

## Válaszok Prof. Dr. Pethő Gábor opponensi véleményére

Hálásan köszönöm Dr. Pethő Gábor Professzor Úrnak, hogy elvállalta dolgozatom véleményezését, és hogy alapos, mindenre kiterjedő bírálatot írt.

### Formai értékelés és megjegyzések:

Örülök, hogy a dolgozat fogalmazása elnyerte a tetszését. Köszönöm a formai észrevételeket, a metodikával kapcsolatban egy későbbi kérdés kapcsán válaszolok. Az összefoglaló bővítése bennem is felmerült, de az egyes kísérletek kapcsán leírt részletes diszkusszió miatt döntöttem a rövidebb összefoglaló formátum mellett.

### Kritikai megjegyzések és kérdések:

- 1. A doktori mű címe két szempontból sem szerencsés. Egyrészt indirekt módon humán vizsgálatokra utal (A szenzitizáció migrénben (ami humán betegség) és állatkísérletes modelljeiben), holott ilyenek nem történtek. Másrészt a cím csak a szenzibilizációra korlátozódik, noha a szerző trigeminális aktivációs folyamatokat is vizsgált. Amúgy a szerző által konzekvensen használt, szenzitizáció" szó - bár nagyon elterjedt fordítás a hazai szóhasználatban - nem hivatalos: „szenzibilizáció" a helyes az Akadémiai szótár szerint. Jobb cím lehetett volna pl.: A nociceptív szenzibilizáció és aktiváció vizsgálata a migrén állatkísérletes modelljeiben.*

Köszönöm a cím kapcsán megfogalmazott kritikát. Bár állatkísérletes alapkutatói eredményeket foglal össze a doktori mű, de igyekeztem ezt a legtöbb esetben a migrénnel, mint klinikai entitással összekapcsolni. Elfogadom azt is, hogy a szenzibilizáció használata a helyes, de a hazai szakmai nyelvezetben a szenzitizáció kifejezés terjedt el.

- 2. Az értekezés jelentős részét képező immunhisztokémiai vizsgálatok leírása kissé redundáns, főleg a metodika vonatkozásában. Célravezetőbb lett volna, ha a szerző az adatokat integratívabban, egy egységként kezelve mutatta volna be. Hasznos lett volna egy összefoglaló táblázat a vizsgált migrénmodellek okozta expressziós mintázatváltozásokról.*

Ez valóban redundánsnak tűnhet, de a hasonló kísérletes módszerek használata miatt igyekeztem megtalálni az egyensúlyt, hogy a különálló részletesebb metodikai rész mellett, az egyes fejezeteknél is világos legyen az alkalmazott módszer. Köszönöm a dolgozat struktúrájára tett javaslatát. Bár az összefoglalásban tömören leírtam a legfontosabb eredményeket, de egyet értek a bírálóval abban, hogy egy táblázat jobban segíthette volna a megértést.

3. *A szerző szerint az elsőként azonosított receptor, amely algogén ágensek hatását közvetíti a TRPV1 (7. oldal, 3. bekezdés). Számos más receptort, pl. a potens fájdalomkeltő bradikinin receptorait már jóval korábban klónozták.*

Köszönöm a pontosítást a TRPV1 receptorokkal kapcsolatban.

4. *A szerző sok helyen említi molekulát (pl. a 16., 17. oldalon), ahol a vegyület szó helyesebb lenne.*

Köszönöm és elfogadom a precíz észrevételt.

5. *A 17. oldalon a 2. bekezdésben a guanilát-cikláz mint az NO receptora kerül említésre. Helyesen az NO célmolekulájáról van szó (az enzimeken lévő kötőhelyeket nem tekintik receptoroknak; lásd „The concise guide to pharmacology”, rendszeresen aktualizálva a British Journal of Pharmacology folyóiratban).*

Köszönöm a bírálónak a szolubilis guanilát-ciklázsal kapcsolatos farmakológiai pontosítását.

6. *Több állatkísérlet leírásában a szolvenssel történő kezelést placebónak nevezi a szerző. Ismereteim szerint a placebo csak a humán vizsgálatok terminológiájában használatos. A szolvens vagy a vehikulum szó helyesebb lett volna.*

Bár placebo hatás állatoknál is létezik, de valóban pontosabb a vehikulum/oldószer/szolvens használata.

7. *A 22. oldalon a 2. bekezdésben a szerző nNOS felszabadulásáról beszél. Nem inkább a lebontásáról van szó?*

Igen, a lebontás valóban jobb kifejezés erre.

8. *A 20. oldalon a 3.1.1. pontban 2000-es saját publikáció adatait említi a szerző. Ezen pont általános bevezetőjében a 19. oldalon azonban 2000 utáni, más szerzők által közölt adatokat találunk, amelyek értelemszerűen lerontják a saját adatok jelentőségét. Helyesebb lett volna csak annyit említeni előzetesen, ami a vizsgálatok idején (azaz 2000 előtt) már ismert volt, és az újabb, támogató adatokat a saját eredmények diskussziójában megemlíteni.*

Köszönöm és teljesen egyetértek, helyesebb lett volna a bíráló által javasolt megfogalmazás.

9. *Mit ért a szerző azon, hogy a glutamát gyorsan felszabaduló transzmitter (8. oldal utolsó bekezdés)? Más transzmitterek lassabban szabadulnak fel?*

Köszönöm a kérdését a gyors és lassú neurotranszmisszió kapcsán. A kisméretű szinaptikus vezikulumokban található neurotranszmitterek gyorsabban szabadulnak fel, hatásuk hamarabb érvényesül. Általában, de nem kizárólagosan ionotróp receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat. A glutamát ebben az esetben így viselkedik. A nagyobb vezikulumokból felszabaduló jellemzően peptid típusú átvivőanyagok legtöbbször lassabb hatáskezdettel, de tartósabb effektussal bírnak (Randall és mtsai., 1997).

10. *A bradikinin nem tárolódik, így nem tud felszabadulni. A 9. oldal alján a „képződő” bradikinin lenne a helyes szó.*

Igen, a bradikinin limitált proteolízissel képződik, köszönöm a pontosítást.

11. *A PGE2 helyes írásmódja PGE<sub>2</sub>.*

Köszönöm a pontosítást.

12. *A szerző nem definiálja a cluster típusú fejfájást.*

A cluster fejfájás az ún. trigemino-autonóm fejfájások csoportjába tartozik, ahol a fájdalom mellett markáns vegetatív tünetek jelentkeznek. A diagnózis a kritériumok szerint (The International Classification of Headache Disorders, 3rd Edition 2018) akkor mondható ki, ha:

- A. Legalább ötször jelentkezik olyan fejfájás, mely teljesíti a B-E kritériumokat
- B. Féloldali szem körüli/feletti és/vagy halántéktáji nagyon erős fájdalom, mely kezeletlenül 15-180 percig tart
- C. Egy vagy mindkettő az alábbiak közül:
  - 1. legalább egy tünet jelentkezik a fejfájás oldalán:
    - kötőhártya belövelltség és/vagy könnyezés
    - orrdugulás és/vagy orrfolyás
    - szemhéj ödéma
    - homlok- és arcverejtékezés
    - miosis és/vagy ptosis
  - 2. nyugtalanság, agitáltság érzés
- D. A gyakorisága másnaponta egy, ill. napi 8 között van.
- E. Nincs jobb ICHD-3 diagnózis

A dolgozatban a migrénre és állatkísérletes modelljeire fókuszáltam. A cluster és a tenziós fejfájást érintőlegesen említem, emiatt nem éreztem feltétlenül szükségét a definíció részletezésének.

13. A 23., illetve a 39. ábra nem hisztogram, hanem oszlopgrafikon.

Köszönöm a javítást.

14. A 24. ábrán (40. oldal) a kétféle szimbólum leírása nem helyes (kontroll versus injekció), hiszen a sóoldatot is injekcióban adták.

Megköszönöm a precíz észrevételt.

15. Nem világos az olvasó számára, hogy a 41. oldal alján lévő hosszás eszmefuttatás a különböző agyi struktúrákról milyen kapcsolatban van a trigeminális ingerléssel. Akár egy mondat beiktatásával, akár a fejezetcím kiegészítésével az elkerülhető lett volna.

Köszönöm a felvetést az agytörzsi struktúrákat illetően. A bevezetőben már említettem, hogy migrénes roham kapcsán bizonyos agytörzsi magok jellegzetes aktivációja jelentkezik (Weiller és mtsai., 1995), melyeket migrén generátoroknak hívunk. A leírásban azért taglaltam, mert ezen magok kapcsolatrendszere és aktivációja fontos lehet, mind a migrénben, mind a fejfájásbetegségek kísérletes modellezésében, akárcsak ebben a konkrét esetben, a Gasser-dúc elektromos ingerlése kapcsán. Ez a bíráló által javasoltak figyelembevételével világosabbá vált volna.

16. Az 57. oldalon az anyagok között említett lizil-ASA hatásmódja nincs megemlítve.

Ez igaz. Bár az előző szakasz utal a hatásmechanizmusra, de egyet értek a bíráló felvetésével, hogy ez lehetett volna konkrétabb.

17. A COX-gátlókkal végzett kísérletek eredményeinek az újdonságát csökkenti az a tény, hogy az NSAID-ok régóta használatosak a migrénes fejfájás kezelésére, igazolva a prosztaglandinok közvetítő szerepét. Helyesebb lett volna ezeket az adatokat a NTG modell validációjaként diszkutálni.

Egyetértek a bírálóval, hogy a COX-gátlókkal végzett kísérletsorozat inkább a modell validációjának tekinthető, bár a COX-2 inhibitorok hatékonysága ebben a kísérleti összeállításban újdonságnak értelmezhető.

18. Miért a koleszterol volt a béta-ösztadiol kontrollja?

Köszönöm az érdekes kérdést. A krónikus ösztadiol kezelés egy korábbi metodikai publikáció alapján történt (Smith és mtsai., 1977), ebben az aktív kezelést adó kapszula koleszterol és ösztadiol 1:1 keverékét tartalmazta. Ezek alapján kontrollként logikus választás a tisztán koleszterolt tartalmazó kapszula alkalmazása. A saját méréseink is megerősítették, hogy az aktív kezelés tartósan megemeli a kísérleti állatok szérum ösztadiol szintjét. Az, hogy miért a koleszterol a vivőanyag, elsősorban gyógyszer technológiai kérdésnek tűnik. Feltételezhető, hogy az aktív hatóanyag fizikokémiai tulajdonságait befolyásolja (kristályos/amorf forma), hasonló struktúrája

miatt oldószerként viselkedik és hatással van a felszívódásra. Farmakokinetikai vizsgálatok alapján az ösztrogén/koleszterol arány korrelál a patkányok steady state ösztrogénszintjével (Mannino és mtsai., 2005).

*19. A 79. oldalon a 2. bekezdésben az áll, hogy „a tartósan magas ösztrogénszint, a többi nemi hormon hatását kiiktatva, pronociceptív az orofaciális formalin modelljében”. Mire alapozza a szerző ezen állítását, mivel más hormonok vizsgálata nem történt? Ugyanezen a helyen említi a szerző az anoctamint, de nem említi mibenlétét.*

A kísérleteket a nőstényeknél ovariectomia után végeztük, így ezek az állatok csupán a mellékvese hormontermelése mellett, alacsony gonadális hormonszintekkel éltek. A vizsgálatban egy paraméter különbözött: a patkányok vagy kaptak ösztrogén kezelést vagy nem. Így az ösztrogén izolált moduláló hatását próbáltuk meghatározni, és több nemi hormon hatása nem vagy alig érvényesült. A második megjegyzést köszönöm: Az anoctamin-1, mely a nocicepcióban is fontos szerepet játszó  $Ca^{2+}$  függő  $Cl^-$  csatorna, ösztrogén hatására emelkedett expressziót mutat (Yamagata és mtsai., 2016).

*20. A szerző több helyen mechanikus hiperalgéziát említi a mechanikai helyett. Hasonlóképpen a termikus hiperalgézia helyett a termális hiperalgézia kifejezés helyesebb lett volna.*

Megköszönöm a bíráló javító szándékú észrevételeit.

*21. A 4.8. pont címében kétszeresen is pontatlan a fogalmazás: egyfelől a „kialakulásában” szó helyett „kialakulására” írandó, másrészt nemi hormonok adása nem történt, csak a nemek összehasonlítása, így csak indirekt módon lehet következtetni a nemi hormonok szerepére.*

Egyetértek a bíráló pontosításával.

*22. A 102. oldalon a szerző a címben említi az anandamidot, de csak jóval lejjebb definiálja ezt az ágenst. Ebben a részben a szerző azt állítja, hogy a kannabinoidreceptorok a központi idegrendszerben találhatóak meg, de pár sorral lejjebb lehetséges lokalizációként említi a ganglion trigeminalet.*

Köszönöm az észrevételeket. A címet követően, rögtön az endokannabinoid rendszerről esik szó és pár sorral később pedig az anandamidról. Bár a rövid köztes szövegrészben a témakör nem változik, lehetséges, hogy elegánsabb lett volna az anandamid korábbi említése. A kannabinoid-1 (CB1) receptorokat elsősorban a központi idegrendszerben írták le, de megtalálhatóak a perifériás idegrendszer területén is (Pertwee 2001), azaz a pontosítás a bíráló részéről teljesen jogos. A kannabinoid-2 receptorok főleg az immunsejteken expresszálódnak, jóval kisebb mértékben jelennek meg az idegrendszer területén (Grabon és mtsai., 2023).

23. *A szerző nem említi, hogy az anandamid a TRPV1-et csak magasabb koncentrációban képes aktiválni. Ennek megfelelően a TRPV1 ionotróp kannabinoidreceptorként való említése nem teljesen elfogadott a szakirodalomban. Továbbá mit jelent az a mondat, hogy „az anandamid gátolja a CGRP és az NO indukált durális vazodilatációt pre- és posztzinaptikus támadásponttal?*

Az anandamid (AEA) mikromoláris koncentrációban képes a TRPV1 receptor aktivációjára (Zygmunt és mtsai., 1999). Számos tanulmány igazolta az AEA hatását a TRPV1 receptoron különböző alkalmazott dózisokban. Intravénásan, bólusban beadott AEA (20 mg/kg) képes volt aktiválni a TRPV1 receptorokat egerekben (Pacher és mtsai., 2004), míg patkányokban a hasonlóan adott 0,75-1 mg/kg dóziséjú AEA szintén képes volt erre (Malinowska és mtsai., 2001). A vizsgálatainkban választott (2x5 mg/kg) dózis alapját az adta, hogy a szakirodalomban alkalmazott intraperitoneális adagot (5-25 mg/kg) (Jaggar és mtsai., 1998) szerettük volna több részletben beadni az állatoknak az AEA gyors felezési ideje miatt (~32 perc) (Snider és mtsai., 2009). Pontos adatunk nincs arra, hogy az általunk alkalmazott AEA mekkora koncentrációt ért el az állatokban, és hogy ez meddig maradt fent, de a fenti kísérletek tükrében ez tartósan elérheti patkányokban a mikromoláris nagyságrendet, mely hat a TRPV1 receptorokra.

A CB1 receptorok megtalálhatóak az elsődleges trigeminális afferenseken és az AEA kezelés képes blokkolni a trigeminális elektromos ingerlés, az NO, valamint a CGRP adását követő durális vazodilatációt, és ezt a hatást a CB1 agonista kezelés felfüggesztette. Mivel az AEA okozta moduláció ebben a kísérletben elektromos ingerlés esetén volt a legkifejezettebb, ezért feltételezhető, hogy hatása nem csak posztzinaptikusan, hanem preszinaptikusan is érvényesül (Akerman és mtsai., 2004).

#### **További kérdések a doktori művel kapcsolatban:**

1. *Az endotélfüggő vazodilatációt közvetítő receptorok általában  $G_q$ -proteinhez kapcsoltak. Pl. az acetilkolin M3 receptora, a bradikinin  $B_1$  és  $B_2$  receptora, a  $H_1$  hisztaminreceptor. Ezeknél az endoteliális  $Ca^{2+}$ -koncentráció növekedése vezet a NOS aktivációjához. Milyen endoteliális jelátviteli út lehet a CGRP  $G_s$ -proteinhez kapcsolt receptora által közvetítette értágulat hátterében?*

A CGRP receptorális kötése a  $G_s$  útvonal aktiválódását eredményezi emelve a cAMP koncentrációt, mely serkenti a protein-kináz A (PKA) aktivitását. Az endoteltől független úton a simaizomsejtben a PKA foszforilálni képes az ATP szenzitív  $K^+$  csatornákat, mely hiperpolarizációt és csökkent  $Ca^{2+}$  beáramlást és ezáltal relaxációt eredményez. Másrészt az endotélsejtekben szintén megemelkedő PKA működés indukálja az eNOS aktivitást, mely fokozott NO képződéshez vezet, és a simaizomhoz diffundálva közvetít értágító hatást (Kumar és mtsai., 2019). A megemelkedett cAMP szint elősegítheti az endoteliális sejtekben a  $Ca^{2+}$  dependens  $K^+$  csatornák megnyitását (Graier és mtsai., 1993), ami szintén szerepet játszhat az értágulat létrejöttében az endotélfüggő hiperpolarizáció révén, mely tovaterjedhet a simaizomsejtekre (Garland és mtsai., 2010). Az endotélsejtek jellemzően nem expresszálnak feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatornákat, így a hiperpolarizáció az egyéb  $Ca^{2+}$  csatornákon keresztül fokozhatja ezen ion intracelluláris beáramlását, és aktiválhatja a vazodilatátor prosztaciklin szintézisét is (Kitazono és mtsai., 1995).

2. *A 7. oldal utolsó bekezdésében a szerző komoly szerepet tulajdonít a szerotoninnak a fájdalom kialakulásában és fenntartásában. Milyen adatok támasztják alá ezt, figyelembe véve, hogy a szerotoninantagonistákat nem használják analgetikumként.*

A szerotonin (5HT) kettős hatással bír a fájdalomérzés folyamatában. Az érző rendszer perifériás részén több szerotoninreceptort azonosítottak: 5HT<sub>1B</sub>, 5HT<sub>1D</sub>, 5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>2B</sub>, 5HT<sub>3</sub>, 5HT<sub>4</sub> és 5HT<sub>7</sub> (Pierce és mtsai., 1997, Wu és mtsai., 2001). 5HT lokális adása hiperalgéziát okoz (Taiwo és mtsai., 1992), melyet az 5HT<sub>1B/D</sub> agonista szumatriptán és az 5HT<sub>2A</sub> és 5HT<sub>3</sub> receptor blokkolása kivéd (Lloyd és mtsai., 2012). Az 5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>4</sub>, 5HT<sub>6</sub> és 5HT<sub>7</sub> antagonisták adása antinociceptív a formalin modellben (Nakajima és mtsai., 2009; Godinez-Chaparro és mtsai., 2011; Rocha-González és mtsai., 2005).

A központi idegrendszerben a raphe magból leszálló szerotoninerg pályák lényegesen befolyásolják a nocicepciót (Fields és mtsai., 1983). A spinális 5HT<sub>2</sub> és 5HT<sub>3</sub> agonizmus a fájdalomérzetet serkenti, míg az 5HT<sub>7</sub> és 5HT<sub>1A</sub> receptorok gátló hatásúak lehetnek (Obata és mtsai., 2001; Bannister és Dickenson 2017; Viguier és mtsai., 2013, Jeong és mtsai., 2012). Migrénben az 5HT<sub>1B/1D</sub> agonista triptánok és a 5HT<sub>1F</sub> agonista ditánok a leghatékonyabb rohamgátló szereknek tarthatók (de Boer és mtsai., 2023), és hatásuk elsősorban a periférián jön létre. A metiszergid a 5HT<sub>2</sub> receptorokat blokkolja, és hatékonyan bizonyult a migrén és a cluster fejfájás megelőzésében, bár potenciálisan súlyos mellékhatásai miatt (pl. retroperitoneális fibrózis) háttérbe szorult (MacGregor és Evers 2017). Az 5HT<sub>3</sub> antagonisták ondanszetrone esetében nincs egyértelmű adat arra, hogy antiemetikus hatása mellett analgetikus potenciállal bírna posztoperatív fájdalomban (Derbent és mtsai., 2005), de neuropátiás fájdalom esetén kis esetszámú vizsgálatban jó hatásúnak tűnik (McCleane és mtsai., 2003). A fentiek alapján azt gondolom, hogy a szerotoninerg rendszer kiemelt résztvevője a fájdalom kialakulásának és fenntartásának, és akár új farmakológiai támadáspontot is adhat a későbbiekben.

3. *Miért nem történt meg a guanilát-cikláz gátlójának vizsgálata a nitroglicerint alkalmazó kísérletekben annak bizonyítására, hogy tényleg az NO felelős a nitroglicerinnel való hatásaiért?*

Részünkről sajnos nem történt meg. Tassorelli és munkacsoportja igazolta a cGMP emelkedését a patkány kaudális trigeminális magjában NTG adása után, hasonló latenciával, mint a mi kísérleteinkben (Tassorelli és mtsai., 2004). Emellett a guanilát-cikláz serkentése fokozza az allodyniát, gátlása mérsékli a hiperalgéziát kísérleti állatokban NTG adását követően (Ben Aissa és mtsai., 2018). Egy másik vizsgálatban a guanilát cikláz gátlása részben kivédi a nitroglicerinnel okozta hiperszenzitivitást egerekben (Ernsten és mtsai., 2024)

4. *A c-fos fehérje, mint neuronális aktivációs marker szerepe jól ismert. Van-e adat a nNOS hasonló funkciójára vonatkozóan a trigeminovaskuláris rendszeren kívül?*

Igen, a nNOS emelkedését írták le a megfelelő gerincvelői hátsó szarvban formalin adását követően (Lam és mtsai., 1996), valamint monoarthritises állatmodellben (Infante et al., 2005) és krónikus neuropátia esetén is (Cizkova és mtsai., 2002)

5. *A CGRP-re vonatkozóan miért nem volt vizsgálat korábbi időpontban a formalin adása után?*

A fenti vizsgálat része volt egy kísérletsorozatnak, ahol nem csupán a CGRP-t mértük, de csak ez a molekula nem változott meg 4 óra látenciával. Akkor csak azért nem szeretnénk volna a felhasznált állatok számát megduplázni, hogy a CGRP viselkedését más időpontban ellenőrizhessük. Természetesen a bírálónak igaza van abban, hogy a kérdéses vizsgálat többlet adatokkal szolgálhatott volna.

6. *A szerző több esetben ANOVA-t használt a statisztikai analízishez. Egyes kísérletsorozatokban valamely post hoc teszttel történt a páronkénti összehasonlítás, máskor t-próbával. Mi indokolja ezt a különbséget?*

Az ANOVA-t követő post hoc tesztek, többféle korrekcióval pontosított t-próbák. A dolgozatban ezeket a korrekciókat nem hangsúlyoztam ki minden egyes esetben, de a kísérletek adatainak elemzése során mindig megtörténtek.

7. *Mi a mechanizmusa a kérgi kúszó depresszióknak (CSD)? Mi magyarázhatja, hogy kiváltásához extrém magas, 1 mólos (!) K-koncentráció szükséges? Hogyan aktiválja a CSD a trigeminális nociceptorokat?*

A tovakúszó kérgi gátlás (cortical spreading depression, CSD) a neuronok és gliasejtek membránjainak rövid ideig tartó (<1 perc) intenzív depolarizációja, amely tovaterjed az agykéreg területén 2-5 mm/perc sebességgel. Ezt az érintett területen masszív  $Ca^{2+}$  és  $Na^{+}$  beáramlás, valamint  $K^{+}$  kiáramlás kíséri, ami erősen emelkedett extracelluláris  $K^{+}$ -szintet eredményez. A depolarizációt a neuronális aktivitás hosszabb ideig tartó gátlása követi. Kiváltó tényezőjeként fontos az iszkémia, trauma és a magas extracelluláris  $K^{+}$  vagy glutamát szint (Somjen 2001). A jelenlegi ismereteink szerint a két utóbbi tényező a legfontosabb a CSD kialakulásában (Vitale és mtsai., 2023). Érdekes módon a  $K^{+}$  adása után létrejött depolarizációt követően viszonylag nagy latenciával (több mp) jelentkezik a kialakuló CSD, mely arra utalhat, hogy közvetlenül nem a kálium okozta depolarizáció felelős a történetekért. A megváltozott ionmilió ronthatja az extracelluláris glutamát eltávolítását, és az ennek következtében kialakuló NMDA receptor aktivitás lehet a fő fenntartója a CSD-nek. Ezzel párhuzamosan a preszinaptikus feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatorna aktivitás is fontos faktora a jelenség kialakulásának, mivel bármelyik blokkolódása esetén a CSD nem alakulhat ki (Vitale és mtsai., 2023). Az 1 M  $K^{+}$  koncentráció valóban extrém magas, de ez egy standard kiváltási mód az állatkísérletek során (Bogdanov és mtsai., 2011). Érdekes, hogy sokkal kisebb  $K^{+}$  koncentráció (15 mM) is képes CSD-t generálni, ha viszonylag nagy kiterjedésű agyi területet ér, azaz fordított korreláció fedezhető fel a két érték ( $K^{+}$  koncentráció és a behatás területe) között. Ráadásul ezek a kísérletek bebizonyították, hogy „élettani” szintű  $K^{+}$  koncentráció változásokkal is el lehet érni a CSD kialakulását (Tang és mtsai., 2014).

A CSD képes a durális vérátáramlást és extravazációt növelni (Bolay és mtsai., 2002), aktiválja a trigeminális fájdalomérző struktúrákat (Zhang és mtsai., 2010) és a durális nociceptorok tartós, mechanikus szenzibilizációját hozza létre (Zhao és Levy 2016), de ennek a folyamatnak minden részlete még nem tisztázott. A kéregben a CSD-t pannexin-1 csatornák kinyílása, megemelkedett neuronális NFkB aktivitás és parenchymalis interleukin-1 $\beta$  expresszió jellemzi, melyet az astrocyták iNOS és COX2 upregulációja kísér (Karatas és mtsai., 2013). Extracellulárisan megemelkedik a  $K^{+}$



(Enger és mtsai., 2015), a glutamát (Zhou és mtsai., 2013), az ATP (Schock és mtsai., 2007) koncentrációja. Ezek a mediátorok diffundálva aktiválják a leptomeningeális afferenseket (Bolat és mtsai 2002, Karatas és mtsai., 2013) és axonreflex révén létrehozzák a neurogén gyulladást a durában. A gliasejtek kiemelt szerepére utal, hogy a CSD során látható vaszkuláris változások a pia mater ereiben kapcsolatban állnak az astrocyták markáns intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint növekedésével (Chuquet és mtsai., 2007). Ennek kapcsán proinflammatoros mediátorok szabadulhatnak fel, mint például az ATP, prosztanoidok és az interleukin- $1\beta$  (Verkhatsky és Nedergaard 2018), melyek a subarachnoideális térbe diffundálva aktiválhatják a leptomeningeális nociceptorokat. Inhibitorokkal végzett vizsgálatok alapján az feltételezhető, hogy a durális nociceptorok aktiválásában a kortikális ATP dependens  $K^+$  csatornáknak, míg a mechanikus szenzibilizációért a folyamat során képződött prosztanoidoknak lehet kiemelt szerepe (Zhao és Levy 2018). Az is nyitott kérdés, hogy a kéregben felszabadult mediátorok hogyan jutnak el az agyhártyákhoz. Jelenleg a legelfogadottabb elmélet, hogy a több barrier ellenére a diffúzió játszhat szerepet a gyorsabb hatásokban (Piertobon és Moskowitz 2013), míg a CSD által átmenetileg gátlódó glimfatikus transzport és a likvor közvetítő szerepe a későbbi, elhúzódó változásokért lehet felelős (Schain és mtsai., 2017).

Az is lehetséges, hogy a CSD aktiváló hatása a másodlagos trigeminális érző neuronokon részben a leszálló pályarendszereken, intrinsic módon is végbe mehet, azaz a jelenségben központi idegrendszeri leszálló folyamatok is részt vehetnek (Lambert és mtsai., 2011).

#### *8. Az open-field teszt tekinthető-e a nocicepció vizsgálati módszerének?*

Az open-field teszt az állatok (általában rágcsálók) mozgási, kutatási aktivitását mérő kísérleti módszer, melyet elsősorban a stressz felmérésére fejlesztettek ki, de már a korai leírásokban szerepel a fájdalomérzet lehetséges vizsgálata is (Denenberg 1969). Önmagában természetesen nem tekinthető a nocicepció vizsgálati módszerének, de kiegészítő lehetőségként alkalmas az állatok fájdalomérzésének felmérésére (Tappe-Theodor és Kuner 2014), és alkalmazhatóak az analgészia vizsgálatára is mind egerekben, mind patkányokban (Cho és mtsai., 2013, Parent és mtsai., 2012).

#### *9. Előfordulnak-e kannabinoidreceptorok a trigeminális neuronok perifériás végződésein? Lehet-e szerepük az anandamid kimutatott hatásaiban?*

A CB1 receptorok többségükben a központi idegrendszerben expresszálódnak, de megtalálhatóak a periférián is, többek között az érző neuronokon és azok végződésein is (Pertwee 2001). Igazolható volt, hogy a CB1 receptorok aktiválása képes a trigeminális A $\delta$  és C rostok tüzelésének csökkentésére (Akerman és mtsai., 2007), valamint a durális vazodilatáció mérséklésére (Akerman és mtsai., 2004), mely arra utal, hogy ezek a receptorok szerepet játszanak az anandamid hatásaiban.

#### *10. A szerző által használt módszerek valamelyikében lehetséges-e a trigeminális aktiváció és szenzibilizáció elkülönítése?*

Véleményem szerint a fájdalomérzésben használt állatkísérletes modellekben igen nehéz teljes mértékben térben elkülöníteni az érző rendszer aktivációját és szenzibilizációját, hisz az utóbbi

kialakulása feltételezi azt, hogy a nociceptív struktúrák aktívak. Ebből kiindulva az elkülönítés kérdése szerintem két irányból közelíthető meg. Egyrészt a szenzibilizáció az aktivációt követően később alakul ki, és így időben behatárolható lehet. Másrészt megjelenhetnek olyan tünetek, melyek elsősorban a szenzibilizációra jellegzetesek, mint pl. perifériás szenzibilizáció esetén a hiperalgéria, míg centrálisnál az allodynia. A NTG modell esetében ez utóbbi jelenléte igazolható (Akermann és mtsai., 2019), de megfigyelhető a formalin modell vagy a durális stimuláció esetén is (Burstein és mtsai., 1998). A perifériáról eredő aktivációt a szenzibilizáció kialakulása után lokális érzéstelenítő (pl. lidokain) kezeléssel esetlegesen ki lehet iktatni.

*11. A 64. oldalon a szerző említi, hogy a szumatriptán hatástalansága (a NTG-modellben a nNOS expresszió tekintetében) annak is lehet a következménye, hogy a szer rosszul penetrál a központi idegrendszerbe. Nem szólnak ezen hipotézis ellen a szerző 66. oldalon bemutatott saját eredményei, miszerint az IS-modellben a szumatriptán-előkezelés gátolta a CGRP, TRPV1 és nNOS expressziót a TNC területén?*

Egyetértek a bírálóval abban, hogy a szumatriptán hatástalansága a NTG modellben a nNOS kapcsán meglepő eredmény, különösen abban a tekintetben, hogy a durális stimuláció hatásait sikeresen kivédte. A szumatriptán a hidrofílebb triptánok közé tartozik, nehezen megy át a vér-agy gáton (Shepherd és mtsai., 1995). Az eltérő kísérletes eredmény oka esetlegesen az lehet, hogy a durális stimulációnál az önerősítő kört dominánsan fenntartó folyamatok a periférián zajlanak (dura), melyet a szumatriptán jól befolyásolhat, míg NTG adása esetében ugyanez a circulus vitiosus a vér agy gáton belül valósul meg (nociceptív afferensek centrális végződése és a TNC másodlagos neuronjai között), ahol a szumatriptán hatása nem érvényesül eléggé.

Végül szeretném még egyszer megköszönni Dr. Pethő Gábor Professzor Úrnak a dolgozatom részletes bírálatát, előremutató kérdéseit, valamint azt, hogy értekezésem nyilvános vitára bocsátását támogatta. Tisztelettel kérem a bírálói kérdésekre adott válaszaim elfogadását.

Szeged, 2024. november 12.



Dr. Párdutz Árpád

### **Irodalomjegyzék:**

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.

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.

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.

Bannister K, Dickenson AH. The plasticity of descending controls in pain: translational probing. *J Physiol*. 2017 Jul 1;595(13):4159-4166. doi: 10.1113/JP274165. Epub 2017 May 26. PMID: 28387936; PMCID: PMC5491855.

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.

Bogdanov VB, Multon S, Chauvel V, Bogdanova OV, Prodanov D, Makarchuk MY, Schoenen J. Migraine preventive drugs differentially affect cortical spreading depression in rat. *Neurobiol Dis*. 2011 Feb;41(2):430-5. doi: 10.1016/j.nbd.2010.10.014. Epub 2010 Oct 23. PMID: 20977938.

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.

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.

Chuquet J, Hollender L, Nimchinsky EA. High-resolution in vivo imaging of the neurovascular unit during spreading depression. *J Neurosci*. 2007 Apr 11;27(15):4036-44. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0721-07.2007. PMID: 17428981; PMCID: PMC6672520.

Cho H, Jang Y, Lee B, Chun H, Jung J, Kim SM, Hwang SW, Oh U. Voluntary movements as a possible non-reflexive pain assay. *Mol Pain*. 2013 May 20;9:25. doi: 10.1186/1744-8069-9-25. PMID: 23688027; PMCID: PMC3716716.

Cízková D, Lukáčová N, Marsala M, Marsala J. Neuropathic pain is associated with alterations of nitric oxide synthase immunoreactivity and catalytic activity in dorsal root ganglia and spinal dorsal horn. *Brain Res Bull*. 2002 Jun;58(2):161-71. doi: 10.1016/s0361-9230(02)00761-x. PMID: 12127013.

de Boer I, Verhagen IE, Souza MNP, Ashina M. Place of next generation acute migraine specific treatments among triptans, non-responders and contraindications to triptans and possible combination therapies. *Cephalalgia*. 2023 Feb;43(2):3331024221143773. doi: 10.1177/03331024221143773. PMID: 36739516.

Denenberg VH. Open-field behavior in the rat: what does it mean?. *Ann N Y Acad Sci*. 1969;159(3):852-859. doi:10.1111/j.1749-6632.1969.tb12983.x

Derbent A, Uyar M, Demirag K, Uyer M, Kurtoglu E, Goktay A. Can antiemetics really relieve pain? *Adv Ther*. 2005 Jul-Aug;22(4):307-12. doi: 10.1007/BF02850080. PMID: 16418140.

Enger R, Tang W, Vindedal GF, Jensen V, Johannes Helm P, Sprengel R, Looger LL, Nagelhus EA. Dynamics of Ionic Shifts in Cortical Spreading Depression. *Cereb Cortex*. 2015 Nov;25(11):4469-76. doi: 10.1093/cercor/bhv054. Epub 2015 Apr 2. PMID: 25840424; PMCID: PMC4816793.

Ernstsen C, Obelitz-Ryom K, Kristensen DMB, Olesen J, Christensen SL, Guo S. Mechanisms of GTN-induced migraine: Role of NOS isoforms, sGC and peroxynitrite in a migraine relevant mouse model. *Cephalalgia*. 2024 Sep;44(9):3331024241277542. doi: 10.1177/03331024241277542. PMID: 39314067.

Fields HL, Vanegas H, Hentall ID, Zorman G. Evidence that disinhibition of brain stem neurones contributes to morphine analgesia. *Nature*. 1983 Dec 15-21;306(5944):684-6. doi: 10.1038/306684a0. PMID: 6656868.

Garland CJ, Hiley CR, Dora KA. EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol*. 2011 Oct;164(3):839-52. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01148.x. PMID: 21133895; PMCID: PMC3195909.

Godínez-Chaparro B, Barragán-Iglesias P, Castañeda-Corral G, Rocha-González HI, Granados-Soto V. Role of peripheral 5-HT(4), 5-HT(6), and 5-HT(7) receptors in development and maintenance of secondary mechanical allodynia and hyperalgesia. *Pain*. 2011 Mar;152(3):687-697. doi: 10.1016/j.pain.2010.12.020. Epub 2011 Jan 15. PMID: 21239110.

Grabon W, Rheims S, Smith J, Bodennec J, Belmeguenai A, Bezin L. CB2 receptor in the CNS: From immune and neuronal modulation to behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 2023 Jul;150:105226. doi: 10.1016/j.neubiorev.2023.105226. Epub 2023 May 8. PMID: 37164044.

Graier WF, Kukovetz WR, Groschner K. Cyclic AMP enhances agonist-induced Ca<sup>2+</sup> entry into endothelial cells by activation of potassium channels and membrane hyperpolarization. *Biochem J*. 1993 Apr 1;291 ( Pt 1)(Pt 1):263-7. doi: 10.1042/bj2910263. PMID: 8385935; PMCID: PMC1132511.

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.

Infante C, Díaz M, Hernández A, Constandil L, Pelissier T. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the dorsal horn of monoarthritic rats: effects of competitive and uncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonists. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(3):R53. doi: 10.1186/ar2208. PMID: 17521446; PMCID: PMC2206346.

Jaggar SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS. The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain*. 1998 May;76(1-2):189-99. doi: 10.1016/s0304-3959(98)00041-4. PMID: 9696473.

Jeong HJ, Mitchell VA, Vaughan CW. Role of 5-HT(1) receptor subtypes in the modulation of pain and synaptic transmission in rat spinal superficial dorsal horn. *Br J Pharmacol*. 2012 Mar;165(6):1956-1965. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01685.x. PMID: 21950560; PMCID: PMC3372843.

Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, Lule S, Eren-Koçak E, Sen ZD, Dalkara T. Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science*. 2013 Mar 1;339(6123):1092-5. doi:

10.1126/science.1231897. Erratum in: Science. 2015 Oct 2;350(6256):aad5166. doi: 10.1126/science.aad5166. Erratum in: Science. 2015 Nov 20;350(6263):921. doi: 10.1126/science.350.6263.921. PMID: 23449592.

Kitazono T, Faraci FM, Taguchi H, Heistad DD. Role of potassium channels in cerebral blood vessels. Stroke. 1995 Sep;26(9):1713-23. doi: 10.1161/01.str.26.9.1713. PMID: 7660420.

Kumar A, Potts JD, DiPette DJ. Protective Role of  $\alpha$ -Calcitonin Gene-Related Peptide in Cardiovascular Diseases. Front Physiol. 2019 Jul 2;10:821. doi: 10.3389/fphys.2019.00821. PMID: 31312143; PMCID: PMC6614340.

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.

Lambert GA, Truong L, Zagami AS. Effect of cortical spreading depression on basal and evoked traffic in the trigeminovascular sensory system. Cephalgia. 2011 Oct;31(14):1439-51. doi: 10.1177/0333102411422383. Epub 2011 Sep 22. PMID: 21940490.

Levy D. Endogenous mechanisms underlying the activation and sensitization of meningeal nociceptors: the role of immuno-vascular interactions and cortical spreading depression. Curr Pain Headache Rep. 2012 Jun;16(3):270-7. doi: 10.1007/s11916-012-0255-1. PMID: 22328144.

Lang PM, Moalem-Taylor G, Tracey DJ, Bostock H, Grafe P. Activity-dependent modulation of axonal excitability in unmyelinated peripheral rat nerve fibers by the 5-HT(3) serotonin receptor. J Neurophysiol. 2006 Dec;96(6):2963-71. doi: 10.1152/jn.00716.2006. Epub 2006 Sep 6. PMID: 16956988.

Loyd DR, Chen PB, Hargreaves KM. Anti-hyperalgesic effects of anti-serotonergic compounds on serotonin- and capsaicin-evoked thermal hyperalgesia in the rat. Neuroscience. 2012 Feb 17;203:207-15. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.019. Epub 2011 Dec 20. PMID: 22209919; PMCID: PMC3461950.

MacGregor EA, Evers S; International Headache Society. The role of methysergide in migraine and cluster headache treatment worldwide - A survey in members of the International Headache Society. Cephalgia. 2017 Oct;37(11):1106-1108. doi: 10.1177/0333102416660551. Epub 2016 Jul 21. PMID: 27449673.

Malinowska B, Kwolek G, Göthert M. Anandamide and methanandamide induce both vanilloid VR1- and cannabinoid CB1 receptor-mediated changes in heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2001 Dec;364(6):562-9. doi: 10.1007/s00210-001-0498-6. PMID: 11770012.

Mannino CA, South SM, Inturrisi CE, Quinones-Jenab V. Pharmacokinetics and effects of 17beta-estradiol and progesterone implants in ovariectomized rats. J Pain. 2005 Dec;6(12):809-16. doi: 10.1016/j.jpain.2005.07.007. PMID: 16326369.

McCleane GJ, Suzuki R, Dickenson AH. Does a single intravenous injection of the 5HT3 receptor antagonist ondansetron have an analgesic effect in neuropathic pain? A double-blinded, placebo-controlled cross-over study. Anesth Analg. 2003 Nov;97(5):1474-1478. doi: 10.1213/01.ANE.0000085640.69855.51. PMID: 14570668.

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.

Obata H, Saito S, Sasaki M, Ishizaki K, Goto F. Antiallodynic effect of intrathecally administered 5-HT(2) agonists in rats with nerve ligation. *Pain*. 2001 Feb 1;90(1-2):173-9. doi: 10.1016/s0304-3959(00)00401-2. PMID: 11166984.

Pacher P, Bátkai S, Kunos G. Haemodynamic profile and responsiveness to anandamide of TRPV1 receptor knock-out mice. *J Physiol*. 2004 Jul 15;558(Pt 2):647-57. doi: 10.1113/jphysiol.2004.064824. Epub 2004 Apr 30. PMID: 15121805; PMCID: PMC1664980.

Parent AJ, Beaudet N, Beaudry H, Bergeron J, Bérubé P, Drolet G, Sarret P, Gendron L. Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain. *Behav Brain Res*. 2012 Apr 1;229(1):160-7. doi: 10.1016/j.bbr.2012.01.001. Epub 2012 Jan 8. PMID: 22245257; PMCID: PMC3848972.

Pertwee RG. Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol*. 2001 Apr;63(5):569-611. doi: 10.1016/s0301-0082(00)00031-9. PMID: 11164622.

Pierce PA, Xie GX, Meuser T, Peroutka SJ. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in human dorsal root ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience*. 1997 Dec;81(3):813-9. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00235-2. PMID: 9316030.

Pietrobon D, Moskowitz MA. Pathophysiology of migraine. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:365-91. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183717. Epub 2012 Nov 26. PMID: 23190076.

Randall DJ, Burggren, WW, French K. Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations. UK: W.H. Freeman and Company, 1997, 6.163-216

Rocha-González HI, Meneses A, Carlton SM, Granados-Soto V. Pronociceptive role of peripheral and spinal 5-HT7 receptors in the formalin test. *Pain*. 2005 Sep;117(1-2):182-92. doi: 10.1016/j.pain.2005.06.011. PMID: 16098671.

Schain AJ, Melo-Carrillo A, Strassman AM, Burstein R. Cortical Spreading Depression Closes Paravascular Space and Impairs Glymphatic Flow: Implications for Migraine Headache. *J Neurosci*. 2017 Mar 15;37(11):2904-2915. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3390-16.2017. Epub 2017 Feb 13. PMID: 28193695; PMCID: PMC5354333.

Schock SC, Munyao N, Yakubchik Y, Sabourin LA, Hakim AM, Ventureyra EC, Thompson CS. Cortical spreading depression releases ATP into the extracellular space and purinergic receptor activation contributes to the induction of ischemic tolerance. *Brain Res*. 2007 Sep 7;1168:129-38. doi: 10.1016/j.brainres.2007.06.070. Epub 2007 Jul 17. PMID: 17706620.

Shepherd SL, Williamson DJ, Williams J, Hill RG, Hargreaves RJ. Comparison of the effects of sumatriptan and the NK1 antagonist CP-99,994 on plasma extravasation in Dura mater and c-fos mRNA expression in trigeminal nucleus caudalis of rats. *Neuropharmacology*. 1995 Mar;34(3):255-61. doi: 10.1016/0028-3908(94)00153-j. PMID: 7630480.

Smith ER, Damassa DA, Davidson JM. Hormone administration; peripheral and intracranial implants. In Myers RE (ed.), *Methods in Psychobiology*, Volume 3. Academic Press, London, UK, 1977, 259-279.

Snider NT, Nast JA, Tesmer LA, Hollenberg PF. A cytochrome P450-derived epoxygenated metabolite of anandamide is a potent cannabinoid receptor 2-selective agonist. *Mol Pharmacol*. 2009

Apr;75(4):965-72. doi: 10.1124/mol.108.053439. Epub 2009 Jan 26. PMID: 19171674; PMCID: PMC2684935.

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.

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.

Tang YT, Mendez JM, Theriot JJ, Sawant PM, López-Valdés HE, Ju YS, Brennan KC. Minimum conditions for the induction of cortical spreading depression in brain slices. *J Neurophysiol.* 2014 Nov 15;112(10):2572-9. doi: 10.1152/jn.00205.2014. Epub 2014 Aug 13. PMID: 25122714; PMCID: PMC4233272.

Tappe-Theodor A, Kuner R. Studying ongoing and spontaneous pain in rodents--challenges and opportunities. *Eur J Neurosci.* 2014 Jun;39(11):1881-90. doi: 10.1111/ejn.12643. Epub 2014 May 29. PMID: 24888508.

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.

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

Verkhatsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev.* 2018 Jan 1;98(1):239-389. doi: 10.1152/physrev.00042.2016. PMID: 29351512; PMCID: PMC6050349.

Viguier F, Michot B, Hamon M, Bourgoin S. Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms--implications of 5-HT<sub>7</sub> and other 5-HT receptor types. *Eur J Pharmacol.* 2013 Sep 15;716(1-3):8-16. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.074. Epub 2013 Mar 13. PMID: 23500207.

Vitale M, Tottene A, Zarin Zadeh M, Brennan KC, Pietrobon D. Mechanisms of initiation of cortical spreading depression. *J Headache Pain.* 2023 Aug 8;24(1):105. doi: 10.1186/s10194-023-01643-9. Erratum in: *J Headache Pain.* 2023 Dec 20;24(1):171. doi: 10.1186/s10194-023-01702-1. PMID: 37553625; PMCID: PMC10408042.

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.

Wu S, Zhu M, Wang W, Wang Y, Li Y, Yew DT. Changes of the expression of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by complete Freund's adjuvant-induced inflammation. *Neurosci Lett.* 2001 Jul 20;307(3):183-6. doi: 10.1016/s0304-3940(01)01946-2. PMID: 11438394.

Zhang X, Levy D, Nosedá R, Kainz V, Jakubowski M, Burstein R. Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura. *J Neurosci.* 2010 Jun 30;30(26):8807-14. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0511-10.2010. Erratum in: *J Neurosci.* 2010 Jul 28;30(30):10259. PMID: 20592202; PMCID: PMC2907647.

Zhao J, Levy D. Cortical Spreading Depression Promotes Persistent Mechanical Sensitization of Intracranial Meningeal Afferents: Implications for the Intracranial Mechanosensitivity of Migraine. *eNeuro*. 2016 Dec 22;3(6):ENEURO.0287-16.2016. doi: 10.1523/ENEURO.0287-16.2016. PMID: 28127585; PMCID: PMC5242377.

Zhao J, Levy D. Dissociation between CSD-Evoked Metabolic Perturbations and Meningeal Afferent Activation and Sensitization: Implications for Mechanisms of Migraine Headache Onset. *J Neurosci*. 2018 May 30;38(22):5053-5066. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0115-18.2018. Epub 2018 Apr 27. PMID: 29703787; PMCID: PMC6705945.

Zhou N, Rungta RL, Malik A, Han H, Wu DC, MacVicar BA. Regenerative glutamate release by presynaptic NMDA receptors contributes to spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013 Oct;33(10):1582-94. doi: 10.1038/jcbfm.2013.113. Epub 2013 Jul 3. PMID: 23820646; PMCID: PMC3790928.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sjørgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 1999 Jul 29;400(6743):452-7. doi: 10.1038/22761. PMID: 10440374.