomic dysfunction in migraine: a survey of 188 patients. *Headache*. 1988 Aug;28(7):465-70. doi: 10.1111/j.1526-4610.1988.hed2807465.x. PMID: 3243708.
236. Håvik B, Røkke H, Bårdsen K, Davanger S, Bramham CR. Bursts of high-frequency stimulation trigger rapid delivery of pre-existing alpha-CaMKII mRNA to synapses: a mechanism in dendritic protein synthesis during long-term potentiation in adult awake rats. *Eur J Neurosci*. 2003 Jun;17(12):2679-89. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02712.x. PMID: 12823475.

237. Hazell GG, Yao ST, Roper JA, Prossnitz ER, O'Carroll AM, Lolait SJ. Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *J Endocrinol.* 2009 Aug;202(2):223-36. doi: 10.1677/JOE-09-0066. Epub 2009 May 6. PMID: 19420011; PMCID: PMC2710976.
238. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia.* 2018 Jan;38(1):1-211. doi: 10.1177/0333102417738202. PMID: 29368949.
239. Heijnen CJ, Rouppe van der Voort C, Wulffraat N, van der Net J, Kuis W, Kavelaars A. Functional alpha 1-adrenergic receptors on leukocytes of patients with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J Neuroimmunol.* 1996 Dec;71(1-2):223-6. doi: 10.1016/s0165-5728(96)00125-7. PMID: 8982123.
240. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007 Jul;87(3):905-31. doi: 10.1152/physrev.00026.2006. PMID: 17615392.
241. Henry JL. Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. *Brain Res.* 1976 Sep 24;114(3):439-51. doi: 10.1016/0006-8993(76)90965-3. PMID: 953765.
242. Hermann DM, Luppi PH, Peyron C, Hinckel P, Jouvet M. Afferent projections to the rat nuclei raphe magnus, raphe pallidus and reticularis gigantocellularis pars alpha demonstrated by iontophoretic application of cholera toxin (subunit b). *J Chem Neuroanat.* 1997 Jun;13(1):1-21. doi: 10.1016/s0891-0618(97)00019-7. PMID: 9271192.
243. Heyliger SO, Goodman CB, Ngong JM, Soliman KF. The analgesic effects of tryptophan and its metabolites in the rat. *Pharmacol Res.* 1998 Oct;38(4):243-50. doi: 10.1006/phrs.1998.0362. PMID: 9774487.
244. Hillard CJ, Muthian S, Kearn CS. Effects of CB(1) cannabinoid receptor activation on cerebellar granule cell nitric oxide synthase activity. *FEBS Lett.* 1999 Oct 8;459(2):277-81. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01253-3. PMID: 10518035.
245. Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz R, Albuquerque EX. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci.* 2001 Oct 1;21(19):7463-73. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-19-07463.2001. PMID: 11567036; PMCID: PMC6762893.
246. Hoffmann J, Wecker S, Neeb L, Dirnagl U, Reuter U. Primary trigeminal afferents are the main source for stimulus-induced CGRP release into jugular vein blood and CSF. *Cephalalgia.* 2012a Jul;32(9):659-67. doi: 10.1177/0333102412447701. Epub 2012a May 30. PMID: 22652383.
247. Hoffmann J, Suprinsinchai W, Andreou AP, Summ O, Akerman S, Goadsby PJ. Olvanil acts on transient receptor potential vanilloid channel 1 and cannabinoid receptors to modulate neuronal transmission in the trigeminovascular system. *Pain.* 2012b Nov;153(11):2226-2232. doi: 10.1016/j.pain.2012.07.006. Epub 2012 Aug 14. PMID: 22902197.
248. Hoffmann J, Baca SM, Akerman S. Neurovascular mechanisms of migraine and cluster headache. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 Apr;39(4):573-594. doi: 10.1177/0271678X17733655. Epub 2017 Sep 26. PMID: 28948863; PMCID: PMC6446418.
249. Horvath G, Kekesi G, Nagy E, Benedek G. The role of TRPV1 receptors in the antinociceptive effect of anandamide at spinal level. *Pain.* 2008 Feb;134(3):277-284. doi: 10.1016/j.pain.2007.04.032. Epub 2007 May 29. PMID: 17533116.
250. Hoskin KL, Kaube H, Goadsby PJ. Sumatriptan can inhibit trigeminal afferents by an exclusively neural mechanism. *Brain.* 1996 Oct;119 (Pt 5):1419-28. doi: 10.1093/brain/119.5.1419. PMID: 8931567.
251. Hoskin KL, Bulmer DC, Lasalandra M, Jonkman A, Goadsby PJ. Fos expression in the midbrain periaqueductal grey after trigeminovascular stimulation. *J Anat.* 2001 Jan;198(Pt 1):29-35. doi: 10.1046/j.1469-7580.2001.19810029.x. PMID: 11215764; PMCID: PMC1468188.
252. Hosobuchi Y, Adams JE, Linchitz R. Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone. *Science.* 1977 Jul 8;197(4299):183-6. doi: 10.1126/science.301658. PMID: 301658.
253. Hou M, Uddman R, Tajti J, Edvinsson L. Nociceptin immunoreactivity and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *Brain Res.* 2003 Feb 28;964(2):179-86. doi: 10.1016/s0006-8993(02)03927-6. PMID: 12576178.
254. Hu HJ, Gereau RW 4th. ERK integrates PKA and PKC signaling in superficial dorsal horn neurons. II. Modulation of neuronal excitability. *J Neurophysiol.* 2003 Sep;90(3):1680-8. doi: 10.1152/jn.00341.2003. Epub 2003 May 15. PMID: 12750418.
255. Hu HJ, Carrasquillo Y, Karim F, Jung WE, Nerbonne JM, Schwarz TL, Gereau RW 4th. The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity. *Neuron.* 2006 Apr 6;50(1):89-100. doi: 10.1016/j.neuron.2006.03.010. PMID: 16600858.

256. Hudmon A, Schulman H. Neuronal CA2+/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:473-510. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135410. Epub 2001 Nov 9. PMID: 12045104.
257. Humphrey PP. 5-Hydroxytryptamine and the pathophysiology of migraine. *J Neurol.* 1991;238 Suppl 1:S38-44. doi: 10.1007/BF01642905. PMID: 2045830.
258. Humphrey PP, Feniuk W, Marriott AS, Tanner RJ, Jackson MR, Tucker ML. Preclinical studies on the anti-migraine drug, sumatriptan. *Eur Neurol.* 1991;31(5):282-90. doi: 10.1159/000116755. PMID: 1653134.
259. Humphrey PP. The discovery of a new drug class for the acute treatment of migraine. *Headache.* 2007 Apr;47 Suppl 1:S10-9. doi: 10.1111/j.1526-4610.2007.00672.x. PMID: 17425704.
260. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature.* 1987 Aug 13-19;328(6131):632-4. doi: 10.1038/328632a0. PMID: 3112583.
261. Iadarola MJ, Brady LS, Draisci G, Dubner R. Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. *Pain.* 1988 Dec;35(3):313-326. doi: 10.1016/0304-3959(88)90141-8. PMID: 2906426.
262. Ichikawa H, Gouty S, Regalia J, Helke CJ, Sugimoto T. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II in the rat cranial sensory ganglia. *Brain Res.* 2004 Apr 16;1005(1-2):36-43. doi: 10.1016/j.brainres.2004.01.030. PMID: 15044062.
263. Ignarro LJ, Lippton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981 Sep;218(3):739-49. PMID: 6115052.
264. Ilzecka J, Kocki T, Stelmasiak Z, Turski WA. Endogenous protectant kynurenic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2003 Jun;107(6):412-8. doi: 10.1034/j.1600-0404.2003.00076.x. PMID: 12757473.
265. Iversen HK, Olesen J, Tfelt-Hansen P. Intravenous nitroglycerin as an experimental model of vascular headache. Basic characteristics. *Pain.* 1989 Jul;38(1):17-24. doi: 10.1016/0304-3959(89)90067-5. PMID: 2506503.
266. Iversen HK. Experimental headache in humans. *Cephalalgia.* 1995;15(4):281-7. doi: 10.1046/j.1468-2982.1995.1504281.x. PMID: 7585924.
267. Iversen HK, Olesen J. Headache induced by a nitric oxide donor (nitroglycerin) responds to sumatriptan. A human model for development of migraine drugs. *Cephalalgia.* 1996 Oct;16(6):412-8. doi: 10.1046/j.1468-2982.1996.1606412.x. PMID: 8902249.
268. Jakubowski M, Levy D, Goor-Aryeh I, Collins B, Bajwa Z, Burstein R. Terminating migraine with allodynia and ongoing central sensitization using parenteral administration of COX1/COX2 inhibitors. *Headache.* 2005 Jul-Aug;45(7):850-61. doi: 10.1111/j.1526-4610.2005.05153.x. PMID: 15985101.
269. Jakubowski M, Levy D, Kainz V, Zhang XC, Kosaras B, Burstein R. Sensitization of central trigeminovascular neurons: blockade by intravenous naproxen infusion. *Neuroscience.* 2007 Aug 24;148(2):573-83. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.04.064. Epub 2007 Jul 25. PMID: 17651900; PMCID: PMC2710388.
270. Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmall R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron.* 2002 Sep 26;36(1):57-68. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00908-x. PMID: 12367506.
271. Ji RR, Gereau RW 4th, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev.* 2009 Apr;60(1):135-48. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.011. Epub 2008 Dec 25. PMID: 19150373; PMCID: PMC2666786.
272. Ji Y, Bennett BM. Biotransformation of glyceryl trinitrate by rat hepatic microsomal glutathione S-transferase 1. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Sep;318(3):1050-6. doi: 10.1124/jpet.106.103713. Epub 2006 May 23. PMID: 16720755.
273. Jones MG, Lever I, Bingham S, Read S, McMahon SB, Parsons A. Nitric oxide potentiates response of trigeminal neurones to dural or facial stimulation in the rat. *Cephalalgia.* 2001 Jul;21(6):643-55. doi: 10.1046/j.1468-2982.2001.00213.x. PMID: 11531896.
274. Juhász G, Zsombok T, Jakab B, Nemeth J, Szolcsanyi J, Bagdy G. Sumatriptan causes parallel decrease in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and migraine headache during nitroglycerin induced migraine attack. *Cephalalgia.* 2005 Mar;25(3):179-83. doi: 10.1111/j.1468-2982.2005.00836.x. PMID: 15689192.

275. Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H, Oh U. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem.* 2004 Feb 20;279(8):7048-54. doi: 10.1074/jbc.M311448200. Epub 2003 Nov 20. PMID: 14630912.
276. Just S, Arndt K, Doods H. The role of CGRP and nicotinic receptors in centrally evoked facial blood flow changes. *Neurosci Lett.* 2005 Jun 10-17;381(1-2):120-4. doi: 10.1016/j.neulet.2005.02.012. Epub 2005 Feb 25. PMID: 15882801.
277. Kao DJ, Li AH, Chen JC, Luo RS, Chen YL, Lu JC, Wang HL. CC chemokine ligand 2 upregulates the current density and expression of TRPV1 channels and Nav1.8 sodium channels in dorsal root ganglion neurons. *J Neuroinflammation.* 2012 Aug 8;9:189. doi: 10.1186/1742-2094-9-189. PMID: 22870919; PMCID: PMC3458897.
278. Katusic S, Beard CM, Bergstralh E, Kurland LT. Incidence and clinical features of trigeminal neuralgia, Rochester, Minnesota, 1945-1984. *Ann Neurol.* 1990 Jan;27(1):89-95. doi: 10.1002/ana.410270114. PMID: 2301931.
279. Kaube H, Hoskin KL, Goadsby PJ. Inhibition by sumatriptan of central trigeminal neurones only after blood-brain barrier disruption. *Br J Pharmacol.* 1993 Jul;109(3):788-92. doi: 10.1111/j.1476-5381.1993.tb13643.x. PMID: 8395298; PMCID: PMC2175651.
280. Kaube H, Herzog J, Käufer T, Dichgans M, Diener HC. Aura in some patients with familial hemiplegic migraine can be stopped by intranasal ketamine. *Neurology.* 2000 Jul 12;55(1):139-41. doi: 10.1212/wnl.55.1.139. PMID: 10891926.
281. Kaube H, Katsarava Z, Przywara S, Drepper J, Ellrich J, Diener HC. Acute migraine headache: possible sensitization of neurons in the spinal trigeminal nucleus? *Neurology.* 2002 Apr 23;58(8):1234-8. doi: 10.1212/wnl.58.8.1234. PMID: 11971092.
282. Kayser V, Elfassi IE, Aubel B, Melfort M, Julius D, Gingrich JA, Hamon M, Bourgoin S. Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT1A^{-/-}, 5-HT1B^{-/-}, 5-HT2A^{-/-}, 5-HT3A^{-/-} and 5-HTT^{-/-} knock-out male mice. *Pain.* 2007 Aug;130(3):235-248. doi: 10.1016/j.pain.2006.11.015. Epub 2007 Jan 23. PMID: 17250964.
283. Kawamura M, Kuraishi Y, Minami M, Satoh M. Antinociceptive effect of intrathecally administered antiserum against calcitonin gene-related peptide on thermal and mechanical noxious stimuli in experimental hyperalgesic rats. *Brain Res.* 1989 Sep 11;497(1):199-203. doi: 10.1016/0006-8993(89)90990-6. PMID: 2790455.
284. Kawasaki Y, Kohno T, Zhuang ZY, Brenner GJ, Wang H, Van Der Meer C, Befort K, Woolf CJ, Ji RR. Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization. *J Neurosci.* 2004 Sep 22;24(38):8310-21. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2396-04.2004. PMID: 15385614; PMCID: PMC6729681.
285. Kawase T, Okuda K, Wu CH, Yoshie H, Hara K, Burns DM. Calcitonin gene-related peptide acts as a mitogen for human Gin-1 gingival fibroblasts by activating the MAP kinase signalling pathway. *J Periodontal Res.* 1999 Apr;34(3):160-8. doi: 10.1111/j.1600-0765.1999.tb02237.x. PMID: 10384404.
286. Kessler M, Terramani T, Lynch G, Baudry M. A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. *J Neurochem.* 1989 Apr;52(4):1319-28. doi: 10.1111/j.1471-4159.1989.tb01881.x. PMID: 2538568.
287. 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. Central terminal sensitization of TRPV1 by descending serotonergic facilitation modulates chronic pain. *Neuron.* 2014 Feb 19;81(4):873-887. doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.011. Epub 2014 Jan 23. PMID: 24462040; PMCID: PMC3943838.
288. Kimura H, Okamoto K, Sakai Y. Modulatory effects of prostaglandin D2, E2 and F2 alpha on the postsynaptic actions of inhibitory and excitatory amino acids in cerebellar Purkinje cell dendrites in vitro. *Brain Res.* 1985 Mar 25;330(2):235-44. doi: 10.1016/0006-8993(85)90682-1. PMID: 2859088.
289. Kiss C, Shepard PD, Bari F, Schwarcz R. Cortical spreading depression augments kynurenate levels and reduces malonate toxicity in the rat cortex. *Brain Res.* 2004 Mar 26;1002(1-2):129-35. doi: 10.1016/j.brainres.2004.01.004. PMID: 14988042.
290. Knyihár-Csillik E, Tajti J, Mohtasham S, Sari G, Vecsei L. Electrical stimulation of the Gasserian ganglion induces structural alterations of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive perivascular sensory nerve terminals in the rat cerebral dura mater: a possible model of migraine headache. *Neurosci Lett.* 1995 Jan 30;184(3):189-92. doi: 10.1016/0304-3940(94)11203-u. PMID: 7715843.
291. Knyihár-Csillik E, Tajti J, Samsam M, Sárosi G, Slezák S, Vecsei L. Effect of a serotonin agonist (sumatriptan) on the peptidergic innervation of the rat cerebral dura mater and on the expression of c-fos in the caudal trigeminal nucleus in an experimental migraine model. *J Neurosci Res.* 1997 Jun 1;48(5):449-64. PMID: 9185668.

292. Knyihár-Csillik E, Tajti J, Samsam M, Sáry G, Buzás P, Vécsei L. Depletion of calcitonin gene-related peptide from the caudal trigeminal nucleus of the rat after electrical stimulation of the Gasserian ganglion. *Exp Brain Res*. 1998 Jan;118(1):111-4. doi: 10.1007/s002210050260. PMID: 9547068.
293. Knyihár-Csillik E, Vécsei L. Effect of a nitric oxide donor on nitroergic nerve fibers in the rat dura mater. *Neurosci Lett*. 1999 Jan 29;260(2):97-100. doi: 10.1016/s0304-3940(98)00949-5. PMID: 10025708.
294. Knyihár-Csillik E, Tajti J, Csillik AE, Chadaide Z, Mihály A, Vécsei L. Effects of eletriptan on the peptidergic innervation of the cerebral dura mater and trigeminal ganglion, and on the expression of c-fos and c-jun in the trigeminal complex of the rat in an experimental migraine model. *Eur J Neurosci*. 2000 Nov;12(11):3991-4002. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00299.x. PMID: 11069595.
295. Knyihár-Csillik E, Toldi J, Mihály A, Krisztin-Péva B, Chadaide Z, Németh H, Fenyo R, Vécsei L. Kynurenine in combination with probenecid mitigates the stimulation-induced increase of c-fos immunoreactivity of the rat caudal trigeminal nucleus in an experimental migraine model. *J Neural Transm (Vienna)*. 2007;114(4):417-21. doi: 10.1007/s00702-006-0545-z. Epub 2006 Aug 10. PMID: 16897600.
296. Knyihár-Csillik E, Mihaly A, Krisztin-Peva B, Robotka H, Szatmari I, Fulop F, Toldi J, Csillik B, Vecsei L. The kynurenate analog SZR-72 prevents the nitroglycerol-induced increase of c-fos immunoreactivity in the rat caudal trigeminal nucleus: comparative studies of the effects of SZR-72 and kynurenic acid. *Neurosci Res*. 2008 Aug;61(4):429-32. doi: 10.1016/j.neures.2008.04.009. Epub 2008 May 2. PMID: 18541319.
297. Kohno T, Wang H, Amaya F, Brenner GJ, Cheng JK, Ji RR, Woolf CJ. Bradykinin enhances AMPA and NMDA receptor activity in spinal cord dorsal horn neurons by activating multiple kinases to produce pain hypersensitivity. *J Neurosci*. 2008 Apr 23;28(17):4533-40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5349-07.2008. PMID: 18434532; PMCID: PMC2653863.
298. Kolaj M, Cerne R, Cheng G, Brickey DA, Randić M. Alpha subunit of calcium/calmodulin-dependent protein kinase enhances excitatory amino acid and synaptic responses of rat spinal dorsal horn neurons. *J Neurophysiol*. 1994 Nov;72(5):2525-31. doi: 10.1152/jn.1994.72.5.2525. PMID: 7884477.
299. Kollau A, Hofer A, Russwurm M, Koesling D, Keung WM, Schmidt K, Brunner F, Mayer B. Contribution of aldehyde dehydrogenase to mitochondrial bioactivation of nitroglycerin: evidence for the activation of purified soluble guanylate cyclase through direct formation of nitric oxide. *Biochem J*. 2005 Feb 1;385(Pt 3):769-77. doi: 10.1042/BJ20041354. PMID: 15377279; PMCID: PMC1134753.
300. Komeima K, Hayashi Y, Naito Y, Watanabe Y. Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/ calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *J Biol Chem*. 2000 Sep 8;275(36):28139-43. doi: 10.1074/jbc.M003198200. PMID: 10874031.
301. Konradsson-Geuken A, Wu HQ, Gash CR, Alexander KS, Campbell A, Sozeri Y, Pellicciari R, Schwarcz R, Bruno JP. Cortical kynurenic acid bi-directionally modulates prefrontal glutamate levels as assessed by microdialysis and rapid electrochemistry. *Neuroscience*. 2010 Sep 15;169(4):1848-59. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.05.052. Epub 2010 Jun 19. PMID: 20600676; PMCID: PMC2918728.
302. Kopp S. The influence of neuropeptides, serotonin, and interleukin 1beta on temporomandibular joint pain and inflammation. *J Oral Maxillofac Surg*. 1998 Feb;56(2):189-91. doi: 10.1016/s0278-2391(98)90867-9. PMID: 9461143.
303. Kors E, Haan J, Ferrari M. Migraine genetics. *Curr Pain Headache Rep*. 2003 Jun;7(3):212-7. doi: 10.1007/s11916-003-0075-4. PMID: 12720601.
304. Kosaras B, Jakubowski M, Kainz V, Burstein R. Sensory innervation of the calvarial bones of the mouse. *J Comp Neurol*. 2009 Jul 20;515(3):331-48. doi: 10.1002/cne.22049. PMID: 19425099; PMCID: PMC2710390.
305. Kou XX, Wu YW, Ding Y, Hao T, Bi RY, Gan YH, Ma X. 17β-estradiol aggravates temporomandibular joint inflammation through the NF-κB pathway in ovariectomized rats. *Arthritis Rheum*. 2011 Jul;63(7):1888-97. doi: 10.1002/art.30334. PMID: 21391199.
306. Kozlov AV, Staniek K, Nohl H. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett*. 1999 Jul 2;454(1-2):127-30. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00788-7. PMID: 10413109.
307. Kress M, Reeh PW. More sensory competence for nociceptive neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 24;93(26):14995-7. doi: 10.1073/pnas.93.26.14995. PMID: 8986750; PMCID: PMC33646.
308. Kristensen JD, Post C, Gordh T Jr, Svensson BA. Spinal cord morphology and antinociception after chronic intrathecal administration of excitatory amino acid antagonists in the rat. *Pain*. 1993 Sep;54(3):309-316. doi: 10.1016/0304-3959(93)90030-S. PMID: 8233545.

309. Kruuse C, Thomsen LL, Birk S, Olesen J. Migraine can be induced by sildenafil without changes in middle cerebral artery diameter. *Brain*. 2003 Jan;126(Pt 1):241-7. doi: 10.1093/brain/awg009. PMID: 12477710.
310. Kuraishi Y, Nanayama T, Ohno H, Minami M, Satoh M. Antinociception induced in rats by intrathecal administration of antiserum against calcitonin gene-related peptide. *Neurosci Lett*. 1988 Oct 17;92(3):325-9. doi: 10.1016/0304-3940(88)90611-8. PMID: 3264395.
311. Lance JW, Lambert GA, Goadsby PJ, Duckworth JW. Brainstem influences on the cephalic circulation: experimental data from cat and monkey of relevance to the mechanism of migraine. *Headache*. 1983 Nov;23(6):258-65. doi: 10.1111/j.1526-4610.1983.hed2306258.x. PMID: 6643036.
312. Lam HH, Hanley DF, Trapp BD, Saito S, Raja S, Dawson TM, Yamaguchi H. Induction of spinal cord neuronal nitric oxide synthase (NOS) after formalin injection in the rat hind paw. *Neurosci Lett*. 1996 Jun 7;210(3):201-4. doi: 10.1016/0304-3940(96)12702-6. PMID: 8805130.
313. Lambert GA, Truong L, Zagami AS. Effect of cortical spreading depression on basal and evoked traffic in the trigeminovascular sensory system. *Cephalalgia*. 2011 Oct;31(14):1439-51. doi: 10.1177/0333102411422383. Epub 2011 Sep 22. PMID: 21940490.
314. Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW, Peters JA. Neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Prog Neurobiol*. 2003 Sep;71(1):67-80. doi: 10.1016/j.pneurobio.2003.09.001. PMID: 14611869.
315. Lange R, Schwarz JA, Hohn M. Acetylsalicylic acid effervescent 1000 mg (Aspirin) in acute migraine attacks; a multicentre, randomized, double-blind, single-dose, placebo-controlled parallel group study. *Cephalalgia*. 2000 Sep;20(7):663-7. doi: 10.1111/j.1468-2982.2000.00101.x. PMID: 11128825.
316. Lapin IP. Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice. *J Neural Transm*. 1978;42(1):37-43. doi: 10.1007/BF01262727. PMID: 641543.
317. Larsson LI, Edvinsson L, Fahrenkrug J, Håkanson R, Owman C, Schaffalitzky de Muckadell O, Sundler F. Immunohistochemical localization of a vasodilatory polypeptide (VIP) in cerebrovascular nerves. *Brain Res*. 1976 Aug 27;113(2):400-4. doi: 10.1016/0006-8993(76)90951-3. PMID: 953744.
318. Larsson M, Broman J. Pathway-specific bidirectional regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II at spinal nociceptive synapses after acute noxious stimulation. *J Neurosci*. 2006 Apr 19;26(16):4198-205. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0352-06.2006. PMID: 16624940; PMCID: PMC6674005.
319. Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia*. 2002 Feb;22(1):54-61. doi: 10.1046/j.1468-2982.2002.00310.x. PMID: 11993614.
320. Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*. 2009 Sep;10(9):895-926. doi: 10.1016/j.jpain.2009.06.012. PMID: 19712899; PMCID: PMC2750819.
321. Lauritzen M, Rice ME, Okada Y, Nicholson C. Quisqualate, kainate and NMDA can initiate spreading depression in the turtle cerebellum. *Brain Res*. 1988 Dec 20;475(2):317-27. doi: 10.1016/0006-8993(88)90620-8. PMID: 2905624.
322. Lauritzen M, Hansen AJ. The effect of glutamate receptor blockade on anoxic depolarization and cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1992 Mar;12(2):223-9. doi: 10.1038/jcbfm.1992.32. PMID: 1312539.
323. Leão AAP. Spreading depression of activity in cerebral cortex. *J Neurophysiol* 1944; 7: 359–390.
324. Leão AAP, Morison RS. Propagation of spreading cortical depression. *J Neurophysiol* 1945; 8: 33–45.
325. Lee J, Saloman JL, Weiland G, Auh QS, Chung MK, Ro JY. Functional interactions between NMDA receptors and TRPV1 in trigeminal sensory neurons mediate mechanical hyperalgesia in the rat masseter muscle. *Pain*. 2012 Jul;153(7):1514-1524. doi: 10.1016/j.pain.2012.04.015. Epub 2012 May 19. PMID: 22609428; PMCID: PMC3377858.
326. Lee KM, Kang BS, Lee HL, Son SJ, Hwang SH, Kim DS, Park JS, Cho HJ. Spinal NF- κ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur J Neurosci*. 2004 Jun;19(12):3375-81. doi: 10.1111/j.0953-816X.2004.03441.x. PMID: 15217394.
327. Lee KS, Asgar J, Zhang Y, Chung MK, Ro JY. The role of androgen receptor in transcriptional modulation of cannabinoid receptor type 1 gene in rat trigeminal ganglia. *Neuroscience*. 2013 Dec 19;254:395-403. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.09.014. Epub 2013 Sep 17. PMID: 24055403; PMCID: PMC3870904.
328. Lee KS, Zhang Y, Asgar J, Auh QS, Chung MK, Ro JY. Androgen receptor transcriptionally regulates μ -opioid receptor expression in rat trigeminal ganglia. *Neuroscience*. 2016 Sep 7;331:52-61. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.06.023. Epub 2016 Jun 16. PMID: 27320211; PMCID: PMC5498154.

329. Leo L, Gherardini L, Barone V, De Fusco M, Pietrobon D, Pizzorusso T, Casari G. Increased susceptibility to cortical spreading depression in the mouse model of familial hemiplegic migraine type 2. *PLoS Genet.* 2011 Jun;7(6):e1002129. doi: 10.1371/journal.pgen.1002129. Epub 2011 Jun 23. PMID: 21731499; PMCID: PMC3121757.
330. Leonelli M, Martins DO, Britto LR. Retinal cell death induced by TRPV1 activation involves NMDA signaling and upregulation of nitric oxide synthases. *Cell Mol Neurobiol.* 2013 Apr;33(3):379-92. doi: 10.1007/s10571-012-9904-5. Epub 2013 Jan 17. PMID: 23324998.
331. Leong S, Liu H, Yeo J. Nitric oxide synthase and glutamate receptor immunoreactivity in the rat spinal trigeminal neurons expressing Fos protein after formalin injection. *Brain Res.* 2000 Feb 7;855(1):107-15. doi: 10.1016/s0006-8993(99)02316-1. PMID: 10650136.
332. Leranath C, Shanabrough M, Horvath TL. Estrogen receptor-alpha in the raphe serotonergic and supramammillary area calretinin-containing neurons of the female rat. *Exp Brain Res.* 1999 Oct;128(3):417-20. doi: 10.1007/s002210050863. PMID: 10501815.
333. LeResche L. Epidemiology of temporomandibular disorders: implications for the investigation of etiologic factors. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(3):291-305. doi: 10.1177/10454411970080030401. PMID: 9260045.
334. Levy D, Strassman AM. Distinct sensitizing effects of the cAMP-PKA second messenger cascade on rat dural mechanonociceptors. *J Physiol.* 2002 Jan 15;538(Pt 2):483-93. doi: 10.1113/jphysiol.2001.013175. PMID: 11790814; PMCID: PMC2290080.
335. Li YQ, Wang ZM, Zheng HX, Shi JW. Central origins of substance P-like immunoreactive fibers and terminals in the spinal trigeminal caudal subnucleus in the rat. *Brain Res.* 1996 May 6;719(1-2):219-24. doi: 10.1016/0006-8993(96)00071-6. PMID: 8782885.
336. Liang DY, Li X, Clark JD. Formalin-induced spinal cord calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha expression is modulated by heme oxygenase in mice. *Neurosci Lett.* 2004 Apr 22;360(1-2):61-4. doi: 10.1016/j.neulet.2004.02.050. PMID: 15082179.
337. Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature.* 2013 Dec 5;504(7478):107-12. doi: 10.1038/nature12822. PMID: 24305160; PMCID: PMC4078027.
338. Limmroth V, Katsarava Z, Liedert B, Guehring H, Schmitz K, Diener HC, Michel MC. An in vivo rat model to study calcitonin gene related peptide release following activation of the trigeminal vascular system. *Pain.* 2001 May;92(1-2):101-6. doi: 10.1016/s0304-3959(00)00475-9. PMID: 11323131.
339. Lin Q, Palecek J, Palecková V, Peng YB, Wu J, Cui M, Willis WD. Nitric oxide mediates the central sensitization of primate spinothalamic tract neurons. *J Neurophysiol.* 1999 Mar;81(3):1075-85. doi: 10.1152/jn.1999.81.3.1075. PMID: 10085334.
340. Linde M, Gustavsson A, Stovner LJ, Steiner TJ, Barré J, Katsarava Z, Lainez JM, Lampl C, Lantéri-Minet M, Rastenyte D, Ruiz de la Torre E, Tassorelli C, André C. The cost of headache disorders in Europe: the Eurolight project. *Eur J Neurol.* 2012 May;19(5):703-11. doi: 10.1111/j.1468-1331.2011.03612.x. Epub 2011 Dec 5. PMID: 22136117.
341. Lipton RB, Bigal ME, Ashina S, Burstein R, Silberstein S, Reed ML, Serrano D, Stewart WF; American Migraine Prevalence Prevention Advisory Group. Cutaneous allodynia in the migraine population. *Ann Neurol.* 2008 Feb;63(2):148-58. doi: 10.1002/ana.21211. PMID: 18059010; PMCID: PMC2729495.
342. Liu L, Chang GQ, Jiao YQ, Simon SA. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. *Brain Res.* 1998 Nov 2;809(2):238-45. doi: 10.1016/s0006-8993(98)00862-2. PMID: 9853116.
343. Liu L, Simon SA. Modulation of IA currents by capsaicin in rat trigeminal ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 2003 Mar;89(3):1387-401. doi: 10.1152/jn.00210.2002. PMID: 12626618.
344. Liu Y, Broman J, Edvinsson L. Central projections of sensory innervation of the rat superior sagittal sinus. *Neuroscience.* 2004;129(2):431-7. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.07.045. PMID: 15501600.
345. Liverman CS, Brown JW, Sandhir R, McCarron KE, Berman NE. Role of the oestrogen receptors GPR30 and ERalpha in peripheral sensitization: relevance to trigeminal pain disorders in women. *Cephalalgia.* 2009a Jul;29(7):729-41. doi: 10.1111/j.1468-2982.2008.01789.x. Epub 2009 Feb 12. PMID: 19220308; PMCID: PMC4054707.
346. Liverman CS, Brown JW, Sandhir R, Klein RM, McCarron K, Berman NE. Oestrogen increases nociception through ERK activation in the trigeminal ganglion: evidence for a peripheral mechanism of allodynia. *Cephalalgia.* 2009b May;29(5):520-31. doi: 10.1111/j.1468-2982.2008.01755.x. Epub 2009 Feb 3. PMID: 19210515; PMCID: PMC2671577.
347. Lizanecz E, Bagi Z, Pásztor ET, Papp Z, Edes I, Kedei N, Blumberg PM, Tóth A. Phosphorylation-dependent desensitization by anandamide of vanilloid receptor-1 (TRPV1) function in rat skeletal muscle arterioles and in Chinese hamster ovary cells

- expressing TRPV1. *Mol Pharmacol.* 2006 Mar;69(3):1015-23. doi: 10.1124/mol.105.015644. Epub 2005 Dec 7. PMID: 16338989.
348. Loscalzo J. Antiplatelet and antithrombotic effects of organic nitrates. *Am J Cardiol.* 1992 Sep 24;70(8):18B-22B. doi: 10.1016/0002-9149(92)90590-u. PMID: 1529922.
349. Lovick TA, Key BJ. Inhibitory effect of nitric oxide on neuronal activity in the periaqueductal grey matter of the rat. *Exp Brain Res.* 1996 Mar;108(3):382-8. doi: 10.1007/BF00227261. PMID: 8801118.
350. Loyd DR, Weiss G, Henry MA, Hargreaves KM. Serotonin increases the functional activity of capsaicin-sensitive rat trigeminal nociceptors via peripheral serotonin receptors. *Pain.* 2011 Oct;152(10):2267-2276. doi: 10.1016/j.pain.2011.06.002. Epub 2011 Jul 6. PMID: 21737202; PMCID: PMC3183408.
351. Loyd DR, Chen PB, Hargreaves KM. Anti-hyperalgesic effects of anti-serotonergic compounds on serotonin- and capsaicin-evoked thermal hyperalgesia in the rat. *Neuroscience.* 2012a Feb 17;203:207-15. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.019. Epub 2011 Dec 20. PMID: 22209919; PMCID: PMC3461950.
352. Loyd DR, Sun XX, Locke EE, Salas MM, Hargreaves KM. Sex differences in serotonin enhancement of capsaicin-evoked calcitonin gene-related peptide release from human dental pulp. *Pain.* 2012b Oct;153(10):2061-2067. doi: 10.1016/j.pain.2012.06.018. Epub 2012 Jul 20. PMID: 22819536; PMCID: PMC3461945.
353. Lozza A, Schoenen J, Delwaide PJ. Inhibition of the blink reflex R2 component after supraorbital and index finger stimulations is reduced in cluster headache: an indication for both segmental and suprasegmental dysfunction? *Pain.* 1997 May;71(1):81-8. doi: 10.1016/s0304-3959(97)03342-3. PMID: 9200177.
354. Lu NZ, Shlaes TA, Gundlach C, Dziennis SE, Lyle RE, Bethea CL. Ovarian steroid action on tryptophan hydroxylase protein and serotonin compared to localization of ovarian steroid receptors in midbrain of guinea pigs. *Endocrine.* 1999 Dec;11(3):257-67. doi: 10.1385/ENDO:11:3:257. PMID: 10786822.
355. Lukács M, Haanes KA, Majláth Z, Tajti J, Vécsei L, Warfvinge K, Edvinsson L. Dural administration of inflammatory soup or Complete Freund's Adjuvant induces activation and inflammatory response in the rat trigeminal ganglion. *J Headache Pain.* 2015;16:564. doi: 10.1186/s10194-015-0564-y. Epub 2015 Sep 2. PMID: 26329487; PMCID: PMC4556720.
356. Lukács M, Warfvinge K, Kruse LS, Tajti J, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L, Edvinsson L. KYNA analogue SZR72 modifies CFA-induced dural inflammation- regarding expression of pERK1/2 and IL-1 β in the rat trigeminal ganglion. *J Headache Pain.* 2016 Dec;17(1):64. doi: 10.1186/s10194-016-0654-5. Epub 2016 Jul 5. PMID: 27377707; PMCID: PMC4932003.
357. Lukács M, Warfvinge K, Tajti J, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L, Edvinsson L. Topical dura mater application of CFA induces enhanced expression of c-fos and glutamate in rat trigeminal nucleus caudalis: attenuated by KYNA derivate (SZR72). *J Headache Pain.* 2017 Dec;18(1):39. doi: 10.1186/s10194-017-0746-x. Epub 2017 Mar 23. PMID: 28337634; PMCID: PMC5364126.
358. Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvet M. Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience.* 1995 Mar;65(1):119-60. doi: 10.1016/0306-4522(94)00481-j. PMID: 7753394.
359. Luo C, Seeburg PH, Sprengel R, Kuner R. Activity-dependent potentiation of calcium signals in spinal sensory networks in inflammatory pain states. *Pain.* 2008 Nov 30;140(2):358-367. doi: 10.1016/j.pain.2008.09.008. Epub 2008 Oct 15. PMID: 18926636.
360. Lynn AB, Herkenham M. Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994 Mar;268(3):1612-23. PMID: 8138973.
361. Ma QP, Woolf CJ. Noxious stimuli induce an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent hypersensitivity of the flexion withdrawal reflex to touch: implications for the treatment of mechanical allodynia. *Pain.* 1995 Jun;61(3):383-390. doi: 10.1016/0304-3959(94)00195-K. PMID: 7478681.
362. Ma QP, Hill R, Sirinathsinghji D. Colocalization of CGRP with 5-HT1B/1D receptors and substance P in trigeminal ganglion neurons in rats. *Eur J Neurosci.* 2001 Jun;13(11):2099-104. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01586.x. PMID: 11422450.
363. Maggioni F, Alessi C, Maggino T, Zanchin G. Headache during pregnancy. *Cephalalgia.* 1997 Nov;17(7):765-9. doi: 10.1046/j.1468-2982.1997.1707765.x. PMID: 9399007.
364. Maihöfner C, Tegeder I, Euchenhofer C, deWitt D, Brune K, Bang R, Neuhuber W, Geisslinger G. Localization and regulation of cyclo-oxygenase-1 and -2 and neuronal nitric oxide synthase in mouse spinal cord. *Neuroscience.* 2000;101(4):1093-108. doi: 10.1016/s0306-4522(00)00361-4. PMID: 11113358.

365. Malek N, Pajak A, Kolosowska N, Kucharczyk M, Starowicz K. The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain. *Mol Cell Neurosci*. 2015 Mar;65:1-10. doi: 10.1016/j.mcn.2015.02.001. Epub 2015 Feb 4. PMID: 25662734.
366. Malhotra R. Understanding migraine: Potential role of neurogenic inflammation. *Ann Indian Acad Neurol*. 2016 Apr-Jun;19(2):175-82. doi: 10.4103/0972-2327.182302. PMID: 27293326; PMCID: PMC4888678.
367. Malick A, Burstein R. Peripheral and central sensitization during migraine. *Funct Neurol*. 2000;15 Suppl 3:28-35. PMID: 11200798.
368. Malick A, Strassman RM, Burstein R. Trigeminothalamic and reticulohypothalamic tract neurons in the upper cervical spinal cord and caudal medulla of the rat. *J Neurophysiol*. 2000 Oct;84(4):2078-112. doi: 10.1152/jn.2000.84.4.2078. PMID: 11024099.
369. Mándi Y, Vécsei L. The kynurenine system and immunoregulation. *J Neural Transm (Vienna)*. 2012 Feb;119(2):197-209. doi: 10.1007/s00702-011-0681-y. Epub 2011 Jul 9. PMID: 21744051.
370. Maniyar FH, Sprenger T, Monteith T, Schankin C, Goadsby PJ. Brain activations in the premonitory phase of nitroglycerin-triggered migraine attacks. *Brain*. 2014 Jan;137(Pt 1):232-41. doi: 10.1093/brain/awt320. Epub 2013 Nov 25. PMID: 24277718.
371. Marchand JE, Hagino N. Afferents to the periaqueductal gray in the rat. A horseradish peroxidase study. *Neuroscience*. 1983 May;9(1):95-106. doi: 10.1016/0306-4522(83)90049-0. PMID: 6877597.
372. Marcus DA. Interrelationships of neurochemicals, estrogen, and recurring headache. *Pain*. 1995 Aug;62(2):129-139. doi: 10.1016/0304-3959(95)00052-T. PMID: 8545137.
373. Markovics A, Kormos V, Gaszner B, Lashgarara A, Szoke E, Sandor K, Szabadfi K, Tuka B, Tajti J, Szolcsanyi J, Pinter E, Hashimoto H, Kun J, Reglodi D, Helyes Z. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol Dis*. 2012 Jan;45(1):633-44. doi: 10.1016/j.nbd.2011.10.010. Epub 2011 Oct 18. PMID: 22033344.
374. Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA. Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *J Neurosci*. 1987 Dec;7(12):4129-36. doi: 10.1523/JNEUROSCI.07-12-04129.1987. PMID: 3694267; PMCID: PMC6569119.
375. Marks GS, McLaughlin BE, Nakatsu K, Brien JF. Biotransformation of glyceryl trinitrate by rat brain homogenate. *Can J Physiol Pharmacol*. 1992 Jun;70(6):935-7. doi: 10.1139/y92-127. PMID: 1423038.
376. Marosi M, Nagy D, Farkas T, Kis Z, Rózsa E, Robotka H, Fülöp F, Vécsei L, Toldi J. A novel kynurenic acid analogue: a comparison with kynurenic acid. An in vitro electrophysiological study. *J Neural Transm (Vienna)*. 2010 Feb;117(2):183-8. doi: 10.1007/s00702-009-0346-2. Epub 2009 Dec 2. PMID: 19953278.
377. Marrannes R, Willems R, De Prins E, Wauquier A. Evidence for a role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat. *Brain Res*. 1988 Aug 9;457(2):226-40. doi: 10.1016/0006-8993(88)90690-7. PMID: 2851364.
378. Marsh N, Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000 Apr;27(4):313-9. doi: 10.1046/j.1440-1681.2000.03240.x. PMID: 10779131.
379. Marvizón JC, Pérez OA, Song B, Chen W, Bunnett NW, Grady EF, Todd AJ. Calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 1 in the rat dorsal horn: localization in glutamatergic presynaptic terminals containing opioids and adrenergic alpha2C receptors. *Neuroscience*. 2007 Aug 10;148(1):250-65. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.05.036. Epub 2007 Jul 5. PMID: 17614212; PMCID: PMC2329818.
380. Mathew NT, Kailasam J, Seifert T. Clinical recognition of allodynia in migraine. *Neurology*. 2004 Sep 14;63(5):848-52. doi: 10.1212/01.wnl.0000137107.27585.f7. PMID: 15365135.
381. Matthews PJ, Aziz Q, Facer P, Davis JB, Thompson DG, Anand P. Increased capsaicin receptor TRPV1 nerve fibres in the inflamed human oesophagus. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004 Sep;16(9):897-902. doi: 10.1097/00042737-200409000-00014. PMID: 15316415.
382. Maurice T, Grégoire C, Espallergues J. Neuro(active)steroids actions at the neuromodulatory sigma1 (sigma1) receptor: biochemical and physiological evidences, consequences in neuroprotection. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006 Aug;84(4):581-97. doi: 10.1016/j.pbb.2006.07.009. Epub 2006 Sep 1. PMID: 16945406.
383. May A, Kaube H, Büchel C, Eichten C, Rijntjes M, Jüptner M, Weiller C, Diener CH. Experimental cranial pain elicited by capsaicin: a PET study. *Pain*. 1998 Jan;74(1):61-66. doi: 10.1016/S0304-3959(97)00144-9. PMID: 9514561.

384. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*. 1984 May 17-23;309(5965):261-3. doi: 10.1038/309261a0. PMID: 6325946.
385. Mazario J, Gaitan G, Herrero JF. Cyclooxygenase-1 vs. cyclooxygenase-2 inhibitors in the induction of antinociception in rodent withdrawal reflexes. *Neuropharmacology*. 2001 Jun;40(7):937-46. doi: 10.1016/s0028-3908(01)00020-x. PMID: 11378164.
386. McCormack K. The spinal actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the dissociation between their anti-inflammatory and analgesic effects. *Drugs*. 1994;47 Suppl 5:28-45; discussion 46-7. doi: 10.2165/00003495-199400475-00006. PMID: 7525183.
386. McDevitt RA, Szot P, Baratta MV, Bland ST, White SS, Maier SF, Neumaier JF. Stress-induced activity in the locus coeruleus is not sensitive to stressor controllability. *Brain Res*. 2009 Aug 18;1285:109-18. doi: 10.1016/j.brainres.2009.06.017. Epub 2009 Jun 12. PMID: 19524553; PMCID: PMC2739002.
387. McGehee DS, Heath MJ, Gelber S, Devay P, Role LW. Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science*. 1995 Sep 22;269(5231):1692-6. doi: 10.1126/science.7569895. PMID: 7569895.
388. McMahan SB, Bennet DLH, Bevan S. Inflammatory mediators and modulators. In: McMahan SB, Koltzenburg M, eds. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. Edinburgh, United Kingdom: Elsevier Churchill Livingstone. 2006; pp 49–72.
389. McNamara FN, Randall A, Gunthorpe MJ. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *Br J Pharmacol*. 2005 Mar;144(6):781-90. doi: 10.1038/sj.bjp.0706040. PMID: 15685214; PMCID: PMC1576058.
390. Mecs L, Tuboly G, Nagy E, Benedek G, Horvath G. The peripheral antinociceptive effects of endomorphin-1 and kynurenic acid in the rat inflamed joint model. *Anesth Analg*. 2009 Oct;109(4):1297-304. doi: 10.1213/ane.0b013e3181b21c5e. PMID: 19762760.
391. Meents JE, Hoffmann J, Chaplan SR, Neeb L, Schuh-Hofer S, Wickenden A, Reuter U. Two TRPV1 receptor antagonists are effective in two different experimental models of migraine. *J Headache Pain*. 2015;16:57. doi: 10.1186/s10194-015-0539-z. Epub 2015 Jun 24. PMID: 26109436; PMCID: PMC4491068.
392. Meng J, Ovsepien SV, Wang J, Pickering M, Sasse A, Aoki KR, Lawrence GW, Dolly JO. Activation of TRPV1 mediates calcitonin gene-related peptide release, which excites trigeminal sensory neurons and is attenuated by a retargeted botulinum toxin with anti-nociceptive potential. *J Neurosci*. 2009 Apr 15;29(15):4981-92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5490-08.2009. PMID: 19369567; PMCID: PMC6665337.
393. Mestre L, Iñigo PM, Mecha M, Correa FG, Hernangómez-Herrero M, Loría F, Docagne F, Borrell J, Guaza C. Anandamide inhibits Theiler's virus induced VCAM-1 in brain endothelial cells and reduces leukocyte transmigration in a model of blood brain barrier by activation of CB(1) receptors. *J Neuroinflammation*. 2011 Aug 18;8:102. doi: 10.1186/1742-2094-8-102. PMID: 21851608; PMCID: PMC3173342.
394. Michael AF, Drummond KN, Doeden D, Anderson JA, Good RA. Tryptophan metabolism in man. *J Clin Invest*. 1964 Sep;43(9):1730-46. doi: 10.1172/JCI105048. PMID: 14208245; PMCID: PMC441975.
395. Milanov I, Bogdanova D. Trigemino-cervical reflex in patients with headache. *Cephalalgia*. 2003 Feb;23(1):35-8. doi: 10.1046/j.1468-2982.2003.00454.x. PMID: 12534578.
396. Miller KJ, Hoffman BJ. Adenosine A3 receptors regulate serotonin transport via nitric oxide and cGMP. *J Biol Chem*. 1994 Nov 4;269(44):27351-6. PMID: 7525554.
397. Miranda AF, Boegman RJ, Beninger RJ, Jhamandas K. Protection against quinolinic acid-mediated excitotoxicity in nigrostriatal dopaminergic neurons by endogenous kynurenic acid. *Neuroscience*. 1997 Jun;78(4):967-75. doi: 10.1016/s0306-4522(96)00655-0. PMID: 9174065.
398. Mitsikostas DD, Sanchez del Rio M, Waeber C, Moskowitz MA, Cutrer FM. The NMDA receptor antagonist MK-801 reduces capsaicin-induced c-fos expression within rat trigeminal nucleus caudalis. *Pain*. 1998 May;76(1-2):239-48. doi: 10.1016/s0304-3959(98)00051-7. PMID: 9696479.
399. Mitsikostas DD, Sanchez del Rio M, Waeber C, Huang Z, Cutrer FM, Moskowitz MA. Non-NMDA glutamate receptors modulate capsaicin induced c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis. *Br J Pharmacol*. 1999 Jun;127(3):623-30. doi: 10.1038/sj.bjp.0702584. PMID: 10401552; PMCID: PMC1566054.
400. Mitsikostas DD, Sanchez del Rio M. Receptor systems mediating c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis in animal models of migraine. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001 Mar;35(1):20-35. doi: 10.1016/s0165-0173(00)00048-5. PMID: 11245884.

401. Miyamoto T, Dubin AE, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS One*. 2009 Oct 29;4(10):e7596. doi: 10.1371/journal.pone.0007596. PMID: 19893614; PMCID: PMC2764051.
402. Mokha SS, McMillan JA, Iggo A. Pathways mediating descending control of spinal nociceptive transmission from the nuclei locus coeruleus (LC) and raphe magnus (NRM) in the cat. *Exp Brain Res*. 1986;61(3):597-606. doi: 10.1007/BF00237586. PMID: 3007190.
403. Moroni F, Carpenedo R, Cozzi A, Meli E, Chiarugi A, Pellegrini-Giampietro DE. Studies on the neuroprotective action of kynurenine mono-oxygenase inhibitors in post-ischemic brain damage. *Adv Exp Med Biol*. 2003;527:127-36. doi: 10.1007/978-1-4615-0135-0_15. PMID: 15206725.
404. Moskowitz MA, Reinhard JF Jr, Romero J, Melamed E, Pettibone DJ. Neurotransmitters and the fifth cranial nerve: is there a relation to the headache phase of migraine? *Lancet*. 1979 Oct 27;2(8148):883-5. doi: 10.1016/s0140-6736(79)92692-8. PMID: 90971.
405. Moskowitz MA. The neurobiology of vascular head pain. *Ann Neurol*. 1984 Aug;16(2):157-68. doi: 10.1002/ana.410160202. PMID: 6206779.
406. Moskowitz MA, Nozaki K, Kraig RP. Neocortical spreading depression provokes the expression of c-fos protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms. *J Neurosci*. 1993 Mar;13(3):1167-77. doi: 10.1523/JNEUROSCI.13-03-01167.1993. PMID: 8382735; PMCID: PMC2737353.
407. Moussaoul S, Duval P, Lenoir V, Garret C, Kerdelhue B. CGRP in the trigeminal nucleus, spinal cord and hypothalamus: effect of gonadal steroids. *Neuropeptides*. 1996 Dec;30(6):546-50. doi: 10.1016/s0143-4179(96)90037-2. PMID: 9004252.
408. Mulderry PK, Ghatei MA, Spokes RA, Jones PM, Pierson AM, Hamid QA, Kanse S, Amara SG, Burren JM, Legon S, et al. Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience*. 1988 Apr;25(1):195-205. doi: 10.1016/0306-4522(88)90018-8. PMID: 2839796.
409. Nag S, Mokha SS. Activation of the trigeminal α 2-adrenoceptor produces sex-specific, estrogen dependent thermal antinociception and antihyperalgesia using an operant pain assay in the rat. *Behav Brain Res*. 2016 Nov 1;314:152-8. doi: 10.1016/j.bbr.2016.08.012. Epub 2016 Aug 6. PMID: 27506651; PMCID: PMC4996728.
410. 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. *Cephalgia*. 2016 Aug;36(9):849-61. doi: 10.1177/0333102415613766. Epub 2015 Oct 28. PMID: 26512068.
411. Nakajima K, Obata H, Ito N, Goto F, Saito S. The nociceptive mechanism of 5-hydroxytryptamine released into the peripheral tissue in acute inflammatory pain in rats. *Eur J Pain*. 2009 May;13(5):441-7. doi: 10.1016/j.ejpain.2008.06.007. Epub 2008 Jul 24. PMID: 18656400.
412. Nakajima Y, Furuichi Y, Biswas KK, Hashiguchi T, Kawahara K, Yamaji K, Uchimura T, Izumi Y, Maruyama I. Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF-kappaB pathway inhibition. *FEBS Lett*. 2006 Jan 23;580(2):613-9. doi: 10.1016/j.febslet.2005.12.079. Epub 2006 Jan 3. Erratum in: *FEBS Lett*. 2006 Mar 20;580(7):1909. PMID: 16406050.
413. Nakanishi M, Hata K, Nagayama T, Sakurai T, Nishisho T, Wakabayashi H, Hiraga T, Ebisu S, Yoneda T. Acid activation of Trpv1 leads to an up-regulation of calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglion neurons via the CaMK-CREB cascade: a potential mechanism of inflammatory pain. *Mol Biol Cell*. 2010 Aug 1;21(15):2568-77. doi: 10.1091/mbc.E10-01-0049. Epub 2010 Jun 9. PMID: 20534813; PMCID: PMC2912344.
414. Näsström J, Karlsson U, Post C. Antinociceptive actions of different classes of excitatory amino acid receptor antagonists in mice. *Eur J Pharmacol*. 1992 Feb 25;212(1):21-9. doi: 10.1016/0014-2999(92)90067-e. PMID: 1313371.
415. Natura G, von Banchet GS, Schaible HG. Calcitonin gene-related peptide enhances TTX-resistant sodium currents in cultured dorsal root ganglion neurons from adult rats. *Pain*. 2005 Aug;116(3):194-204. doi: 10.1016/j.pain.2005.04.002. PMID: 15927395.
416. Nellgård B, Wieloch T. NMDA-receptor blockers but not NBQX, an AMPA-receptor antagonist, inhibit spreading depression in the rat brain. *Acta Physiol Scand*. 1992 Dec;146(4):497-503. doi: 10.1111/j.1748-1716.1992.tb09451.x. PMID: 1283483.
417. Nelson MT, Huang Y, Brayden JE, Hescheler J, Standen NB. Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K⁺ channels. *Nature*. 1990 Apr 19;344(6268):770-3. doi: 10.1038/344770a0. PMID: 2109832.
418. Nicolodi M, Sicuteri F. Exploration of NMDA receptors in migraine: therapeutic and theoretic implications. *Int J Clin Pharmacol Res*. 1995;15(5-6):181-9. PMID: 8835616.

419. Nilsson LK, Nordin C, Jönsson EG, Engberg G, Linderholm KR, Erhardt S. Cerebrospinal fluid kynurenic acid in male and female controls - correlation with monoamine metabolites and influences of confounding factors. *J Psychiatr Res.* 2007 Jan-Feb;41(1-2):144-51. doi: 10.1016/j.jpsychires.2005.12.001. Epub 2006 Jan 24. PMID: 16434056.
420. Niu KY, Zhang Y, Ro JY. Effects of gonadal hormones on the peripheral cannabinoid receptor 1 (CB1R) system under a myositis condition in rats. *Pain.* 2012 Nov;153(11):2283-2291. doi: 10.1016/j.pain.2012.07.037. Epub 2012 Aug 31. PMID: 22940464; PMCID: PMC3578305.
421. Noguchi K, Senba E, Morita Y, Sato M, Tohyama M. Co-expression of alpha-CGRP and beta-CGRP mRNAs in the rat dorsal root ganglion cells. *Neurosci Lett.* 1990 Jan 1;108(1-2):1-5. doi: 10.1016/0304-3940(90)90696-7. PMID: 2304619.
422. Nosedá R, Kainz V, Borsook D, Burstein R. Neurochemical pathways that converge on thalamic trigeminovascular neurons: potential substrate for modulation of migraine by sleep, food intake, stress and anxiety. *PLoS One.* 2014 Aug 4;9(8):e103929. doi: 10.1371/journal.pone.0103929. PMID: 25090640; PMCID: PMC4121288.
423. Nozaki K, Moskowitz MA, Boccalini P. CP-93,129, sumatriptan, dihydroergotamine block c-fos expression within rat trigeminal nucleus caudalis caused by chemical stimulation of the meninges. *Br J Pharmacol.* 1992 Jun;106(2):409-15. doi: 10.1111/j.1476-5381.1992.tb14348.x. PMID: 1327382; PMCID: PMC1907519.
424. Nozaki K, Moskowitz MA, Maynard KI, Koketsu N, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH. Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993 Jan;13(1):70-9. doi: 10.1038/jcbfm.1993.9. PMID: 7678014.
425. Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem.* 2002 Apr 19;277(16):13375-8. doi: 10.1074/jbc.C200104200. Epub 2002 Mar 7. PMID: 11884385.
426. Obata H, Saito S, Ishizaki K, Goto F. Antinociception in rat by sarpogrelate, a selective 5-HT(2A) receptor antagonist, is peripheral. *Eur J Pharmacol.* 2000 Sep 15;404(1-2):95-102. doi: 10.1016/s0014-2999(00)00522-7. PMID: 10980267.
427. Ogawa A, Ren K, Tsuboi Y, Morimoto T, Sato T, Iwata K. A new model of experimental parotitis in rats and its implication for trigeminal nociception. *Exp Brain Res.* 2003 Oct;152(3):307-16. doi: 10.1007/s00221-003-1538-x. Epub 2003 Jul 31. PMID: 12898097.
428. Ohnishi T, Okuda-Ashitaka E, Matsumura S, Katano T, Nishizawa M, Ito S. Characterization of signaling pathway for the translocation of neuronal nitric oxide synthase to the plasma membrane by PACAP. *J Neurochem.* 2008 Jun 1;105(6):2271-85. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05325.x. PMID: 18331476.
429. Ohshiro H, Tonai-Kachi H, Ichikawa K. GPR35 is a functional receptor in rat dorsal root ganglion neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Jan 11;365(2):344-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.10.197. Epub 2007 Nov 9. PMID: 17996730.
430. Ohta T, Ikemi Y, Murakami M, Imagawa T, Otsuguro K, Ito S. Potentiation of transient receptor potential V1 functions by the activation of metabotropic 5-HT receptors in rat primary sensory neurons. *J Physiol.* 2006 Nov 1;576(Pt 3):809-22. doi: 10.1113/jphysiol.2006.112250. Epub 2006 Aug 10. PMID: 16901936; PMCID: PMC1890424.
431. Olesen J, Iversen HK, Thomsen LL. Nitric oxide supersensitivity: a possible molecular mechanism of migraine pain. *Neuroreport.* 1993 Aug;4(8):1027-30. doi: 10.1097/00001756-199308000-00008. PMID: 8241457.
432. Olesen J, Burstein R, Ashina M, Tfelt-Hansen P. Origin of pain in migraine: evidence for peripheral sensitisation. *Lancet Neurol.* 2009 Jul;8(7):679-90. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70090-0. PMID: 19539239.
433. Olesen J. Nitric oxide-related drug targets in headache. *Neurotherapeutics.* 2010 Apr;7(2):183-90. doi: 10.1016/j.nurt.2010.03.006. PMID: 20430317; PMCID: PMC5084099.
434. Osebold JW. Mechanisms of action by immunologic adjuvants. *J Am Vet Med Assoc.* 1982 Nov 15;181(10):983-7. PMID: 6294032.
435. Oshinsky ML, Luo J. Neurochemistry of trigeminal activation in an animal model of migraine. *Headache.* 2006 Jun;46 Suppl 1:S39-44. doi: 10.1111/j.1526-4610.2006.00489.x. PMID: 16927963.
436. Oxenkrug GF. Genetic and hormonal regulation of tryptophan kynurenine metabolism: implications for vascular cognitive impairment, major depressive disorder, and aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Dec;1122:35-49. doi: 10.1196/annals.1403.003. PMID: 18077563.
437. Pajot J, Ressayre C, Ngom I, Woda A. Gonadectomy induces site-specific differences in nociception in rats. *Pain.* 2003 Jul;104(1-2):367-73. doi: 10.1016/s0304-3959(03)00044-7. PMID: 12855347.

438. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6. doi: 10.1038/327524a0. PMID: 3495737.
439. Pan L, Song K, Hu F, Sun W, Lee I. Nitric oxide induces apoptosis associated with TRPV1 channel-mediated Ca(2+) entry via S-nitrosylation in osteoblasts. *Eur J Pharmacol*. 2013 Sep 5;715(1-3):280-5. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.05.009. Epub 2013 May 23. PMID: 23707350.
440. Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience*. 2001;102(4):937-44. doi: 10.1016/s0306-4522(00)00523-6. PMID: 11182255.
441. 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. doi: 10.1097/00001756-200009280-00008. PMID: 11043526.
442. 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. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02031.x. PMID: 12081660.
443. 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. doi: 10.1111/j.1468-2982.2006.01244.x. PMID: 17212683.
444. Párdutz Á, Schoenen J. NSAIDs in the Acute Treatment of Migraine: A Review of Clinical and Experimental Data. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010 Jun 17;3(6):1966-1987. doi: 10.3390/ph3061966. PMID: 27713337; PMCID: PMC4033962.
445. Parohova J, Vrankova S, Barta A, et al. The cross-talk of nuclear factor kappaB and nitric oxide in the brain. *Activitas Nervosa Superior Rediviva* 2009; 51: 123–126.
446. Paxinos G, Watson C . *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th edn. Academic Press, London. 2007
447. Pecins-Thompson M, Brown NA, Kohama SG, Bethea CL. Ovarian steroid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA expression in rhesus macaques. *J Neurosci*. 1996 Nov 1;16(21):7021-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-21-07021.1996. PMID: 8824338; PMCID: PMC6579247.
448. Pecins-Thompson M, Brown NA, Bethea CL. Regulation of serotonin re-uptake transporter mRNA expression by ovarian steroids in rhesus macaques. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998 Jan;53(1-2):120-9. doi: 10.1016/s0169-328x(97)00286-6. PMID: 9473622.
449. Peng LM, Chen XP, Shi RZ, Chen L, Li YJ, Yang TL. Involvement of anandamide transporter in calcitonin gene-related peptide expression stimulated by nitroglycerin and influence of ALDH2 Glu504Lys polymorphism. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014 Nov;64(5):460-4. doi: 10.1097/FJC.0000000000000138. PMID: 25098345.
450. Peres MF, Zukerman E, Senne Soares CA, Alonso EO, Santos BF, Faulhaber MH. Cerebrospinal fluid glutamate levels in chronic migraine. *Cephalalgia*. 2004 Sep;24(9):735-9. doi: 10.1111/j.1468-2982.2004.00750.x. PMID: 15315529.
451. Perkins MN, Stone TW. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res*. 1982 Sep 9;247(1):184-7. doi: 10.1016/0006-8993(82)91048-4. PMID: 6215086.
452. Perkins MN, Stone TW. Actions of kynurenic acid and quinolinic acid in the rat hippocampus in vivo. *Exp Neurol*. 1985 Jun;88(3):570-9. doi: 10.1016/0014-4886(85)90072-x. PMID: 2987017.
453. Perrotta A, Serrao M, Tassorelli C, Arce-Leal N, Guaschino E, Sances G, Rossi P, Bartolo M, Pierelli F, Sandrini G, Nappi G. Oral nitric-oxide donor glyceryl-trinitrate induces sensitization in spinal cord pain processing in migraineurs: a double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *Eur J Pain*. 2011 May;15(5):482-90. doi: 10.1016/j.ejpain.2010.09.010. Epub 2010 Oct 20. PMID: 20965755.
454. Pertovaara M, Raitala A, Uusitalo H, Pukander J, Helin H, Oja SS, Hurme M. Mechanisms dependent on tryptophan catabolism regulate immune responses in primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2005 Oct;142(1):155-61. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02889.x. PMID: 16178870; PMCID: PMC1809473.
455. Pertwee RG. Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol*. 2001 Apr;63(5):569-611. doi: 10.1016/s0301-0082(00)00031-9. PMID: 11164622.
456. Pettit DA, Anders DL, Harrison MP, Cabral GA. Cannabinoid receptor expression in immune cells. *Adv Exp Med Biol*. 1996;402:119-29. doi: 10.1007/978-1-4613-0407-4_17. PMID: 8787652.

457. 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. The L-kynurenine-probenecid combination reduces neuropathic pain in rats. *Eur J Pain*. 2013 Oct;17(9):1365-73. doi: 10.1002/j.1532-2149.2013.00305.x. Epub 2013 Mar 25. PMID: 23529950.
458. Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev*. 2002 Jun;54(2):233-46. doi: 10.1124/pr.54.2.233. PMID: 12037140.
459. Pozzo-Miller LD, Inoue T, Murphy DD. Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca²⁺ transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J Neurophysiol*. 1999 Mar;81(3):1404-11. doi: 10.1152/jn.1999.81.3.1404. PMID: 10085365.
460. Pradhan AA, Smith ML, McGuire B, Tarash I, Evans CJ, Charles A. Characterization of a novel model of chronic migraine. *Pain*. 2014 Feb;155(2):269-274. doi: 10.1016/j.pain.2013.10.004. Epub 2013 Oct 10. PMID: 24121068; PMCID: PMC3920577.
470. Prescott ED, Julius D. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*. 2003 May 23;300(5623):1284-8. doi: 10.1126/science.1083646. PMID: 12764195.
471. Puig S, Rivot JP, Besson JM. Effect of subcutaneous administration of the chemical algogen formalin, on 5-HT metabolism in the nucleus raphe magnus and the medullary dorsal horn: a voltammetric study in freely moving rats. *Brain Res*. 1992 Sep 11;590(1-2):250-4. doi: 10.1016/0006-8993(92)91102-k. PMID: 1422833.
472. Puri J, Bellinger LL, Kramer PR. Estrogen in cycling rats alters gene expression in the temporomandibular joint, trigeminal ganglia and trigeminal subnucleus caudalis/upper cervical cord junction. *J Cell Physiol*. 2011 Dec;226(12):3169-80. doi: 10.1002/jcp.22671. PMID: 21321935; PMCID: PMC3110508.
473. Puri V, Cui L, Liverman CS, Roby KF, Klein RM, Welch KM, Berman NE. Ovarian steroids regulate neuropeptides in the trigeminal ganglion. *Neuropeptides*. 2005 Aug;39(4):409-17. doi: 10.1016/j.npep.2005.04.002. PMID: 15936815.
474. Puri V, Puri S, Svojanovsky SR, Mathur S, Macgregor RR, Klein RM, Welch KM, Berman NE. Effects of oestrogen on trigeminal ganglia in culture: implications for hormonal effects on migraine. *Cephalalgia*. 2006 Jan;26(1):33-42. doi: 10.1111/j.1468-2982.2005.00987.x. PMID: 16396664.
475. Quartu M, Serra MP, Ambu R, Lai ML, Del Fiacco M. AMPA-type glutamate receptor subunits 2/3 in the human trigeminal sensory ganglion and subnucleus caudalis from prenatal ages to adulthood. *Mech Ageing Dev*. 2002 Mar 15;123(5):463-71. doi: 10.1016/s0047-6374(01)00358-x. PMID: 11796131.
476. Quartu M, Serra MP, Boi M, Poddighe L, Picci C, Demontis R, Del Fiacco M. TRPV1 receptor in the human trigeminal ganglion and spinal nucleus: immunohistochemical localization and comparison with the neuropeptides CGRP and SP. *J Anat*. 2016 Dec;229(6):755-767. doi: 10.1111/joa.12529. Epub 2016 Jul 26. PMID: 27456865; PMCID: PMC5108161.
477. Raap DK, DonCarlos L, Garcia F, Muma NA, Wolf WA, Battaglia G, Van de Kar LD. Estrogen desensitizes 5-HT(1A) receptors and reduces levels of G(z), G(i1) and G(i3) proteins in the hypothalamus. *Neuropharmacology*. 2000 Jul 24;39(10):1823-32. doi: 10.1016/s0028-3908(99)00264-6. PMID: 10884563.
478. Raboisson P, Dallel R. The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004 Apr;28(2):219-26. doi: 10.1016/j.neubiorev.2003.12.003. PMID: 15172765.
479. Raskin NH, Hosobuchi Y, Lamb S. Headache may arise from perturbation of brain. *Headache*. 1987 Sep;27(8):416-20. doi: 10.1111/j.1526-4610.1987.hed2708416.x. PMID: 3667258.
480. Rasmussen BK, Jensen R, Schroll M, Olesen J. Epidemiology of headache in a general population--a prevalence study. *J Clin Epidemiol*. 1991;44(11):1147-57. doi: 10.1016/0895-4356(91)90147-2. PMID: 1941010.
481. Rasmussen BK, Olesen J. Migraine with aura and migraine without aura: an epidemiological study. *Cephalalgia*. 1992 Aug;12(4):221-8; discussion 186. doi: 10.1046/j.1468-2982.1992.1204221.x. PMID: 1525797.
482. Read SJ, Smith MI, Hunter AJ, Parsons AA. The dynamics of nitric oxide release measured directly and in real time following repeated waves of cortical spreading depression in the anaesthetised cat. *Neurosci Lett*. 1997 Sep 5;232(3):127-30. doi: 10.1016/s0304-3940(97)00604-6. PMID: 9310296.
483. Redecker C, Wang W, Fritschy JM, Witte OW. Widespread and long-lasting alterations in GABA(A)-receptor subtypes after focal cortical infarcts in rats: mediation by NMDA-dependent processes. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002 Dec;22(12):1463-75. doi: 10.1097/01.WCB.0000034149.72481.BD. PMID: 12468891.
484. Rehavi M, Goldin M, Roz N, Weizman A. Regulation of rat brain vesicular monoamine transporter by chronic treatment with ovarian hormones. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998 Jun 1;57(1):31-7. doi: 10.1016/s0169-328x(98)00058-8. PMID: 9630494.

485. Reuter U, Chiarugi A, Bolay H, Moskowitz MA. Nuclear factor-kappaB as a molecular target for migraine therapy. *Ann Neurol*. 2002 Apr;51(4):507-16. doi: 10.1002/ana.10159. PMID: 11921057.
486. Roberts MH. 5-Hydroxytryptamine and antinociception. *Neuropharmacology*. 1984 Dec;23(12B):1529-36. doi: 10.1016/0028-3908(84)90097-2. PMID: 6098854.
487. Robbins MS, Lipton RB. The epidemiology of primary headache disorders. *Semin Neurol*. 2010 Apr;30(2):107-19. doi: 10.1055/s-0030-1249220. Epub 2010 Mar 29. PMID: 20352581.
488. Rose DP. The influence of oestrogens on tryptophan metabolism in man. *Clin Sci*. 1966 Oct;31(2):265-72. PMID: 5955724.
489. Rose DP, Braidman IP. Excretion of tryptophan metabolites as affected by pregnancy, contraceptive steroids, and steroid hormones. *Am J Clin Nutr*. 1971 Jun;24(6):673-83. doi: 10.1093/ajcn/24.6.673. PMID: 4325646.
490. Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol*. 2003 Nov;140(5):790-801. doi: 10.1038/sj.bjpp.0705467. Epub 2003 Sep 29. PMID: 14517174; PMCID: PMC1574087.
491. Rossi F, Valentina C, Garavaglia S, Sathyaasikumar KV, Schwarcz R, Kojima S, Okuwaki K, Ono S, Kajii Y, Rizzi M. Crystal structure-based selective targeting of the pyridoxal 5'-phosphate dependent enzyme kynurenine aminotransferase II for cognitive enhancement. *J Med Chem*. 2010 Aug 12;53(15):5684-9. doi: 10.1021/jm100464k. PMID: 20684605; PMCID: PMC3929320.
492. Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2014 Oct;94(4):1099-142. doi: 10.1152/physrev.00034.2013. PMID: 25287861; PMCID: PMC4187032.
493. Russell MB, Olesen J. A nosographic analysis of the migraine aura in a general population. *Brain*. 1996 Apr;119 (Pt 2):355-61. doi: 10.1093/brain/119.2.355. PMID: 8800932.
494. Saad AA, Abdel-Tawab GA, el-Zoghby SM, Mostafa MH, Moursi GE. Relationship between pyridoxal phosphate and some synthetic oestrogens in their effect on kynurenine hydrolase and kynurenine aminotransferase enzymes of normal mouse liver. *Biochem Pharmacol*. 1974 Mar 1;23(5):999-1013. doi: 10.1016/0006-2952(74)90030-6. PMID: 4458682.
495. Sachs M, Pape HC, Speckmann EJ, Gorji A. The effect of estrogen and progesterone on spreading depression in rat neocortical tissues. *Neurobiol Dis*. 2007 Jan;25(1):27-34. doi: 10.1016/j.nbd.2006.08.013. Epub 2006 Sep 27. PMID: 17008106.
496. Saengjaroenatham C, Supornsilpchai W, Ji-Au W, Srikiatkachorn A, Maneesri-le Grand S. Serotonin depletion can enhance the cerebrovascular responses induced by cortical spreading depression via the nitric oxide pathway. *Int J Neurosci*. 2015 Feb;125(2):130-9. doi: 10.3109/00207454.2014.908876. Epub 2014 May 19. PMID: 24670256.
497. Saito S, Kidd GJ, Trapp BD, Dawson TM, Bredt DS, Wilson DA, Traystman RJ, Snyder SH, Hanley DF. Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase. *Neuroscience*. 1994 Mar;59(2):447-56. doi: 10.1016/0306-4522(94)90608-4. PMID: 7516502.
498. Salio C, Fischer J, Franzoni MF, Conrath M. Pre- and postsynaptic localizations of the CB1 cannabinoid receptor in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience*. 2002;110(4):755-64. doi: 10.1016/s0306-4522(01)00584-x. PMID: 11934482.
499. Saloman JL, Chung MK, Ro JY. P2X₃ and TRPV1 functionally interact and mediate sensitization of trigeminal sensory neurons. *Neuroscience*. 2013 Mar 1;232:226-38. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.11.015. Epub 2012 Nov 29. PMID: 23201260; PMCID: PMC3600407.
500. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Aug 1;90(15):7240-4. doi: 10.1073/pnas.90.15.7240. PMID: 7688473; PMCID: PMC47112.
501. Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*. 2001 Mar 22;410(6827):471-5. doi: 10.1038/35068566. PMID: 11260714.
502. Samuels ER, Szabadi E. Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organisation. *Curr Neuropharmacol*. 2008 Sep;6(3):235-53. doi: 10.2174/157015908785777229. PMID: 19506723; PMCID: PMC2687936.
503. Sancho R, Calzado MA, Di Marzo V, Appendino G, Muñoz E. Anandamide inhibits nuclear factor-kappaB activation through a cannabinoid receptor-independent pathway. *Mol Pharmacol*. 2003 Feb;63(2):429-38. doi: 10.1124/mol.63.2.429. PMID: 12527815.
504. Sances G, Tassorelli C, Pucci E, Ghiotto N, Sandrini G, Nappi G. Reliability of the nitroglycerin provocative test in the diagnosis of neurovascular headaches. *Cephalalgia*. 2004 Feb;24(2):110-9. doi: 10.1111/j.1468-2982.2004.00639.x. PMID: 14728706.

505. Sand T, Zwart JA. The blink reflex in chronic tension-type headache, migraine, and cervicogenic headache. *Cephalalgia*. 1994 Dec;14(6):447-50; discussion 394-5. doi: 10.1046/j.1468-2982.1994.1406447.x. PMID: 7697706.
506. Sandrini G, Alfonsi E, Ruiz L, Pavesi G, Micieli G, Manzoni GC, Mancina D, Nappi G. Impairment of corneal pain perception in cluster headache. *Pain*. 1991 Dec;47(3):299-304. doi: 10.1016/0304-3959(91)90219-N. PMID: 1784500.
507. Santamaría A, Ríos C, Solís-Hernández F, Ordaz-Moreno J, González-Reynoso L, Altagracia M, Kravzov J. Systemic DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology*. 1996 Jan;35(1):23-8. doi: 10.1016/0028-3908(95)00145-x. PMID: 8684593.
508. Saper CB, Scammell TE, Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*. 2005 Oct 27;437(7063):1257-63. doi: 10.1038/nature04284. PMID: 16251950.
509. Saper CB, Fuller PM, Pedersen NP, Lu J, Scammell TE. Sleep state switching. *Neuron*. 2010 Dec 22;68(6):1023-42. doi: 10.1016/j.neuron.2010.11.032. PMID: 21172606; PMCID: PMC3026325.
510. Sappington RM, Calkins DJ. Contribution of TRPV1 to microglia-derived IL-6 and NFkappaB translocation with elevated hydrostatic pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Jul;49(7):3004-17. doi: 10.1167/iovs.07-1355. Epub 2008 Mar 24. PMID: 18362111; PMCID: PMC4139938.
511. Sarchielli P, Di Filippo M, Nardi K, Calabresi P. Sensitization, glutamate, and the link between migraine and fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep*. 2007 Oct;11(5):343-51. doi: 10.1007/s11916-007-0216-2. PMID: 17894924.
512. Sarker MH, Fraser PA. The role of guanylyl cyclases in the permeability response to inflammatory mediators in pial venular capillaries in the rat. *J Physiol*. 2002 Apr 1;540(Pt 1):209-18. doi: 10.1113/jphysiol.2001.012912. PMID: 11927680; PMCID: PMC2290229.
513. Sasaki M, Obata H, Kawahara K, Saito S, Goto F. Peripheral 5-HT2A receptor antagonism attenuates primary thermal hyperalgesia and secondary mechanical allodynia after thermal injury in rats. *Pain*. 2006 May;122(1-2):130-6. doi: 10.1016/j.pain.2006.01.021. Epub 2006 Mar 9. PMID: 16527395.
514. Sawai T, Bernier F, Fukushima T, Hashimoto T, Ogura H, Nishizawa Y. Estrogen induces a rapid increase of calcium-calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus. *Brain Res*. 2002 Sep 20;950(1-2):308-11. doi: 10.1016/S0006-8993(02)03186-4. PMID: 12231258.
515. Schlereth T, Birklein F. The sympathetic nervous system and pain. *Neuromolecular Med*. 2008;10(3):141-7. doi: 10.1007/s12017-007-8018-6. Epub 2007 Nov 8. PMID: 17990126.
516. Schmelz M, Petersen LJ. Neurogenic inflammation in human and rodent skin. *News Physiol Sci*. 2001 Feb;16:33-7. doi: 10.1152/physiologyonline.2001.16.1.33. PMID: 11390944.
517. Schmuck K, Ullmer C, Kalkman HO, Probst A, Lubbert H. Activation of meningeal 5-HT2B receptors: an early step in the generation of migraine headache? *Eur J Neurosci*. 1996 May;8(5):959-67. doi: 10.1111/j.1460-9568.1996.tb01583.x. PMID: 8743744.
518. Schoenen J. Traitement des céphalées de tension [Treatment of tension headache]. *Rev Neurol (Paris)*. 2000;156 Suppl 4:4S87-92. French. PMID: 11139755.
519. Schoonman GG, Evers DJ, Terwindt GM, van Dijk JG, Ferrari MD. The prevalence of premonitory symptoms in migraine: a questionnaire study in 461 patients. *Cephalalgia*. 2006 Oct;26(10):1209-13. doi: 10.1111/j.1468-2982.2006.01195.x. PMID: 16961788.
520. Schürks M, Diener HC. Migraine, allodynia, and implications for treatment. *Eur J Neurol*. 2008 Dec;15(12):1279-85. doi: 10.1111/j.1468-1331.2008.02343.x. PMID: 19068510.
521. Schueler M, Messlinger K, Dux M, Neuhuber WL, De R. Extracranial projections of meningeal afferents and their impact on meningeal nociception and headache. *Pain*. 2013 Sep;154(9):1622-1631. doi: 10.1016/j.pain.2013.04.040. Epub 2013 Apr 27. PMID: 23707274.
522. Schuh-Hofer S, Richter M, Geworski L, Villringer A, Israel H, Wenzel R, Munz DL, Arnold G. Increased serotonin transporter availability in the brainstem of migraineurs. *J Neurol*. 2007 Jun;254(6):789-96. doi: 10.1007/s00415-006-0444-0. Epub 2007 Mar 12. PMID: 17351723.
523. Schulte LH, May A. The migraine generator revisited: continuous scanning of the migraine cycle over 30 days and three spontaneous attacks. *Brain*. 2016 Jul;139(Pt 7):1987-93. doi: 10.1093/brain/aww097. Epub 2016 May 5. PMID: 27190019.

524. Schwartz ES, Lee I, Chung K, Mo Chung J. Oxidative stress in the spinal cord is an important contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice. *Pain*. 2008 Sep 15;138(3):514-524. doi: 10.1016/j.pain.2008.01.029. Epub 2008 Mar 28. PMID: 18375065; PMCID: PMC2581506.
525. Schwarcz R, Pellicciari R. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Oct;303(1):1-10. doi: 10.1124/jpet.102.034439. PMID: 12235226.
526. Schwedt TJ, Larson-Prior L, Coalson RS, Nolan T, Mar S, Ances BM, Benzinger T, Schlaggar BL. Allodynia and descending pain modulation in migraine: a resting state functional connectivity analysis. *Pain Med*. 2014 Jan;15(1):154-65. doi: 10.1111/pme.12267. Epub 2013 Oct 25. PMID: 24165094; PMCID: PMC4188437.
527. Shimizu T, Toriumi H, Sato H, Shibata M, Nagata E, Gotoh K, Suzuki N. Distribution and origin of TRPV1 receptor-containing nerve fibers in the dura mater of rat. *Brain Res*. 2007 Oct 10;1173:84-91. doi: 10.1016/j.brainres.2007.07.068. Epub 2007 Aug 10. PMID: 17765209.
528. Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 1997 Dec 1;388(4):507-25. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19971201)388:4<507::aid-cne1>3.0.co;2-6. PMID: 9388012.
529. Sicuteri F. Headache as possible expression of deficiency of brain 5-hydroxytryptamine (central denervation supersensitivity). *Headache*. 1972 Jul;12(2):69-72. doi: 10.1111/j.1526-4610.1972.hed1202069.x. PMID: 4262476.
530. Sicuteri F, Del Bene E, Poggioni M, Bonazzi A. Unmasking latent dynociception in healthy subjects. *Headache*. 1987 Apr;27(4):180-5. doi: 10.1111/j.1526-4610.1987.hed2704180.x. PMID: 3110103.
531. Silberstein SD, Young WB. Migraine aura and prodrome. *Semin Neurol*. 1995 Jun;15(2):175-82. doi: 10.1055/s-2008-1041021. PMID: 7481137.
532. Silberstein SD, Merriam GR. Physiology of the menstrual cycle. *Cephalalgia*. 2000 Apr;20(3):148-54. doi: 10.1046/j.1468-2982.2000.00034.x. PMID: 10997766.
533. Silverman W, Locovei S, Dahl G. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Sep;295(3):C761-7. doi: 10.1152/ajpcell.00227.2008. Epub 2008 Jul 2. PMID: 18596212; PMCID: PMC2544448.
534. Simpson KL, Altman DW, Wang L, Kirifides ML, Lin RC, Waterhouse BD. Lateralization and functional organization of the locus coeruleus projection to the trigeminal somatosensory pathway in rat. *J Comp Neurol*. 1997 Aug 18;385(1):135-47. PMID: 9268121.
535. Sluka KA, Dougherty PM, Sorkin LS, Willis WD, Westlund KN. Neural changes in acute arthritis in monkeys. III. Changes in substance P, calcitonin gene-related peptide and glutamate in the dorsal horn of the spinal cord. *Brain Res Brain Res Rev*. 1992 Jan-Apr;17(1):29-38. doi: 10.1016/0165-0173(92)90004-6. PMID: 1379098.
536. Smillie SJ, King R, Kodji X, Outzen E, Pozsgai G, Fernandes E, Marshall N, de Winter P, Heads RJ, Dessapt-Baradez C, Gnudi L, Sams A, Shah AM, Siow RC, Brain SD. An ongoing role of α -calcitonin gene-related peptide as part of a protective network against hypertension, vascular hypertrophy, and oxidative stress. *Hypertension*. 2014 May;63(5):1056-62. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02517. Epub 2014 Feb 10. PMID: 24516108.
537. Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, Shaffer A, Talley JJ, Masferrer JL, Seibert K, Isakson PC. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Oct 27;95(22):13313-8. doi: 10.1073/pnas.95.22.13313. PMID: 9789085; PMCID: PMC23795.
538. Smith WL, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol*. 1996;62:167-215. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60430-7. PMID: 8781269.
539. Sokołowska M, Bednarski M, Kwiecień I, Filipek B, Włodek L. Bioactivation of nitroglycerin to nitric oxide (NO) and S-nitrosothiols in the rat liver and evaluation of the coexisting hypotensive effect. *Fundam Clin Pharmacol*. 2004 Aug;18(4):449-56. doi: 10.1111/j.1472-8206.2004.00265.x. PMID: 15312151.
540. Somerville BW. Estrogen-withdrawal migraine. I. Duration of exposure required and attempted prophylaxis by premenstrual estrogen administration. *Neurology*. 1975 Mar;25(3):239-44. doi: 10.1212/wnl.25.3.239. PMID: 1167630.
541. Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev*. 2001 Jul;81(3):1065-96. doi: 10.1152/physrev.2001.81.3.1065. PMID: 11427692.
542. Sommer C. Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. *Mol Neurobiol*. 2004 Oct;30(2):117-25. doi: 10.1385/MN:30:2:117. PMID: 15475622.

543. South SM, Kohno T, Kaspar BK, Hegarty D, Vissel B, Drake CT, Ohata M, Jenab S, Sailer AW, Malkmus S, Masuyama T, Horner P, Bogulavsky J, Gage FH, Yaksh TL, Woolf CJ, Heinemann SF, Inturrisi CE. A conditional deletion of the NR1 subunit of the NMDA receptor in adult spinal cord dorsal horn reduces NMDA currents and injury-induced pain. *J Neurosci*. 2003 Jun 15;23(12):5031-40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-12-05031.2003. PMID: 12832526; PMCID: PMC6741202.
544. Spencer SE, Sawyer WB, Wada H, Platt KB, Loewy AD. CNS projections to the pterygopalatine parasympathetic preganglionic neurons in the rat: a retrograde transneuronal viral cell body labeling study. *Brain Res*. 1990 Nov 26;534(1-2):149-69. doi: 10.1016/0006-8993(90)90125-u. PMID: 1705849.
545. Sprenger T, Willoch F, Miederer M, Schindler F, Valet M, Berthele A, Spilker ME, Förderreuther S, Straube A, Stangier I, Wester HJ, Tölle TR. Opioidergic changes in the pineal gland and hypothalamus in cluster headache: a ligand PET study. *Neurology*. 2006 Apr 11;66(7):1108-10. doi: 10.1212/01.wnl.0000204225.15947.f8. PMID: 16606930.
546. Sprenger T, Viana M, Tassorelli C. Current Prophylactic Medications for Migraine and Their Potential Mechanisms of Action. *Neurotherapeutics*. 2018 Apr;15(2):313-323. doi: 10.1007/s13311-018-0621-8. PMID: 29671241; PMCID: PMC5935650.
547. Srikiatkachorn A, Suwattanasophon C, Ruangpattanaatawee U, Phansuwan-Pujito P. 2002 Wolff Award. 5-HT_{2A} receptor activation and nitric oxide synthesis: a possible mechanism determining migraine attacks. *Headache*. 2002 Jul-Aug;42(7):566-74. doi: 10.1046/j.1526-4610.2002.02142.x. PMID: 12482207.
548. Srivastava DP, Woolfrey KM, Penzes P. Insights into rapid modulation of neuroplasticity by brain estrogens. *Pharmacol Rev*. 2013 Sep 27;65(4):1318-50. doi: 10.1124/pr.111.005272. PMID: 24076546; PMCID: PMC3799233.
549. Steiner TJ, Jensen R, Katsarava Z, Linde M, MacGregor EA, Osipova V, Paemeleire K, Olesen J, Peters M, Martelletti P. Aids to management of headache disorders in primary care (2nd edition) : on behalf of the European Headache Federation and Lifting The Burden: the Global Campaign against Headache. *J Headache Pain*. 2019 May 21;20(1):57. doi: 10.1186/s10194-018-0899-2. PMID: 31113373; PMCID: PMC6734476.
550. Stepien A, Chalimoniuk M. Level of nitric oxide-dependent cGMP in patients with migraine. *Cephalalgia*. 1998 Nov;18(9):631-4. doi: 10.1046/j.1468-2982.1998.1809631.x. PMID: 9876887.
551. Stone TW. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog Neurobiol*. 2001 Jun;64(2):185-218. doi: 10.1016/s0301-0082(00)00032-0. PMID: 11240212.
552. Stone TW, Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Darlington LG. Tryptophan, adenosine, neurodegeneration and neuroprotection. *Metab Brain Dis*. 2007 Dec;22(3-4):337-52. doi: 10.1007/s11011-007-9064-3. PMID: 17712616.
553. Storer RJ, Goadsby PJ. Trigeminovascular nociceptive transmission involves N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Neuroscience*. 1999;90(4):1371-6. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00536-3. PMID: 10338304.
554. Stovner Lj, Hagen K, Jensen R, Katsarava Z, Lipton R, Scher A, Steiner T, Zwart JA. The global burden of headache: a documentation of headache prevalence and disability worldwide. *Cephalalgia*. 2007 Mar;27(3):193-210. doi: 10.1111/j.1468-2982.2007.01288.x. PMID: 17381554.
555. Strassman AM, Vos BP. Somatotopic and laminar organization of fos-like immunoreactivity in the medullary and upper cervical dorsal horn induced by noxious facial stimulation in the rat. *J Comp Neurol*. 1993 May 22;331(4):495-516. doi: 10.1002/cne.903310406. PMID: 8509507.
556. Strassman AM, Raymond SA, Burstein R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature*. 1996 Dec 12;384(6609):560-4. doi: 10.1038/384560a0. PMID: 8955268.
557. Sufka KJ, Staszko SM, Johnson AP, Davis ME, Davis RE, Smitherman TA. Clinically relevant behavioral endpoints in a recurrent nitroglycerin migraine model in rats. *J Headache Pain*. 2016;17:40. doi: 10.1186/s10194-016-0624-y. Epub 2016 Apr 19. PMID: 27093871; PMCID: PMC4837195.
558. Sugiyo S, Takemura M, Dubner R, Ren K. Trigeminal transition zone/rostral ventromedial medulla connections and facilitation of orofacial hyperalgesia after masseter inflammation in rats. *J Comp Neurol*. 2005 Dec 26;493(4):510-23. doi: 10.1002/cne.20797. PMID: 16304628.
559. Sun RQ, Tu YJ, Lawand NB, Yan JY, Lin Q, Willis WD. Calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA- and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization. *J Neurophysiol*. 2004 Nov;92(5):2859-66. doi: 10.1152/jn.00339.2004. PMID: 15486424.
560. Suzuki N, Hardebo JE. The cerebrovascular parasympathetic innervation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1993 Spring;5(1):33-46. PMID: 8452761.

561. Svendsen F, Tjølsen A, Hole K. AMPA and NMDA receptor-dependent spinal LTP after nociceptive tetanic stimulation. *Neuroreport*. 1998 Apr 20;9(6):1185-90. doi: 10.1097/00001756-199804200-00041. PMID: 9601691.
562. Svendsen O, Lykkegaard K. Neuronal c-Fos immunoreactivity as a quantitative measure of stress or pain. *Acta Agric Scand A Anim Sci* 2001, 51:131–134
563. Svensson CI, Yaksh TL. The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002;42:553-83. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.42.092401.143905. PMID: 11807183.
564. Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*. 1999 Jun;51(2):159-212. PMID: 10353985.
565. Taiwo YO, Levine JD. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. *Neuroscience*. 1992;48(2):485-90. doi: 10.1016/0306-4522(92)90508-y. PMID: 1534874.
566. Taleghany N, Sarajari S, DonCarlos LL, Gollapudi L, Oblinger MM. Differential expression of estrogen receptor alpha and beta in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci Res*. 1999 Sep 1;57(5):603-15. PMID: 10462685.
567. Tallaksen-Greene SJ, Young AB, Penney JB, Beitz AJ. Excitatory amino acid binding sites in the trigeminal principal sensory and spinal trigeminal nuclei of the rat. *Neurosci Lett*. 1992 Jul 6;141(1):79-83. doi: 10.1016/0304-3940(92)90339-9. PMID: 1324445.
568. Tang B, Ji Y, Traub RJ. Estrogen alters spinal NMDA receptor activity via a PKA signaling pathway in a visceral pain model in the rat. *Pain*. 2008 Jul 31;137(3):540-549. doi: 10.1016/j.pain.2007.10.017. Epub 2008 Feb 20. PMID: 18068901; PMCID: PMC2543943.
569. Tanaka M, Matsumoto Y, Murakami T, Hisa Y, Iyata Y. The origins of catecholaminergic innervation in the rostral ventromedial medulla oblongata of the rat. *Neurosci Lett*. 1996 Mar 22;207(1):53-6. doi: 10.1016/0304-3940(96)12487-3. PMID: 8710209.
570. Tashiro A, Okamoto K, Bereiter DA. Morphine modulation of temporomandibular joint-responsive units in superficial laminae at the spinomedullary junction in female rats depends on estrogen status. *Eur J Neurosci*. 2008 Nov;28(10):2065-74. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06488.x. PMID: 19046387.
571. Tashiro A, Okamoto K, Bereiter DA. Chronic inflammation and estradiol interact through MAPK activation to affect TMJ nociceptive processing by trigeminal caudalis neurons. *Neuroscience*. 2009 Dec 29;164(4):1813-20. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.09.058. Epub 2009 Sep 25. PMID: 19786077; PMCID: PMC2813765.
572. Tashiro A, Okamoto K, Bereiter DA. Rapid estrogenic effects on TMJ-responsive brainstem neurons. *J Dent Res*. 2012 Feb;91(2):210-4. doi: 10.1177/0022034511428156. Epub 2011 Nov 4. PMID: 22058119; PMCID: PMC3261121.
573. Tassorelli C, Joseph SA. Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Res*. 1995 Jun 5;682(1-2):167-81. doi: 10.1016/0006-8993(95)00348-t. PMID: 7552308.
574. Tassorelli C, Joseph SA, Nappi G. Neurochemical mechanisms of nitroglycerin-induced neuronal activation in rat brain: a pharmacological investigation. *Neuropharmacology*. 1997 Oct;36(10):1417-24. doi: 10.1016/s0028-3908(97)00122-6. PMID: 9423929.
575. Tassorelli C, Joseph SA, Nappi G. Reciprocal circuits involved in nitroglycerin-induced neuronal activation of autonomic regions and pain pathways: a double immunolabeling and tract-tracing study. *Brain Res*. 1999 Sep 25;842(2):294-310. doi: 10.1016/s0006-8993(99)01806-5. PMID: 10526126.
576. Tassorelli C, Greco R, Wang D, Sandrini M, Sandrini G, Nappi G. Nitroglycerin induces hyperalgesia in rats--a time-course study. *Eur J Pharmacol*. 2003a Mar 19;464(2-3):159-62. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01421-3. PMID: 12620509.
577. Tassorelli C, Greco R, Sandrini G, Nappi G. Central components of the analgesic/antihyperalgesic effect of nimesulide: studies in animal models of pain and hyperalgesia. *Drugs*. 2003b ;63 Suppl 1:9-22. doi: 10.2165/00003495-200363001-00003. PMID: 14506907.
578. Tassorelli C, Blandini F, Greco R, Nappi G. Nitroglycerin enhances cGMP expression in specific neuronal and cerebrovascular structures of the rat brain. *J Chem Neuroanat*. 2004 Mar;27(1):23-32. doi: 10.1016/j.jchemneu.2003.08.006. PMID: 15036360.
579. Tassorelli C, Greco R, Cappelletti D, Sandrini G, Nappi G. Comparative analysis of the neuronal activation and cardiovascular effects of nitroglycerin, sodium nitroprusside and L-arginine. *Brain Res*. 2005a Jul 27;1051(1-2):17-24. doi: 10.1016/j.brainres.2005.05.067. PMID: 16005857.

580. Tassorelli C, Greco R, Morazzoni P, Riva A, Sandrini G, Nappi G. Parthenolide is the component of tanacetum parthenium that inhibits nitroglycerin-induced Fos activation: studies in an animal model of migraine. *Cephalalgia*. 2005b Aug;25(8):612-21. doi: 10.1111/j.1468-2982.2005.00915.x. PMID: 16033387.
581. Tassorelli C, Greco R, Wang D, Sandrini G, Nappi G. Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test. *Eur J Pharmacol*. 2006 Mar 18;534(1-3):103-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.01.023. Epub 2006 Feb 28. PMID: 16507304.
582. Tassorelli C, Greco R, Armentero MT, Blandini F, Sandrini G, Nappi G. A role for brain cyclooxygenase-2 and prostaglandin-E2 in migraine: effects of nitroglycerin. *Int Rev Neurobiol*. 2007;82:373-82. doi: 10.1016/S0074-7742(07)82020-4. PMID: 17678972.
583. Taylor DL, Urenjak J, Zilkha E, Obrenovitch TP. Effects of probenecid on the elicitation of spreading depression in the rat striatum. *Brain Res*. 1997 Aug 1;764(1-2):117-25. doi: 10.1016/S0006-8993(97)00434-4. PMID: 9295200.
584. Ter Horst GJ, Meijler WJ, Korf J, Kemper RH. Trigeminal nociception-induced cerebral Fos expression in the conscious rat. *Cephalalgia*. 2001 Dec;21(10):963-75. doi: 10.1046/j.1468-2982.2001.00285.x. PMID: 11843868.
585. Tfelt-Hansen P. Efficacy of beta-blockers in migraine. A critical review. *Cephalalgia*. 1986;6 Suppl 5:15-24. doi: 10.1177/033310248600605502. PMID: 2879629.
586. Tfelt-Hansen P, Daugaard D, Lassen LH, Iversen HK, Olesen J. Prednisolone reduces nitric oxide-induced migraine. *Eur J Neurol*. 2009 Oct;16(10):1106-11. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02654.x. Epub 2009 Jul 14. PMID: 19614965.
587. Thomaidis T, Karagounakis D, Spantideas A, Katelanis S. Transcranial Doppler in migraine attacks before and after treatment with oral zolmitriptan or sumatriptan. *Headache*. 2003 Jan;43(1):54-8. doi: 10.1046/j.1526-4610.2003.03009.x. PMID: 12864759.
588. Thomaidis T, Karapanayiotides T, Kerezoudi E, Avramidis T, Haeropoulos C, Zoukos Y, Spantideas A. Intravenous valproate aborts glyceryl trinitrate-induced migraine attacks: a clinical and quantitative EEG study. *Cephalalgia*. 2008 Mar;28(3):250-6. doi: 10.1111/j.1468-2982.2007.01513.x. Epub 2008 Jan 15. PMID: 18201252.
589. Thomas SR, Terentis AC, Cai H, Takikawa O, Levina A, Lay PA, Freewan M, Stocker R. Post-translational regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase activity by nitric oxide. *J Biol Chem*. 2007 Aug 17;282(33):23778-87. doi: 10.1074/jbc.M700669200. Epub 2007 May 29. PMID: 17535808.
590. Thomsen LL, Iversen HK, Brinck TA, Olesen J. Arterial supersensitivity to nitric oxide (nitroglycerin) in migraine sufferers. *Cephalalgia*. 1993 Dec;13(6):395-9; discussion 376. doi: 10.1046/j.1468-2982.1993.1306395.x. PMID: 7906202.
591. Thomsen LL, Kruuse C, Iversen HK, Olesen J. A nitric oxide donor (nitroglycerin) triggers genuine migraine attacks. *Eur J Neurol*. 1994 Sep;1(1):73-80. doi: 10.1111/j.1468-1331.1994.tb00053.x. PMID: 24283432.
592. Thomsen LL, Olesen J. A pivotal role of nitric oxide in migraine pain. *Ann N Y Acad Sci*. 1997 Dec 19;835:363-72. doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb48642.x. PMID: 9616786.
593. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992 Oct;51(1):5-17. doi: 10.1016/0304-3959(92)90003-T. PMID: 1454405.
594. Tokunaga A, Saika M, Senba E. 5-HT_{2A} receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery. *Pain*. 1998 Jun;76(3):349-355. doi: 10.1016/S0304-3959(98)00066-9. PMID: 9718253.
595. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 1998 Sep;21(3):531-43. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80564-4. PMID: 9768840.
596. Tottene A, Conti R, Fabbro A, Vecchia D, Shapovalova M, Santello M, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Pietrobon D. Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in Ca(v)_{2.1} knockin migraine mice. *Neuron*. 2009 Mar 12;61(5):762-73. doi: 10.1016/j.neuron.2009.01.027. PMID: 19285472.
597. Tucker DC, Saper CB. Specificity of spinal projections from hypothalamic and brainstem areas which innervate sympathetic preganglionic neurons. *Brain Res*. 1985 Dec 23;360(1-2):159-64. doi: 10.1016/0006-8993(85)91231-4. PMID: 4075168.
598. Tunis MM, Wolff HG. Studies on headache: further observations on cranial and conjunctival vessels during and between attacks of vascular headache. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1952;67(5):693-694.

599. Tvedskov JF, Thomsen LL, Iversen HK, Gibson A, Williams P, Olesen J. The prophylactic effect of valproate on glyceryltrinitrate induced migraine. *Cephalalgia*. 2004a Jul;24(7):576-85. doi: 10.1111/j.1468-2982.2003.00720.x. PMID: 15196300.
600. Tvedskov JF, Thomsen LL, Thomsen LL, Iversen HK, Williams P, Gibson A, Jenkins K, Peck R, Olesen J. The effect of propranolol on glyceryltrinitrate-induced headache and arterial response. *Cephalalgia*. 2004b Dec;24(12):1076-87. doi: 10.1111/j.1468-2982.2004.00796.x. PMID: 15566422.
601. Uddman R, Edvinsson L, Ekman R, Kingman T, McCulloch J. Innervation of the feline cerebral vasculature by nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide: trigeminal origin and co-existence with substance P. *Neurosci Lett*. 1985 Nov 20;62(1):131-6. doi: 10.1016/0304-3940(85)90296-4. PMID: 2415882.
602. Urenjak J, Obrenovitch TP, Zilkha E. Effect of probenecid on depolarizations evoked by N-methyl-D-aspartate (NMDA) in the rat striatum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1997 Jan;355(1):36-42. doi: 10.1007/pl00004915. PMID: 9007840.
603. Ushmorov A, Ratter F, Lehmann V, Dröge W, Schirmmacher V, Umansky V. Nitric-oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome C release. *Blood*. 1999 Apr 1;93(7):2342-52. PMID: 10090945.
604. van den Maagdenberg AM, Pietrobon D, Pizzorusso T, Kaja S, Broos LA, Cesetti T, van de Ven RC, Tottene A, van der Kaa J, Plomp JJ, Frants RR, Ferrari MD. A Cacna1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron*. 2004 Mar 4;41(5):701-10. doi: 10.1016/s0896-6273(04)00085-6. PMID: 15003170.
605. Vasko MR, Campbell WB, Waite KJ. Prostaglandin E2 enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J Neurosci*. 1994 Aug;14(8):4987-97. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-08-04987.1994. PMID: 7519258; PMCID: PMC6577198.
606. Velenovská M, Fisar Z. Effect of cannabinoids on platelet serotonin uptake. *Addict Biol*. 2007 Jun;12(2):158-66. doi: 10.1111/j.1369-1600.2007.00065.x. PMID: 17508987.
607. Vécsei L, Miller J, MacGarvey U, Beal MF. Kynurenine and probenecid inhibit pentylentetrazol- and NMDLA-induced seizures and increase kynurenic acid concentrations in the brain. *Brain Res Bull*. 1992 Feb;28(2):233-8. doi: 10.1016/0361-9230(92)90184-y. PMID: 1596743.
608. Vécsei L, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Jan;12(1):64-82. doi: 10.1038/nrd3793. Epub 2012 Dec 14. PMID: 23237916.
609. Vikelis M, Mitsikostas DD. The role of glutamate and its receptors in migraine. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2007 Aug;6(4):251-7. doi: 10.2174/187152707781387279. PMID: 17691981.
610. Vikman KS, Rycroft BK, Christie MJ. Switch to Ca²⁺-permeable AMPA and reduced NR2B NMDA receptor-mediated neurotransmission at dorsal horn nociceptive synapses during inflammatory pain in the rat. *J Physiol*. 2008 Jan 15;586(2):515-27. doi: 10.1113/jphysiol.2007.145581. Epub 2007 Nov 22. PMID: 18033811; PMCID: PMC2375596.
611. Világi I, Klapka N, Luhmann HJ. Optical recording of spreading depression in rat neocortical slices. *Brain Res*. 2001 Apr 20;898(2):288-96. doi: 10.1016/s0006-8993(01)02196-5. PMID: 11306015.
612. Vincent L, Vang D, Nguyen J, Gupta M, Luk K, Ericson ME, Simone DA, Gupta K. Mast cell activation contributes to sickle cell pathobiology and pain in mice. *Blood*. 2013 Sep 12;122(11):1853-62. doi: 10.1182/blood-2013-04-498105. Epub 2013 Jun 17. PMID: 23775718; PMCID: PMC3772495.
613. Volfe Z, Dvilansky A, Nathan I. Cannabinoids block release of serotonin from platelets induced by plasma from migraine patients. *Int J Clin Pharmacol Res*. 1985;5(4):243-6. PMID: 2997048.
614. Walker JS, Carmody JJ. Experimental pain in healthy human subjects: gender differences in nociception and in response to ibuprofen. *Anesth Analg*. 1998 Jun;86(6):1257-62. doi: 10.1097/00000539-199806000-00023. PMID: 9620515.
615. Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ, McIntyre P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Jan;304(1):56-62. doi: 10.1124/jpet.102.042010. PMID: 12490575.
616. Wallace JL, Bak A, McKnight W, Asfaha S, Sharkey KA, MacNaughton WK. Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. *Gastroenterology*. 1998 Jul;115(1):101-9. doi: 10.1016/s0016-5085(98)70370-1. PMID: 9649464.
617. Wang H, Nie H, Zhang RX, Qiao JT. Peripheral nitric oxide contributes to both formalin- and NMDA-induced activation of nociceptors: An immunocytochemical study in rats. *J Neurosci Res*. 1999 Sep 15;57(6):824-9. PMID: 10467253.

618. Wang QP, Nakai Y. The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. *Brain Res Bull.* 1994;34(6):575-85. doi: 10.1016/0361-9230(94)90143-0. PMID: 7922601.
619. Wang XM, Mokha SS. Opioids modulate N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)-evoked responses of trigeminothalamic neurons. *J Neurophysiol.* 1996 Sep;76(3):2093-6. doi: 10.1152/jn.1996.76.3.2093. PMID: 8890319.
620. Wang Z, Ma W, Chabot JG, Quirion R. Calcitonin gene-related peptide as a regulator of neuronal CaMKII-CREB, microglial p38-NFkB and astroglial ERK-Stat1/3 cascades mediating the development of tolerance to morphine-induced analgesia. *Pain.* 2010 Oct;151(1):194-205. doi: 10.1016/j.pain.2010.07.006. Epub 2010 Aug 5. PMID: 20691540.
621. Watanabe M, Mishina M, Inoue Y. Distinct gene expression of the N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit in peripheral neurons of the mouse sensory ganglia and adrenal gland. *Neurosci Lett.* 1994 Jan 3;165(1-2):183-6. doi: 10.1016/0304-3940(94)90740-4. PMID: 8015722.
622. Watkins LR, Martin D, Ulrich P, Tracey KJ, Maier SF. Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Pain.* 1997 Jul;71(3):225-35. doi: 10.1016/s0304-3959(97)03369-1. PMID: 9231865.
623. Wei F, Vadakkan KI, Toyoda H, Wu LJ, Zhao MG, Xu H, Shum FW, Jia YH, Zhuo M. Calcium calmodulin-stimulated adenylyl cyclases contribute to activation of extracellular signal-regulated kinase in spinal dorsal horn neurons in adult rats and mice. *J Neurosci.* 2006 Jan 18;26(3):851-61. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3292-05.2006. PMID: 16421305; PMCID: PMC6675366.
624. Weidner C, Klede M, Rukwied R, Lischetzki G, Neisius U, Skov PS, Petersen LJ, Schmelz M. Acute effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin--a microdialysis study. *J Invest Dermatol.* 2000 Dec;115(6):1015-20. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00142.x. PMID: 11121135.
625. Weiller C, May A, Limmroth V, Jüptner M, Kaube H, Schayck RV, Coenen HH, Diener HC. Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med.* 1995 Jul;1(7):658-60. doi: 10.1038/nm0795-658. PMID: 7585147.
626. Widner B, Sepp N, Kowald E, Ortner U, Wirleitner B, Fritsch P, Baier-Bitterlich G, Fuchs D. Enhanced tryptophan degradation in systemic lupus erythematosus. *Immunobiology.* 2000 Apr;201(5):621-30. doi: 10.1016/S0171-2985(00)80079-0. PMID: 10834318.
627. Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev.* 1996 Oct;17(5):533-85. doi: 10.1210/edrv-17-5-533. PMID: 8897024.
628. Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet.* 2000 Feb 19;355(9204):646-8. doi: 10.1016/S0140-6736(99)12031-2. PMID: 10696997.
629. Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science.* 2002 Apr 26;296(5568):678-82. doi: 10.1126/science.1063545. PMID: 11976437.
630. Wise EA, Price DD, Myers CD, Heft MW, Robinson ME. Gender role expectations of pain: relationship to experimental pain perception. *Pain.* 2002 Apr;96(3):335-342. doi: 10.1016/S0304-3959(01)00473-0. PMID: 11973007; PMCID: PMC2535906.
631. Wolf H, Walter S, Brown RR, Arend RA. Effect of natural oestrogens on tryptophan metabolism: evidence for interference of oestrogens with kynureninase. *Scand J Clin Lab Invest.* 1980 Feb;40(1):15-22. doi: 10.3109/00365518009091522. PMID: 7367807.
632. Woolf CJ. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature.* 1983 Dec 15-21;306(5944):686-8. doi: 10.1038/306686a0. PMID: 6656869.
633. Woolf C, Wiesenfeld-Hallin Z. Substance P and calcitonin gene-related peptide synergistically modulate the gain of the nociceptive flexor withdrawal reflex in the rat. *Neurosci Lett.* 1986 May 15;66(2):226-30. doi: 10.1016/0304-3940(86)90195-3. PMID: 2425287.
634. Woolf CJ, King AE. Dynamic alterations in the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat spinal cord. *J Neurosci.* 1990 Aug;10(8):2717-26. doi: 10.1523/JNEUROSCI.10-08-02717.1990. PMID: 2388084; PMCID: PMC6570288.
635. Woolf CJ, Thompson SWN. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain.* 1991 Mar;44(3):293-299. doi: 10.1016/0304-3959(91)90100-C. PMID: 1828878.
636. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science.* 2000 Jun 9;288(5472):1765-9. doi: 10.1126/science.288.5472.1765. PMID: 10846153.

637. Woolf CJ. Central sensitization: uncovering the relation between pain and plasticity. *Anesthesiology*. 2007 Apr;106(4):864-7. doi: 10.1097/01.anes.0000264769.87038.55. PMID: 17413924.
638. Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 2011 Mar;152(3 Suppl):S2-S15. doi: 10.1016/j.pain.2010.09.030. Epub 2010 Oct 18. PMID: 20961685; PMCID: PMC3268359.
639. Woolley CS, McEwen BS. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci*. 1992 Jul;12(7):2549-54. doi: 10.1523/JNEUROSCI.12-07-02549.1992. Erratum in: *J Neurosci* 1992 Oct;12(10):followi. PMID: 1613547; PMCID: PMC6575846.
640. Woolley CS, McEwen BS. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J Comp Neurol*. 1993 Oct 8;336(2):293-306. doi: 10.1002/cne.903360210. PMID: 8245220.
641. Woolley CS, McEwen BS. Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. *J Neurosci*. 1994 Dec;14(12):7680-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-12-07680.1994. PMID: 7996203; PMCID: PMC6576901.
642. Wu J, Lin Q, McAdoo DJ, Willis WD. Nitric oxide contributes to central sensitization following intradermal injection of capsaicin. *Neuroreport*. 1998 Mar 9;9(4):589-92. doi: 10.1097/00001756-199803090-00005. PMID: 9559921.
643. Wu J, Fang L, Lin Q, Willis WD. Fos expression is induced by increased nitric oxide release in rat spinal cord dorsal horn. *Neuroscience*. 2000;96(2):351-7. doi: 10.1016/s0306-4522(99)00534-5. PMID: 10683575.
644. Xu XJ, Dalsgaard CJ, Wiesenfeld-Hallin Z. Spinal substance P and N-methyl-D-aspartate receptors are coactivated in the induction of central sensitization of the nociceptive flexor reflex. *Neuroscience*. 1992 Dec;51(3):641-8. doi: 10.1016/0306-4522(92)90303-j. PMID: 1283208.
645. Yaksh TL, Dirig DM, Conway CM, Svensson C, Luo ZD, Isakson PC. The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E2 is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1. *J Neurosci*. 2001 Aug 15;21(16):5847-53. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-16-05847.2001. PMID: 11487607; PMCID: PMC6763183.
646. Yang E, Schulman H. Structural examination of autoregulation of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*. 1999 Sep 10;274(37):26199-208. doi: 10.1074/jbc.274.37.26199. PMID: 10473573.
647. Yang Y, Ozawa H, Lu H, Yuri K, Hayashi S, Nihonyanagi K, Kawata M. Immunocytochemical analysis of sex differences in calcitonin gene-related peptide in the rat dorsal root ganglion, with special reference to estrogen and its receptor. *Brain Res*. 1998 Apr 27;791(1-2):35-42. doi: 10.1016/s0006-8993(98)00021-3. PMID: 9593813.
648. Yamagata K, Sugimura M, Yoshida M, Sekine S, Kawano A, Oyamaguchi A, Maegawa H, Niwa H. Estrogens Exacerbate Nociceptive Pain via Up-Regulation of TRPV1 and ANO1 in Trigeminal Primary Neurons of Female Rats. *Endocrinology*. 2016 Nov;157(11):4309-4317. doi: 10.1210/en.2016-1218. Epub 2016 Sep 30. PMID: 27689413.
649. Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N. The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. *Anesth Analg*. 2002 Apr;94(4):962-7, table of contents. doi: 10.1097/00000539-200204000-00035. PMID: 11916805.
650. Yetkin E, Ozisik H, Ozcan C, Aksoy Y, Turhan H. Increased dilator response to nitrate and decreased flow-mediated dilatation in migraineurs. *Headache*. 2007 Jan;47(1):104-10. doi: 10.1111/j.1526-4610.2007.00657.x. PMID: 17355503.
651. Yu LH, Li N, Liu CY, Ma B. Estrogen altered facial mechanical pain threshold and trigeminal P2X3 receptor expression. *Neuro Endocrinol Lett*. 2011;32(6):811-5. PMID: 22286789.
652. Yu M, Ives D, Ramesha CS. Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*. 1997 Aug 22;272(34):21181-6. doi: 10.1074/jbc.272.34.21181. PMID: 9261124.
653. Zaccagnino P, D'Oria S, Romano LL, Di Venere A, Sardanelli AM, Lorusso M. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol decreases calcium induced cytochrome c release from liver mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. 2012 Apr;44(2):273-80. doi: 10.1007/s10863-012-9431-6. Epub 2012 Mar 22. PMID: 22437740.
654. Zeitz KP, Guy N, Malmberg AB, Dirajlal S, Martin WJ, Sun L, Bonhaus DW, Stucky CL, Julius D, Basbaum AI. The 5-HT3 subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci*. 2002 Feb 1;22(3):1010-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-03-01010.2002. PMID: 11826129; PMCID: PMC6758503.
655. Zhang RX, Mi ZP, Qiao JT. Changes of spinal substance P, calcitonin gene-related peptide, somatostatin, Met-enkephalin and neurotensin in rats in response to formalin-induced pain. *Regul Pept*. 1994 Apr 14;51(1):25-32. doi: 10.1016/0167-0115(94)90131-7. PMID: 7518602.

656. Zhang YQ, Gao X, Zhang LM, Wu GC. The release of serotonin in rat spinal dorsal horn and periaqueductal gray following carrageenan inflammation. *Neuroreport*. 2000 Nov 9;11(16):3539-43. doi: 10.1097/00001756-200011090-00027. PMID: 11095514.
657. Zhang X, Ji RR, Arvidsson J, Lundberg JM, Bartfai T, Bedecs K, Hökfelt T. Expression of peptides, nitric oxide synthase and NPY receptor in trigeminal and nodose ganglia after nerve lesions. *Exp Brain Res*. 1996 Oct;111(3):393-404. doi: 10.1007/BF00228728. PMID: 8911933.
658. Zhang X, Levy D, Kainz V, Nosedá R, Jakubowski M, Burstein R. Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression. *Ann Neurol*. 2011 May;69(5):855-65. doi: 10.1002/ana.22329. Epub 2011 Mar 17. PMID: 21416489; PMCID: PMC3174689.
659. Zhao H, Tian Z, Hao J, Chen B. Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005 Jan 21;3:6. doi: 10.1186/1477-7827-3-6. PMID: 15661083; PMCID: PMC548297.
660. Zhu CB, Hewlett WA, Feoktistov I, Biaggioni I, Blakely RD. Adenosine receptor, protein kinase G, and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent up-regulation of serotonin transporters involves both transporter trafficking and activation. *Mol Pharmacol*. 2004 Jun;65(6):1462-74. doi: 10.1124/mol.65.6.1462. PMID: 15155839.
661. Zhu WH, Lu CZ, Huang YM, Link H, Xiao BG. A putative mechanism on remission of multiple sclerosis during pregnancy: estrogen-induced indoleamine 2,3-dioxygenase by dendritic cells. *Mult Scler*. 2007 Jan;13(1):33-40. doi: 10.1177/1352458506071171. PMID: 17294609.
662. Zhu X, Eisenach JC. Cyclooxygenase-1 in the spinal cord is altered after peripheral nerve injury. *Anesthesiology*. 2003 Nov;99(5):1175-9. doi: 10.1097/00000542-200311000-00026. PMID: 14576556.
663. Ziegler DK, Hassanein RS. Specific headache phenomena: their frequency and coincidence. *Headache*. 1990 Feb;30(3):152-6. doi: 10.1111/j.1526-4610.1990.hed3003152.x. PMID: 2323917.
664. Zou X, Lin Q, Willis WD. Enhanced phosphorylation of NMDA receptor 1 subunits in spinal cord dorsal horn and spinothalamic tract neurons after intradermal injection of capsaicin in rats. *J Neurosci*. 2000 Sep 15;20(18):6989-97. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-18-06989.2000. PMID: 10995844; PMCID: PMC6772833.