

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Az elhízás és a migrén kapcsolatának háttérében álló trigeminovaskuláris
diszfunkciók, különös tekintettel a meningeális kemoszenzitív
nociceptorok szerepére**

Marics Balázs

Témavezetők: Dr. Dux Mária, Dr. Peitl Barna



DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2017

*„S e sok próbára mégis azt hiszed,
Hogy új küzdésed nem lesz hasztalan?
S célt érsz? Valóban e megtörhetetlen
Gyermekkedély csak emberé lehet.”*

Madách Imre

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK.....	1
2. BEVEZETÉS.....	3
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
3.1. Az elhízás és a migrén népegészségügyi jelentősége.....	5
3.2. Az elhízás és a migrén lehetséges kapcsolata.....	8
3.3. A trigeminovaskuláris rendszer jelentősége a migrén patogenezisében.....	10
3.3.1. A trigeminovaskuláris rendszer funkcionális anatómiája.....	11
3.3.2. A meningeális nociceptorok efferens funkciója és a neurogén gyulladás.....	13
3.4. A CGRP szerepe a migrén patogenezisében	13
3.4.1. Klinikai megfigyelések.....	14
3.4.2. CGRP-t expresszáló trigeminális afferensek és a CGRP felszabadulás következményei.....	14
3.5. A TRPV1 és a TRPA1 receptorok szerepe a meningeális nocicepcióban	17
3.5.1. TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák.....	17
3.5.2. TRPV1 és TRPA1 receptorok által közvetített neurogén érreakciók és a trigeminális aktiváció	19
3.5.3. A TRPV1 és a TRPA1 receptorok aktivációjának lehetséges kapcsolata a fejfájást provokáló tényezőkkel	20
3.6. Trigemino-vaskuláris nociszenzor komplex	21
3.7. Az elhízás és a migrén közötti kapcsolat háttérben álló lehetséges mechanizmusok.	23
3.8. Az elhízással összefüggő patofiziológiai elváltozások modellezése.....	29
4. CÉLKITŰZÉSEK.....	30
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	32
5.1. Etikai engedélyek	32
5.2. Étrend-indukált elhízás állatmodellje.....	32
5.2.1. Kísérleti állatok és étrendi kezelés	32
5.2.2. Inzulínérzékenység vizsgálata.....	32
5.2.2.1. Hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp	32
5.2.2.2. HOMA-IR és QUICKI index	33
5.2.3. Gyulladásos citokinek plazmakoncentrációjának meghatározása.....	34
5.2.4. Zsír szövet mennyiségének és a máj tömegének mérése	34
5.3. Trigeminális nociceptorok funkcionális állapotának jellemzése.....	34
5.3.1. Meningeális érreakciók vizsgálata <i>in vivo</i>	34
5.3.2. CGRP felszabadulás mérése <i>ex vivo</i>	36
5.3.3. CGRP és TRPV1 kettős immunhisztokémiai festés dura mater totálpreparátumon.....	36

5.3.4. TRPA1 fehérje expressziója a trigeminális ganglionban	37
5.4. Statisztikai kiértékelés	37
6. EREDMÉNYEK.....	39
6.1. Étrend-indukált elhízás állatmodell jellemzése	39
6.1.1. Étrendi kezelés hatása a táp- és folyadékfogyasztásra, valamint az energiabevitelre	39
6.1.2. A testsúly, a zsírszövet mennyiségének és a máj tömegének változása.....	39
6.1.3. A glükóz és az inzulin homeosztázis károsodása	41
6.1.4. A gyulladásos citokinek plazmakoncentrációjának változása.....	42
6.2. Étrend-indukált elhízás hatása a trigeminovaszkuláris rendszer működésére.....	43
6.2.1. A meningeális vazoreaktivitásban és a szenzoros neurogén érreakciókban bekövetkező változások.....	43
6.2.1.1. Kapszaicin-szenzitív neurogén vazodilatáció	43
6.2.1.2. A kapszaicin vazokonstriktor hatása	44
6.2.1.3. Akrolein által kiváltott véráramlás fokozódás	45
6.2.1.4. Endothel- és simaizom függő relaxáció	46
6.2.2. A dura mater afferens idegrostjaiból történő nyugalmi- és kémiai stimulációt követő CGRP felszabadulás elhízással összefüggő változásai	47
6.2.2.1. Bazális CGRP felszabadulás	47
6.2.2.2. TRPV1 receptor aktivációját követő CGRP felszabadulás	47
6.2.2.3. TRPA1 receptor-mediált CGRP felszabadulás	48
6.2.2.4. KCl által kiváltott CGRP felszabadulás	49
6.2.3. TRPV1- és CGRP-immunreaktivitás patkány kemény agyhártyájában.....	50
6.2.4. TRPA1 fehérje expressziója a trigeminális ganglionban	51
7. MEGBESZÉLÉS.....	52
7.1. Magas zsír és magas szacharóz tartalmú étrend által kiváltott elhízás.....	52
7.2. Étrend-indukált elhízás hatása a meningeális érreakciókra.....	54
7.3. Elhízás hatása a trigeminális afferensekből történő CGRP felszabadulásra	56
7.4. A fokozott CGRP felszabadulás hátterében álló lehetséges mechanizmusok.....	59
8. ÖSSZEFOGLALÁS	62
9. SUMMARY	63
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	64
10.1. Hivatkozott közlemények	64
10.2. Saját közlemények	83
11. TÁRGYSZAVAK.....	85
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	86
13. FÜGGELÉK	88

1. RÖVIDÍTÉSEK

AMM	arteria meningeae media
AC	adenilát-cikláz
ANKTM1	ankyrin-like with transmembrane domains protein 1 (ankyrin transzmembrán protein 1 receptor)
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BK	bradykinin
CAM	Ca ²⁺ -calmodulin
COX-2	ciklooxygenáz-2
CRLP	calcitonin receptor-like protein (calcitonin receptor-szerű fehérje)
DALY	disability-adjusted life year (egészségkárosodással korrigált életevek)
BMI	body mass index (testtömeg index)
CGRP	calcitonin gén-rokon peptid
EIA	enzyme-linked immunoassay
ERK	extracellular signal-regulated kinase (extracellulárisan szabályozott kináz)
GC	guanilát-cikláz
GIR	glükóz infúziós ráta
H ₁ -receptor	hisztamin ₁ receptor
H ₂ -receptor	hisztamin ₂ receptor
HEGC	hiperinulinémiás euglikémiás glükóz clamp
4-HNE	4-hydroxynonenal
HFHS	high-fat, high-sucrose (magas zsír, magas szacharóz)
HOMA-IR	homeostasis model assessment of insulin resistance (inzulinrezisztencia index)
HRP	horseradish peroxidase (torma peroxidáz)
IGF-1	insulin-like growth factor (inzulinszerű növekedési faktor)
IHS	International Headache Society (Nemzetközi Fejfájás Társaság)
IL-1 β	interleukin-1 β
IL-6	interleukin-6
ip.	intraperitoneális
IRMA	immunoradiometric assay
KCl	kálium-klorid

NGF	nerve growth factor (ideg növekedési faktor)
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey (Nemzeti Egészségügyi- és Táplálkozási Felmérés)
NKA	neurokinin A
NO	nitrogén-monoxid
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
PAR-2	proteáz-aktivált receptor 2
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PGI ₂	prostaglandin I ₂
PIP ₂	foszfatidil inozitol-bisz-foszfát
PI3K	foszfatidil-inozitol-3 kináz
PKA	protein kináz A
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
PU	perfusion unit (perfúziós egység)
QUICKI	quantitative insulin sensitivity check index (kvantitatív inzulinérzékenységi index)
RCP	receptor component protein (receptor komponens fehérje)
RTK	receptor tirozin kináz
SIF	szintetikus intersticiális folyadék
sIL-6R	szolubilis IL-6 receptor
SP	substance P (P-anyag)
TNF α	tumor nekrosis faktor α
TrkA	tropomiozin receptor kináz A
TRPA1	transzens receptor potenciál ankyrin 1
TRPV1	transzens receptor potenciál vanilloid 1
WHO	World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)
YLD	years lived by disability (egészségkárosodásban leélt életevek)

2. BEVEZETÉS

Az elhízás napjaink és a közeljövő egyik legsúlyosabb egészségügyi-, társadalmi- és gazdasági problémája, mely összefüggésbe hozható számos krónikus betegség kialakulásával (Malik, Willett, Hu 2013). Az utóbbi évek epidemiológiai és klinikai megfigyelései alátámasztani látszanak az elhízás és a primer fejfájások, elsősorban a migrén progressziója közötti kapcsolatot (Chai et al. 2014). A migrén az életminőség és munkaképesség jelentős mértékű csökkenésével jár (Salomon et al. 2012), mely nem csak az egyénre, de a társadalomra is komoly terhet ró (Linde et al. 2012). Az elhízás elősegítheti a migrén kialakulását, már meglévő betegség esetén pedig növelheti a fejfájásos rohamok gyakoriságát és súlyosságát (pl. intenzitás és időtartam) (Chai et al. 2014; Verrotti et al. 2014). Az elhízás és a migrén közötti kapcsolat hátterében álló mechanizmusok azonban mind a mai napig nem ismertek, melyhez nagymértékben hozzájárul a kérdés tisztázására irányuló kísérletes vizsgálatok hiánya (Cindy Chai et al. 2014).

A migrén patogenezisében meghatározó szerepet tulajdonítanak a trigeminovaskuláris rendszer aktivációjával összefüggő eseményeknek, melyek a dura matert beidegző primer szenzoros afferensek, illetve a teljes trigeminális fájdalomérző pálya aktiválódásához és/vagy szenzitizációjához vezethetnek (Pietrobon and Moskowitz 2013). Korábbi kutatások egyértelműen igazolták a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) és a tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatornák szerepét a meningeális nocicepció folyamatában (Dussor et al. 2014; Dux, Sántha, Jancsó 2012). A TRPV1 és TRPA1 receptorokat expresszáló ún. kemoszenzitív idegrostok peptiderg neuron-populációjának aktiválódása a nociceptív szignálok centrális irányú továbbítása mellett olyan vazoaktív neuropeptidek felszabadulásával is együtt jár (efferens funkció), melyek pozitív visszacsatolós reakciók beindítása révén a fejfájásos fájdalom kialakulásához és súlyosbodásához vezethetnek (Dux, Sántha, Jancsó 2012). A trigeminális primer afferensekből felszabaduló szenzoros neuropeptidek közül jelenleg a calcitonin gén-rokon peptid (CGRP) kórélettani szerepe tűnik a legjelentősebbnek. A CGRP-t a migrénes fejfájás egyik kulcsfontosságú mediátoraként tartják számon (Karsan and Goadsby 2015a), de az elhízás és a migrén közötti kapcsolat szempontjából is felvetődött a szerepe (Recober and Goadsby 2010). A dura mater kemoszenzitív idegrostjai szelektíven stimulálhatók a paprika csípősségét adó alkaloid, a kapszaicin segítségével, CGRP-mediált meningeális véráramlás fokozódást eredményezve (Dux, Sántha, Jancsó 2003). E neurovaszkuláris történések tanulmányozásából következtetni lehet a trigeminális nociceptorok funkcionális állapotára.

A jelenlegi elképzelések szerint az elhízás, elsősorban a gyulladásos folyamatok felerősödésén keresztül, a trigeminális fájdalomérző pálya aktivációs küszöbének csökkenéséhez és a fejfájásos rohamok kiváltásában szerepet játszó tényezők iránti érzékenység növekedéséhez vezethet (Bigal et al. 2007a; Cindy Chai et al. 2014; Recober and Goadsby 2010). Ezen feltételezések, valamint a lehetséges patomechanizmusok direkt kísérletes eredmények által történő bizonyítása azonban még várat magára.

Újabb vizsgálatok rávilágítottak, hogy a szenzoros neuronok TRPV1 és TRPA1 receptorait számos olyan tényező aktiválhatja (Benemei et al. 2014; Dussor et al. 2014), melyeket a migrénes rohamok rizikófaktorai között is számon tartanak (Silva-Néto, Peres, Valença 2014). Az orrnyálkahártyát innerváló kemoszenzitív trigeminális afferensek által közvetített nazo-meningeális útvonal aktiválódásának például meghatározó szerepe lehet a belégzés útján fejfájásos rohamokat provokálni képes irritáns vegyületek (pl. akrolein) hatásmechanizmusában (Kunkler et al. 2014). Klinikai és kísérletes vizsgálatok eredményei alapján feltételezhető, hogy az elhízás számos olyan komplex patofiziológiai változás kialakulásával járhat együtt, melyek a TRPV1 és a TRPA1 receptorok működését is befolyásolhatják. A meningeális nociceptorok funkciójában, valamint azok kemoszenzitív neuronpopulációjának aktivációját követő trigeminovaskuláris eseményekben bekövetkező változások hozzájárulhatnak a migrénes fejfájás elhízással összefüggő progressziójához és az ehhez kapcsolódó betegségteher növekedéséhez.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Az elhízás és a migrén népegészségügyi jelentősége

Az 1980 és 2013 között eltelt időszakban mind a fejlett, mind pedig a fejlődő országok esetében jelentős mértékben emelkedett a gyermek- és a felnőttkori túlsúly, valamint az elhízás prevalenciája (Ng et al. 2014). Világviszonylatban a felnőtt férfiak 36,9%-a, míg a felnőtt nők 38%-a rendelkezik ideálisnál magasabb testtömeg indexszel (body mass index, BMI). Ez az arány a fejlett országokban élő fiatal fiúk és lányok esetében 23,8 és 22,6%. Becslések szerint a túlsúlyos ($BMI \geq 25$) és az elhízott ($BMI \geq 30$) egyének száma 2013-ban elérte a 2,1 milliárd főt, mely a Föld népességének körülbelül 30%-a (Ng et al. 2014). Amennyiben a megfigyelt trendek tovább folytatódnak, 2030-ra ez az arány elérheti az 50%-ot is (Finkelstein et al. 2012).

Klinikai és kísérletes vizsgálatok egyértelműen igazolják, hogy az elhízás patofiziológiai (pl. metabolikus, morfológiai és funkcionális) elváltozások sokaságához vezethet, melyek nem csak számos egészségügyi probléma kialakulásához és progressziójához járulhatnak hozzá, de az életminőség romlását és a várható élettartam csökkenését is elősegíthetik (Peeters et al. 2003). Az elhízás például az inzulinrezisztencia, a 2-es típusú cukorbetegség és a kardiovaszkuláris betegségek egyik legfontosabb rizikótényezője (Kahn, Hull, Utzschneider 2006; Lavie, Milani, Ventura 2009), jelentős mértékben növelheti egyes daganatos betegségek, valamint a májat, epehólyagot, légzőrendszert és ízületeket érintő betegségek kockázatát (Kopelman 2007), de összefüggésbe hozható bizonyos neurodegeneratív kórképek és krónikus fájdalom szindrómák manifesztációjával is (Ashrafian et al. 2013; Wright L.J. et al. 2010).

Az elhízás ugyanakkor nem csak az egyénre, de a társadalomra is jelentős terhet ró. A McKinsey Global Institute 2014 novemberében kiadott tanulmánya szerint az elhízás által okozott gazdasági terhek világszinten elérhetik a globális GDP 2,8%-át, melynek mértéke közel azonos a dohányzás következtében felmerülő költségekkel (2,9%). Az elhízás a fejlett országok egészségügyi kiadásainak kb. 2-7%-áért lehet felelős, ami azonban az elhízással összefüggő betegségek kezelési költségeinek számba vétele után akár a 20%-ot is elérheti (WHO 2013). Összefüggés mutatható ki továbbá a súlyfelesleg mértéke és a hozzá társuló direkt- és indirekt kiadások nagysága között (Dee et al. 2014). Az elhízás globális népegészségügyi jelentőségére való tekintettel az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) a nem-fertőző betegségek (noncommunicable diseases) megelőzésére és

kontrolljára irányuló, 2013 és 2020 közötti időszakra vonatkozó akciótervnek prioritásai között szerepel az elhízáshoz kapcsolódó terhek csökkentése (WHO 2013).

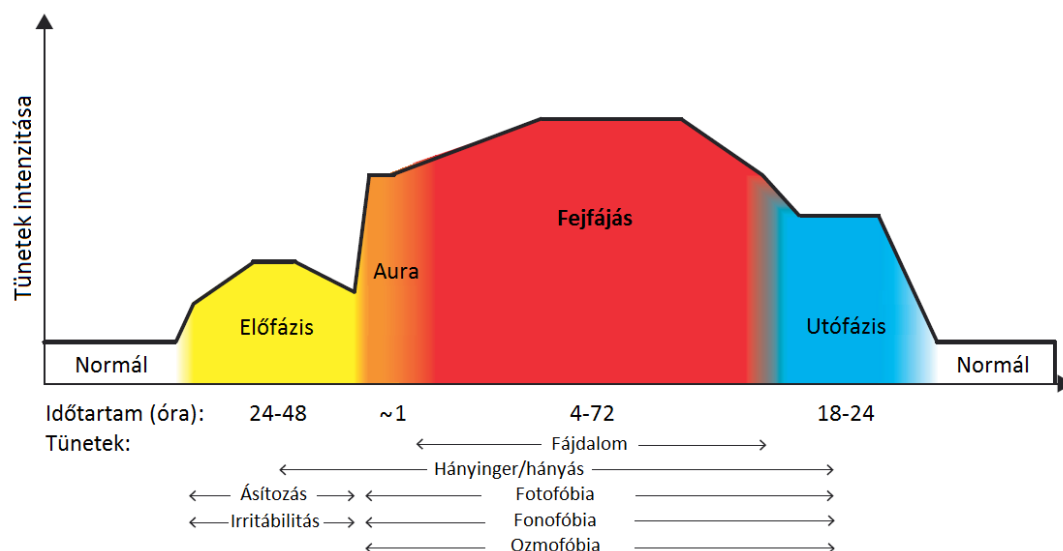
A fejfájásokkal kapcsolatos kérdések szintén kitüntetett figyelmet érdemelnek. A fejfájás az egyik leggyakoribb panasz, mellyel orvoshoz fordulnak az emberek, továbbá a csökkent munkaképesség vezető okai között szerepel. A fejfájás élettartam prevalenciáját világszinten 66%-ra becsülik (Stovner et al. 2007), de egyes populációkban elérheti a 96%-ot is (Rasmussen et al. 1991). Habár 300-nál is több tényező vezethet fejfájáshoz (Evans 1996), a Nemzetközi Fejfájás Társaság (International Headache Society, IHS) a fejfájások három nagy csoportját különbözteti meg. Az első csoportot, a fejfájások közel 90 százalékáért felelős primer fejfájások alkotják, melyek pontos patomechanizmusa mind a mai napig nem ismert. Ide tartozik a migrén, a tenziós típusú fejfájás, a cluster fejfájás és más trigemino-autonom fejfájások, továbbá az egyéb ritka elsődleges fejfájások. A második csoportot alkotó szekunder fejfájásokhoz (~10%) azok a fejfájások sorolhatók, melyek kísérő tünetként jelentkeznek egyéb betegségek, fertőzések, traumák, homeosztázis zavarok, bizonyos kémiai anyagok hatására, vagy azok megvonása következtében. A fejfájások maradék néhány százalékáért pedig a cranialis neuralgiák, a centrális és primer arcfájdalmak, valamint a ritka fejfájástípusok felelősek a harmadik csoportot alkotva (Headache Classification Committee of the International Headache Society 2013).

Kutatásainkat elsősorban a migrénnel kapcsolatos kérdések vezérelték, mely a 14-16% körüli élettartam prevalenciájával a második leggyakoribb primer fejfájásnak tekinthető a tenziós típusú fejfájás mögött (Stovner et al. 2007; Stovner and Andree 2010), világszerte több mint 800 millió embert érintve (Vos et al. 2015). Az elsődleges fejfájástípusok közül azonban magasan a migrén jár az egyén életminőségének és munkaképességének legnagyobb mértékű csökkenésével (Salomon et al. 2012). A migrén népegészségügyi jelentőségét a Globális Betegségteher Vizsgálat (Global Burden of Disease Study) 2013-as adatai is jól szemléltetik. A különböző betegségek egyénre, családra és társadalomra rótt terheit összesítő „egészségkárosodással korrigált életévek” mutató (disability-adjusted life year, DALY) által képezett rangsorban, a migrén világszinten a 13. helyet foglalja el a nem fertőző betegségek között (Murray 2015). Az „egészségkárosodásban leélt életévek” (years lived by disability, YLD) tekintetében azonban már a 6. legjelentősebb okként szerepel a cukorbetegséget megelőzve, míg a neurológiai betegségek között az 1. helyet foglalja el a betegségcsoport által okozott YLD közel 50%-át alkotva (Vos et al. 2015). A migrén által a társadalomra rótt gazdasági teher legnagyobb része ugyanakkor a munkából való kiesésből és a csökkent hatékonysággal ledolgozott munkanapok következtében felmerülő indirekt költségekből

származik (Linde et al. 2012; Stovner and Andréa 2008), melyek az életminőség és a teljesítőképesség migrénes rohamok alatti drasztikus csökkenésére vezethetők vissza. A migrénes rohamok gyakoriságával és súlyosságával kapcsolatos kérdéseknek a jelen értekezésben összefoglalt kísérletes munkánk szempontjából is kiemelt jelentősége van.

A migrén primer fejfájás betegség, melynek két fő típusa az aura nélküli és az aurával járó forma. A fájdalom jellemzően féloldali lokalizációjú, lüktető jellegű, intenzitása a mérsékelttől az erős fájdalomig terjedhet, fizikai aktivitás általában súlyosbítja a tüneteket. A betegség komplexitásából adódóan nem beszélhetünk klasszikus értelemben vett, egységes definícióról. A jelenlegi klinikai gyakorlat a migrén diagnózisa tekintetében elsősorban az IHS által javasolt kritériumrendszerre támaszkodik (Headache Classification Committee of the International Headache Society 2013). A klinikum oldaláról megfogalmazódó kritikai észrevételek azonban jól jelzik, hogy még ezen irányelvek sem mentesek az ellentmondásoktól és folyamatos felülvizsgálatra szorulnak (Francis 2016).

A migrénes rohamokon belül négy fázist lehet megkülönböztetni, melyek együttesen akár 3 és 5 nap közötti időtartamot is felölelhetnek (**1. ábra**). A migrénes roham a betegek körülbelül 37-80%-ában egy néhány órától akár napokig is tartó előfázissal veszi kezdetét, melyet olyan általános tünetek jellemezhetnek, mint például az ingerlékenység, fáradékonyság, gyakori ásítózás, megnövekedett étvágy, hangulatváltozások vagy nyaki fájdalmak. A betegek körülbelül egyharmadában egy aura fázis is kialakulhat, melyet általában 5-20 perc alatt kifejlődő és kevesebb, mint egy órán át tartó vizuális, szomatoszenzoros és/vagy motoros tünetek alkotnak. A következő és egyben legmegterhelőbb fázis a fejfájásos fájdalom időszaka, melyet kezeletlen vagy sikertelenül kezelt esetben legalább 4, de akár 72 órán keresztül tartó, többségében féloldali (kisebb részben kétoldali), közepes vagy súlyos erősségű, általában lüktető jellegű vagy görcsös fejfájás jellemez. A fájdalmat gyakran hányinger, hányás, a szagok-, a fény és a hangok iránti túlérzékenység (ozmo-, foto- és fonofóbia), valamint allodynia (az egyébként fájdalommentes ingerek fájdalmassá válása) kíséri. A migrénes roham egy jellemzően 18-24 órán át tartó utófázissal zárul, mely során a betegek életminőségét továbbra is olyan panaszok csökkenthetik, mint a fáradtság, dekoncentráltóság és irritábilis, míg mások eufórikus állapotról számolnak be (Burgos-Vega, Moy, Dussor 2015; Diener et al. 2012).



1. ábra. A migrén fázisainak időbeli lefolyása és jellemző tünetei (Burgos-Vega et al. 2015).

A migrénes rohamok során kialakuló fizikai- és szellemi teljesítőképesség csökkenés mértékét jól szemlélteti az egészségi problémák által okozott korlátozottság becslésére szolgáló skálán elért 0,433-as érték. A skála 0 (teljesen egészséges) és 1 (klinikai halál) között mutatja a korlátozottság súlyosságát, mely alapján a migrénes rohamok által eredményezett 43,3%-os funkciócsökkenés összevethető a közepsúlyos sclerosis multiplex 44,5 (0,445) vagy éppen az akut szívinfarktust követő első két nap 42,2%-os (0,422) értékeivel (Salomon et al. 2012). A migrénes betegek általános életminőségének romlásához ezért jelentősen hozzájárul a fejfájásos rohamoktól való félelem következtében kialakuló szorongás is (Wacogne et al. 2003). Az eddigiek alapján látható, hogy kitüntetett figyelmet érdemel minden olyan tényező, mely a migrén prevalenciájának és/vagy a fejfájásos rohamok gyakoriságának, súlyosságának (pl. intenzitás és időtartam) növekedéséhez vezethet.

3.2. Az elhízás és a migrén lehetséges kapcsolata

Az utóbbi évek epidemiológiai kutatásai alapján egyre biztosabbnak tűnik, hogy az elhízás növelheti a primer fejfájások, elsősorban a migrén kialakulásának kockázatát, már meglévő betegség esetén pedig elősegítheti annak progresszióját. Az irodalmi áttekintés e szakaszának elsődleges célja, hogy betekintést nyújtson azon folyamat főbb lépéseibe, mely egyrészt rávilágított az elhízás és a migrén közötti kapcsolat létezésére, másrészt viszont a megfigyelt összefüggések hátterében álló patofiziológiai folyamatok feltárása iránti igényt is megfogalmazta.

2000-ben Brown és munkatársai publikálták az első olyan vizsgálatot, melynek eredményeiből már következtetni lehetett az elhízás és a fejfájásos állapot közötti kapcsolat létezésére. Munkájuk során 18 és 23 év közötti ausztrál nők ($n = 14779$) esetében vizsgálták a BMI és az életminőség különböző indikátorai közötti összefüggéseket. Eredményeik alapján a túlsúllyal (BMI 25-29,9) rendelkezők 12%-kal, míg az elhízottak (BMI ≥ 30) 47%-kal gyakrabban számoltak be fejfájásos, vagy migrénszerű panaszokról a normál testsúlyú egyénekhez képest (Brown et al. 2000).

Ezt követően 2003-ban jelentek meg Scher és munkatársai által végzett, már lényegesen specifikusabb elemzés eredményei, melyben a krónikus fejfájás (≥ 180 fejfájásos nap/év) etiológiai hátterét és prognózisát befolyásoló tényezőket vizsgálták longitudinális mintán ($n = 1932$, életkor: 18-65 év). A krónikus fejfájásos betegek esetében 34%-kal gyakoribb volt az elhízás az évi 2-104 fejfájásos nappal rendelkező csoporthoz képest. Az elhízás továbbá több mint ötszörösére növelte az epizódikus fejfájás krónikussá válásának kockázatát (Scher et al. 2003).

Az első jelentősebb, kifejezetten a migrén és az elhízás közötti kapcsolatra irányuló populációs vizsgálat ($n = 30215$) eredményeit Bigal és munkatársai közzölték 2006-ban, akik ugyan nem találtak összefüggést a migrén prevalenciája és a BMI között, a rohamok gyakorisága és a betegség klinikai jellegzetességei tekintetében azonban igen. A testtömeg index kategóriák és a migrénes rohamok száma közötti összefüggés különösen a magas rohamgyakorisággal rendelkező csoport (10-15 fejfájásos nap/hónap) esetében volt szembetűnő. A normál testsúlyú migrénesek 4,4%-ának volt havonta 10-15 fejfájásos napja, mely a túlsúlyos egyéneknél 5,8%-ra, míg az elhízottak esetében 13,6 (BMI 30-34,9) és 20,7%-ra (BMI ≥ 35) emelkedett. Az elhízás (BMI ≥ 30) továbbá összefüggést mutatott a migrénes rohamok alatti fájdalom, a rohamokat kísérő fonofóbia és fotofóbia, valamint a betegségteher mértékének növekedésével (Bigal, Liberman, Lipton 2006). Egy későbbi, immár 162576 személy adatait feldolgozó kutatásuk szintén hasonló eredményre jutott (Bigal et al. 2007b).

2008-ban Ford és munkatársai első alkalommal végeztek olyan elemzést ($n = 7601$, életkor: 20-85 év), mely a korábbi közleményektől eltérően a BMI-t nem önbevallásos alapon, hanem mért értékek alapján számította az amerikai Nemzeti Egészségügyi- és Táplálkozási Felmérés (National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES) során nyert adatokat felhasználva. Az elhízás (BMI ≥ 30) 37%-kal növelte a fejfájás kockázatát a normál testsúllyal rendelkező populációhoz képest (Ford et al. 2008).

A következő fontosabb előrelépés Peterlin és munkatársainak köszönhető, akik 2010-ben (szintén a NHANES adatait felhasználva) rávilágítottak a nem, az életkor és a hasi típusú elhízás (derékkörfogat: nő > 88 cm, férfi > 102 cm) jelentőségére (n = 21873). Megállapították, hogy 55 éves kor alatt a BMI növekedésével mindkét nem esetében fokozódik a migrén prevalenciája, továbbá, hogy a hasi típusú elhízás önálló kockázati tényezőnek tekinthető, mely a nők esetében független a BMI-től. Az 55 év feletti korosztályokban azonban egyik nem esetében sem találtak összefüggést a migrén prevalenciája és a BMI között. A hasi típusú elhízás férfiakban szintén nem befolyásolta a migrén gyakoriságát, nőkben viszont meglepő módon csökkentette (Peterlin et al. 2010).

Az elhízás és a fejfájások/migrén közötti kapcsolat lehetőségét felvető első megfigyelések óta jelentős lendületet vettek a kérdés vizsgálatára irányuló epidemiológiai kutatások. 2014-ben Chai és munkatársai az addig megjelent közlemények eredményeinek szisztematikus áttekintése után megállapították, hogy az adatok alátámasztani látszanak az elhízás és a fejfájás közötti kapcsolat létezését. Becsléseik szerint az elhízás, a túlsúly mértékétől függően, 40-80%-kal növelheti a migrén kialakulásának kockázatát (Chai et al. 2014). Az elhízás továbbá együtt járhat a fejfájásos rohamok gyakoriságának, intenzitásának és időtartamának növekedésével (Ornello et al. 2015; Verrotti et al. 2014).

Fontos azonban kiemelni, hogy az elhízás és a fejfájások közötti kapcsolat szempontjából rendelkezésre álló információk jelenleg szinte teljes egészében epidemiológiai kutatásokból származnak, melyek azonban jellegükből adódóan nem ideálisak ok-okozati összefüggések és mechanizmusok feltárására. Így tehát az utóbbi években egyre erőteljesebb igény fogalmazódott meg a kísérletes vizsgálatokkal foglalkozók irányába, hogy a rendelkezésre álló információk integrálásával munkahipotéziseket generáljanak és lépéseket tegyenek a megfigyelt jelenségek hátterében álló patomechanizmusok felderítése érdekében. Tekintettel arra, hogy a fejfájások közül a migrén jelenti a legnagyobb betegségterhet, valamint az elhízás és a fejfájások közötti összefüggés is a migrén esetében tűnik a legmeggyőzőbbnek, az értekezés további része és az elvégzett kísérletes munkánk is ennek megfelelően közelíti meg a problémakört.

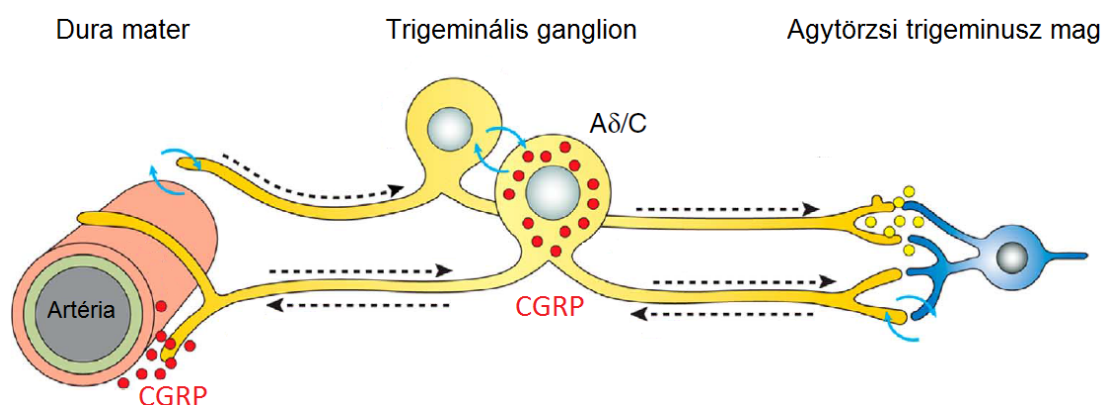
3.3. A trigeminovaskuláris rendszer jelentősége a migrén patogenezisében

A migrén egy komplex, számos részletében még ismeretlen kórélettani hátterű neurológiai betegség (Pietrobon and Moskowitz 2013). A kutatások kezdeti időszakában a migrént egy tisztán érederetű fejfájásnak gondolták, melyet többek között a fejfájás lüktető

jellegére, az intrakraniális erek átmérőjének és véráramlásának rohamok során megfigyelhető változásaira, valamint az érzékítő hatással rendelkező gyógyszerek terápiás hatékonyságára alapoztak. Ezt követően nyertek teret azok az elképzelések, melyek az idegrendszeri folyamatok kóros működését jelölték meg a migrénes fejfájás elsődleges okaként, míg a betegek egy részében megfigyelhető vaszkuláris történéseket csupán másodlagos jelenségeknek tekintették. A jelenleg uralkodó álláspontok szerint azonban a migrén sokkal inkább egy neurovaszkuláris jellegű fejfájás, melynek patogenezisében egyszerre van szerepe a kóros központi idegrendszeri folyamatoknak és a vaszkuláris történéseket is magába foglaló perifériás eseményeknek, valamint az ezek komponensei között kialakuló bonyolult interakcióknak. Ezen elméletek középpontjában a trigeminovaszkuláris rendszer működésével kapcsolatos kérdések állnak (Nosedá and Burstein 2013).

3.3.1. A trigeminovaszkuláris rendszer funkcionális anatómiája

A trigeminovaszkuláris fájdalomérző rendszer meghatározó részét képezik a trigeminális ganglion pseudounipoláris primer szenzoros neuronjainak afferensei, ezen idegrostok által beidegzett agyi érszakaszok, a lágy- és kemény agyhártya (pia- és dura mater), az axonok centrális végződése, valamint az agytörzsi trigeminusz mag (nucleus spinalis nervi trigemini subnucleus caudalis) másodlagos érző neuronjai (**2. ábra**) (Goadsby 2013).



2. ábra. A trigeminovaszkuláris rendszer vázlatos képe. CGRP: calcitonin gén-rokon peptid; Aδ/C: mielinhüvelyes (Aδ) és velőtlen (C) rostok (Eberhardt et al. 2014 alapján).

A kemény agyhártya tekinthető a legfontosabb intrakraniális fájdalomérző struktúrának, amit az 1940-es években éber pácienseken végzett idegsebészeti műtétek eredményei igazoltak. Ezek során a dura mater, elsősorban az arteria meningea media (AMM)

környékének stimulálása fejfájásnak megfelelő tüneteket eredményezett (Penfield and McNaughton 1940; Ray and Wolff 1940). A dura materben futó trigeminális afferensek nociceptív funkcióval rendelkező vékony mielinhüvelyes (A δ -) és velőtlen (C-) rostok, melyek kisebb része a dura mater kötőszövetes állományában, míg többségük a meningeális erek közvetlen közelében helyezkedik el (Keller and Marfurt 1991). Ezen érző idegek periféria felől történő aktiválódása szenzoros információt továbbít a trigeminocervicalis komplexbe, melyet az agytörzsi trigeminusz mag és a felső nyaki gerincvelő hátsó szarvának első két szelvénye (C1 és C2) alkot. A szenzoros információ ezt követően a trigeminocervicalis komplexben található másodlagos érző neuronok és interneuronok közvetítésével az agytörzs egyéb részeibe, a hipotalamuszba és a thalamuszba jutnak, melyek végül kapcsolatot teremtenek az agykéreggel. A fájdalomérzet a szenzoros információk magasabb agyi területeken történő feldolgozásának eredményeként alakul ki (Pietrobon and Moskowitz 2013).

A fejfájáskutatás kezdeti évei óta igen nagyszámú humán (pl. genetikai, funkcionális képalkotó, farmakológiai) és állatkísérletes (pl. elektrofiziológiai, biokémiai, morfológiai, viselkedési) módszer került bevezetésre az elsődleges fejfájások patogenezisének tanulmányozására, melyek lényegének, valamint erősségeinek és korlátainak ismertetése meghaladja ezen értekezés lehetőségeit (Ashina, Hansen, Olesen 2013; Cutrer and Smith 2013; Romero-Reyes and Akerman 2014). Fő gondolatként azonban fontos kiemelni, hogy mind a mai napig nem létezik egyetlen olyan módszer sem, mely képes lenne a migrén folyamatát teljes komplexitásában modellezni. Így a jelenleg alkalmazott módszerek mindegyike olyan részfolyamatok vizsgálatára irányul, melyeknek nagy valószínűséggel szerepe lehet a migrén patofiziológiájában. E módszertani repertoár által felhalmozott információk teszik lehetővé a migrén patogenezisének jobb megértését, valamint képezik az alapját az új, hatékonyabb gyógyszerek fejlesztésének.

A migrén kórélettanára vonatkozó ismeretekhez nagymértékben hozzájárultak a dura matert beidegző primer afferensek aktivációjával összefüggő neuroszekretoros és vaszkuláris történések tanulmányozása és az ezekből nyert felismerések (Romero-Reyes and Akerman 2014). Erre a célra a patkányok megfelelő állatmodellnek tekinthetők a trigeminovaszkuláris rendszerük emberhez viszonyított nagyfokú hasonlósága alapján (Schueler et al. 2014).

3.3.2. A meningeális nociceptorok efferens funkciója és a neurogén gyulladás

A dura mater nociceptív afferenseinek egy jelentős része peptiderg idegrost, melyek a szenzoros szignálok központi idegrendszer felé történő továbbítása mellett (klasszikus afferens működés), efferens funkcióval is rendelkeznek. Ennek lényege, hogy az idegi aktivációt követően olyan proinflammatorikus neuropeptidek szabadulhatnak fel a perifériás végződésekből, melyek meningeális értágulatot, plazma extravazációt és szöveti hízósejt aktivációt/degranulációt eredményeznek az innervált területen (Zagami, Goadsby, Edvinsson 1990). Ez a jelenség a neurogén gyulladás, melynek vazodilatációs komponenséért a CGRP (Messlinger et al. 1995), míg a plazma extravazációért a P-anyag (substance P, SP) és a neurokinin A (NKA) felelős (Dimtriadou et al. 1991; Markowitz, Saito, Moskowitz 1987).

A neurogén gyulladásnak, különösen a folyamat során felszabaduló proinflammatorikus mediátoroknak fontos szerepet tulajdonítanak a perifériás szenzitizáció jelenségének kialakításában, mely lényegében a meningeális nociceptorok érzékenységének és válaszkészségének fokozódását jelenti a fájdalomkeltő, vagy éppen a korábban fájdalmat kiváltani nem képes tényezők iránt (Olesen et al. 2009). A dura afferensek felől érkező nociceptív inputok perifériás szenzitizáció által történő felerősödése azonban a trigeminocervicalis komplexben és a thalamusban lévő, már sokkal kiterjedtebb neuronális kapcsolatokkal rendelkező másod- és harmadrendű neuronok aktivitásának és érzékenységének fokozódásához vezethet (centrális szenzitizáció) (Dodick and Silberstein 2006). Végeredményben tehát a teljes trigeminális fájdalomérző pálya érzékenysége és aktivitása megnövekedhet, alapot szolgáltatva a migrénes rohamok során fellépő fejfájás és egyéb szenzoros tünetek kialakulásához, mint például az allodynia (nem fájdalmas stimulusok fájdalmassá válása) és a hiperalgécia (fájdalmas stimulusok iránti fokozott érzékenység) (Bernstein and Burstein 2012).

3.4. A CGRP szerepe a migrén patogenezisében

A CGRP egy 37 aminosavból álló neuropeptid, melynek két, nagymértékben hasonló biológiai aktivitással rendelkező izoformája ismert (α -CGRP és β -CGRP) (Arulmani et al. 2004). A CGRP felszabadulással kapcsolatos kérdések több szempontból is kiemelt jelentőséggel bírnak a migrén patogenezise tekintetében (Russo 2015).

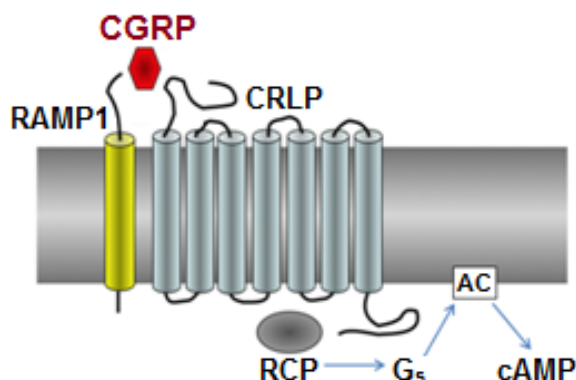
3.4.1. Klinikai megfigyelések

A CGRP migrénes fejfájásban betöltött szerepét számos klinikai és kísérletes megfigyelés igazolja (Karsan and Goadsby 2015a). Migrénes rohamok során a véna jugularisból vett vérmintákban a CGRP koncentrációjának emelkedését mérték (Goadsby, Edvinsson, Ekman 1990), mely megakadályozható volt a migrén akut terápiájában használatos triptánok adásával (Edvinsson and Goadsby 1994). Emelkedett CGRP plazmakoncentrációról migrénes betegekben a migrénes rohamok közötti időszakban is beszámoltak (Cernuda-Morollón et al. 2013). A migrén a CGRP nociceptív hatásai iránti túlérzékenységgel járhat együtt, melyet jól szemléltet, hogy a CGRP intravénás infúziója egészséges egyéneknél nem okoz különösebb panaszt (Petersen et al. 2005), migrénes betegekben ugyanakkor fejfájást provokálhat (Lassen et al. 2002). A CGRP-, illetve a CGRP receptor ellenes antitestek terápiás alkalmazhatóságával kapcsolatos klinikai eredmények is sokat ígérőek, közvetlen bizonyítékot szolgáltatva a CGRP migrénes fejfájásban betöltött szerepére (Bigal, Walter, Rapoport 2015; Ho et al. 2008; Karsan and Goadsby 2015b; Olesen et al. 2004). Eddigi ismereteink alapján a trigeminális afferensekből felszabaduló szenzoros neuropeptidok közül a CGRP-nek tulajdonítják a legnagyobb jelentőséget a migrén patofiziológiájában. Ennek megfelelően a CGRP hatásait modulálni képes gyógyszerek fejlesztése a migrén hatékonyabb terápiájára irányuló törekvések középpontjába került (Russo 2015).

3.4.2. CGRP-t expresszáló trigeminális afferensek és a CGRP felszabadulás következményei

A trigeminovaskuláris rendszerben található CGRP a primer szenzoros neuronok trigeminális ganglionban lévő sejttestjeiben szintetizálódik, majd azok idegvégződéseiben tárolódik nagy, denz vezikulákban (Uddman et al. 1985). Mind az emberi, mind pedig a patkány trigeminális ganglion esetében hasonló arányban, az idegsejtek közel felében mutatható ki CGRP immunreaktivitás (Eftekhari et al. 2010; Reuss, Riemann, Vollrath 1992), melyek egy kisebb részében jellemző a P-anyaggal történő kolokalizáció is (Lee et al. 1985). A dura matert beidegző CGRP-immunreaktív idegrostok döntően az AMM és a meningeális szinuszok közvetlen közelében haladnak (Keller and Marfurt 1991; Meßlinger et al. 1993), ahol hízósejtek is nagy számban találhatók (Dimitriadou et al. 1997; Dimlich et al. 1991). A trigeminális afferensek elektromos vagy kémiai (pl. kapszaicin, akrolein, gyulladáscsökkentő mediátorok) stimulációja a perifériás idegvégzésekben tárolt neuropeptidok Ca^{2+} -szignálhoz kötött exocitózist eredményezi (Ebersberger et al. 1999; Geppetti et al. 1990).

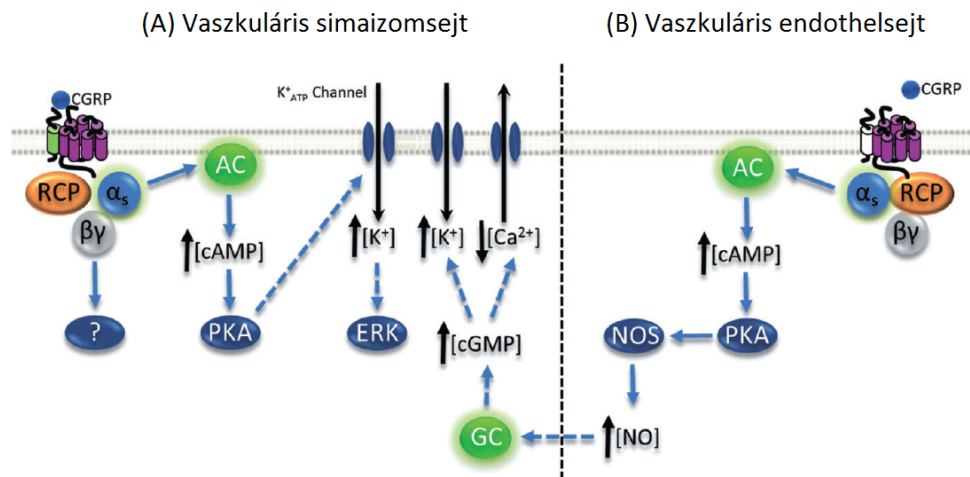
A felszabadult CGRP a három alegységből álló CGRP receptorhoz kötődve fejti ki biológiai hatását (**3. ábra**).



3. ábra. A CGRP receptor szerkezete és a G_s -proteinhez kapcsolt jelátviteli útvonal. CGRP: calcitonin gén-rokon peptid; RAMP1: receptor-aktivitást módosító fehérje 1; CRLP: calcitonin receptor-szerű fehérje; RCP: receptor komponens fehérje; AC: adenilát-cikláz (Messlinger et al. 2012 alapján).

A célsejt membránjában található egy nagyobb, 7 transzmembrán doménnel rendelkező calcitonin receptor-szerű fehérje (calcitonin receptor-like protein; CRLP) alegység, mely egy szintén a membránban lévő receptor-aktivitást módosító fehérje 1 (receptor activity-modifying protein 1; RAMP1) egységgel közösen alkotja a CGRP-re specifikus ligandkötő helyet. Ezt a komplexet egy kisebb intracelluláris fehérje, a receptor komponens fehérje (receptor component protein; RCP) kapcsolja hozzá az intracelluláris jelátvivő rendszerhez, a G_s -fehérjéhez, ami az adenilát-cikláz enzim (AC) aktiválásán keresztül a cAMP koncentráció emelkedéséhez vezet.

CGRP receptorok kimutathatók a meningeális erek simaizomsejtjein, a hízósejtek és a Schwann sejtek membránjában, a trigeminális ganglionban, valamint az agytörzsi trigeminusz magban. A CGRP értágító hatása döntően az artériák CGRP receptorainak aktivációjára vezethető vissza, mely végeredményben a simaizomsejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjának csökkenéséhez, majd az érfal ellazulásához és a véráramlás fokozódásához vezet. Egyes adatok arra utalnak, hogy a CGRP értágító hatásához részben az endotheliális CGRP receptorok által aktivált jelátviteli útvonalak is hozzájárulhatnak, bár ezen elképzelések minden kétséget kizáró bizonyítása még várat magára (**4. ábra**) (Walker and Hay 2013).



4. ábra. A CGRP receptor aktivációját követő intracelluláris események vaszkuláris simaizom (A)- és endothelsejtben (B). AC: adenilát-cikláz; PKA: protein kináz A; ERK: extracellulárisan szabályozott kináz; GC: guanilát-cikláz; NO: nitrogén-monoxid; NOS: nitrogén-monoxid szintáz (Walker and Hay 2013 alapján).

CGRP receptorokat a hízósejtek és a Schwann sejtek membránja is tartalmaz (Lennerz et al. 2008). Míg az utóbbiak élettani szerepe nem teljesen tisztázott, addig a hízósejtek esetében ismert, hogy ezek CGRP receptorainak aktiválódása a hízósejtek degranulációjához, ezáltal pedig további proinflammatorikus mediátorok, mint például a hisztamin felszabadulásához vezethet (Dimtriadou et al. 1991; Schwenger et al. 2007). A hízósejtek degranulációja a meningeális nociceptorok aktiválásán és érzékenyítésén keresztül (Levy et al. 2007; Zhang et al. 2007) hozzájárulhat a migrénes fejfájás kialakulásához (Theoharides et al. 2005).

A hisztamin a CGRP-hez hasonlóan közvetlenül az artériákon hatva fejt ki vazóaktív hatását endothel- és simaizom függő mechanizmusokon keresztül (Dux, Schwenger, Messlinger 2002). A hisztamin által kiváltott meningeális vazodilatációt az endothelsejtek H₁- és a simaizomsejtek H₂-receptorainak aktivációja közvetíti. A perivaszkuláris térben lévő hisztamin elsősorban a simaizomsejtek membránjában található H₂-receptort aktiválja, mely az adenilát-cikláz enzim stimulálásán keresztül vezet az érfal relaxációjához. A véráramban lévő hisztamin ezzel szemben döntően az endotheliális H₁-receptorok aktiválása és következményes NO produkció révén vált ki vazodilatációt. Érdeemes megemlíteni, hogy a meningeális erek simaizomsejtjei H₁-receptorokat is tartalmaznak, melyek aktivációja vazokonstriktációt eredményez. Magas perivaszkuláris hisztamin koncentráció esetén azonban a H₂-receptorok által mediált hatás dominál.

A jelenlegi kutatások egyik legfontosabb, ugyanakkor a mai napig nagyrészt megválaszolatlan kérdése, hogy vajon milyen elsődleges endogén és/vagy exogén tényezők,

valamint milyen mechanizmusokon keresztül vezetnek a meningeális nociceptorok aktiválódásához és szenzitizációjához? E kérdések tekintetében már számos receptor, mediátor és egyéb tényező különálló, vagy ezek interakcióján alapuló eseménysorozat szerepe vetődött fel az évek során.

3.5. A TRPV1 és a TRPA1 receptorok szerepe a meningeális nocicepcióban

Immunhisztokémiai festéssel kombinált retrográd jelöléses vizsgálatok kimutatták, hogy a dura matert beidegző trigeminális afferensek körülbelül 25%-a rendelkezik TRPV1 receptorral, melyek többsége (kb. 80%) CGRP-t is expresszál (Huang et al. 2012; Shimizu et al. 2007). A TRPV1-pozitív meningeális afferensek elsősorban az arteria meninge media ágai körül a perivaszkuláris régióban helyezkednek el, míg kisebb részük az erektől távolabb, a dura kötőszövetes állományában (Dux et al. 2007; Shimizu et al. 2007). A TRPV1-pozitív peptiderg afferensek egy jelentős hányadában TRPA1 receptorok is kimutathatók (Jordt et al. 2004; Kobayashi et al. 2005; Story et al. 2003). Nem csak e két receptor lokalizációjában figyelhető meg sok hasonlóság, hanem funkciójukban és farmakológiai tulajdonságaikban is. Egyre több adat támasztja alá a meningeális nocicepcióban és a migrénes fejfájás patogenezisében betöltött szerepüket (Benemei et al. 2014; Dux, Sántha, Jancsó 2012), melyek következtében a migrénellenes gyógyszerfejlesztés potenciális célpontjaivá váltak (Dussor et al. 2014).

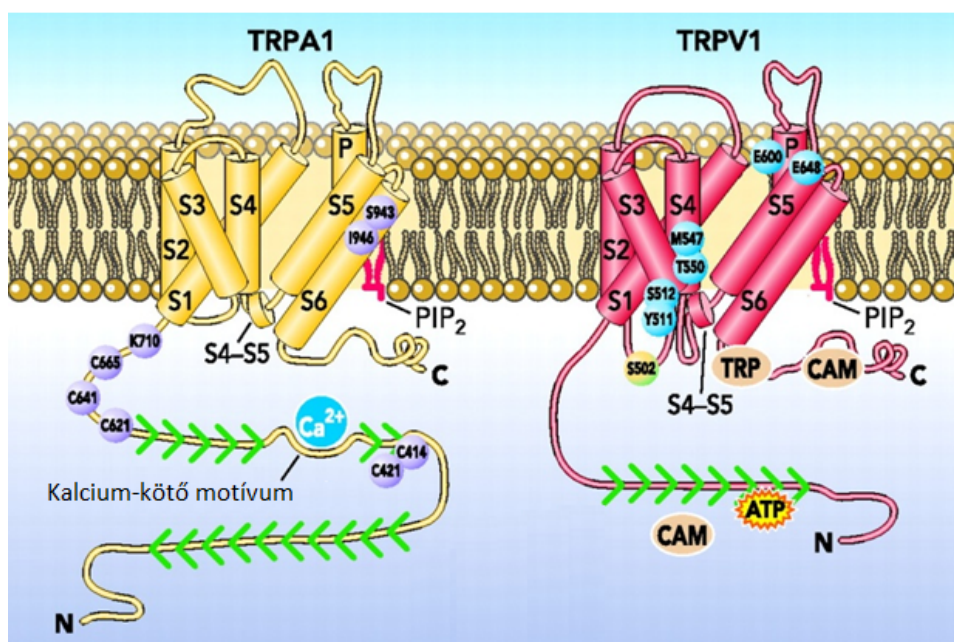
3.5.1. TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák

A tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatornák 6 transzmembrán doménnel rendelkező nem szelektív kationcsatornák, melyeket hat alcsoportba sorolnak: TRPV (vanilloid), TRPA (ankyrin), TRPC (kanonikus), TRPM (melasztatin), TRPP (policisztin) és TRPML (mukolipin) (Nilius et al. 2007). A TRP ioncsatornák számottevő mértékben expresszálódnak a C és A δ típusú axonokkal rendelkező szenzoros neuronokban, ahol a nociceptív folyamatokban van szerepük a fájdalmas fizikai (hő- és mechanikai behatások) és kémiai ingerek (extracelluláris pH, ozmolaritás, irritatív anyagok és számos eltérő kémiai szerkezetű mediátor) érzékelésén keresztül (Julius 2013). A TRPV1 ioncsatorna a TRPV alcsalád (TRPV1-6) első tagja, melyet először a paprika (*Capsicum annuum* és *Capsicum frutescens*) csípősségét adó kapszaicin molekula (8-metil-N-vanillil-transz-6-nonénamid) receptoraként azonosították, majd tekintettel arra, hogy egyéb vanilloid csoporttal rendelkező

molekulák kötésére is képes, az elnevezését vanilloid receptorra (VR1) módosították. Végül az ioncsatorna pontos szerkezetének megismerése után a TRP receptor családba sorolták be (TRPV1). A TRPA1 receptor a TRPA alcsalád máig egyetlen ismert tagja, melyet korábban ankyrin transzmembrán protein 1 receptor (ankyrin-like with transmembrane domains protein 1, ANKTM1) néven említettek.

A neuronális TRPV1 és TRPA1 receptorok figyelemre méltó tulajdonsága, mely kórélettani szempontból is nagy jelentőséggel bírhat, hogy egyfajta molekuláris integrátorként funkcionálva számos különböző típusú és szerkezetű endogén és exogén molekula képes befolyásolni a működésüket (pl. aktiválni, érzékenyíteni). Ilyenek többek között a gyulladásos folyamatok, a szöveti károsodások és az oxidatív stressz során képződő anyagok, számos növényi eredetű természetes vegyület és környezeti szennyező anyag, melyek egy részét a fejfájásos rohamokat provokáló tényezők között tartják számon.

A TRPV1 és TRPA1 receptorok aktivációja Na^+ és Ca^{2+} ionok beáramlását eredményezi az idegsejtbe, hozzájárulva a membrán depolarizációjához és a szenzoros neuron aktiválódásához (Julius 2013). A két receptor szerkezetéről az **5. ábra** nyújt vázlatos áttekintést.



5. ábra. A TRPA1 és TRPV1 receptorok szerkezete, valamint azok ligandkötő régiói és szabályozó helyei. Mindkét receptor polimodális funkciójú ioncsatorna, melyek az extracelluláris- és intracelluláris oldalról is számos fizikai és kémiai ingerrel aktiválhatók, a kationcsatorna megnyílását eredményezve. Lila és kék körök: ligandkötésben fontos aminosav oldalláncok; TRP: tranzien receptor potenciál; CAM: Ca^{2+} -calmodulin kötőhely; PIP_2 : foszfatidil inozitol-bisz-foszfát kötőhely; ATP: adenozin-5'-trifoszfát kötőhely (Bessac és Jordt 2008).

3.5.2. TRPV1 és TRPA1 receptorok által közvetített neurogén érreakciók és a trigeminális aktiváció

Kísérletes körülmények között a dura mater kapszaicinnal történő ingerlése a perifériás érző-idegvégződések membránjában lévő TRPV1 receptorok aktivációján keresztül CGRP felszabaduláshoz és következményes véráramlás fokozódáshoz vezet. A kapszaicin által kiváltott szenzoros neurogén vazodilatáció blokkolható a TRPV1 kompetitív antagonistá capsazepin és a CGRP receptor antagonistá CGRP₈₋₃₇ előkezelés segítségével, valamint a kapszaicin-érzékeny afferensek destrukcióját eredményező szisztémás kapszaicin-deszenzibilizációval (Dux, Sántha, Jancsó 2003). A kapszaicinnal történő stimulációt követő CGRP felszabadulás a migrén akut terápiájában használatos sumatriptan segítségével is gátolható (Eltorp, Jansen-Olesen, Hansen 2000). A TRPA1 agonista akrolein dura mater felszínére történő juttatása szintén CGRP felszabaduláshoz és szenzoros neurogén vazodilatációhoz vezet, mely mind a CGRP₈₋₃₇, mind pedig a szelektív TRPA1 antagonistá HC-030031 előkezelés segítségével gátolható (Albrecht et al. 2013).

Egyre több kísérletes adat támasztja alá, hogy a meningeális TRPV1 és TRPA1 receptorok aktivációja a lokális efferens válaszok mellett a trigeminális fájdalomérző pálya aktiválódásához és migrénszerű tünetek kialakulásához is hozzájárulhat. A meningeális nociceptorok kapszaicinnal történő stimulációja fokozza az extracellulárisan szabályozott kináz (extracellular signal-regulated kinase, ERK) fehérje foszforilációját a trigeminális ganglionban (Iwashita et al. 2013), valamint a c-fos immunreaktivitást az agytörzsi trigeminusz magban (Mitsikostas, Sanchez Del Rio, Waeber 2002; Nozaki, Boccalini, Moskowitz 1992), melyek a fájdalommal összefüggő neuronális aktiváció fontos indikátorai. Újabb adatok arra utalnak, hogy a migrén akut terápiájában használatos és az egyébként 5-HT_{1B/1D} receptorok agonistájaként számon tartott triptánok hatásmechanizmusában a TRPV1 receptorokra kifejtett gátló hatásnak is szerepe lehet. A sumatriptan egyrészt gátolja a kapszaicin által kiváltott inward áramot a trigeminális ganglionban, másrészt csökkenti a spontán serkentő posztszinaptikus áramok frekvenciájának kapszaicin hatására bekövetkező fokozódását az agytörzsi trigeminusz magban (Evans et al. 2012). A sumatriptan emellett hatékonynak bizonyult az intraplantáris kapszaicin injekciót követő termális hiperalgédia mértékének csökkentésében is (Lloyd, Chen, Hargreaves 2012). *In vivo* kísérletek során megfigyelték, hogy a meningeális nociceptorok kapszaicinnal, valamint a TRPA1 agonista mustárolajjal és umbellulone-nal történő stimulációja allodynia kialakulásához vezet az arc és

a talp területén, mely a nocifenzív válaszok fokozódására és a centrális fájdalomérző pályák szenzitizációjára utal (Edelmayer et al. 2012; Yan et al. 2011).

3.5.3.A TRPV1 és a TRPA1 receptorok aktivációjának lehetséges kapcsolata a fejfájást provokáló tényezőkkel

Újabb vizsgálatok rávilágítottak, hogy számos olyan anyag képes aktiválni a TRPV1 és a TRPA1 receptorokat, melyeket a migrénes rohamok kiváltásának rizikófaktorai között tartanak számon (Silva-Néto, Peres, Valença 2014). Az alkoholfogyasztás például a fejfájásos rohamok egyik jól ismert kockázati tényezője (Kelman 2007). Az etanol nemcsak a primer érző idegsejtek TRPV1 receptorainak direkt aktivációjára képes, de egyúttal az egyéb TRPV1 agonisták által kiváltott neuronális válasz mértékét is potenciózza (Trevisani et al. 2002). Intragasztrikusan adott etanol hatására TRPV1-mediált CGRP felszabadulást, szenzoros neurogén vazodilatációt és szöveti plazma extravazációt figyeltek meg a dura materben (Nicoletti et al. 2008). Ismert továbbá, hogy a TRPV1 receptort számos növényi vegyület képes aktiválni, mint például a feketeborsban lévő piperin, a gyömbérben található zingeron, a szegfűszegből kivonható eugenol, vagy éppen a fokhagyma és a vöröshagyma hatóanyaga az allicin (Julius 2013). Szelektív TRPA1 izgató hatással rendelkezik számos iparban használt vegyület, környezeti szennyező- és irritáns anyag, mint például az akrolein (Bautista et al. 2006), a formaldehid (McNamara et al. 2007), a klór (Bessac and Jordt 2008) vagy a cigaretta füst (André et al. 2008). Mindemellett olyan természetes vegyületek esetében is igazolták a TRPA1 aktiváló hatást, mint az allicin (Bautista et al. 2005), az allil-izotiocianát (Jordt et al. 2004), a fahéjaldehid (Bandell et al. 2004), vagy például a „fejfájás fának” is nevezett amerikai babér (*Umbellularia californica*) levelének kivonatában található monoterpén keton umbellulone. Az utóbbi évek egyik érdekes felismerése, hogy az orr nyálkahártyáját beidegző trigeminális afferensek kapszaicinnal, vagy a TRPA1 agonista akroleinnal és mustárolajjal történő stimulációja a CGRP-tartalmú meningeális afferensek aktiválódásához és következményes véráramlás fokozódáshoz vezet (Kunkler et al. 2011). Nem sokkal ezt követően igazolták, hogy az umbellulone-nak mind az intravénás, mind pedig az intranazális alkalmazása CGRP-mediált meningeális véráramlás fokozódást eredményez, mely a TRPA1 antagonistá HC-030031 és a CGRP antagonistá BIBN4096BS alkalmazásával felfüggeszthető (Nassini et al. 2012). E számos részletében még nem tisztázott nazo-meningeális útvonal TRPA1 receptorok által közvetített aktiválódását (Kunkler et al. 2014) a belégzés útján

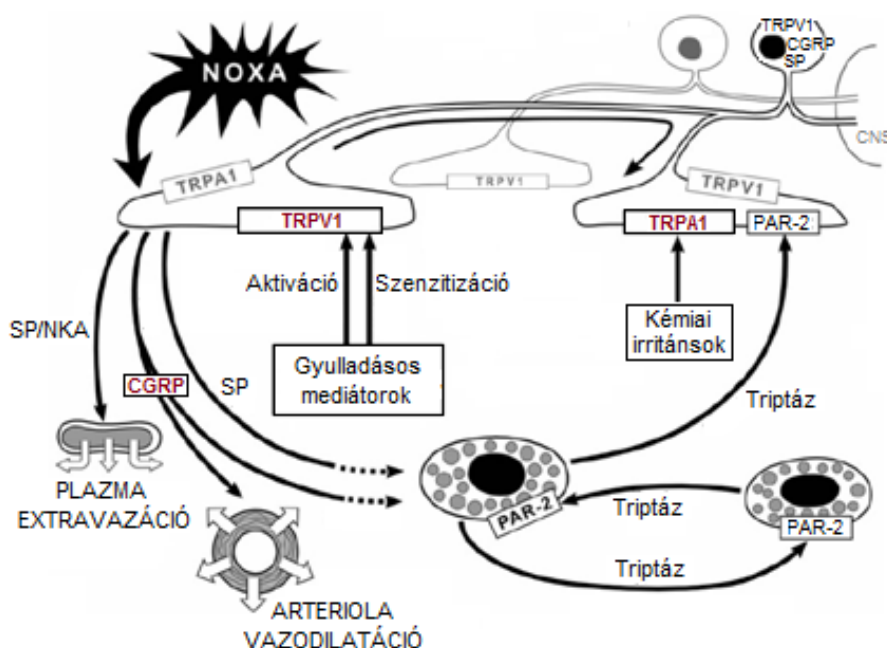
fejfájásos rohamokat kiváltani képes tényezők egyik legfontosabb hatásmechanizmusának tekintik (Benemei et al. 2014).

Az akrolein kitüntetett helyet foglal el a TRPA1 agonista vegyületek között, az emberi szervezet akrolein expozíciójának nagy valószínűsége miatt. Az akrolein ugyanis alapvető komponensét képezi a cigarettafüstnek, valamint a járműforgalom és az ipari tevékenységek során képződő szmognak (Stevens and Maier 2008). Mindemellett azonban gyakorlatilag bármely szerves anyag égése együtt járhat a keletkezésével (Stevens and Maier 2008). Így például az ételkészítéshez használt zsiradékok túlhevítése során is számottevő mértékben képződhet, mely egy nem megfelelően szellőző konyha esetében a levegő akrolein koncentrációjának növekedéséhez vezethet (Seaman, Bennett, Cahill 2009). E kérdések gyakorlati jelentőségét jól szemlélteti, hogy az akrolein metabolitjainak megnövekedett szintjét mutatták ki olyan nők vizeletében, akik rendszeresen rosszul szellőző helyiségben főztek (Hecht et al. 2015). Egy nemrég közölt vizsgálat a trigeminovaskuláris rendszer szenzitizációját írta le belégzés útján történő tartós akrolein expozíció hatására (Kunkler et al. 2015), tovább hangsúlyozva a TRPA1 receptorok és a környezeti irritáns anyagok lehetséges szerepét a migrénes rohamok kialakulásában.

3.6. Trigemino-vaskuláris nociszenzor komplex

Habár az eddigi évek, évtizedek kutatásainak eredményeként számos tényező és folyamat patofiziológiai szerepe felvetődött a migrénes fejfájás kialakulásával kapcsolatban, e felismerések egyúttal a betegség komplexitására is rávilágítottak. Valószínűleg önmagában egyik sem tekinthető kizárólagos oki tényezőnek, melyet az elhízás és a migrén kapcsolatának tanulmányozására irányuló kísérletes vizsgálatok tervezésekor is érdemes szem előtt tartani. Ezért az egyes tényezők lehetséges szerepének hangsúlyozása mellett szükség van a kutatások izolált eredményeit integráló átfogóbb, rendszerszintű megközelítésekre is, melyek talán nagyobb valószínűséggel adhatnak magyarázatot a migrén patogenezisére irányuló kérdésekre. Ezen elképzelések közé tartozik a trigeminovaskuláris nociszenzor komplex koncepciója is, mely a fejfájásos fájdalom kialakulásában, a rohamok alatt megfigyelhető súlyosbodásában és a fájdalom megszűnésében potenciálisan szerepet játszó perifériás eseményeket foglalja egy rendszerbe (**6. ábra**). A komplex fő elemeit a dura matert beidegző kemoszenzitív primer szenzoros afferensek, ezek aktivációjában szerepet játszó receptorok, különös tekintettel a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornákra, a meningeális mikrocirkulációs

rendszer és a hízósejtek alkotják, beleértve a proinflammatorikus neuropeptidek (CGRP, SP, NKA) és a hízósejt eredetű mediátorok (pl. triptáz, hisztamin) felszabadulását is.



6. ábra. A trigeminovaskuláris nociszenzor komplex vázlatos képe. TRPV1: tranziens receptor potenciál vanilloid 1; TRPA1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1; CGRP: calcitonin gén-rokon peptid; SP: P-anyag; NKA: neurokinin A; PAR-2: proteáz-aktivált receptor 2 (Dux et. al 2012 alapján).

A rendelkezésre álló kísérletes információk alapján szoros anatómiai és funkcionális kapcsolat feltételezhető a komplex egyes elemei között, így az elképzelés szerint a rendszer egy adott pontjának aktivációja a többi komponens aktivációját is maga után vonhatja, mely pozitív visszacsatolások, öngerjesztő körök beindulásához vezethet a trigeminovaskuláris nociszenzor komplexen belül. A trigeminális afferenseken keresztül a centrális irányba történő nociceptív szignalizáció lényegében e perifériás történések közös eredőjének is tekinthető, melynek erőssége az események előrehaladtával a lokális circulus vitiosusok következtében folyamatosan növekedhet, a fejfájásos panaszok fokozódását eredményezve. A migrénes fájdalom terminációjához viszont a trigeminális afferensek aktivitási szintjének csökkenése is hozzájárulhat, mely összefüggésben lehet a meningeális nociceptorokból felszabaduló neuropeptidek és hízósejt eredetű mediátorok depléciójával, valamint a nociceptív faktorok véráramlás-fokozódás útján történő eliminációjával.

A trigeminovaskuláris nociszenzor komplex koncepciója ugyanakkor nem csak a migrénes fejfájás, mint alapjelenség kialakulásáért felelős kórélettani folyamatok egy részére adhat magyarázatot, de segítséget nyújthat a migrénes fejfájás elhízással összefüggő

progressziójának hátterében álló patomechanizmusok felderítéséhez is. Feltételezésünk szerint ugyanis az elhízás egy olyan összetett, metabolikus-, morfológiai és funkcionális elváltozásokkal teli környezetet teremt a szervezetben, mely hatással lehet a trigeminovaszkuláris nociszenzor komplex működésére is, különös tekintettel a rendszer középpontjában helyet foglaló TRPV1 és TRPA1 receptorok aktiválódásával összefüggő eseményekre.

3.7. Az elhízás és a migrén közötti kapcsolat hátterében álló lehetséges mechanizmusok

A jelenlegi elképzelések szerint az elhízás és a migrén közötti kapcsolatban egyaránt szerepe lehet az egyirányú ok-okozati összefüggéseknek (pl. az elhízás fokozza a migrén progresszióját és/vagy a migrén növeli az elhízás kialakulásának kockázatát), valamint azon kórélettani folyamatoknak, melyek mind a két állapot esetében egymástól függetlenül is fellelhetők (Bigal et al. 2007a). A lehetséges tényezőket élettani, pszichológiai és viselkedési/életmódbeli csoportokba lehet sorolni, melyek azonban szorosan összefügghetnek egymással, így a csoportosításuk is elsősorban didaktikai jellegű (Bond et al. 2011). Az első csoporton belül a gyulladásos folyamatok szerepe tűnik a legvalószínűbbnek, továbbá a feltételezések során nagy hangsúlyt kapnak a táplálékfelvétel- és az energiaforgalom központi idegrendszeri (hypothalamus) szabályozásában szerepet játszó tényezők is (pl. szerotonin, orexinek, adiponektin, leptin, rezisztin), de az autonóm idegrendszeri diszfunkciók szerepe sem zárható ki. A második csoport esetében a pszichológiai stressz, a nem megfelelő megküzdési stratégiák, a túlzott mértékű gyógyszerhasználat, valamint a depresszió és szorongásos betegségek jelentősége mellett szóló érvek hangoznak el a leggyakrabban. A viselkedési/életmódbeli tényezők szempontjából pedig az alvászavarok, az elégtelen mennyiségű fizikai aktivitás és a kedvezőtlen étkezési szokások (rendszeretlen étkezés, magas zsírtartalmú étrend, túlzott kalóriabevitel) szerepét szokták hangsúlyozni.

A gyulladásos folyamatok jelentőségével kapcsolatos érvek azon alapszanak, hogy az elhízás gyakran együtt jár egy krónikusan fennálló szisztémás gyulladásos állapot kialakulásával (Calder et al. 2011), mely során számos olyan mediátor képződése és szekréciója fokozódhat, melyeknek szerepet tulajdonítanak a migrén patogenezisében (Bigal et al. 2007a; Bond et al. 2011; Cindy Chai et al. 2014; Recober and Goadsby 2010; Waeber and Moskowitz 2005). A migrénes rohamok során megfigyelték a tumor nekrozis faktor α (TNF α), interleukin-1 β (IL-1 β) és interleukin-6 (IL-6) proinflammatorikus citokinek (Perini et al. 2005; Sarchielli et al. 2006), a prosztoglandin E₂ (PGE₂) és a 6-keto prosztoglandin F_{1 α}

alogén proszttaglandinok (Sarchielli et al. 2000), a szolubilis intercelluláris adhézios molekula-1 (Sarchielli et al. 2006), valamint a nitritek plazmakoncentrációjának emelkedését (Sarchielli et al. 2000), felvetve e mediátorok lehetséges szerepét a fejfájásos fájdalom kialakulásának folyamatában. A gyulladásos citokinek patofiziológiai jelentőségére utalnak azok a klinikai vizsgálatok is, melyek az IL-1 β és az IL-6 perifériás vérben mért koncentrációjának emelkedett szintjét írták le a rohamok közötti interiktális időszakban a migrénes (Fidan et al. 2006; Koçer et al. 2009; Uzar et al. 2011) és a krónikus tenziós típusú fejfájásban szenvedő betegek esetében (Della Vedova et al. 2013; Koçer et al. 2010). A C-reaktív protein koncentrációja szintén emelkedett lehet migrénesekben (Vanmolkot and De Hoon 2007). Elhízás során tartósan megemelkedhet az imént említett gyulladásos mediátorok szintézise és szekréciója (Calder et al. 2011; Fain et al. 2002; Spranger et al. 2003), melynek következtében elhízott migrénesekben megnőhet a gyulladásos folyamatok patofiziológiai szerepe, hozzájárulva a migrén manifesztációjához és/vagy a fejfájásos rohamok gyakoriságának és súlyosságának növekedéséhez (Bigal et al. 2007a). Feltételezhető, hogy amennyiben ezek az összefüggések valóban léteznek, akkor azok részben a trigeminovaskuláris rendszerre gyakorolt hatásokon keresztül valósulnak meg (Waeber and Moskowitz 2005).

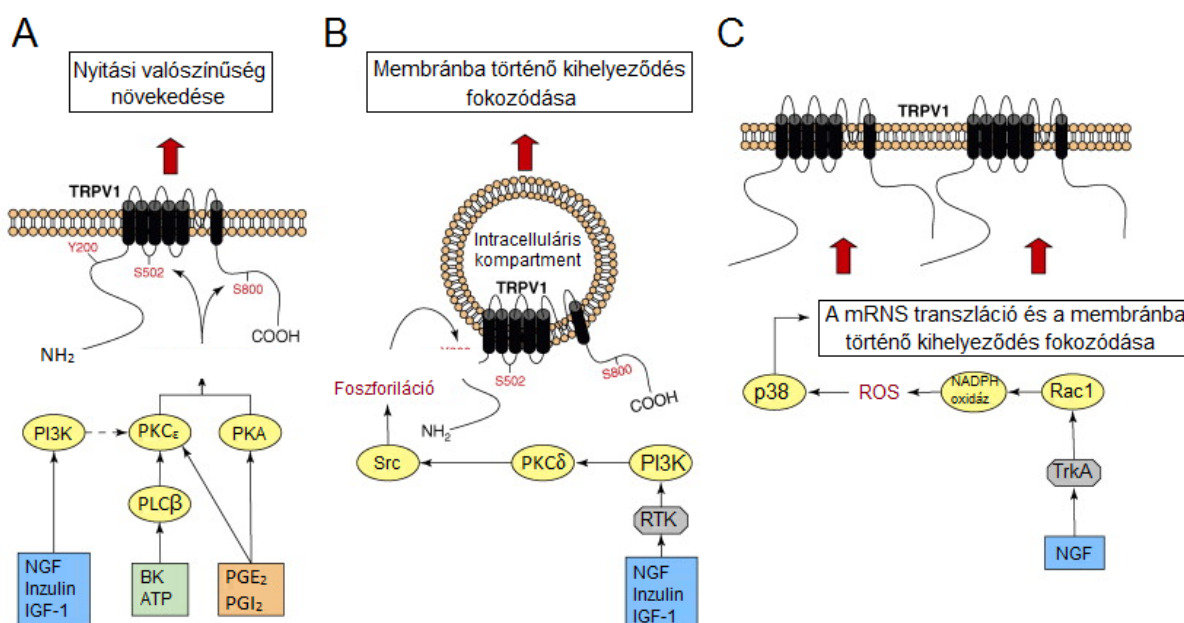
Az elhízás és a migrén kapcsolatával foglalkozó elméletek (direkt evidenciák hiányában) ugyanakkor nem mennek tovább a gyulladásos folyamatok szerepének általánosságokban történő hangsúlyozásánál. Mindemellett, a kemoszenzitív meningeális afferensek által expresszált TRPV1 és TRPA1 receptorok aktivációjával összefüggő trigeminovaskuláris események meglehetősen csekély hangsúlyt kapnak a gondolatmenetek során (Bigal et al. 2007a; Bigal and Lipton 2008; Bond et al. 2011; Cindy Chai et al. 2014; Peterlin, Rapoport, Kurth 2010; Recober and Goadsby 2010). A TRPV1 és TRPA1 ioncsatornákat expresszáló meningeális nociceptorok a gyulladásos mediátorok potenciális célpontjai lehetnek. Feltételezésünk szerint az elhízás egy olyan metabolikus és immunológiai elváltozásokkal teli környezetet teremthet, mely idővel a meningeális nociceptorok, illetve a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák működésének és az aktiválásukkal összefüggő trigeminovaskuláris események megváltozásához vezethet, tovább növelve e tényezők kórélettani szerepét a fejfájásos fájdalom kialakításában.

In vivo elektrofiziológiai vizsgálatok igazolták, hogy a TNF α , IL-1 β és az IL-6 dura mater felszínére történő juttatása a meningeális nociceptorok aktivitásának fokozódását eredményezheti (Yan et al. 2012; Zhang et al. 2011; Zhang, Burstein, Levy 2012), melyhez potenciálisan hozzájárulhatnak a TRPV1 receptorok működésére gyakorolt hatások is (Khan

et al. 2008; Miller et al. 2009; Schäfers and Sorkin 2008). A TRPV1 receptort a gyulladásos fájdalom kiváltásában szerepet játszó anyagok molekuláris integrátoraként tartják számon (Szallasi A. et al. 2007). A gyulladásos mediátorok egy része közvetlenül aktiválhatja a TRPV1 receptorokat (pl. lipoxigenáz termékek), míg mások a saját receptoraik által elindított intracelluláris jelátviteli útvonalakon keresztül vezethetnek a receptor szenzitizációjához (Julius 2013).

A TRPV1 érzékenységének fokozódásában kiemelt jelentőséget tulajdonítanak a receptor kapuzási tulajdonságaiban, membránba történő transzlokációjában és a receptor fehérje expressziójában bekövetkező változásoknak (7. ábra). A prosztaglandinok (PGE_2 , prosztaglandin I_2), az adenzin-5'-trifoszfát (ATP), a bradykinin, az ideg növekedési faktor (nerve growth factor, NGF), valamint az inzulin és az inzulinszerű növekedési faktor (insulin-like growth factor, IGF-1) különböző mechanizmusokon keresztül a membránban lévő TRPV1 receptorok szabályozó helyeinek (pl. S502 és S800) foszforilációjához, ezáltal a TRPV1 aktivációs küszöbének csökkenéséhez, a csatorna nyitási valószínűségének növekedéséhez vezethetnek. Mindemellett a NGF, inzulin és IGF-1 a szenzoros idegvégződésekben található vezikulák TRPV1 receptorainak foszforilációját (pl. Y200) is elősegítheti, mely a funkcionális TRPV1 receptorok membránba történő transzlokációjának fokozódásához vezethet. Egyes megfigyelések szerint a NGF a TRPV1 fehérje expressziójának növelése által is hozzájárulhat a perifériás nociceptorok szenzitizációjához (Meents, Neeb, Reuter 2010). A TRPV1 hő aktivációs küszöbe fiziológiai körülmények között 43°C körüli értéken van, ami azonban a szöveti sérülések és a gyulladásos folyamatok során felszabaduló faktorok hatására jelentős mértékben csökkenhet, akár a normális testhőmérsékleti tartományt ($\geq 37^\circ\text{C}$) megközelítő szintre is, a receptor spontán aktiválódását eredményezve (Fischer and Reeh 2007; Pethő, Derow, Reeh 2001; Tominaga et al. 1998). A lokális pH csökkenés a gyulladásos folyamatok gyakori velejárója, melynek az acidózis mértékétől függően pozitív allosztérikus (pH $\sim 6,5$) és direkt aktiváló (pH > 6) hatása lehet a TRPV1 receptorokra (Holzer 2009; Leffler, Mönter, Koltzenburg 2006). A trigeminális afferensek perifériás terminálisai közelében elhelyezkedő hízósejtek degranulációja például a lokális H^+ koncentráció emelkedéséhez (intragranuláris pH $\sim 5,5$) és számos olyan mediátor felszabadulásához vezethet, melyek direkt vagy indirekt módon hozzájárulhatnak a meningeális nociceptorok és a TRPV1 ioncsatornák aktiválódásához és szenzitizációjához (De Young, Nemeth, Scarpa 1987; Dux et al. 2009; Zhang et al. 2007). A TRPA1 receptoroknak szintén fontos jellemzője, hogy működésüket számos eltérő szerkezetű, a szöveti károsodások és gyulladásos folyamatok során képződő endogén molekula, valamint

irritáns hatású exogén vegyület képes befolyásolni (aktiválni, érzékenyíteni) (Bautista, Pellegrino, Tsunozaki 2013; Benemei et al. 2014).



7. ábra. A TRPV1 receptor szenzitizációjában szerepet játszó főbb mechanizmusok: (A) kapuzási tulajdonságok megváltozása, (B) TRPV1 receptorokat tartalmazó intracelluláris kompartmentek sejtmembránba történő transzlokációjának fokozódása, (C) a receptor fehérje expressziójának növekedése. TRPV1: tranziens receptor potenciál vanilloid 1; PI3K: foszfatidil-inozitol-3 kináz; PKC: protein kináz C; PKA: protein kináz A; PLC: foszfolipáz C; BK: bradykinin; ATP: adenzin-5'-trifoszfat; TrkA: tropomiozin receptor kináz A; RTK: receptor tirozin kináz; NGF: ideg növekedési faktor; IGF-1: inzulinszerű növekedési faktor; PGE $_2$: prosztaglandin E $_2$; PGI $_2$: prosztaglandin I $_2$ (Meents et al. 2010 alapján).

Fontos azonban kiemelni, hogy nem csak a gyulladásos mediátorok szintjében megfigyelhető változás az egyetlen olyan metabolikus eltérés, mely mind a migrénesekben, mind pedig az elhízottakban megfigyelhető és hatással lehet a TRPV1 és TRPA1 receptorok működésére. A gyulladásos folyamatok, az oxidatív stressz és az inzulinrezisztencia patogenezise számos ponton kapcsolódik egymáshoz, circulus vitiosusok egész hálózatát létrehozva (Dandona, Aljada, Bandyopadhyay 2004; Fernández-Sánchez et al. 2011). Ezen összefüggések ráadásul még erőteljesebbé válnak hasi típusú elhízás esetén (Calder et al. 2011), mely az epidemiológiai vizsgálatok eredményei alapján egy különálló kockázati tényezőnek tekinthető az elhízás és a migrén kapcsolata szempontjából (Peterlin et al. 2010). Köztudott, hogy az elhízás gyakran együtt jár az inzulin és a glükóz homeosztázis károsodásával (Dandona, Aljada, Bandyopadhyay 2004), valamint az oxidatív és a nitroztív

stressz mértékének növekedésével (Codoñer-Franch et al. 2012; Gutierrez-Lopez et al. 2012; Sankhla et al. 2012; Wonisch et al. 2012). E metabolikus eltéréseket normál súlyú migrénes egyéneknél is megfigyelték (Bernecker et al. 2011; Cavestro et al. 2007; Gruber et al. 2010a; Gruber et al. 2010b; Gupta et al. 2009; Rainero et al. 2005; Tuncel et al. 2008; Yilmaz et al. 2007), felvetve e tényezők szerepét a migrén patogenezisében. Kísérletes vizsgálatok igazolták, hogy a szenzoros neuronokban expresszáldó TRPV1 receptorok érzékenységet mind az inzulin (Van Buren et al. 2005), mind pedig az oxidatív stressz (Chuang and Lin 2009) képes fokozni, míg a TRPA1 receptorokat az elektrofil tulajdonságú molekulák, valamint az oxidatív és nitrozatív stressz során keletkező anyagok molekuláris szenzoraként tartják számon (Benemei et al. 2014).

Az eddigi áttekintésből látható, hogy elhízás hatására változás következhet be számos olyan faktor szisztémás és/vagy lokális koncentrációjában, melyek befolyásolhatják a TRPV1 és/vagy a TRPA1 receptorok működését, ezáltal pedig a trigeminovaskuláris aktivációval összefüggő folyamatokat. Az elhízás és a migrén kapcsolata mögött álló mechanizmusok tekintetében azonban további fontos szempont lehet, hogy e két receptortípus nem csak nagymértékben koexpresszáldó a szenzoros neuronok membránjában, de egyre több adat támasztja alá a működésük során létrejövő funkcionális interakciók létezését és a kereszt-szenzitizáció lehetőségét is (Akopian 2011; Salas, Hargreaves, Akopian 2009). Így tehát amennyiben bizonyos tényezők változást eredményeznek az egyik receptor aktivitásában, funkciójában, úgy indirekt módon a másik receptor működésére is hatással lehetnek (Patil, Jeske, Akopian 2010; Spahn, Stein, Zöllner 2014; Staruschenko, Jeske, Akopian 2010). A tüdőt beidegző n. vagus szenzoros idegrostjain található TRPV1 és TRPA1 receptorok egyidejű aktivációja például szinergista módon megnöveli a kiváltott válaszok mértékét (Lin et al. 2015).

Röviddel a jelen értekezésben ismertetett vizsgálataink megkezdése után két olyan közlemény is megjelent, melyek az elhízás trigeminális fájdalomérző pályára gyakorolt hatását vizsgálták (Rossi et al. 2013; Rossi et al. 2013). Mindkét kutatást Rossi és munkatársai végezték, akik így elsőként számoltak be a trigeminális neuronok aktivációjának elhízással összefüggő fokozódásáról. *In vivo* kísérleteikben a pofa területén alkalmazott kapszaicin injekció által kiváltott c-fos expresszió fokozódás szignifikáns mértékű növekedését figyelték meg magas zsírtartalmú étrend következtében elhízott egerek agytörzsi trigeminusz magjában (Rossi et al. 2013). Az általuk használt viselkedési tesztben azonban nem találtak változást az ugyanezen terület termális stimulációját követő akut válaszok tekintetében (Rossi et al. 2013). Jelen vizsgálataink befejezése után nem sokkal jelent meg

harmadik közleményük, melyben a kapszaicin által aktivált sejtek százalékos arányának növekedését és a Ca^{2+} beáramlás fokozódását írták le mind az étrend-indukált elhízott, mind pedig a leptin hiányos egerek trigeminális ganglionjában (Rossi et al. 2015). Ezek a vizsgálatok azonban nem tértek ki arra a kérdésre, hogy az elhízás milyen módon befolyásolja ezen idegrostok aktivációját követő lokális efferens válaszokat. Habár csak hipotetikusán, de Recober és Goadsby már 2010-ben felvetette a CGRP lehetséges szerepét az elhízás és a migrén kapcsolatában (Recober and Goadsby 2010). Feltételezésük szerint ugyanis az elhízás fokozott CGRP képződéshez és/vagy a CGRP hatásai iránti érzékenység fokozódásához vezethet, mely a trigeminális rendszer aktivációs küszöbének csökkenését és a rohamokat provokáló tényezők iránti fogékonyság növekedését eredményezheti.

Ha azonban az elhízás valóban képes egy olyan endogén környezetet kialakítani, mely végül a trigeminális neuronok aktivációját és az ezt követő neuropeptid felszabadulás mértékének megváltozását eredményezi, akkor további fontos kérdésként merül fel, hogy vajon történik-e változás a trigeminális nociszenzor komplex egy másik szerves komponensének, a meningeális mikrocirkulációs rendszernek az integritásában. Ugyanis a neurogén gyulladás során megfigyelhető vazodilatációnak nagy valószínűséggel fontos szerepe van a nociceptív és szövetkárosító anyagok, valamint a trigeminovaskuláris rendszer szenzitizációját elősegítő tényezők gyors és hatékony eltávolításában, a szöveti homeosztázis visszaállításában (Dux and Messlinger 2009). Migrénes egyéneknél fokozódhat a cerebrovaszkuláris betegségek kockázata (Sinclair and Matharu 2012), míg az elhízás a mikroerek diszfunkciójához vezethet (Jonk et al. 2007). A vazoreaktivitás elhízással összefüggő károsodása többek között az endothel függő értágító faktorokra történő csökkent válaszkészségben és az érszűkítő folyamatok felerősödésében nyilvánulhat meg (Jonk et al. 2007), melyek kialakulásához jelentős mértékben hozzájárulhatnak a gyulladásos folyamatok, inzulinrezisztencia és az oxidatív stressz együttese által gerjesztett komplex patofiziológiai történések (Crimi, Ignarro, Napoli 2007; Singer G. and Granger N. 2007). Az elhízás meningeális érreakciókra gyakorolt hatása azonban mind a mai napig nem ismert. A meningeális mikrocirkulációs rendszer funkciójának károsodása a keringéssel a dura materbe kerülő, vagy a lokálisan felszabaduló pronociceptív faktorok kevésbé hatékony eliminációjához vezethet, mely elősegítheti a trigeminális fájdalomérző pálya aktivitásának fokozódását.

3.8. Az elhízással összefüggő patofiziológiai elváltozások modellezése

Az elhízás és a fejfájások közötti kapcsolat hátterében álló patomechanizmusok felderítésére irányuló kísérletes vizsgálatokat ideális esetben olyan állatmodelleken kellene elvégezni, melyek a lehető legjobban modellezik azt az elhízott migrénes populációt, mely esetében a két állapot közötti kapcsolat a legerősebbnek mondható. Ez a jelenlegi ismereteink mellett sajnos nem megoldható, hiszen a témával foglalkozó epidemiológiai tanulmányok az elhízást általában valamilyen antropometriai paraméter, többnyire BMI alapján jellemezték, és nem történtek további lépések a vizsgált populáció részletes karakterizálására. Az elhízás etiológiai háttere azonban nagyon komplex, mely során a vizsgált végpontokra érdemes úgy tekinteni, mint számos tényező (befolyásolható és nem befolyásolható) jelenlétének, valamint azok dózis- és időfüggő interakciójának végeredményére (Jung and Choi 2014; Malik, Willett, Hu 2013).

Az elhízás tanulmányozására alkalmazható számos állatmodell közül az étrend-indukált elhízás módszere tűnik a legmegfelelőbbnek, mivel a nyugati típusú étrenddel összefüggő kedvezőtlen táplálkozási szokások jelentős mértékben hozzájárulnak az elhízás prevalenciájának világszintű növekedéséhez (Popkin, Adair, Ng 2012). Természetesen e csoporton belül is számos különböző változat és kombináció létezik azok minden előnyével és hátrányával. Mivel a nyugati típusú étrendre egyaránt jellemző a zsírok és a finomított szénhidrátok, egyszerű cukrok túlzott mértékű fogyasztása, valamint ezen obezitogén étrendi faktorok kombinációját különösen alkalmasnak tartják a humán elhízással összefüggő patofiziológiai eltérések modellezésére (Brown and Panchal 2011), jelen kísérleteinkben is ezt az étrendi módszert alkalmaztuk.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Alap kutatás jellegű vizsgálatainkkal hozzá kívánunk járulni az elhízás és az elsődleges fejfájástípusok közül a legnagyobb betegségterhet jelentő migrén progressziója közötti kapcsolat hátterében álló patomechanizmusok felderítéséhez. Munkánk során magas zsír és magas szacharóz (high-fat, high-sucrose, HFHS) tartalmú étrend által elhízott patkányokban modelleztük azokat a metabolikus és immunológiai változásokat, melyek az elhízott emberek szervezetére is jellemzőek lehetnek. *In vivo* és *ex vivo* kísérleteket végeztünk annak eldöntésére, hogy az elhízás befolyásolhatja-e a trigeminovaskuláris rendszer aktivációjával összefüggő neuropeptid felszabadulást és a dura mater encephali perfúziós viszonyait, melyek diszfunkciója potenciálisan hozzájárulhat a trigeminális fájdalomérző pálya aktivitásának elhízással összefüggő fokozódásához.

Munkánk során az alábbi kérdéskörök vizsgálatára koncentráltunk:

1. Történik-e változás a meningeális erek vazomotor működésében, valamint a TRPV1 és a TRPA1 receptorok aktivációját követő neurogén szenzoros érreakciókban?
2. Befolyásolja-e az elhízás a fejfájások patogenezisében és a lokális regulatorikus működésekben egyaránt kulcsfontosságúnak tekintett CGRP tartalmú meningeális afferensek funkcióját, különös tekintettel a perifériás idegvégződésekből történő spontán, valamint kálium-klorid által kiváltott CGRP felszabadulásra?
3. Megvizsgáltuk, hogy az elhízás hatással van-e a meningeális kemoszenzitív nociceptorok TRPV1 és TRPA1 ioncsatornákat expresszáló populációjának válaszkészségére?
4. A funkcionális eltérések tanulmányozásán túl szemikvantitatív vizsgálatokat végeztünk a kemoszenzitív meningeális afferensek elhízással összefüggő változásainak kimutatására. Dura mater totálpreparátumban immunhisztokémiai festéssel azonosítottuk a TRPV1 receptort expresszáló és a CGRP-t tartalmazó idegrostokat, majd vizsgáltuk azok megoszlását és morfológiai jellemzőit, továbbá meghatároztuk a TRPA1 receptor fehérje expresszióját a trigeminális ganglionban.

5. A trigeminovaskuláris rendszer működésére vonatkozó megfigyeléseinket kiegészítettük az általunk alkalmazott magas zsír és magas szacharóz tartalmú étrend táplálékfelvételre, testsúlyra, zsírszövet mennyiségére és a máj tömegére gyakorolt hatásának jellemzésével. Vizsgáltuk továbbá a glükóz és inzulin homeosztázisban, valamint a szisztémás gyulladásos folyamatokban bekövetkező változásokat.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Etikai engedélyek

Vizsgálatainkat a Debreceni Egyetem és a Szegedi Tudományegyetem helyi Állatkísérletes Bizottságainak engedélyével, valamint etikai irányelveinek betartásával végeztük. Figyelembe vettük továbbá az Európai Parlament 2010/63/EU sz. direktívájában megfogalmazott előírásokat.

5.2. Étrend-indukált elhízás állatmodellje

5.2.1. Kísérleti állatok és étrendi kezelés

Vizsgálatainkhoz hím Sprague-Dawley patkányokat (Charles-Rivers Laboratories, Isaszeg, Magyarország) használtunk. Az állatokat 6 hetes korukban random módon kontroll és kezelt csoportba osztottuk, majd 20 héten keresztül standard állatházi körülmények között tartottuk (22 ± 2 °C, 50-70%-os relatív páratartalom, 12 óránként változó világos/sötét periódusok). A kontroll csoport standard laboratóriumi tápot (3,20 kcal/g, 59% szénhidrát, 32% fehérje, 9% zsír; termék kód: S8106-S011 SM R/M-Z+H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Németország) és csapvizet kapott. Az elhízás kiváltása céljából a kezelt csoport tagjai magas zsír és magas szacharóz tartalmú étrendben részesültek, melyet zsírdús táp (4,56 kcal/g, 35% szénhidrát, 20% fehérje, 45% zsír; termék kód: 824018, Special Diets Services, Nagy-Britannia) és 5% szacharóz tartalmú csapvíz alkotott. Rendszeresen mértem az *ad libitum* táp- és folyadékfogyasztást, valamint az állatok testsúlyában bekövetkező változást. A kísérletek elvégzésére a 20 hetes étrendi kezelést követően került sor.

5.2.2. Inzulinérzékenység vizsgálata

5.2.2.1. Hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp

A teljes test inzulinérzékenység meghatározásához az erre szolgáló „gold standard” eljárást, a hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp (HEGC) módszert alkalmaztuk (Peitl et al. 2010). Éjszakai éheztetést követően az állatokat intraperitoneálisan (ip.) adott thiopentállal (100 mg/kg, Thiopental Sandoz, Sandoz GmbH, Ausztria) altattuk, majd trachea kanül behelyezésével biztosítottuk a szabad légutakat. Ezt követően egy-egy polietilén kanült vezetünk be a jobb- és baloldali vena jugularisba inzulin (Humulin R 100NE/ml, Lilly PLC,

USA), valamint glükóz (Glükóz 20%, TEVA Zrt., Magyarország) infúzió számára, melyeket infúziós pumpák segítségével adagoltunk a kísérletek során. A műtéti eljárás zárásaként kanült helyeztünk a jobb oldali arteria carotis communisba mintavételezés céljából. A testhőmérsékletet rektális hőmérő és fűthető műtőasztal segítségével tartottuk fiziológias tartományban (37,0 - 37,5 °C). Rövid stabilizációs időszakot követően megkezdtük az inzulininfúzió állandó sebességgel történő adagolását (3 mU/kg/perc). A normoglikémiás állapot ($5,5 \pm 0,5$ mmol/l) megtartása érdekében az inzulin hipoglikémizáló hatását a glükóz infúzió sebességének változtatásával kompenzáltuk a 10 percnként mért vércukorértékek alapján. Az aktuális vércukorszinteket az artériás kanülon át vett vérmintákból (~5 µl) vércukormérő készülékkel (Accu-Check Active, Roche Diagnostics GmbH, Németország) határoztuk meg. A teljes test inzulinérzékenységet az egyensúlyi állapot során mért átlagos glükóz infúziós sebességgel (glükóz infúziós ráta, GIR, mg/kg/perc) jellemeztük. Az egyensúlyi állapot jellemzően a HEGC megkezdését követő 90-100. perc környékén alakul ki, melyet a vércukorértékek legalább 20 percig tartó normoglikémiás tartományban történő stabilizálódása jelez változatlan glükóz infúziós sebesség mellett. A plazma inzulinszintek meghatározása céljából vérmintákat (0,1 ml) gyűjtöttünk antikoaguláns (40 µl K3-EDTA) tartalmú csövekbe (Eppendorf, Eppendorf AG, Németország) a HEGC megkezdése előtt és az egyensúlyi állapot során. A minták centrifugálását (10000 g, 2 perc, 4 °C) követően a felülúszót eltávolítottuk és -70 °C-on tároltuk. A méréseket Dr. Peitl Barna szakmai felügyelete mellett önállóan végeztem.

5.2.2.2. *HOMA-IR és QUICKI index*

Az inzulinérzékenység további jellemzése érdekében elvégeztük az inzulinrezisztencia index (homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR) és a kvantitatív inzulinérzékenységi index (quantitative insulin sensitivity check index, QUICKI) számítását, melyekhez a HEGC vizsgálat és a gyulladáscsökkentő citokinek plazmakoncentrációjának mérésére irányuló kísérleteink során nyert vérmintákból meghatározott éhgyomri vércukor és plazma inzulin értékeket használtuk. A HOMA-IR index számításához elosztottam az éhgyomri vércukor (mmol/l) és az éhgyomri plazma inzulinszintek (µU/ml) szorzatát 22,5-del (Antunes et al. 2016; Cacho et al. 2008; Matthews et al. 1985), míg a QUICKI index kalkulációjához az alábbi képletet alkalmaztam: $QUICKI = 1/[\log \text{ éhgyomri vércukor (mg/dl)} + \log \text{ éhgyomri plazma inzulin (µU/ml)}]$ (Katz et al. 2000).

5.2.3. Gyulladásos citokinek plazmakoncentrációjának meghatározása

Éjszakai éheztetést követően az állatokat thiopentállal (100 mg/kg, ip.) altattuk, majd vérvétel céljából polietilén kanült vezetünk a jobb oldali arteria carotis communisba. Rövid stabilizációs periódust követően meghatároztuk az éhgyomri vércukorértéket (Accu-Check Active, Roche Diagnostics GmbH, Németország), majd vérmintákat gyűjtöttünk antikoagulánst (40 µl K3-EDTA) tartalmazó csövekbe (Eppendorf, Eppendorf AG, Németország). A minták centrifugálását (10000 g, 2 perc, 4 °C) követően a felülúszót elválasztottuk, majd -70 °C-on tároltuk a TNF α , IL-1 β és IL-6 gyulladásos citokinek, valamint az inzulin plazmakoncentrációjának meghatározásáig. A TNF α , IL-1 β (mindkettő: Thermo Scientific, USA) és IL-6 (Life Technologies, USA) koncentrációk mérése enzyme-linked immunoassay (EIA) módszerrel történt a gyártók által biztosított útmutatók alapján. Az inzulinszintek meghatározását immunoradiometric assay (IRMA) módszerrel végeztük, kereskedelmi forgalomban kapható inzulin IRMA kit (Izotóp Intézet Kft., Magyarország) segítségével. A mintavételt önállóan végeztem, a citokinek plazmakoncentrációját Dr. Pázmándi Kitti és Dr. Bácsi Attila, az inzulinszinteket Dr. Németh József határozta meg.

5.2.4. Zsírszövet mennyiségének és a máj tömegének mérése

A kísérletek végén a kontroll és HFHS diétán tartott állatok túlaltatását követően (thiopentál 250 mg/kg, i.p.) eltávolítottam az intraabdominális és az epididimális fehér zsírövet, majd az adipozitás mértékét a zsírpárnák abszolút tömegében, valamint azok össztömegének testtömeghez viszonyított százalékos arányában (adipozitás index) határoztam meg. Végezetül mindkét csoport esetében eltávolítottam a kísérleti állatok máját, majd összehasonítottam azok abszolút tömegét.

5.3. Trigeminalis nociceptorok funkcionális állapotának jellemzése

5.3.1. Meningeális érreakciók vizsgálata in vivo

A meningeális vérátáramlásban bekövetkező változásokat a Kurosawa és munkatársai által leírt nyitott koponya-ablak módszerrel vizsgáltuk (Kurosawa et al. 1995). Az állatok a thiopentállal (150 mg/kg, ip.) történő anesztéziát követően a kísérlet ideje alatt trachea kanülön keresztül spontán lélegeztek. Az artériás középnyomást az arteria femoralisba vezetett és transzducer közbeiktatásával manométerhez csatlakoztatott kanül segítségével

monitoroztuk. A testhőmérsékletet elektromos melegítőpárnával 37,0 - 37,5 °C között tartottuk, melyet rektális hőmérővel ellenőriztünk. A kísérletek során folyamatosan ügyeltünk a megfelelő mélységű anesztézia fenntartására, melyet szükség esetén további thiopentál injekciókkal (25 mg/kg, ip.) biztosítottunk. Az állatok fejét sztereotaxiás készülékben rögzítettük, a parietális koponyacsont egy 4 × 6 mm-es területének eltávolításával feltártuk a dura matert, majd pH 7,4-es szintetikus intersticiális folyadékkal (SIF) fedtük be, melynek összetétele a következő volt: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 10 mM glükóz és 10 mM Hepes. A véráramlást az AMM kortikális artériáktól távol eső ágai fölött lézer Doppler áramlásmérővel mértük (Perimed, Svédország). A vérátáramlást 1 Hz mintavételi frekvenciával Perisoft program (Perimed, Svédország) segítségével regisztráltuk, értékeit perfúziós egységekben fejeztük ki. A stimuláló anyagokat mikropipetta segítségével 40 µl térfogatban juttattuk a dura mater felszínére, majd 5 perc múlva eltávolítottuk. A véráramlás-értékek kiindulási szintre történő visszatéréséig a durát SIF-kal fedtük. A szabaddá tett dura mater kémiai ingerléséhez kapszaicint (100 nM és 10 µM) és akroleint (50, 100 és 300 µM) használtunk. Az akrolein (300 µM) meningeális érreakciókra gyakorolt hatását a TRPA1 receptor antagonist HC-030031-gyel (50 µM) történő előkezelést követően is meghatároztuk. Az akrolein hatásmechanizmusát a dura mater CGRP receptor antagonist CGRP₈₋₃₇ peptiddel (100 µM) történő előkezelését követő akrolein (300 µM) applikációval vizsgáltuk. Az antagonistákat közvetlenül a kémiai stimulációt megelőzően 5 perc időtartamra juttattuk a dura mater felszínére. Az AMM reaktivitását a CGRP (100 µM) és a hisztamin (100 µM) véráramlást fokozó hatásának mérésével teszteltük. Az akrolein, CGRP, hisztamin és CGRP₈₋₃₇ SIF-ban történő oldását, valamint a megfelelő koncentrációra történő hígítását közvetlenül a felhasználás előtt végeztük el. A kapszaicint 32 mM-os, 6% etanolt és 8% Tween80-at tartalmazó törzsoldatból, a HC-030031-et 10 mM-os dimetil-szulfoxiddal készült oldatból hígítottuk a szükséges koncentrációra szintén SIF segítségével. A vizsgálati anyagokat a HC-030031 kivételével (Tocris, Egyesült Királyság) a Sigma-Aldrich Chemie GmbH-től (Németország) vásároltuk. A meningeális alapáramlás értékét a vizsgálandó anyag applikációja előtti 3 perces időintervallum alatt mért átlagértékek adták. A kémiai stimulus hatására bekövetkező véráramlás változásokat az alapáramlás százalékában tüntettük fel, mely során az applikációs periódus alatt megfigyelt maximális mértékű véráramlás változás 1 perces időintervallumának átlagértékét vagy az applikációs időszak percenkénti értékeit hasonlítottuk az alapáramláshoz. A kísérletek végén az állatokat thiopentállal (250 mg/kg, i.p.) túlaltattuk. A méréseket Dr. Dux Mária szakmai felügyelete mellett önállóan végeztem.

5.3.2. CGRP felszabadulás mérése ex vivo

A CGRP felszabadulást *ex vivo* dura mater preparátumon mértük az Ebersberger és munkatársai által leírt módon (Ebersberger et al. 1999). Az állatokat thiopentállal (150 mg/kg, ip.) altattuk, majd dekapitáltuk. A koponyát a külső felszín megtisztítása után a középvonal mentén kettévágtuk és az agyféltekéket eltávolítottuk. Az intakt dura materrel fedett preparátumokat 30 percre oxigénnel (95%) és szén-dioxiddal (5%) átáramoltatott SIF-ba helyeztük. A méréseket 37 °C-on végeztük. A koponyagödröket 300 µl SIF-kal töltöttük fel. A koponyafelekből mikropipetta segítségével 5 percenként mintát gyűjtöttünk CGRP meghatározás céljából. A nyugalmi CGRP felszabadulás mértékét a dura mater SIF-kal történő átmosását követően nyert mintából határoztuk meg. Az ezt követő inkubációs periódusokban a dura matert kapszaicinnel (10 és 100 nM), akroleinnel (10, 50, 100 és 300 µM) vagy kálium-kloriddal (KCl, 60 mM) stimuláltuk. Kontroll állatokban vizsgáltuk a HC-030031-gyel (50 µM) történő előkezelés hatását az akrolein (300 µM) által kiváltott CGRP felszabadulás mértékére. A gyűjtött mintákat (100 µl) EIA puffert (25 µl) tartalmazó Eppendorf csövekbe gyűjtöttük, majd további felhasználásig -70 °C-on tároltuk. A CGRP koncentráció meghatározása EIA módszerrel történt, patkány CGRP-re specifikus EIA kit segítségével (Bertin Pharma, Franciaország) 1 pg/ml-es minimális detekciós küszöb mellett. A reakció végtermék fotometriásan mért koncentrációját, mely arányos a minták CGRP koncentrációjával, Dynex MRX microplate reader (Dynex Technologies GmbH, Németország) segítségével határoztuk meg. A méréseket Dr. Dux Mária szakmai felügyelete mellett önállóan végeztem.

5.3.3. CGRP és TRPV1 kettős immunhisztokémiai festés dura mater totálpreparátumon

A thiopentállal (150 mg/kg, ip.) altatott állatokat fiziológiás sóoldattal (150 ml), majd 0,1 M foszfát-pufferben (pH 7,4) oldott 4%-os paraformaldehid oldattal (500 ml) transzkardiálisan perfundáltuk, majd dekapitáltuk. A külső felszín megtisztítása után a koponyát a középvonal mentén kettévágtuk és az agyféltekéket eltávolítottuk. A koponyagödrök parietális területéről eltávolítottuk az AMM ágait és a környező idegrostokat is tartalmazó dura matert, majd 2 órán keresztül utófixáltuk a perfúzióhoz is használt fixáló oldatban. A TRPV1- és CGRP-immunreaktív képleteket indirekt immunfluoreszcens festéssel azonosítottuk. A dura mater totálpreparátumokat 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk TRPV1 ellen nyúlban termeltetett poliklonális antitesttel (Alomone Laboratories, Izrael), valamint monoklonális egér anti-CGRP antitesttel (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Németország) 1:500

hígításokban. Foszfát-pufferrel történő mosást követően a preparátumokat 1:500 hígítást alkalmazva 2 órán keresztül inkubáltuk Cy3- illetve DL488-konjugált másodlagos antitestekkel (mindkettő: Jackson Immunoresearch Laboratories, USA). A dura mater totálpreparátumokról konfokális fluoreszcens mikroszkóppal (ZEISS LSM 700, Németország) készítettünk felvételeket. Az immunhisztokémiai festést Dr. Dux Mária felügyelete mellett végeztem. A preparátumokról Oszlács Orsolya készített mikroszkópos felvételeket.

5.3.4. TRPA1 fehérje expressziója a trigeminális ganglionban

A TRPA1 fehérje expresszióját western blot analízissel határoztuk meg. Éjszakai éheztetést követően az állatokat thiopentállal (150 mg/kg, ip.) altattuk, majd dekapitáltuk. A trigeminális ganglionokat eltávolítottuk, majd proteáz inhibitor koktéllal (Sigma-Aldrich, USA) és 1 mM phenylmethylsulfonyl fluorid-dal (Sigma-Aldrich, USA) szupplementált NP40 sejtlízis pufferben (Thermo Fisher Scientific, USA) homogenizáltuk kézi homogenizátor (Sigma-Aldrich, USA) segítségével. A homogenizátumokat 2×10 perces szonikálást követően 2 órán keresztül 4 °C-on ráztuk, majd centrifugáltuk (13680 g, 20 perc, 4 °C). A felülúszó fehérjetartalmának meghatározásához BCA Protein Assayt (Thermo Fisher Scientific, USA) használtunk. A teljes sejt lizátumokat (40 - 50 µg fehérje) redukáló közegben 10%-os poliakrilamid gélen elektroforetizáltuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. A membránokat nyúlban termeltetett anti-β-aktin antitesttel (1:1000, Cell Signalling Technology, USA) és anti-TRPA1 antitesttel (1:2500, Alomone Labs, Israel) inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán át. Ezt követően a membránokat szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk torma peroxidázzal konjugált, számarban termeltetett anti-nyúl IgG másodlagos antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:5000 hígításban. A vizualizálást SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA) használatával végeztük Gel Logic 1500 Imaging System készülék (Kodak, Japán) segítségével. A mintavételt önállóan végeztem, a TRPA1 fehérje expresszióját Dr. Varga Angelika határozta meg.

5.4. Statisztikai kiértékelés

Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel. A statisztikai elemzés Statistica 12 (StatSoft, USA) szoftverrel történt. A CGRP és citokin koncentrációk, a véráramlás, a TRPA1 fehérje expresszió, a táp- és folyadékfogyasztás, valamint az energiabevitel statisztikai kiértékeléséhez Student t-tesztet ($n \geq 10$) és Mann-Whitney U-tesztet ($n < 10$)

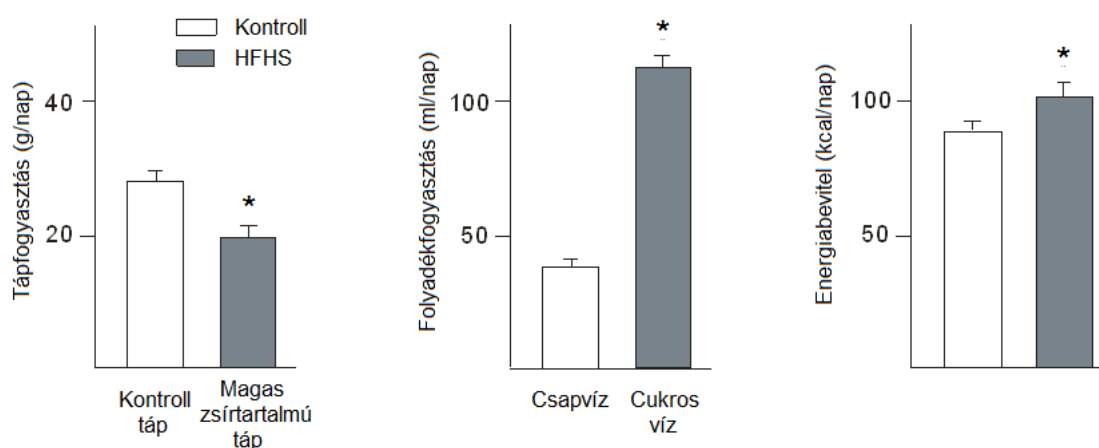
használtunk. A többi paraméter esetében Bonferroni-féle *post hoc* módosítással kiegészített egyszempontos varianciaanalízist (One-Way ANOVA) alkalmaztunk. Az átlagértékek különbségeit akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha $p < 0,05$ volt. A statisztikai kiértékelést önállóan végeztem.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Étrend-indukált elhízás állatmodell jellemzése

6.1.1. Étrendi kezelés hatása a táp- és folyadékfogyasztásra, valamint az energiabevitelre

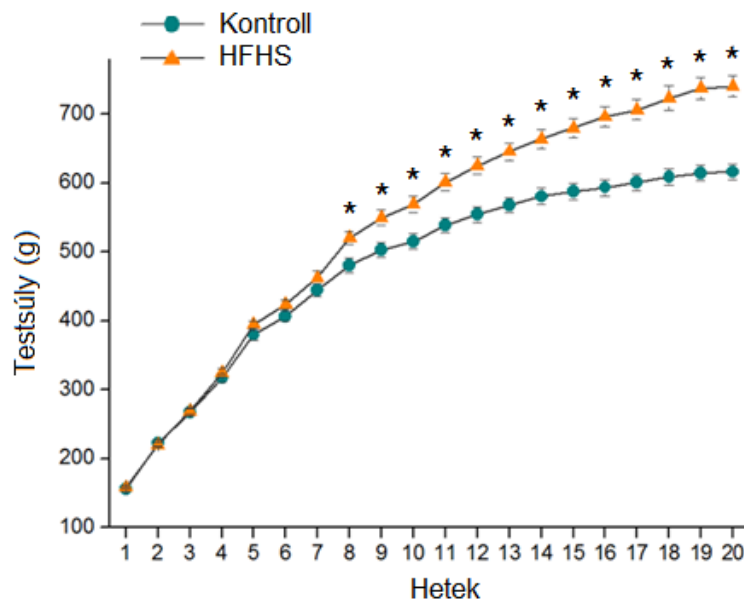
A magas zsír és magas szacharóz tartalmú étrenden tartott állatok szignifikánsan kevesebb tápot ($28,5 \pm 0,4$ vs. $18,4 \pm 0,2$ g/nap, $p < 0,001$, $n = 17-17$) és több folyadékot ($39,7 \pm 0,5$ vs. $125,9 \pm 1,8$ ml/nap, $p < 0,001$, $n = 17-17$) fogyasztottak, mint a kontroll csoport. A zsírdús táp magasabb energiatartalma, valamint a cukros vízből származó többlet kalóriabevitel miatt az obezitogén étrend szignifikánsan magasabb átlagos napi energiabevitelt ($90,7 \pm 1,7$ vs. $110,1 \pm 1,2$ kcal/nap, $p < 0,001$, $n = 17-17$) eredményezett a kontroll csoporthoz viszonyítva (**8. ábra**).



8. ábra. A kontroll, valamint a magas zsír és magas szacharóz tartalmú (HFHS) étrenden tartott állatok átlagos napi tápfogyasztása, folyadékfogyasztása és energiabevitel. *Statistikailag szignifikáns különbség a kontroll csoportban mért értékekhez képest.

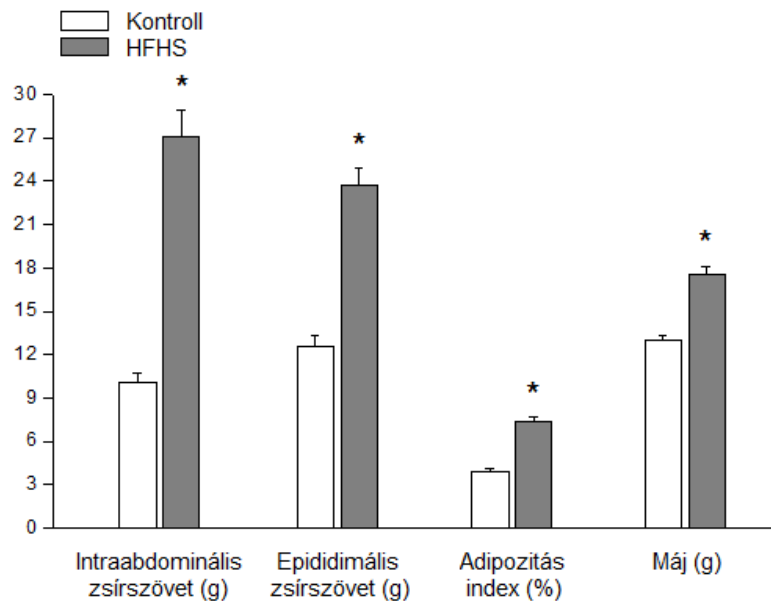
6.1.2. A testsúly, a zsírszövet mennyiségének és a máj tömegének változása

Az étrendi kezelés kezdetekor nem volt szignifikáns különbség a kontroll és a kezelt csoport átlagos testsúlyában (155 ± 3 vs. 158 ± 2 g, $p = 0,48$, $n = 17-17$). A 20. hét végére azonban a magas zsír és magas szacharóz tartalmú étrenden lévő állatok testsúlya szignifikánsan meghaladta a kontroll csoportra jellemző értékeket (616 ± 11 vs. 740 ± 15 g, $p < 0,001$). A kontroll és a kezelt csoport testsúlyában megfigyelhető különbség a 8. héttől vált szignifikánssá ($p < 0,01$), mely ezt követően az étrendi kezelés végéig megmaradt (**9. ábra**).



9. ábra. A testsúlyváltozás alakulása a kontroll, valamint a HFHS étrendi kezelésben részesülő állatok esetében. *Statistikailag szignifikáns különbség a kontroll csoportban mért értékekhez képest.

A zsírdús táp és a cukros víz fogyasztása az intraabdominális ($10,09 \pm 0,64$ vs. $27,09 \pm 1,84$ g, $p < 0,001$, $n = 22-23$) és az epididimális ($12,59 \pm 0,70$ vs. $23,73 \pm 1,15$ g, $p < 0,001$, $n = 22-23$) zsírszövet mennyiségének, valamint a teljes zsírszövet testtömeghez viszonyított százalékos arányának ($3,93 \pm 0,16$ vs. $7,35 \pm 0,3$ %, $p < 0,001$, $n = 22-23$) növekedéséhez vezetett, mely a máj megnagyobbodásával is együtt járt ($13 \pm 0,36$ vs. $17,53 \pm 0,59$ g, $p < 0,001$, $n = 22-23$) (**10. ábra**).



10. ábra. Az intraabdominális és az epididimális zsírszövet abszolút tömege, a teljes zsírszövet testsúlyhoz viszonyított aránya (adipozitás index) és a máj tömege a kontroll, valamint a HFHS étrendi csoportok esetében a 20. hét végén. *Statistikailag szignifikáns különbség a kontroll csoportban mért értékekhez képest.

6.1.3. A glükóz és az inzulin homeosztázis károsodása

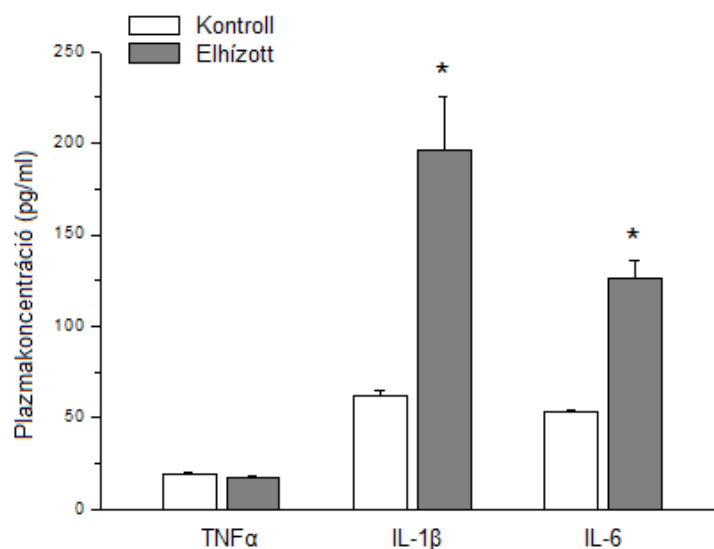
A glükóz és az inzulin homeosztázisban bekövetkező változásokra az éhgyomri vércukor- és inzulinszintek alakulásából, az ezekből számolt HOMA-IR és QUICKI indexekből, valamint a HEGC egyensúlyi állapota során mért glükóz infúziós rátából (GIR) következtettünk. A magas zsír és magas szacharóz tartalmú étrend által kiváltott elhízás az éhgyomri vércukorérték enyhe, ugyanakkor szignifikáns emelkedéséhez vezetett ($p < 0,01$, $n = 22-23$), mellyel párhuzamosan az éhgyomri inzulinkoncentráció jelentős mértékű növekedése is megfigyelhető volt ($p < 0,001$, $n = 22-23$). Az étrend-indukált elhízott állatok mindemellett szignifikánsan magasabb HOMA-IR indexszel ($p < 0,001$, $n = 22-23$), alacsonyabb QUICKI értékkel ($p < 0,001$, $n = 22-23$) és csökkent glükóz infúziós rátával ($p < 0,05$, $n = 5-5$) rendelkeztek (**1. táblázat**).

	Kontroll	Elhízott
Éhgyomri vércukorszint (mmol/l)	5,61 ± 0,13	6,31 ± 0,19*
Éhgyomri inzulinszint (μU/ml)	18,05 ± 1,68	43,08 ± 4,36*
HOMA-IR	4,49 ± 0,44	12,53 ± 1,59*
QUICKI	0,31 ± 0,004	0,28 ± 0,004*
GIR (ml/kg/perc)	9,66 ± 1,35	4,60 ± 1,34*

1. táblázat. Az éhgyomri vércukor- és inzulinszintek, az inzulinrezisztencia-index (HOMA-IR), a kvantitatív inzulinérzékenységi index (QUICKI) és a glükóz infúziós ráta (GIR) alakulása étrend-indukált elhízás hatására. *Statistikailag szignifikáns különbség a kontroll csoportban mért értékekhez képest.

6.1.4. A gyulladásos citokinek plazmakoncentrációjának változása

A magas zsír és magas szacharóz tartalmú étrend által kiváltott elhízás eltérő módon befolyásolta a vizsgált gyulladásos mediátorok szisztémás keringésben mérhető koncentrációját. Elhízott állatokban jelentős mértékű növekedés volt megfigyelhető az IL-1 β ($61,63 \pm 3,67$ vs. $195,87 \pm 29,57$ pg/ml, $p < 0,001$, $n = 17-18$) és az IL-6 plazmaszintjében ($53,21 \pm 1,33$ vs. $126,27 \pm 9,74$, $p < 0,001$, $n = 17-18$), a TNF α koncentrációjában azonban nem következett be érdemi változás ($19,03 \pm 1,22$ vs. $16,87 \pm 1,43$ pg/ml, $p = 0,26$, $n = 9-9$) (**11. ábra**).



11. ábra. Étrend-indukált elhízás hatása a tumor nekrosis faktor α (TNF α), az interleukin-1 β (IL-1 β) és az interleukin-6 (IL-6) gyulladásos citokinek plazma koncentrációjára. *Statistikailag szignifikáns különbség a kontroll csoportban mért értékekhez képest.

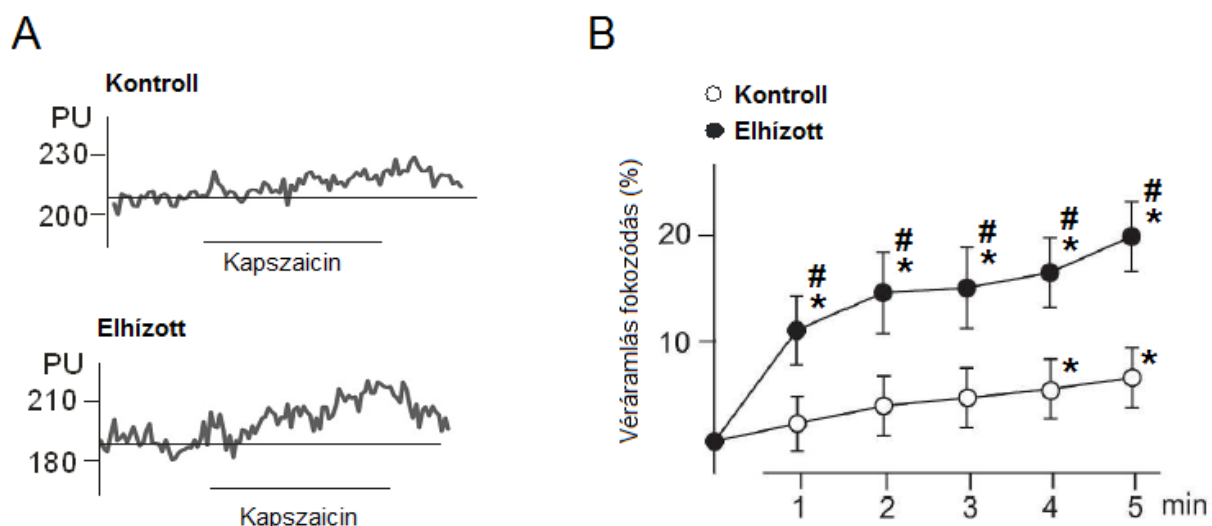
6.2. Étrend-indukált elhízás hatása a trigeminovaszkuláris rendszer működésére

6.2.1. *A meningeális vazoreaktivitásban és a szenzoros neurogén érreakciókban bekövetkező változások*

A lézer Doppler áramlásmérővel az AMM ágai fölött mért perfúziós értékek nem különböztek szignifikáns mértékben a kontroll és az elhízott állatok esetében ($226,1 \pm 20,29$ vs. $214,4 \pm 20,1$ PU, $p = 0,96$). Szintén nem találtunk érdemi különbséget a kontroll és az elhízott állatok átlagos vérnyomásértékeiben (128 ± 17 vs. 134 ± 13 Hgmm, $p = 0,96$), habár azok enyhén magasabbak voltak a korábban, hasonló kísérletes körülmények között regisztrált értékeknél (Dux, Sántha, Jancsó 2003). A dura mater felszínére applikált anyagok sem a kontroll, sem az elhízott állatokban nem befolyásolták a szisztémás vérnyomás értékeit.

6.2.1.1. *Kapszaicin-szenzitív neurogén vazodilatáció*

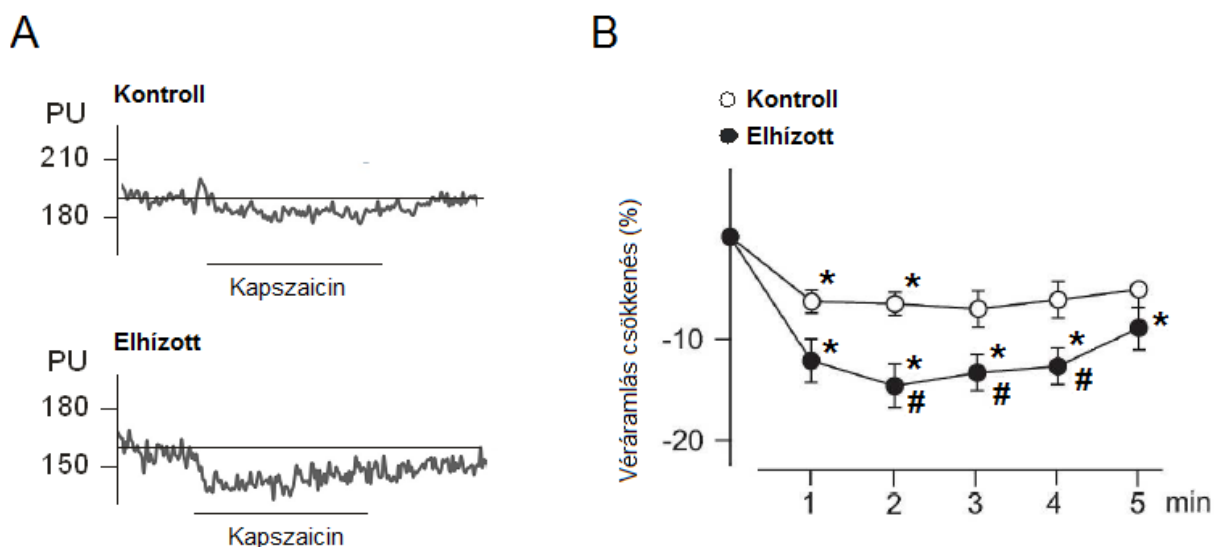
A dura mater TRPV1 receptorokat expresszáló kemoszenzitív neuronpopulációjának szelektív kémiai ingerléséhez 100 nM koncentrációjú kapszaicin oldatot használtunk. Az alkalmazott stimulus a kontroll állatok esetében a meningeális véráramlás mérsékelt fokozódásához vezetett, mely az 5 perces applikációs periódus utolsó két percében elérte a statisztikailag szignifikáns szintet ($p = 0,048$ és $p = 0,035$, $n = 8$). Az étrend-indukált elhízás a kapszaicin által kiváltott vazodilatáció jelentős mértékű fokozódását eredményezte. Elhízott állatokban a 100 nM-os kapszaicin oldat az applikáció teljes időtartama alatt szignifikáns véráramlás növekedést okozott ($p \leq 0,023$, $n = 9$), melynek mértéke az utolsó perc esetében elérte a $20 \pm 3,1$ %-ot, jelentősen meghaladva ($p \leq 0,049$) a kontroll mérések ugyanezen időpontjában regisztrált értéket ($6,1 \pm 2,3$ %) (**12. ábra**).



12. ábra. A kapszaicin (100 nM) topikális applikációja által kiváltott meningeális véráramlás fokozódás. Eredeti regisztrátumok (A) és a kapszaicin véráramlásra gyakorolt hatásának statisztikai kiértékelése során kapott eredmények (B). *Statisztikailag szignifikáns különbség az alapáramláshoz viszonyítva. #Statisztikailag szignifikáns különbség a kontroll csoportban mért értékekhez képest.

6.2.1.2. A kapszaicin vazokonstriktor hatása

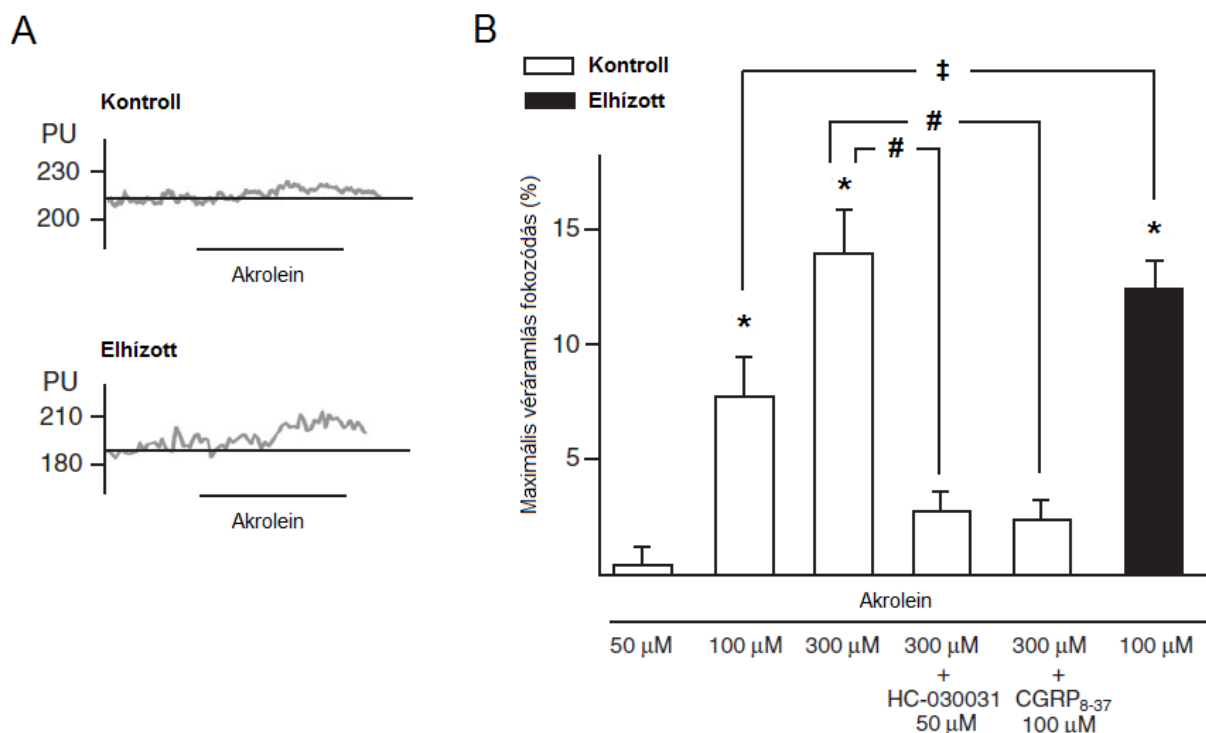
A 10 μ M-os kapszaicin oldat dura mater felszínére történő juttatása mindkét állatcsoport esetében a meningeális véráramlás azonnali csökkenéséhez vezetett, ugyanakkor az étrend-indukált elhízás együtt járt a kapszaicin vazokonstriktor hatásának jelentős erősödésével. A kontroll csoportban ($n = 6$) a véráramlás csökkenés mértéke $4,7 \pm 2,7$ és $2,7 \pm 2,5$ % között változott, mely az első két perc során elérte a statisztikailag szignifikáns szintet ($p \leq 0,048$). Elhízott állatokban ($n = 6$) a kapszaicin az alapáramlás $14,5 \pm 2,9$ és $8 \pm 2,8$ % közötti csökkenését eredményezte, melynek mértéke a teljes applikációs periódus során szignifikánsnak adódott, továbbá a második, harmadik és negyedik percben is szignifikánsan meghaladta a kontroll csoportra jellemző értékeket ($p \leq 0,037$) (13. ábra).



13. ábra. A kapszaicin (10 μ M) topikális applikációja által kiváltott meningeális véráramlás csökkenés. Eredeti regisztrátumok (A) és a kapszaicin véráramlásra gyakorolt hatásának statisztikai kiértékelését követően kapott eredmények (B). *Statisztikailag szignifikáns különbség az alapáramláshoz viszonyítva. #Statisztikailag szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz képest.

6.2.1.3. Akrolein által kiváltott véráramlás fokozódás

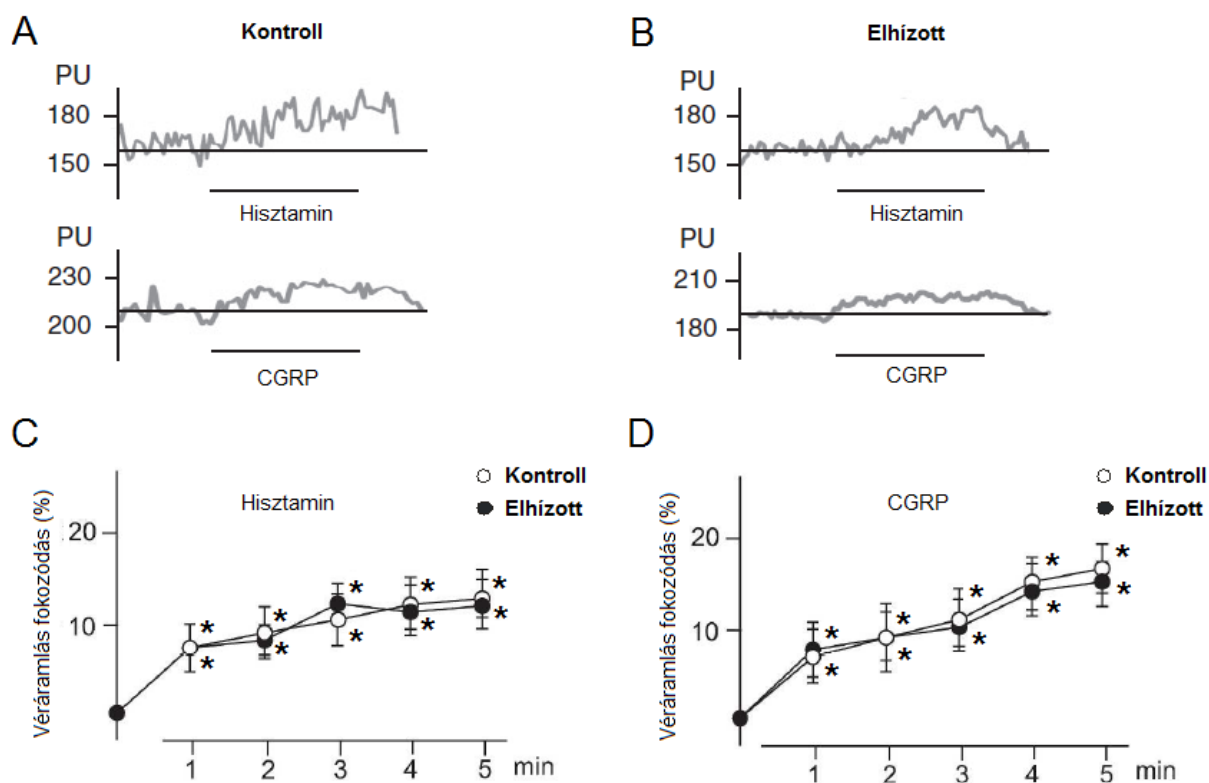
Az elhízás TRPA1-mediált szenzoros neurogén vazodilatációra gyakorolt hatását a dura mater akroleinnel történő stimulációját követő maximális véráramlás fokozódás mérésével vizsgáltuk. Kontroll állatokban az 50 μ M-os akrolein oldat hatástalannak bizonyult ($0,35 \pm 0,94$ %, $p = 0,71$, $n = 10$), míg a 100 μ M-os ($7,7 \pm 1,4$ %, $p < 0,001$, $n = 10$) és a 300 μ M-os ($14,4 \pm 2,3$ %, $p < 0,001$, $n = 12$) koncentrációk alkalmazása a meningeális véráramlás szignifikáns és dóziszfüggő fokozódásához vezetett. TRPA1 antagonistá HC-030031 (50 μ M) előkezelés kivédte az akroleinnel (300 μ M) történő stimulációt követő véráramlás növekedést ($2,05 \pm 1,2$ %, $p = 0,001$, $n = 8$). A CGRP receptor antagonistá CGRP₈₋₃₇ (100 μ M) hasonlóan blokkolta az akrolein (300 μ M) véráramlás-fokozó hatását ($1,9 \pm 1,2$ %, $p = 0,001$, $n = 8$). Az akrolein (100 μ M) topikális applikációja az elhízott állatokban is jelentős véráramlás fokozódást eredményezett ($13,1 \pm 2,2$ %, $p < 0,001$, $n = 9$), melynek mértéke szignifikánsan meghaladta a kontroll csoport esetében mért értéket ($p = 0,049$) (**14. ábra**).



14. ábra. Az akrolein topikális applikációja által kiváltott meningeális véráramlás fokozódás. Eredeti regisztrátumok 100 μ M-os akroleinnel történő stimulációt követően (A) és a különböző koncentrációjú akrolein oldatok maximális véráramlás-fokozó hatásának statisztikai kiértékelését követően kapott eredmények, kiegészítve a HC-030031 és a CGRP₈₋₃₇ előkezelés akrolein által kiváltott vazodilatációra gyakorolt hatásával (B). *Statisztikailag szignifikáns különbség az alapáramláshoz viszonyítva. #Statisztikailag szignifikáns különbség a 300 μ M-os akrolein hatásához képest. ‡Statisztikailag szignifikáns különbség a kontrollhoz viszonyítva.

6.2.1.4. Endothel- és simaizom függő relaxáció

A meningeális erek reaktivitásában étrend-indukált elhízás hatására kialakuló változásokat a direkt értágító hatású CGRP és hisztamin 100 μ M-os koncentrációban történő applikációjával vizsgáltuk. A hisztamin kontroll állatokban $7,1 \pm 2,3$ és $11,6 \pm 2$ %, elhízott állatokban pedig $7,1 \pm 1,6$ és $11,3 \pm 2,1$ % közötti véráramlás változásokat indukált az 5 perces applikáció egyes perceire számítva. A perfúzió alapáramláshoz viszonyított szignifikáns növekedését mértük mindkét állatcsoportban az applikáció teljes időtartama alatt ($p \leq 0,015$ és $p \leq 0,035$, $n = 8-8$). CGRP hatására kontroll állatokban $6 \pm 1,7$ és $14,7 \pm 3,6$ %, elhízottakban pedig $7,4 \pm 2,7$ és $13,6 \pm 3,6$ % közötti véráramlás fokozódást mértünk, melynek mértéke az applikáció teljes időtartama alatt szignifikánsan meghaladta az alapáramlást ($p \leq 0,015$ és $p \leq 0,035$, $n = 8-10$). A kontroll és az elhízott állatcsoportok között azonban sem a hisztamin ($p \leq 0,98$), sem a CGRP ($p \leq 0,92$) esetében nem volt különbség a véráramlás változás mértékében (**15. ábra**).



15. ábra. A hisztamin (100 μ M) és a CGRP (100 μ M) topikális applikációja által kiváltott meningeális véráramlás változás. Eredeti regisztrátumok (A és B), valamint a hisztamin (C) és a CGRP (D) véráramlásra gyakorolt hatásának statisztikai kiértékelését követően kapott eredmények. *Statisztikailag szignifikáns különbség az alapáramláshoz viszonyítva.

6.2.2. A dura mater afferens idegrostjaiból történő nyugalmi- és kémiai stimulációt követő CGRP felszabadulás elhízással összefüggő változásai

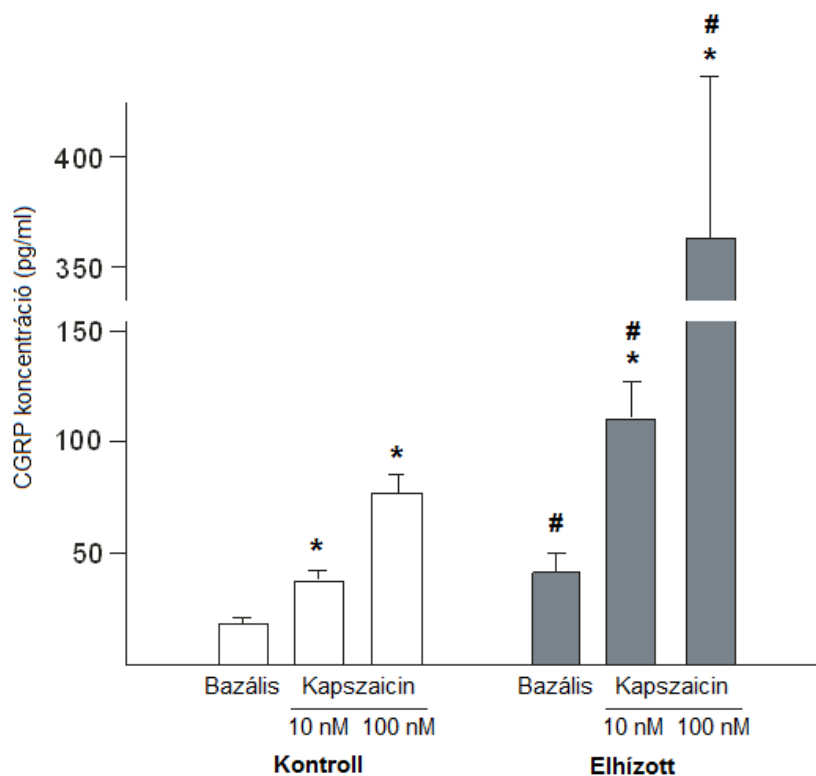
6.2.2.1. Bazális CGRP felszabadulás

Az *ex vivo* dura mater preparátumokban mért bazális CGRP felszabadulás szignifikánsan különbözött a két csoport esetében. A nyugalmi körülmények között felszabaduló CGRP mennyisége elhízott állatokban jelentősen meghaladta a kontroll csoport értékeit ($16 \pm 1,5$ vs. $42,1 \pm 6,6$ pg/ml, $p = 0,005$, $n = 13-22$) (**16. ábra**).

6.2.2.2. TRPV1 receptor aktivációját követő CGRP felszabadulás

A trigeminális TRPV1 receptorok 10, illetve 100 nM-os kapszaicinnal történő stimulációja mindkét állatcsoport esetében a CGRP felszabadulás dóziszfüggő növekedéséhez vezetett. Az alacsonyabb kapszaicin koncentráció a kontroll állatokban $34,7 \pm 2,3$ pg/ml-re ($196,6 \pm 21,2$ %, $p < 0,001$, $n = 7$), az elhízott csoportban pedig $120 \pm 27,6$ pg/ml-re ($300,1 \pm 60,1$ %, $p = 0,004$, $n = 11$) növelte a CGRP felszabadulás mértékét. A 100 nM-os kapszaicin

oldat a CGRP felszabadulást $75,6 \pm 7$ pg/ml-re ($612,7 \pm 58,9$ %, $p < 0,001$, $n = 6$), illetve $358,1 \pm 95,5$ pg/ml-re ($853,1 \pm 76$ %, $p = 0,004$, $n = 11$) növelte a kontroll és az elhízott állatok mintáiban. Étrend-indukált elhízott állatokban mindkét kapszaicin koncentráció szignifikánsan nagyobb mértékű CGRP felszabadulást eredményezett a megfelelő kontroll csoportokhoz viszonyítva ($p = 0,027$ és $p < 0,048$) (16. ábra).

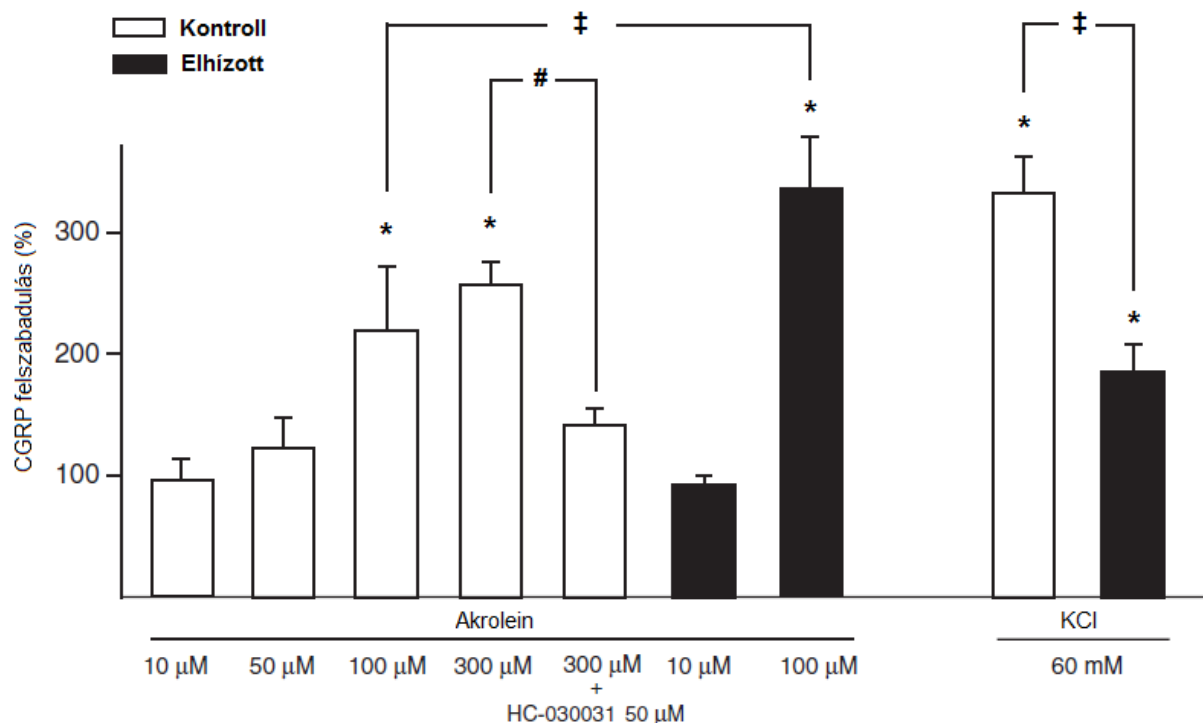


16. ábra. A dura materből nyugalmi körülmények között és kapszaicin stimulációt követően mért CGRP felszabadulás. *Statistikailag szignifikáns különbség a bazális CGRP felszabaduláshoz viszonyítva. #Statistikailag szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz képest.

6.2.2.3. TRPA1 receptor-mediált CGRP felszabadulás

A kontroll állatok kemény agyhártyájának 10 és 50 μ M-os akroleinnel történő stimulációja nem befolyásolta számottevően a trigeminális afferensekből történő CGRP felszabadulást ($p = 0,88$, $n = 7$ és $p = 0,203$, $n = 6$). A 10 μ M-os akrolein oldat alkalmazása az elhízott csoport esetében is hatástalannak bizonyult ($p = 0,51$, $n = 7$). Az akrolein magasabb, 100 és 300 μ M-os koncentrációi a kontroll mintákból felszabaduló CGRP mennyiségének szignifikáns növekedéséhez vezettek ($227,1 \pm 29,9$ %, $p < 0,001$, $n = 8$ és $232,7 \pm 18,8$ %, $p < 0,001$, $n = 8$). Az akroleinnel (300 μ M) kiváltható CGRP felszabadulás blokkolható volt a TRPA1 antagonistá HC-030031 (50 μ M) előkezelés segítségével ($132,2 \pm 15,9$ %, $p = 0,001$,

n = 8). A 100 μ M-os akrolein applikációja elhízott állatokban is jelentősen megnövelte a felszabaduló CGRP mennyiségét ($336 \pm 33,1$ %, $p = 0,001$, $n = 14$), melynek mértéke szignifikánsan meghaladta a kontroll csoportra jellemző értéket ($p = 0,039$) (17. ábra).



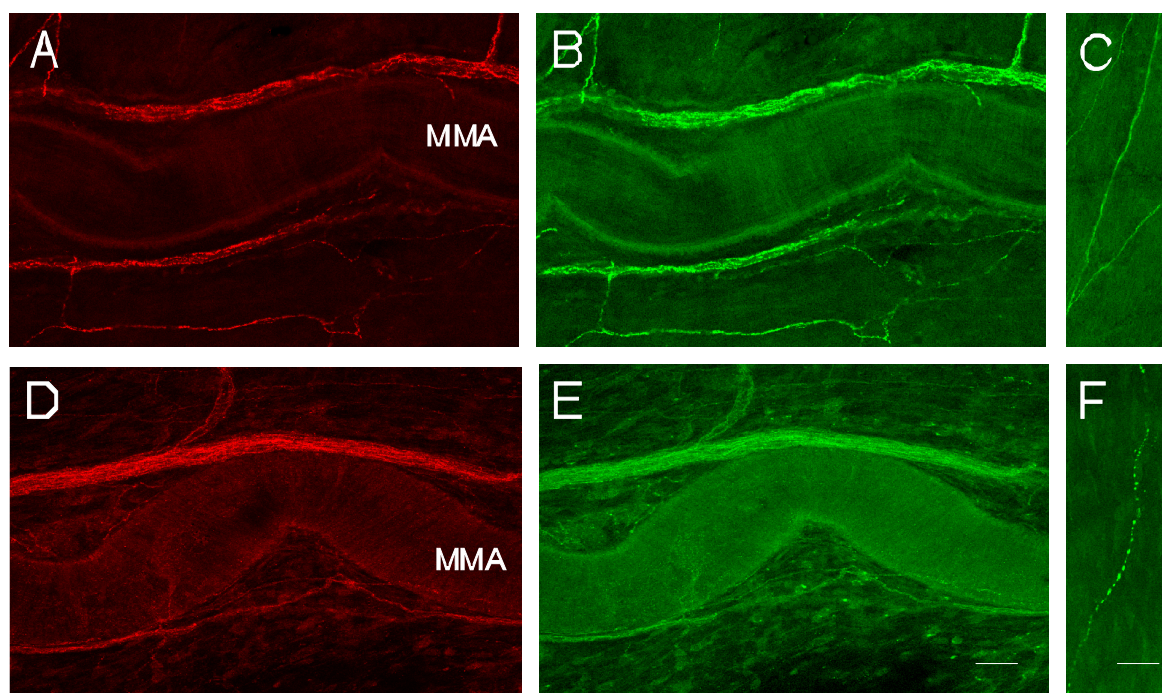
17. ábra. Dura materből történő CGRP felszabadulás akroleinnel és kálium-kloriddal (KCl) történő stimulációt követően, valamint a HC-030031 előkezelés akrolein által kiváltott CGRP felszabadulásra gyakorolt hatása. *Statisztikailag szignifikáns különbség a bazális CGRP felszabaduláshoz viszonyítva. #Statisztikailag szignifikáns különbség az akrolein (300 μ M) hatásához képest. ‡Statisztikailag szignifikáns különbség a kontroll csoportban mért értékekkel összehasonlítva.

6.2.2.4. KCl által kiváltott CGRP felszabadulás

Munkánk során a magas extracelluláris kálium koncentráció hatására bekövetkező depolarizáció és következményes CGRP felszabadulás elhízással összefüggő változását is vizsgáltuk. A dura mater 60 mM-os KCl oldattal történő stimulációja jelentősen megnövelte a CGRP felszabadulást mind a kontroll ($307,4 \pm 38,3$ %, $p < 0,001$, $n = 8$), mind pedig az elhízott ($182,7 \pm 18,2$ %, $p < 0,001$, $n = 13$) állatok mintáiban. Az elhízott állatokban a KCl által kiváltott CGRP felszabadulás mértéke elmaradt a kontrollban mért értékektől ($p = 0,001$) (17. ábra).

6.2.3. TRPV1- és CGRP-immunreaktivitás patkány kemény agyhártyájában

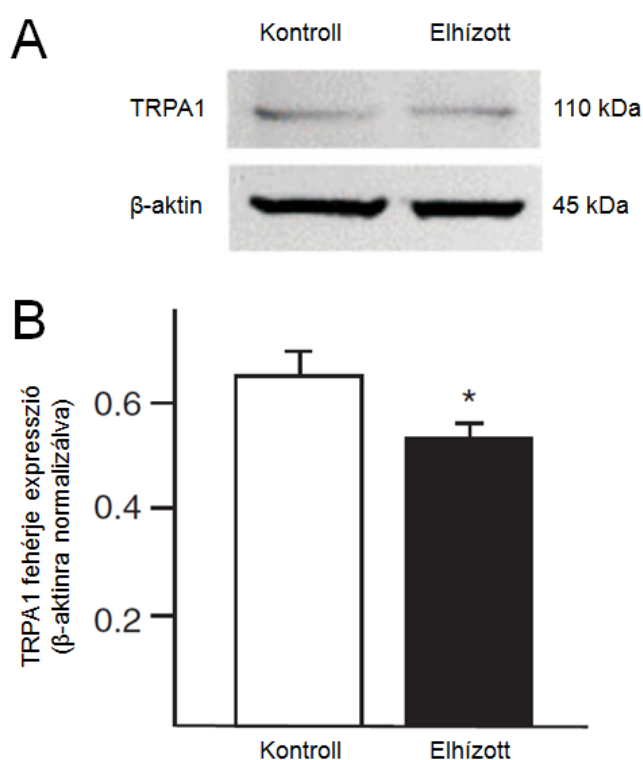
Mind a kontroll, mind az elhízott állatok esetében nagyszámú TRPV1- és CGRP-immunreaktív idegrost volt látható a supratentorialis dura mater encephali teljes területén. A TRPV1-immunreaktív neuronok többsége a dura mater ereinek közvetlen közelében helyezkedett el, de a dura kötőszövetes, látható erektől távolabb fekvő régiókban is jelentős számú TRPV1-pozitív idegrost volt megfigyelhető. Összhangban a korábbi vizsgálatok eredményeivel (Dux et al. 2007; Shimizu et al. 2007), a TRPV1-CGRP kettős immunhisztokémia festés jelentős mértékű kolokalizációt mutatott. A TRPV1- és a CGRP-immunreaktív afferensek megoszlása nagymértékű hasonlóságot mutatott a két állatcsoportban. Az elhízott állatok dura preparátumaiban az erektől távolabbi területeken megfigyelhető, idegkötegekből kiváló egyes rostok esetében jellegzetes morfológiai változásokat figyeltünk meg. Míg a kontroll állatokban a CGRP immunreaktivitás egyenletes megoszlást mutatott az idegrostokban, addig az elhízott állatok afferenseinek esetében gyöngysor szerű mintázat volt megfigyelhető (18. ábra).



18. ábra. TRPV1- (A, D) és CGRP- (B, C, E, F) immunreaktív idegrostok a kontroll (A - C) és az elhízott (D - F) patkányok dura mater encephalijában. Az E képen feltüntetett lépték hossza 50 µm, mely érvényes az A, B és D képekre is. Az F képen feltüntetett lépték 25 µm, ami a C képre is vonatkozik. MMA: arteria meningeae media

6.2.4. TRPA1 fehérje expressziója a trigeminális ganglionban

A TRPA1 fehérje expressziójában bekövetkező változásokat western blot módszerrel vizsgáltuk a kontroll és az elhízott állatok trigeminális ganglionjából nyert teljes sejt lizátumokban. A TRPA1 elleni antitest egy ~110 kDa-os sávot jelölt meg, mely az antitest kontroll peptidjével történő előinkubálással blokkolható volt, alátámasztva az alkalmazott antitest antigén-specifitását. A ~110 kDa-os immunpozitív csík β -aktinra normalizált optikai denzitásának meghatározása igazolta, hogy étrend-indukált elhízás hatására csökkent a TRPA1 receptor fehérje expressziója a hagyományos étrenden tartott kontroll állatok értékeihez képest ($0,62 \pm 0,1$ vs. $0,52 \pm 0,09$ a β -aktinra normalizálva, $p = 0,048$, $n = 7-8$) (19. ábra).



19. ábra. Reprezentatív western blot (A) és a β -aktinra normalizált optikai denzitás értékek (B). *Statistikailag szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz képest.

7. MEGBESZÉLÉS

7.1. Magas zsír és magas szacharóz tartalmú étrend által kiváltott elhízás

A táp- és folyadékfogyasztására vonatkozó adataink arra utalnak, hogy az általunk alkalmazott magas zsír és magas szacharóz tartalmú étrend hatással volt a táplálékfelvétel- és az energiaegyensúly szabályozására (Guyenet and Schwartz 2012). Az obezitogén étrenden lévő állatok ugyanis szignifikánsan kevesebb tápot és több folyadékot fogyasztottak, mint a kontroll csoport. A táplálékfelvétel ilyen irányú változásait más munkacsoportok is megfigyelték az étrend összetételének hasonló módosításait követően (Chen et al. 2008; Frye et al. 2009; Jin et al. 2014; Lindqvist et al. 2005; Picchi et al. 2011). A táp energiasűrűségének növelése a tápfogyasztás abszolút mennyiségének csökkenését vonhatja maga után, mely a szervezet energia-egyensúlyra való törekvésével áll összefüggésben. Ezt támasztják alá azon megfigyeléseink is, melyek alapján a zsírdús táp fogyasztásában megfigyelhető csökkenés ellenére közel azonos volt a két csoport tápból történő energiabevitele. Ezen adatok azonban nem értelmezhetők izoláltan, hiszen a cukros víz étrendbe történő beiktatása egy további változót jelent az energia- és táplálékfelvétel szabályozása szempontjából. Korábbi vizsgálatok leírták, hogy a cukros víz fogyasztása jelentős mértékben megnövelheti az állatok folyadékfelvételét (Bunag, Tomita, Sasaki 1983; Lindqvist et al. 2005), melynek hátterében nagy valószínűséggel az agy jutalmazó rendszerére gyakorolt hatások állhatnak. Mindemellert az is ismert, hogy a zsírdús táp és a cukros víz kombinációja a szilárd táplálék elfogyasztásának további csökkenéséhez vezethet (Bunag, Tomita, Sasaki 1983; Lindqvist et al. 2005), melyben szintén az energiabevitel központi idegrendszeri szabályozásának lehet szerepe. A magas zsír és magas szacharóz tartalmú étrenden tartott állatok szignifikánsan magasabb összenergia-beviteléből látszik, hogy az obezitogén étrendi faktorok e kombinációja az energiaegyensúly megbomlásához vezetett. Ezt támasztja alá a testsúly, az intraabdominális és az epididimális zsírszövet mennyiségének, valamint a zsírszövet teljes testtömeghez viszonyított arányának szignifikáns mértékű növekedése is.

Az elhízás igazolása mellett vizsgáltuk a HFHS étrend következtében kialakuló metabolikus- és immunológiai változásokat is. Ennek keretében mértük a glükóz- és inzulin homeosztázis paramétereinek, valamint azon gyulladásos citokinek plazmakoncentrációinak változását, melyeknek a primer fejfájások patogenezisében is jelentőséget tulajdonítanak. Ezen eredményeink értékes információval szolgálhatnak az elhízottakban bekövetkező, a meningeális nocicepció és a fejfájások patomechanizmusát érintő kérdésekről. Az étrend-

indukált elhízás hiperinzulinémiához és az éhgyomri vércukorszint enyhe, ugyanakkor szignifikáns mértékű emelkedéséhez vezetett. Az inzulinérzékenység károsodására a HOMA-IR emelkedése és a QUICKI érték csökkenése is utalt, az alacsonyabb glükóz infúziós ráta pedig egyértelműen igazolta (Muniyappa et al. 2008). Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a kontroll csoport esetében is bekövetkezett az inzulinérzékenység bizonyos mértékű csökkenése. Munkahipotézisünk szempontjából azonban a két állatcsoport inzulinérzékenységében megfigyelhető jelentős mértékű különbség bír elsődleges információtartalommal. Az inzulinrezisztencia, a hiperinzulinémia és a károsodott glükóz homeosztázis migrén patogenezisében betöltött lehetséges szerepét már számos humán vizsgálat felvetette (Cavestro et al. 2007; Gruber et al. 2010a; Rainero et al. 2005).

A szisztémás gyulladásos állapot kialakulását jelzi, hogy elhízott állatokban az IL-1 β és az IL-6 proinflammatorikus citokinek plazmaszintjének jelentős mértékű emelkedése volt megfigyelhető (Calder et al. 2011). A plazma TNF α koncentrációjában nem történt érdemi változás, mely természetesen nem zárja ki a dura materben lokálisan képződő TNF α szerepét a trigeminális idegek szenzitizációjában és a létrejött neurovaszkuláris eltérésekben (Hotamisligil et al. 1995; Khan et al. 2008). A magas zsír és magas szacharóz tartalmú étrend, a glükóz és inzulin homeosztázis károsodása, valamint a szisztémás gyulladásos folyamatok külön-külön is fokozhatják a zsírmáj kialakulásának kockázatát, melynek valószínűségét még tovább növeli e tényezők együttes jelenléte (Jung and Choi 2014; Ragab et al. 2015). Újabb klinikai megfigyelések összefüggést találtak a nem-alkoholos zsírmáj és a migrénes betegségben eltöltött időtartam, a migrénes aura gyakorisága, valamint a fejfájásos rohamok hossza között (Celikbilek et al. 2014).

Összességében tehát elmondható, hogy az étrend-indukált elhízott állatmodellünk egyszerre több olyan kórélettani folyamat jeleit is mutatta, melyek gyakran megfigyelhetők elhízott emberekben és amelyeknek a migrénes fejfájás patofiziológiájában is szerepet tulajdonítanak. Számos irodalmi adat utal arra, hogy e tényezők a trigeminovaszkuláris rendszer elhízással összefüggő funkcionális változásaival is kapcsolatba hozhatók. A trigeminovaszkuláris rendszer működésében megfigyelt változások azonban nagy valószínűséggel nem vezethetők vissza egyetlen jól definiált kóroki tényezőre, így azokra érdemes úgy tekinteni, mint a számos különböző faktor dózis- és időfüggő interakciójának eredményére.

7.2. Étrend-indukált elhízás hatása a meningeális érreakciókra

A dura matert beidegző trigeminális peptiderg afferensek aktivációjával összefüggő lokális regulatorikus reakciók tanulmányozása révén következtetni lehet ezen idegek funkcionális állapotára, valamint a meningeális nocicepcióban betöltött szerepükben bekövetkező változásokra (Dux, Sántha, Jancsó 2003; Dux et al. 2007; Kurosawa et al. 1995). Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a kemény agyhártya CGRP tartalmú idegrostjainak kemoszenzitív (TRP receptorokat expresszáló) neuronpopulációja fontos szerepet játszik a meningeális vérátáramlás szabályozásában (Dux, Sántha, Jancsó 2003; Dux et al. 2016a; Kunkler et al. 2011). Fejfájáskor a szenzoros neurogén vazodilatáció hozzájárulhat a nociceptív anyagok dura materből történő eltávolításához és a megváltozott szöveti homeosztázis helyreállításához (Dux and Messlinger 2009). A fokális és tranziens hipoperfúziót eredményező cerebrális mikrocirkulációs zavarok viszont egyes feltételezések szerint összefüggésbe hozhatók a migrénes aura kialakulásával (Dalkara, Nozari, Moskowitz 2010).

Munkánk során vizsgáltuk, hogy étrend-indukált elhízás hatására megváltozik-e a meningeális erek vazokonstriktor és vazodilatátor kapacitása, illetve a TRPV1 és TRPA1 receptorok aktivációját követő szenzoros neurogén vaszkuláris reakció? A vazodilatátor hatású vegyületek lokális applikációját követő véráramlás fokozódás mind a kontroll, mind az elhízott állatok esetében lassabban alakult ki, mint ahogyan az a hasonló körülmények között elvégzett korábbi vizsgálatok során jellemző volt (Dux, Sántha, Jancsó 2003; Dux et al. 2009; Eberhardt et al. 2014). Mivel az életkor hatással lehet a trigeminovaszkuláris rendszer aktivációját követő reakciókra (Fan et al. 2012), az AMM vazoreaktivitásában megfigyelhető különbségek is elsősorban a jelen kísérletsorozatban részt vevő állatok korábbiakhoz (10-12 hét) viszonyított idősebb életkorára (26 hét) vezethető vissza.

A hisztamin és a CGRP direkt vazodilatátor hatásának mérésével vizsgáltuk, hogy az étrend-indukált elhízás befolyásolja-e a meningeális erekben közvetlenül kiváltható értágulat mértékét. Mindkét anyag az erek endothel- és simaizom sejtjein lévő specifikus receptorokhoz kötődve okoz vazodilatációt (Dux, Schwenger, Messlinger 2002; Walker and Hay 2013). Kísérleteink során mind a CGRP, mind a hisztamin applikációja szignifikáns mértékű véráramlás fokozódást eredményezett, a kiváltott válaszok nagyságában azonban nem volt szignifikáns különbség a kontroll és az elhízott állatok között. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az általunk alkalmazott állatmodellben az étrend-indukált elhízás nem befolyásolta

azokat az útvonalakat, melyek a dura mater ereinek endothel- és simaizom sejtjeiben a CGRP és a hisztamin értágító hatásáért felelősek.

A meningeális kemoszenzitív afferensek aktivációját eredményező TRPV1 agonista kapszaicin és TRPA1 agonista akrolein mindkét állatcsoportban fokozta a meningeális vérátáramlást. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a meningeális kapszaicin applikáció hatására bekövetkező értágulat a nociceptorok perifériás idegvégződésein található TRPV1 receptorok aktivációját követő CGRP felszabadulás eredménye (Dux, Sántha, Jancsó 2003). A TRPA1 receptor aktiváció és a CGRP kapcsolatát az akrolein által kiváltott vazodilatációban a szelektív TRPA1 antagonistá HC-030031 és a CGRP receptor antagonistá CGRP₈₋₃₇ előkezelés vazodilatációt csökkentő hatásával igazoltuk. Ezen eredményeink további bizonyítéknak szolgálnak arra vonatkozóan, hogy a környezetünkben jelentős mennyiségben megtalálható égéstermék akrolein, a TRPA1 receptorok stimulációja révén váltja ki aktiváló hatását a trigeminovaskuláris rendszerben, ami CGRP felszabaduláshoz vezet (Albrecht et al. 2013; Kunkler et al. 2011). Eredményeink igazolták, hogy az elhízás fokozza a kemoszenzitív afferensek TRPV1 és TRPA1 stimulációra mutatott válaszkészségét. Mivel a CGRP direkt értágító hatása nem változott, a jelenség hátterében a szenzoros idegekből történő CGRP felszabadulás mértékének növekedése állhat, melyet a dura materen végzett *ex vivo* kísérleteink eredményei is alátámasztottak.

Számos irodalmi adat igazolja, hogy a TRPV1 receptor agonistaként ismert kapszaicin összetett vaszkuláris hatásokkal rendelkezik. A szenzoros neuropeptid felszabadulás révén generált perfúzió növekedés mellett, különösen a kapszaicin nagyobb koncentrációban történő alkalmazásakor, vazokonstrikciót is kiválthat. Ezt a kétoldalú vaszkuláris hatást korábban a meningeális erek vonatkozásában is igazolták (Dux, Sántha, Jancsó 2003; Dux et al. 2007). A korábbi megfigyelésekhez hasonlóan nagy dózisú kapszaicin a mostani kísérleteinkben is mindkét állatcsoport meningeális ereiben azonnali és szignifikáns mértékű véráramlás csökkenést eredményezett. Ismert, hogy a TRPV1 receptor szenzoros ganglionban is előforduló endogén agonistái, az endogén vanilloidok hasonló módon két ellentétes komponensből összetevődő vaszkuláris választ generálnak a meningeális erekben (Dux et al. 2016b). Mivel a kapszaicin véráramlást csökkentő hatása elhízott állatokban kifejezettebb volt, számolni kell elhízottakban az érzékkítő stimulusra adott válasz fokozódására, ami kedvezőtlenül befolyásolhatja a migrénes fájdalom kiváltásában és fenntartásában szerepet játszó mediátorok eltávolítását és így késleltetheti a szöveti homeosztázis helyreállítását. A kapszaicin által kiváltott vazokonstrikció fokozódására vonatkozó eredményünk interpretálását megnehezíti, hogy a kapszaicin érzékkítő hatásáért felelős mechanizmus még

nem tisztázott. Szenzoros neurogén mechanizmusok valószínűleg nem játszanak benne szerepet, mivel a kemoszenzitív nociceptorok funkcióképtelenné tétele a kísérleti állatok nagy dózisú szisztémás kapszaicin kezelésével (kapszaicin deszenzibilizáció) nem befolyásolja a vazokonstrikció mértékét (Dux, Sántha, Jancsó 2003). A kapszaicin által kiváltott vazokonstrikció valószínűleg az erek simaizom rétegére gyakorolt direkt hatásokkal áll összefüggésben (Duckles 1986; Pórszász et al. 2002; Toda et al. 1972), melynek keretében nem zárható ki a vaszkuláris lokalizációjú TRPV1 receptor szerepe sem (Tóth et al. 2014). A TRPV1 receptor számos különböző szövettípus artériáinak simaizomsejtjein expresszáldik, ahol aktivációja a simaizomsejtekbe történő Ca^{2+} beáramláshoz és következményes vazokonstrikcióhoz vezet (Czikora et al. 2013; Kark et al. 2008). Egy egyelőre még csak absztrakt formájában közölt kutatás eredményei felvetették, hogy a vaszkuláris TRPV1 receptoroknak a meningeális erek esetében is szerepe lehet a kapszaicin érszűkítő hatásában (Manuelyan et al. 2015). Izolált patkány AMM ereken végzett *in vitro* vizsgálatok alapján a kapszaicin által kiváltott vazokonstrikció részben a simaizomsejtek falában lévő TRPV1 receptorok aktivációját követő Ca^{2+} beáramlás által valósul meg, melyben szerepe lehet mind a TRPV1 ioncsatornákon keresztül történő direkt Ca^{2+} beáramlásnak, mind pedig a TRPV1-mediált Na^+ beáramlás következtében megnyíló feszültségfüggő kalcium csatornáknak. Korábbi vizsgálatok a Ca^{2+} áram növekedését figyelték meg patkányok cerebrális artériáinak simaizomsejtjeiben is, magas zsírtartalmú étrend hatására (Wilde et al. 2000). A meningeális simaizomsejtek Ca^{2+} homeosztázisának étrend-indukált elhízással összefüggő károsodása hozzájárulhat az érszűkítő stimulusokra adott válasz fokozódásához.

7.3. Elhízás hatása a trigeminális afferensekből történő CGRP felszabadulásra

A kemény agyhártyát beidegző peptiderg afferensek aktivációját követő CGRP felszabadulás nem csak a neurogén szenzoros vazodilatációt váltja ki, de központi szerepe lehet a nociceptív információ centrális irányú továbbításában és így a migrénes fejfájás kialakulásának folyamatában is (Pietrobon and Moskowitz 2013; Russo 2015). A dura materből történő CGRP felszabadulás mérése a meningeális nociceptorok funkcionális állapotának jellemzését segítő módszer (Dux et al. 2007; Ebersberger et al. 1999). Vizsgálataink igazolták, hogy étrend-indukált elhízás hatására változások következnek be mind a nyugalmi, mind pedig a kémiai stimuláció által kiváltott trigeminális CGRP felszabadulás mértékében. Elhízott állatokban a bazális CGRP felszabadulás növekedését figyeltük meg, mely a durát innerváló peptiderg afferensek, vagy azok egy csoportjának

fokozott aktivitására utal. A peptiderg afferensek fokozott nyugalmi aktivitása a TRPV1 és TRPA1 receptorokat érő stimulusokra adott fokozott válaszkészséggel kombinálva olyan mértékű CGRP felszabadulást eredményezhet, melynek fontos szerepe lehet a migrénes fejfájás kialakulásával összefüggő perifériás eseményekben (Dussor et al. 2014), így a trigeminovaskuláris nociszenzor komplex aktiválásában és ennek következtében a perifériás vaszkuláris reakciók felerősödésében (Dux, Sántha, Jancsó 2012). A korábbi megfigyeléseknek megfelelően kísérleteinkben a dura mater kapszaicinnal és akroleinnal történő stimulációja a CGRP felszabadulás szignifikáns fokozódását eredményezte (Dux, Sántha, Jancsó 2003; Eberhardt et al. 2014; Kunkler et al. 2011; Nassini et al. 2012). A TRPA1 receptorok szerepét ebben a reakcióban igazolta, hogy a TRPA1 antagonistá HC-030031-gyel történő előkezelés kivédte az akrolein hatására bekövetkező CGRP felszabadulást. Eredményeink alátámasztani látszanak Rossi és munkatársai azon megfigyeléseit, miszerint az étrend-indukált elhízás a kapszaicin-szenzitív afferensek aktivációjának fokozódásához vezet (Rossi et al. 2013). Ők az arc területén alkalmazott kapszaicin injekció által kiváltott c-fos expresszió szignifikáns növekedését figyelték meg magas zsírtartalmú étrend következtében elhízott egerek agytörzsi trigeminusz magjában (Rossi et al. 2013). A dura afferensek Ca^{2+} homeosztázisát érintő változások hozzájárulhatnak a kapszaicin és az akrolein által kiváltott CGRP felszabadulás növekedéséhez. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedésének meghatározó szerepe van a szenzoros idegvégződésekből dokkolt CGRP-t tartalmazó vezikulák exocitózisában (Akerman, Williamson, Goadsby 2003), valamint a TRPV1 és a TRPA1 receptorok funkciójának modulálásában (Rosenbaum et al. 2004; Zurborg et al. 2007). Rossi és munkatársai a kapszaicin-szenzitív neuronok százalékos arányának növekedését és az aktivációjukat követő Ca^{2+} beáramlás fokozódását írták le mind az étrend-indukált elhízott, mind pedig a leptin hiányos egerek trigeminális ganglionjában (Rossi et al. 2015). A metabolikus háttér jellemzésére irányuló vizsgálataink alapján azonban további faktorok szerepe is felvetődik. *In vivo* elektrofiziológiai vizsgálatok igazolták, hogy mind az IL-1 β , mind pedig az IL-6 növelheti a meningeális nociceptorok érzékenységét (Yan et al. 2012; Zhang, Burstein, Levy 2012). Patkány trigeminális ganglion sejtek IL-1 β -val történő kezelése fokozta a nyugalmi és a kapszaicin által kiváltott CGRP felszabadulást (Capuano et al. 2009; Neeb et al. 2011), míg a talp bőrébe adott IL-1 β fokozta a kapszaicin-szenzitív neurogén vazodilatációt úgy, hogy közben a CGRP direkt értágító hatásában nem történt változás (Herbert and Holzer 1994). Az IL-1 β a ciklooxygenáz-2 (COX-2) enzim aktiválásán keresztül fokozhatja a PGE₂ képződését a trigeminális ganglionban (Neeb et al. 2011). A PGE₂ viszont a TRPV1 receptor hőaktivációs

küszöbének csökkenését és a kapszaicin által kiváltott neuronális válaszok fokozódását eredményezi (Gu, Kwong, Lee 2003; Lopshire and Nicol 1998; Moriyama et al. 2005), az agytörzsi trigeminusz magban pedig potenciózza a kapszaicin hatására bekövetkező CGRP felszabadulást (Jenkins et al. 2004). Az IL-6 a szolubilis receptorával (sIL-6R) komplexet képezve, az aktivációs küszöbhőmérséklet (hőküszöb) csökkenéséhez és a hő által kiváltott ionáramok fokozódásához vezet hátsó gyöki ganglion sejtekben, melyben a TRPV1 receptorokra gyakorolt hatásoknak is szerepe lehet (Obreja et al. 2005). *In vitro* patkánybőr preparátumban kimutatták, hogy mind az IL-1 β , mind pedig az IL-6/sIL-6R komplex növelheti a hő által kiváltott CGRP felszabadulás mértékét (Oprée and Kress 2000). Az IL-1 β hatására megemelkedett COX-2 aktivitás ugyanakkor számos olyan elektrofil tulajdonsággal rendelkező molekula képződésével is együtt járhat, melyek befolyásolhatják a TRPA1 receptorok működését (Dall'Acqua et al. 2014; Materazzi et al. 2008; Taylor-Clark et al. 2008). Az elhízás, az inzulinrezisztencia, a hiperinzulinémia és a károsodott glükóz homeosztázis mind fokozhatják az oxidatív és a nitrozatív stressz mértékét (Bondia-Pons, Ryan, Martinez 2012). Étrend-indukált elhízott egerekben összefüggést találtak az agyban mérhető oxidatív stressz mértéke és a zsírszövet mennyisége között (Freeman et al. 2013). A reaktív oxigén gyökök fokozott képződése hozzájárulhat mind a TRPV1, mind pedig a TRPA1 receptorok szenzitizációjához (Bessac et al. 2008; Chuang and Lin 2009). Kísérletes adatok utalnak továbbá arra, hogy a TRPV1 receptorok funkcióját az inzulin is modulálhatja (Van Buren et al. 2005). Korábbi vizsgálatok a 4-hydroxynonenal (4-HNE) akkumulációját figyelték meg a primer szenzoros afferensekben magas zsírtartalmú étrend következtében elhízott, csökkent glükóztoleranciával rendelkező, hiperinzulinémiás egerek esetében (Obrosova et al. 2007). A 4-HNE szelektív módon képes aktiválni a TRPA1 receptorokat, az érző idegek excitabilitásának növekedését és a CGRP felszabadulás fokozódását eredményezve (Trevisani et al. 2007). Végezetül pedig nem zárható ki a TRPV1 és a TRPA1 receptorok közötti kereszt-szenzitizáció lehetősége sem (Akopian 2011; Salas, Hargreaves, Akopian 2009).

Vizsgálataink kimutatták azt is, hogy a direkt depolarizáló hatású KCl applikációja elhízott állatokban csökkent mértékű CGRP felszabadulást eredményez. A nyugalmi membránpotenciál depolarizációját egy fontos mechanizmusnak tartják az érzőneuronok gyulladásos mediátorok hatására bekövetkező szenzitizációjában (Harriott and Gold 2009). Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy az IL-1 β a kisméretű trigeminális nociceptív neuronokban a nyugalmi membránpotenciál depolarizációját eredményezheti, ami a feszültségfüggő kálium csatornákra gyakorolt gátló hatással hozható összefüggésbe (Takeda

et al. 2008). A PGE₂-t, hisztamint és bradykinint tartalmazó "inflammatory soup" lokális applikációját követően szintén megfigyelték a membránpotenciál ilyen irányú változásait (Harriott and Gold 2009). A dura afferensek nyugalmi membránpotenciáljának eltolódása, valamint a feszültségfüggő kalcium csatornák aktivitásának, esetleg hosszabb távon expressziójának megváltozása potenciálisan hozzájárulhat a magas extracelluláris KCl koncentráció által kiváltott CGRP felszabadulás elhízott állatokban megfigyelhető csökkenéséhez (Amrutkar et al. 2011; Ma et al. 2012; Morita et al. 2004; Zhou et al. 2006).

Az étrend-indukált elhízás állatmodellünkben megfigyelt változások tehát a meningeális nociceptorok szenzitizációjára utalnak, valamint direkt kísérletes bizonyítékaul szolgálnak a kapszaicin és az akrolein által kiváltott trigeminovaszkuláris reakciók fokozódására. A TRPV1- és a TRPA1-mediált CGRP felszabadulás növekedésének önmagában is fontos kórélettani következményei lehetnek a fejfájások patogenezise szempontjából, melyek jelentőségét csak még tovább növeli a nyugalmi CGRP felszabadulás fokozódása. Egy nemrégiben közölt vizsgálat eredményei alapján ugyanis az egyébként direkt algogén hatásokkal nem rendelkező CGRP fájdalomérzet kiváltásához vezethet abban az esetben, ha a trigeminovaszkuláris rendszer érzékenysége már eleve emelkedett (Capuano et al. 2014).

7.4. A fokozott CGRP felszabadulás háttérében álló lehetséges mechanizmusok

Elhízott állatok dura mater totálpreparátumaiban a CGRP- és TRPV1-immunreaktív rostok sűrűsége és eloszlása nagyfokú hasonlóságot mutatott az irodalomban korábban ismertetett adatokkal (Dux et al. 2007; Shimizu et al. 2007). Ez az innervációs mintázat nem különbözött a kontroll és elhízott állatok esetében. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a kapszaicin által kiváltott szenzoros neurogén vazodilatáció fokozódása nem elsősorban a TRPV1 receptorok membránba történő kihelyeződésének növekedésével, hanem sokkal inkább a receptor aktiválhatóságának, kapuzási tulajdonságainak elhízással összefüggő változásaival állhat összefüggésben (Meents, Neeb, Reuter 2010). Az IL-1 β például a fájdalomérző primer érzőneuronok TRPV1 receptorainak nociceptív stimulusok iránti érzékenységének fokozódását eredményezheti, miközben nem befolyásolja a TRPV1 receptorok plazmamembránba történő transzlokációját (Camprubí-Robles, Planells-Cases, Ferrer-Montiel 2009).

Bár a CGRP-immunreaktív afferensek elhelyezkedése és megoszlása a dura mater területén nem mutatott eltérést a két állatcsoportban, a vastagabb idegkötegekből leágazó, a

dura kötőszövetes állományában haladó axonok esetében jellegzetes különbség volt megfigyelhető. Míg kontroll állatokban a festődés egyenletes eloszlást mutatott az axon teljes hosszában, addig elhízott állatokban jellegzetes, gyöngysorra emlékeztető morfológiát mutatott, mely valószínűleg a rostokból történő fokozott CGRP felszabadulás jele (Knyihár-Csillik et al. 1997; Messlinger et al. 1995). Figyelembe véve, hogy az elhízott állatok számos, a pre-diabeteszes állapotra jellemző metabolikus eltérést mutattak, valamint a korábbi vizsgálatok a TRPV1-immunreaktív neuronok számának csökkenését írták le streptozotocin kezelés által kiváltott diabétesz mellituszban (Dux et al. 2007), a neurodegeneratív folyamatok esetleges szerepe is felvetődhet (Ashrafi et al. 2013).

A magas zsír és magas szacharóz tartalmú étrend által kiváltott elhízás a TRPA1 fehérje mennyiségének enyhe, ugyanakkor szignifikáns mértékű csökkenését eredményezte. Figyelembe véve azt a számos, elhízással is kapcsolatba hozható faktort és mechanizmust, melyek irodalmi adatok alapján a trigeminális afferensek és a TRPA1 receptor aktivitásának fokozódása irányába hathatnak, beleértve a TRPV1 és a TRPA1 receptorok közötti interakciók lehetőségét is, a TRPA1 fehérje expressziójában megfigyelhető változás egyfajta negatív, kompenzatorikus mechanizmusként is értelmezhető, mely a tartósan fokozott neuronális aktivitás kedvezőtlen hatásainak ellensúlyozására, mérséklésére irányulhat (Khomula et al. 2013).

Kísérleteink során a trigeminális kemoszenzitív nociceptorok peptiderg populációjában bekövetkező változásokat vizsgáltuk. Azonban nem szabad figyelmen kívül hagyni azt a tényt, hogy a TRPV1 receptort expresszáló neuronok jelentős része nem tartalmaz neuropeptideket. A nem-peptiderg neuronpopuláció a Griffonia simplicifolia isolectin B4 kötő képessége alapján azonosítható. A peptideket nem tartalmazó afferensek pontos szerepe a fejfájások patomechanizmusában még nem ismert. Elképzelhető, hogy a peptiderg és nem-peptiderg afferensek párhuzamos utakat képviselnek a fájdalom feldolgozásában (Dux, Sántha, Jancsó 2012). A peptiderg afferensek aktivációja a perifériás szövetben véráramlásfokozódást eredményez, a CGRP felszabadulásnak a centrális végződésekből azonban valószínűleg csak módosító szerepe van más primer afferens neuronpopulációk neurotransmitter felszabadítására (Messlinger et al. 2012). A peptideket nem tartalmazó, de TRPV1 receptort expresszáló trigeminális neuronok nem vesznek részt a dura mater lokális regulatorikus folyamataiban, azonban direkt útját képezhetik a fájdalomérzés centrális irányú továbbításának (Dux, Sántha, Jancsó 2012). A TRPV1 receptort expresszáló CGRP tartalmú meningeális afferensek működésében megfigyelt

változások alapján feltételezhető, hogy az elhízás hasonló módon érintheti a trigeminális afferensek TRPV1-pozitív, de CGRP-t nem tartalmazó neuronpopulációját is.

Tekintettel a kemoszenzitív trigeminális afferensek fejfájások patomechanizmusában betöltött központi szerepére, a TRPV1 receptor agonistái (a csatorna deszenzitizációja révén) és antagonistái egyaránt potenciális terápiás szereknek tekinthetők migrénben. Ennek megfelelően a TRPV1 ioncsatorna foszforilációját gátló és ezáltal a csatorna nyitását akadályozó kináz gátlók a csatorna szenzitizációját védik ki. Ez a kezelési stratégia különösen elhízott migrénes emberekben ígéretes, akikben a TRPV1 és TRPA1 receptorok megváltozott funkciója jelentős patofiziológiai tényezőnek tűnik (Brederson, Kym, Szallasi 2013; Meents, Neeb, Reuter 2010).

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elhízás növelheti a migrén kialakulásának kockázatát, valamint a fejfájásos rohamok gyakoriságát és súlyosságát. Munkánk során arra kerestük a választ, hogy az elhízás hatással lehet-e azokra a trigeminovaskuláris rendszer aktivációjával összefüggő perifériás eseményekre, melyeknek szerepet tulajdonítanak a migrénes fejfájás patogenezisében.

Vizsgálatainkat magas zsír és magas szacharóz tartalmú étrend következtében elhízott patkányokon végeztük. Igazoltuk elhízott állatokban a testsúly, a zsírszövet mennyiségének és a máj tömegének növekedése mellett a glükóz és inzulin homeosztázis károsodását (inzulinrezisztencia, emelkedett éhgyomri vércukor- és inzulinszint), valamint a szisztémás gyulladásos állapot kialakulását (emelkedett interleukin-1 β és interleukin-6, valamint változatlan tumor nekrosis faktor α koncentráció).

Eredményeink igazolták, hogy étrend-indukált elhízás hatására jelentősen fokozódik a kapszaicin és az akrolein által kiváltott szenzoros neurogén vazodilatáció mértéke, mely a meningeális kemoszenzitív afferensek tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1)- és tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) receptorainak aktivációját követő nagyobb mértékű calcitonin gén-rokon peptid (CGRP) felszabadulásra vezethető vissza. Megállapítottuk továbbá, hogy az elhízás együtt jár a nyugalmi CGRP felszabadulás növekedésével és a magas extracelluláris kálium-klorid koncentráció által kiváltható CGRP felszabadulás csökkenésével. Eltekintve a CGRP-immunreaktivitás idegroston belüli megoszlásában megfigyelhető különbségtől, nem találtunk változást a dura mater TRPV1- és CGRP-immunreaktív idegrostjainak elhelyezkedésében és megoszlásában. A TRPA1 fehérje trigeminális ganglionban történő expressziója azonban enyhe, ugyanakkor szignifikáns csökkenést mutatott. A kapszaicin vazokonstriktor hatásának elhízott állatokban bekövetkező fokozódása felhívhatja a figyelmet az arteria meninge media érszűkítő folyamatainak elhízással összefüggő rendellenességeire.

Eredményeink elhízott állatokban a CGRP tartalmú meningeális nociceptorok szenzitizációjára utalnak, a TRPV1- és a TRPA1-mediált trigeminovaskuláris reakciók fokozódása ezen ioncsatornáként működő receptorok aktiválhatóságának megváltozásával állhat összefüggésben. Munkánk hozzájárulhat a fejfájásos fájdalom súlyosságának és a migrénes rohamokat provokáló tényezők iránti érzékenység elhízott egyéneknél megfigyelhető növekedéséért felelős patofiziológiai folyamatok megértéséhez.

9. SUMMARY

Obesity may increase the risk for having migraine and appears to enhance the frequency and severity of headache attacks. Our study was aimed to investigate the effects of obesity on peripheral events related to the activation of trigeminovascular nociceptive system.

Our experiments were performed in a rat model of high-fat and high-sucrose diet-induced obesity. Dietary treatment resulted in increased body weight, fat tissue and liver mass along with impaired glucose and insulin homeostasis (insulin resistance, elevated fasting blood glucose and insulin levels) in addition to exacerbated systemic proinflammatory milieu (higher plasma concentrations of interleukin-1 β and interleukin-6, but unchanged tumor necrosis factor α levels).

The present study revealed that diet-induced obesity potentiates capsaicin- and acrolein-evoked neurogenic sensory vasodilatation in the meninges due to augmented release of calcitonin gene-related peptide (CGRP) from chemosensitive afferents upon the activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptors. Obesity was also associated with an enhanced basal CGRP release and an attenuated response to potassium chloride in the dura mater. Except for minor morphological changes, the distribution of dural TRPV1- and CGRP-immunoreactive afferents was similar in control and obese animals. We measured a significant reduction in the expression of TRPA1 protein in the trigeminal ganglia of obese rats. The marked enhancement in capsaicin-induced vasoconstriction may suggest obesity-related changes in the vasoconstrictor properties of the middle meningeal artery.

Our results indicate that diet-induced obesity leads to sensitization of CGRP-containing meningeal afferents. The potentiation in TRPV1- and TRPA1-mediated trigeminovascular responses are likely the result of altered gating properties of these ion channels. The present findings may provide insight into pathophysiological events responsible for migraine progression and the increased susceptibility to headache triggers in obese individuals.

10. IRODALOMJEGYZÉK

10.1. Hivatkozott közlemények

- Akerman S, Williamson DJ, Goadsby PJ. 2003. Voltage-dependent calcium channels are involved in neurogenic dural vasodilatation via a presynaptic transmitter release mechanism. *Br J Pharmacol* 140(3):558-66.
- Akopian AN. 2011. Regulation of nociceptive transmission at the periphery via TRPA1-TRPV1 interactions. *Curr Pharm Biotechnol* 12(1):89-94.
- Albrecht S, Denner A, Eberhardt M, DeCol R, Messlinger K. 2013. Role for TRPA1 receptor channels in trigeminal afferent activation and neuropeptide release from rat cranial dura mater. *The Journal of Headache and Pain* 14(Supplement 1):70.
- Amrutkar DV, Ploug KB, Olesen J, Jansen-Olesen I. 2011. Role for voltage gated calcium channels in calcitonin gene-related peptide release in the rat trigeminovascular system. *Neuroscience* 172:510-7.
- André E, Campi B, Materazzi S, Trevisani M, Amadesi S, Massi D, Creminon C, Vaksman N, Nassini R, Civelli M, et al. 2008. Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by α,β -unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. *J Clin Invest* 118(7):2574-82.
- Antunes LC, Elkfury JL, Jornada MN, Foletto KC, Bertoluci MC. 2016. Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in wistar rats. *Arch Endocrinol Metab* 60(2):138-42.
- Arulmani U, MaassenVanDenBrink A, Villal n CM, Saxena PR. 2004. Calcitonin gene-related peptide and its role in migraine pathophysiology. *Eur J Pharmacol* 500(1-3 SPEC. ISS.):315-30.
- Ashina M, Hansen JM, Olesen J. 2013. Pearls and pitfalls in human pharmacological models of migraine: 30 years' experience. *Cephalalgia* 33(8):540-53.
- Ashrafian H, Harling L, Darzi A, Athanasiou T. 2013. Neurodegenerative disease and obesity: What is the role of weight loss and bariatric interventions? *Metab Brain Dis* 28(3):341-53.
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. 2004. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41(6):849-57.
- Bautista DM, Pellegrino M, Tsunozaki M. 2013. TRPA1: A gatekeeper for inflammation. *Annual Review of Physiology* 75:181-200.
- Bautista DM, Jordt S-, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D. 2006. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124(6):1269-82.

- Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Högestätt ED, Julius D, Jordt S-, Zygmunt PM. 2005. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(34):12248-52.
- Benemei S, Fusi C, Trevisan G, Geppetti P. 2014. The TRPA1 channel in migraine mechanism and treatment. *Br J Pharmacol* 171(10):2552-67.
- Bernecker C, Ragginer C, Fauler G, Horejsi R, Möller R, Zelzer S, Lechner A, Wallner-Blazek M, Weiss S, Fazekas F, et al. 2011. Oxidative stress is associated with migraine and migraine-related metabolic risk in females. *European Journal of Neurology* 18(10):1233-9.
- Bernstein C and Burstein R. 2012. Sensitization of the trigeminovascular pathway: Perspective and implications to migraine pathophysiology. *J Clin Neurol* 8(2):89-99.
- Bessac BF and Jordt S-. 2008. Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control. *Physiology* 23(6):360-70.
- Bessac BF, Sivula M, Von Hehn CA, Escalera J, Cohn L, Jordt S-. 2008. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest* 118(5):1899-910.
- Bigal ME and Lipton RB. 2008. Concepts and mechanisms of migraine chronification. *Headache* 48(1):7-15.
- Bigal ME, Liberman JN, Lipton RB. 2006. Obesity and migraine: A population study. *Neurology* 66(4):545-50.
- Bigal ME, Lipton RB, Holland PR, Goadsby PJ. 2007a. Obesity, migraine, and chronic migraine: Possible mechanisms of interaction. *Neurology* 68(21):1851-61.
- Bigal ME, Tsang A, Loder E, Serrano D, Reed ML, Lipton RB. 2007b. Body mass index and episodic headaches: A population-based study. *Arch Intern Med* 167(18):1964-70.
- Bigal ME, Walter S, Rapoport AM. 2015. Therapeutic antibodies against CGRP or its receptor. *Br J Clin Pharmacol* 79(6):886-95.
- Bond DS, Roth J, Nash JM, Wing RR. 2011. Migraine and obesity: Epidemiology, possible mechanisms and the potential role of weight loss treatment. *Obesity Reviews* 12(501):e362-71.
- Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. 2012. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem* 68(4):701-11.
- Brederson J-, Kym PR, Szallasi A. 2013. Targeting TRP channels for pain relief. *Eur J Pharmacol* 716(1-3):61-76.
- Brown L and Panchal SK. 2011. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011.

- Brown WJ, Mishra G, Kenardy J, Dobson A. 2000. Relationships between body mass index and well-being in young Australian women. *Int J Obes* 24(10):1360-8.
- Bunag RD, Tomita T, Sasaki S. 1983. Chronic sucrose ingestion induces mild hypertension and tachycardia in rats. *Hypertension* 5(2):218-25.
- Burgos-Vega C, Moy J, Dussor G. 2015. Meningeal afferent signaling and the pathophysiology of migraine. *Prog Mol Biol Transl Sci* 131:537-64.
- Cacho J, Sevillano J, De Castro J, Herrera E, Ramos MP. 2008. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in wistar and sprague-dawley rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(5):E1269-76.
- Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K, Esposito K, Jönsson LS, Kolb H, Lansink M, et al. 2011. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr* 106(SUPPL. 3):S5-S78.
- Camprubí-Robles M, Planells-Cases R, Ferrer-Montiel A. 2009. Differential contribution of SNARE-dependent exocytosis to inflammatory potentiation of TRPV1 in nociceptors. *FASEB Journal* 23(11):3722-33.
- Capuano A, Greco MC, Navarra P, Tringali G. 2014. Correlation between algogenic effects of calcitonin-gene-related peptide (CGRP) and activation of trigeminal vascular system, in an in vivo experimental model of nitroglycerin-induced sensitization. *Eur J Pharmacol* 740:97-102.
- Capuano A, De Corato A, Lisi L, Tringali G, Navarra P, Dello Russo C. 2009. Proinflammatory-activated trigeminal satellite cells promote neuronal sensitization: Relevance for migraine pathology. *Molecular Pain* 5.
- Cavestro C, Rosatello A, Micca G, Ravotto M, Pia Marino M, Asteggiano G, Beghi E. 2007. Insulin metabolism is altered in migraineurs: A new pathogenic mechanism for migraine? *Headache* 47(10):1436-42.
- Celikbilek A, Celikbilek M, Okur A, Dogan S, Borekci E, Kozan M, Gursoy S. 2014. Non-alcoholic fatty liver disease in patients with migraine. *Neurological Sciences* 35(10):1573-8.
- Cernuda-Morollón E, Larrosa D, Ramón C, Vega J, Martínez-Camblor P, Pascual J. 2013. Interictal increase of CGRP levels in peripheral blood as a biomarker for chronic migraine. *Neurology* 81(14):1191-6.
- Chai NC, Scher AI, Moghekar A, Bond DS, Peterlin BL. 2014. Obesity and headache: Part I-A systematic review of the epidemiology of obesity and headache. *Headache* 54(2):219-34.
- Chen W-, Ho B-, Lee C-, Lee C-, Pan T-. 2008. Red mold rice prevents the development of obesity, dyslipidemia and hyperinsulinemia induced by high-fat diet. *Int J Obes* 32(11):1694-704.

- Chuang H- and Lin S. 2009. Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(47):20097-102.
- Cindy Chai N, Bond DS, Moghekar A, Scher AI, Peterlin BL. 2014. Obesity and headache: Part II - potential mechanism and treatment considerations. *Headache* 54(3):459-71.
- Codoñer-Franch P, Navarro-Ruiz A, Fernández-Ferri M, Arilla-Codoñer A, Ballester-Asensio E, Valls-Bellés V. 2012. A matter of fat: Insulin resistance and oxidative stress. *Pediatric Diabetes* 13(5):392-9.
- Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C. 2007. Microcirculation and oxidative stress. *Free Radic Res* 41(12):1364-75.
- Cutrer FM and Smith JH. 2013. Human studies in the pathophysiology of migraine: Genetics and functional neuroimaging. *Headache* 53(2):401-12.
- Czikora Á, Rutkai I, Pásztor ET, Szalai A, Pórszász R, Boczán J, Édes I, Papp Z, Tóth A. 2013. Different desensitization patterns for sensory and vascular TRPV1 populations in the rat: Expression, localization and functional consequences. *PLoS ONE* 8(11).
- Dalkara T, Nozari A, Moskowitz MA. 2010. Migraine aura pathophysiology: The role of blood vessels and microembolisation. *Lancet Neurol* 9(3):309-17.
- Dall'Acqua MC, Bonet IJM, Zampronio AR, Tambeli CH, Parada CA, Fischer L. 2014. The contribution of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) to the in vivo nociceptive effects of prostaglandin E2. *Life Sci* 105(1-2):7-13.
- Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. 2004. Inflammation: The link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 25(1):4-7.
- De Young MB, Nemeth EF, Scarpa A. 1987. Measurement of the internal pH of mast cell granules using microvolumetric fluorescence and isotopic techniques. *Arch Biochem Biophys* 254(1):222-33.
- Dee A, Kearns K, O'Neill C, Sharp L, Staines A, O'Dwyer V, Fitzgerald S, Perry IJ. 2014. The direct and indirect costs of both overweight and obesity: A systematic review. *BMC Res Notes* 7(1).
- Della Vedova C, Cathcart S, Dohnalek A, Lee V, Hutchinson MR, Immink MA, Hayball J. 2013. Peripheral interleukin-1 β levels are elevated in chronic tension-type headache patients. *Pain Research and Management* 18(6):301-6.
- Diener H-, Dodick DW, Goadsby PJ, Lipton RB, Olesen J, Silberstein SD. 2012. Chronic migraine - classification, characteristics and treatment. *Nat Rev Neurol* 8(3):162-71.
- Dimitriadou V, Rouleau A, Trung Tuong MD, Newlands GJF, Miller HRP, Luffau G, Schwartz J-, Garbarg M. 1997. Functional relationships between sensory nerve fibers and mast cells of dura mater in normal and inflammatory conditions. *Neuroscience* 77(3):829-39.

- Dimlich RVW, Keller JT, Strauss TA, Fritts MJ. 1991. Linear arrays of homogenous mast cells in the dura mater of the rat. *J Neurocytol* 20(6):485-503.
- Dimtriadou V, Buzzi MG, Moskowitz MA, Theoharides TC. 1991. Trigeminal sensory fiber stimulation induces morphological changes reflecting secretion in rat dura mater mast cells. *Neuroscience* 44(1):97-112.
- Dodick D and Silberstein S. 2006. Central sensitization theory of migraine: Clinical implications. *Headache* 46(SUPPL. 4):S182-91.
- Duckles SP. 1986. Effects of capsaicin on vascular smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 333(1):59-64.
- Dussor G, Yan J, Xie JY, Ossipov MH, Dodick DW, Porreca F. 2014. Targeting TRP channels for novel migraine therapeutics. *ACS Chemical Neuroscience* 5(11):1085-96.
- Dux M and Messlinger K. 2009. Neurogenic vascular responses in the dura mater and their relevance for the pathophysiology of headaches. In: *NeuroImmune biology*. Jancsó G, editor. 1st ed. Elsevier Science. 193-209 p.
- Dux M, Sántha P, Jancsó G. 2012. The role of chemosensitive afferent nerves and TRP ion channels in the pathomechanism of headaches. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 464(3):239-48.
- Dux M, Sántha P, Jancsó G. 2003. Capsaicin-sensitive neurogenic sensory vasodilatation in the dura mater of the rat. *J Physiol (Lond)* 552(3):859-67.
- Dux M, Schwenger N, Messlinger K. 2002. Possible role of histamine (H₁- and H₂-) receptors in the regulation of meningeal blood flow. *Br J Pharmacol* 137(6):874-80.
- Dux M, Rosta J, Sántha P, Jancsó G. 2009. Involvement of capsaicin-sensitive afferent nerves in the proteinase-activated receptor 2-mediated vasodilatation in the rat dura mater. *Neuroscience* 161(3):887-94.
- Dux M, Will C, Vogler B, Filipovic MR, Messlinger K. 2016a. Meningeal blood flow is controlled by H₂S-NO crosstalk activating a HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Br J Pharmacol* 173(3):431-45.
- Dux M, Deák É, Tassi N, Sántha P, Jancsó G. 2016b. Endovanilloids are potential activators of the trigeminovascular nocisensor complex. *J Headache Pain* 17(1).
- Dux M, Rosta J, Pintér S, Sántha P, Jancsó G. 2007. Loss of capsaicin-induced meningeal neurogenic sensory vasodilatation in diabetic rats. *Neuroscience* 150(1):194-201.
- Eberhardt M, Dux M, Namer B, Miljkovic J, Cordasic N, Will C, Kichko TI, De La Roche J, Fischer M, Suárez SA, et al. 2014. H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nature Communications* 5.

- Ebersberger A, Averbeck B, Messlinger K, Reeh PW. 1999. Release of substance P, calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 from rat dura mater encephali following electrical and chemical stimulation in vitro. *Neuroscience* 89(3):901-7.
- Edelmayer RM, Le LN, Yan J, Wei X, Nassini R, Materazzi S, Preti D, Appendino G, Geppetti P, Dodick DW, et al. 2012. Activation of TRPA1 on dural afferents: A potential mechanism of headache pain. *Pain* 153(9):1949-58.
- Edvinsson L and Goadsby PJ. 1994. Neuropeptides in migraine and cluster headache. *Cephalalgia* 14(5):320-7.
- Eftekhari S, Salvatore CA, Calamari A, Kane SA, Tajti J, Edvinsson L. 2010. Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human trigeminal ganglion. *Neuroscience* 169(2):683-96.
- Eltorp C, Jansen-Olesen I, Hansen AJ. 2000. Release of calcitonin gene-related peptide (CGRP) from guinea pig dura mater in vitro is inhibited by sumatriptan but unaffected by nitric oxide. *Cephalalgia* 20(9):838-44.
- Evans MS, Cheng X, Jeffry JA, Disney KE, Premkumar LS. 2012. Sumatriptan inhibits TRPV1 channels in trigeminal neurons. *Headache* 52(5):773-84.
- Evans RW. 1996. Diagnostic testing for the evaluation of headaches. *Neurol Clin* 14(1):1-26.
- Fain JN, Kanu A, Bahouth SW, Cowan Jr. GSM, Hiler ML, Leffler CW. 2002. Comparison of PGE2, prostacyclin and leptin release by human adipocytes versus explants of adipose tissue in primary culture. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids* 67(6):467-73.
- Fan P-, Kuo P-, Hu JW, Chang S-, Hsieh S-, Chiou L-. 2012. Different trigemino-vascular responsiveness between adolescent and adult rats in a migraine model. *Cephalalgia* 32(13):979-90.
- Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. 2011. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 12(5):3117-32.
- Fidan I, Yüksel S, Ýmir T, Irkeç C, Aksakal FN. 2006. The importance of cytokines, chemokines and nitric oxide in pathophysiology of migraine. *J Neuroimmunol* 171(1-2):184-8.
- Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, Trogon JG, Pan L, Sherry B, Dietz W. 2012. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *Am J Prev Med* 42(6):563-70.
- Fischer MJM and Reeh PW. 2007. Sensitization to heat through G-protein-coupled receptor pathways in the isolated sciatic mouse nerve. *Eur J Neurosci* 25(12):3570-5.
- Ford ES, Li C, Pearson WS, Zhao G, Strine TW, Mokdad AH. 2008. Body mass index and headaches: Findings from a national sample of US adults. *Cephalalgia* 28(12):1270-6.

- Francis MV. 2016. Migraine without aura: towards a new definition. *J Headache Pain Manag* 1(2):1-5.
- Freeman LR, Zhang L, Nair A, Dasuri K, Francis J, Fernandez-Kim S-, Bruce-Keller AJ, Keller JN. 2013. Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brainfunction. *Free Radical Biology and Medicine* 56:226-33.
- Frye M, McMurtry I, Orton EC, Fagan K. 2009. Use of fat-fed rats to study the metabolic and vascular sequelae of obesity and β -adrenergic antagonism. *Comp Med* 59(3):242-8.
- Geppetti P, Del Bianco E, Santicioli P, Th.Lippe I, Maggi CA, Sicuteri F. 1990. Release of sensory neuropeptides from dural venous sinuses of guinea pig. *Brain Res* 510(1):58-62.
- Goadsby PJ. 2013. Migraine and the trigeminal autonomic cephalalgias. In: Wall & melzack's textbook of pain. McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey I, et al, editors. Sixth Edition ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 815 p.
- Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. 1990. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol* 28(2):183-7.
- Gruber H-, Bernecker C, Pailer S, Fauler G, Horejsi R, Möller R, Lechner A, Fazekas F, Truschnig-Wilders M. 2010a. Hyperinsulinaemia in migraineurs is associated with nitric oxide stress. *Cephalalgia* 30(5):593-8.
- Gruber H-, Bernecker C, Lechner A, Weiss S, Wallner-Blazek M, Meinitzer A, Höbarth G, Renner W, Fauler G, Horejsi R, et al. 2010b. Increased nitric oxide stress is associated with migraine. *Cephalalgia* 30(4):486-92.
- Gu Q, Kwong K, Lee L-. 2003. Ca^{2+} transient evoked by chemical stimulation is enhanced by PGE2 in vagal sensory neurons: Role of cAMP/PKA signaling pathway. *J Neurophysiol* 89(4):1985-93.
- Gupta R, Pathak R, Bhatia MS, Banerjee BD. 2009. Comparison of oxidative stress among migraineurs, tension-type headache subjects, and a control group. *Annals of Indian Academy of Neurology* 12(3):167-72.
- Gutierrez-Lopez L, Garcia-Sanchez JR, Rincon-Viquez MDJ, Lara-Padilla E, Sierra-Vargas MP, Olivares-Corichi IM. 2012. Hypocaloric diet and regular moderate aerobic exercise is an effective strategy to reduce anthropometric parameters and oxidative stress in obese patients. *Obesity Facts* 5(1):12-22.
- Guyenet SJ and Schwartz MW. 2012. Regulation of food intake, energy balance, and body fat mass: Implications for the pathogenesis and treatment of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 97(3):745-55.
- Harriott AM and Gold MS. 2009. Electrophysiological properties of dural afferents in the absence and presence of inflammatory mediators. *J Neurophysiol* 101(6):3126-34.

- Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). 2013. The international classification of headache disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 33(9):629-808.
- Hecht SS, Koh W-, Wang R, Chen M, Carmella SG, Murphy SE, Yuan J-. 2015. Elevated levels of mercapturic acids of acrolein and crotonaldehyde in the urine of chinese women in singapore who regularly cook at home. *PLoS ONE* 10(3).
- Herbert MK and Holzer P. 1994. Interleukin-1 β enhances capsaicin-induced neurogenic vasodilatation in the rat skin. *Br J Pharmacol* 111(3):681-6.
- Ho TW, Ferrari MD, Dodick DW, Galet V, Kost J, Fan X, Leibensperger H, Froman S, Assaid C, Lines C, et al. 2008. Efficacy and tolerability of MK-0974 (telcagepant), a new oral antagonist of calcitonin gene-related peptide receptor, compared with zolmitriptan for acute migraine: A randomised, placebo-controlled, parallel-treatment trial. *Lancet* 372(9656):2115-23.
- Holzer P. 2009. Acid-sensitive ion channels and receptors. *Handb Exp Pharmacol* 194:283-332.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95(5):2409-15.
- Huang D, Li S, Dhaka A, Story GM, Cao Y-. 2012. Expression of the transient receptor potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons innervating the dura. *Molecular Pain* 8.
- Iwashita T, Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, Ebine T, Funakubo M, Suzuki N. 2013. Activation of extracellular signal-regulated kinase in the trigeminal ganglion following both treatment of the dura mater with capsaicin and cortical spreading depression. *Neurosci Res* 77(1-2):110-9.
- Jenkins DW, Langmead CJ, Parsons AA, Strijbos PJ. 2004. Regulation of calcitonin gene-related peptide release from rat trigeminal nucleus caudalis slices in vitro. *Neurosci Lett* 366(3):241-4.
- Jin C, MacDonell R, Speed J, Pollock D. 2014. Synergy of high salt and high fat diet on kidney injury and adiposity (1086.1). *The FASEB Journal* 28(1 Supplement).
- Jonk AM, Houben AJHM, De Jongh RT, Serné EH, Schaper NC, Stehouwer CDA. 2007. Microvascular dysfunction in obesity: A potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Physiology* 22(4):252-60.
- Jordt S-, Bautista DM, Chuang H-, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. 2004. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427(6971):260-5.
- Julius D. 2013. TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29:355-84.

- Jung UJ and Choi M-. 2014. Obesity and its metabolic complications: The role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 15(4):6184-223.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444(7121):840-6.
- Kark T, Bagi Z, Lizanecz E, Pásztor ET, Erdei N, Czikora Á, Papp Z, Édes I, Pórszász R, Tóth A. 2008. Tissue-specific regulation of microvascular diameter: Opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol Pharmacol* 73(5):1405-12.
- Karsan N and Goadsby PJ. 2015a. Calcitonin gene-related peptide and migraine. *Curr Opin Neurol* 28(3):250-4.
- Karsan N and Goadsby PJ. 2015b. CGRP mechanism antagonists and migraine management. *Curr Neurol Neurosci Rep* 15(5):25.
- Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. 2000. Quantitative insulin sensitivity check index: A simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85(7):2402-10.
- Keller JT and Marfurt CF. 1991. Peptidergic and serotonergic innervation of the rat dura mater. *J Comp Neurol* 309(4):515-34.
- Kelman L. 2007. The triggers or precipitants of the acute migraine attack. *Cephalalgia* 27(5):394-402.
- Khan AA, Diogenes A, Jeske NA, Henry MA, Akopian A, Hargreaves KM. 2008. Tumor necrosis factor α enhances the sensitivity of rat trigeminal neurons to capsaicin. *Neuroscience* 155(2):503-9.
- Khomula EV, Viatchenko-Karpinski VY, Borisyuk AL, Duzhy DE, Belan PV, Voitenko NV. 2013. Specific functioning of Cav3.2 T-type calcium and TRPV1 channels under different types of STZ-diabetic neuropathy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1832(5):636-49.
- Knyihár-Csillik E, Tajti J, Samsara M, Sáros G, Slezák S, Vécsei L. 1997. Effect of a serotonin agonist (sumatriptan) on the peptidergic innervation of the rat cerebral dura mater and on the expression of c-fos in the caudal trigeminal nucleus in an experimental migraine model. *J Neurosci Res* 48(5):449-64.
- Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, Noguchi K. 2005. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with Ad/C-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol* 493(4):596-606.
- Koçer A, Koçer E, Memisogullari R, Domaç FM, Yüksel H. 2010. Interleukin-6 levels in tension headache patients. *Clin J Pain* 26(8):690-3.

- Koçer A, Memisogullari R, Domaç FM, Ilhan A, Koçer E, Okuyucu S, Özdemir B, Yüksel H. 2009. IL-6 levels in migraine patients receiving topiramate. *Pain Practice* 9(5):375-9.
- Kopelman P. 2007. Health risks associated with overweight and obesity. *Obes Rev* 8(SUPPL. 1):13-7.
- Kunkler PE, Ballard CJ, Oxford GS, Hurley JH. 2011. TRPA1 receptors mediate environmental irritant-induced meningeal vasodilatation. *Pain* 152(1):38-44.
- Kunkler PE, Zhang L, Pellman JJ, Oxford GS, Hurley JH. 2015. Sensitization of the trigeminovascular system following environmental irritant exposure. *Cephalalgia* 35(13):1192-201.
- Kunkler PE, Ballard CJ, Pellman JJ, Zhang L, Oxford GS, Hurley JH. 2014. Intraganglionic signaling as a novel nasal-meningeal pathway for TRPA1-dependent trigeminovascular activation by inhaled environmental irritants. *PLoS ONE* 9(7).
- Kurosawa M, Messlinger K, Pawlak M, Schmidt RF. 1995. Increase of meningeal blood flow after electrical stimulation of rat dura mater encephali: Mediation by calcitonin gene-related peptide. *Br J Pharmacol* 114(7):1397-402.
- Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. 2002. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia* 22(1):54-61.
- Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO. 2009. Obesity and cardiovascular disease. risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J Am Coll Cardiol* 53(21):1925-32.
- Lee Y, Kawai Y, Shiosaka S, Takami K, Kiyama H, Hillyard CJ, Girgis S, MacIntyre I, Emson PC, Tohyama M. 1985. Coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P-like peptide in single cells of the trigeminal ganglion of the rat: Immunohistochemical analysis. *Brain Res* 330(1):194-6.
- Leffler A, Mönter B, Koltzenburg M. 2006. The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice. *Neuroscience* 139(2):699-709.
- Lennerz JK, Rühle V, Ceppa EP, Neuhuber WL, Bunnett NW, Grady EF, Messlinger K. 2008. Calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the rat trigeminovascular system: Differences between peripheral and central CGRP receptor distribution. *J Comp Neurol* 507(3):1277-99.
- Levy D, Burstein R, Kainz V, Jakubowski M, Strassman AM. 2007. Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache. *Pain* 130(1-2):166-76.
- Lin Y-, Lin R-, Ruan T, Khosravi M, Lee L-. 2015. A synergistic effect of simultaneous TRPA1 and TRPV1 activations on vagal pulmonary C-fiber afferents. *J Appl Physiol* 118(3):273-81.

- Linde M, Gustavsson A, Stovner LJ, Steiner TJ, Barré J, Katsarava Z, Lainez JM, Lampl C, Lantéri-Minet M, Rastenytė D, et al. 2012. The cost of headache disorders in europe: The eurolight project. *Eur J Neurol* 19(5):703-11.
- Lindqvist A, De La Cour CD, Stegmark A, Håkanson R, Erlanson-Albertsson C. 2005. Overeating of palatable food is associated with blunted leptin and ghrelin responses. *Regul Pept* 130(3):123-32.
- Lopshire JC and Nicol GD. 1998. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: Whole-cell and single-channel studies. *Journal of Neuroscience* 18(16):6081-92.
- Lloyd DR, Chen PB, Hargreaves KM. 2012. Anti-hyperalgesic effects of anti-serotonergic compounds on serotonin- and capsaicin-evoked thermal hyperalgesia in the rat. *Neuroscience* 203:207-15.
- Ma S-, Li B, Huang H-, Peng Y-, Qiu Y-. 2012. Interleukin-6 inhibits L-type calcium channel activity of cultured cerebellar granule neurons. *Journal of Physiological Sciences* 62(5):385-92.
- Malik VS, Willett WC, Hu FB. 2013. Global obesity: Trends, risk factors and policy implications. *Nat Rev Endocrinol* 9(1):13-27.
- Manuelyan I, Syed A, Koide M, Shui B, Sonkusare S, Kotlikoff M, Nelson M, Wellman G. 2015. TRPV1-mediated Ca²⁺ influx and middle meningeal artery constriction. *The FASEB Journal* 29(1 Supplement).
- Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA. 1987. Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *J Neurosci* 7(12):4129-36.
- Materazzi S, Nassini R, André E, Campi B, Amadesi S, Trevisani M, Bunnett NW, Patacchini R, Geppetti P. 2008. Cox-dependent fatty acid metabolites cause pain through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(33):12045-50.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. 1985. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28(7):412-9.
- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, et al. 2007. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(33):13525-30.
- Meents JE, Neeb L, Reuter U. 2010. TRPV1 in migraine pathophysiology. *Trends Mol Med* 16(4):153-9.
- Messlinger K, Lennerz JK, Eberhardt M, Fischer MJM. 2012. CGRP and NO in the trigeminal system: Mechanisms and role in headache generation. *Headache* 52(9):1411-27.

- Messlinger K, Hanesch U, Kurosawa M, Pawlak M, Schmidt RF. 1995. Calcitonin gene related peptide released from dural nerve fibers mediates increase of meningeal blood flow in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 73(7):1020-4.
- Meßlinger K, Hanesch U, Baumgärtel M, Trost B, Schmidt RF. 1993. Innervation of the dura mater encephali of cat and rat: Ultrastructure and calcitonin gene-related peptide-like and substance P-like immunoreactivity. *Anat Embryol* 188(3):219-37.
- Miller RJ, et al. 2009. Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. *Handb Exp Pharmacol* 194:417-49.
- Mitsikostas DD, Sanchez Del Rio M, Waeber C. 2002. 5-Hydroxytryptamine_{1B/1D} and 5-hydroxytryptamine_{1F} receptors inhibit capsaicin-induced c-fos immunoreactivity within mouse trigeminal nucleus caudalis. *Cephalalgia* 22(5):384-94.
- Morita K, Miyasako T, Kitayama S, Dohi T. 2004. Interleukin-1 inhibits voltage-dependent P/Q-type Ca²⁺ channel associated with the inhibition of the rise of intracellular free Ca²⁺ concentration and catecholamine release in adrenal chromaffin cells. *Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects* 1673(3):160-9.
- Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M. 2005. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Molecular Pain* 1.
- Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. 2008. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: Advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(1):E15-26.
- Murray CJL. 2015. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: Quantifying the epidemiological transition. *Lancet* .
- Nassini R, Materazzi S, Vriens J, Prenen J, Benemei S, De Siena G, La Marca G, Andr E, Preti D, Avonto C, et al. 2012. The 'headache tree' via umbellulone and TRPA1 activates the trigeminovascular system. *Brain* 135(2):376-90.
- Neeb L, Hellen P, Boehnke C, Hoffmann J, Schuh-Hofer S, Dirnagl U, Reuter U. 2011. IL-1 β stimulates COX-2 dependent PGE₂ synthesis and CGRP release in rat trigeminal ganglia cells. *PLoS ONE* 6(3).
- Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC, Biryukov S, Abbafati C, Abera SF, et al. 2014. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the global burden of disease study 2013. *The Lancet* 384(9945):766-81.
- Nicoletti P, Trevisani M, Manconi M, Gatti R, De Siena G, Zagli G, Benemei S, Capone JA, Geppetti P, Pini LA. 2008. Ethanol causes neurogenic vasodilation by TRPV1 activation and CGRP release in the trigeminovascular system of the guinea pig. *Cephalalgia* 28(1):9-17.

- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. 2007. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87(1):165-217.
- Nosedá R and Burstein R. 2013. Migraine pathophysiology: Anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, cortical spreading depression, sensitization, and modulation of pain. *Pain* 154(SUPPL. 1):S44-53.
- Nozaki K, Boccalini P, Moskowitz MA. 1992. Expression of c-fos-like immunoreactivity in brainstem after meningeal irritation by blood in the subarachnoid space. *Neuroscience* 49(3):669-80.
- Obreja O, Biasio W, Andratsch M, Lips KS, Rathee PK, Ludwig A, Rose-John S, Kress M. 2005. Fast modulation of heat-activated ionic current by proinflammatory interleukin 6 in rat sensory neurons. *Brain* 128(7):1634-41.
- Obrosova IG, Ilnytska O, Lyzogubov VV, Pavlov IA, Mashtalir N, Nadler JL, Drel VR. 2007. High-fat diet-induced neuropathy of pre-diabetes and obesity: Effects of "healthy" diet and aldose reductase inhibition. *Diabetes* 56(10):2598-608.
- Olesen J, Burstein R, Ashina M, Tfelt-Hansen P. 2009. Origin of pain in migraine: Evidence for peripheral sensitisation. *Lancet Neurol* 8(7):679-90.
- Olesen J, Diener H-, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U, Pollentier S, Lesko LM. 2004. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *New Engl J Med* 350(11):1104-10.
- Oprée A and Kress M. 2000. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α , IL-1 β , and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: Effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *Journal of Neuroscience* 20(16):6289-93.
- Ornello R, Ripa P, Pistoia F, Degan D, Tiseo C, Carolei A, Sacco S. 2015. Migraine and body mass index categories: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Journal of Headache and Pain* 16(1).
- Patil MJ, Jeske NA, Akopian AN. 2010. Transient receptor potential V1 regulates activation and modulation of transient receptor potential A1 by Ca²⁺. *Neuroscience* 171(4):1109-19.
- Peeters A, Barendregt JJ, Willekens F, Mackenbach JP, Al Mamun A, Bonneux L, Janssen F, Kunst A, Nusselder W. 2003. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: A life-table analysis. *Ann Intern Med* 138(1):24-32.
- Peitl B, Döbrönte R, Drimba L, Sári R, Varga A, Németh J, Pázmány T, Szilvássy Z. 2010. Involvement of cholecystokinin in baseline and post-prandial whole body insulin sensitivity in rats. *Eur J Pharmacol* 644(1-3):251-6.
- Penfield W and McNaughton F. 1940. Dural headache and innervation of the dura mater. *Arch Neurol* 44(1):43-75.

- Perini F, D'Andrea G, Galloni E, Pignatelli F, Billo G, Alba S, Bussone G, Toso V. 2005. Plasma cytokine levels in migraineurs and controls. *Headache* 45(7):926-31.
- Peterlin BL, Rapoport AM, Kurth T. 2010. Migraine and obesity: Epidemiology, mechanisms, and implications. *Headache* 50(4):631-48.
- Peterlin BL, Rosso AL, Rapoport AM, Scher AI. 2010. Obesity and migraine: The effect of age, gender and adipose tissue distribution. *Headache* 50(1):52-62.
- Petersen KA, Lassen LH, Birk S, Lesko L, Olesen J. 2005. BIBN4096BS antagonizes human α -calcitonin gene related peptide-induced headache and extracerebral artery dilatation. *Clin Pharmacol Ther* 77(3):202-13.
- Pethö G, Derow A, Reeh PW. 2001. Bradykinin-induced nociceptor sensitization to heat is mediated by cyclooxygenase products in isolated rat skin. *Eur J Neurosci* 14(2):210-8.
- Picchi MG, de Mattos AM, Barbosa MR, Duarte CP, Gandini MA, Portari GV, Jordão AA. 2011. A high-fat diet as a model of fatty liver disease in rats. *Acta Cir Bras* 26(SUPPL. 2):25-30.
- Pietrobon D and Moskowitz MA. 2013. Pathophysiology of migraine. *Annual Review of Physiology* 75:365-91.
- Popkin BM, Adair LS, Ng SW. 2012. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev* 70(1):3-21.
- Pórszász R, Porkoláb A, Ferencz A, Pataki T, Szilvássy Z, Szolcsányi J. 2002. Capsaicin-induced nonneural vasoconstriction in canine mesenteric arteries. *Eur J Pharmacol* 441(3):173-5.
- Ragab SMM, Abd Elghaffar SK, El-Metwally TH, Badr G, Mahmoud MH, Omar HM. 2015. Effect of a high fat, high sucrose diet on the promotion of non-alcoholic fatty liver disease in male rats: The ameliorative role of three natural compounds. *Lipids Health Dis* 14(1).
- Rainero I, Limone P, Ferrero M, Valfrè W, Pelissetto C, Rubino E, Gentile S, Lo Giudice R, Pinessi L. 2005. Insulin sensitivity is impaired in patients with migraine. *Cephalalgia* 25(8):593-7.
- Rasmussen BK, Jensen R, Schroll M, Olesen J. 1991. Epidemiology of headache in a general population-A prevalence study. *J Clin Epidemiol* 44(11):1147-57.
- Ray BS and Wolff HG. 1940. Experimental studies on headache: Pain sensitive structures of the head and their significance in headache. *Arch Surg* 41:813-56.
- Recober A and Goadsby PJ. 2010. Calcitonin gene-related peptide: A molecular link between obesity and migraine? *Drug News and Perspectives* 23(2):112-7.
- Reuss S, Riemann R, Vollrath L. 1992. Substance P- and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive neurons in the rat trigeminal ganglion - with special reference to meningeal and pineal innervation. *Acta Histochem* 92(1):104-9.

- Romero-Reyes M and Akerman S. 2014. Update on animal models of migraine. *Curr Pain Headache Rep* 18(11).
- Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M, Gordon SE. 2004. Ca²⁺/Calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol* 123(1):53-62.
- Rossi HL, Luu AKS, Devilbiss JL, Recober A. 2013. Obesity increases nociceptive activation of the trigeminal system. *European Journal of Pain (United Kingdom)* 17(5):649-53.
- Rossi HL, Broadhurst KA, Luu ASK, Lara O, Kothari SD, Mohapatra DP, Recober A. 2015. Abnormal trigeminal sensory processing in obese mice. *Pain* 157(1):235-46.
- Rossi HL, Luu AKS, Kothari SD, Kuburas A, Neubert JK, Caudle RM, Recober A. 2013. Effects of diet-induced obesity on motivation and pain behavior in an operant assay. *Neuroscience* 235:87-95.
- Russo AF. 2015. Calcitonin gene-related peptide (CGRP): A new target for migraine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55:533-52.
- Salas MM, Hargreaves KM, Akopian AN. 2009. TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: Interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur J Neurosci* 29(8):1568-78.
- Salomon JA, Vos T, Hogan DR, Gagnon M, Naghavi M, Mokdad A, Begum N, Shah R, Karyana M, Kosen S, et al. 2012. Common values in assessing health outcomes from disease and injury: Disability weights measurement study for the global burden of disease study 2010. *Lancet* 380(9859):2129-43.
- Sankhla M, Sharma TK, Mathur K, Rathor JS, Butolia V, Gadhok AK, Vardey SK, Sinha M, Kaushik GG. 2012. Relationship of oxidative stress with obesity and its role in obesity induced metabolic syndrome. *Clin Lab* 58(5-6):385-92.
- Sarchielli P, Alberti A, Codini M, Floridi A, Gallai V. 2000. Nitric oxide metabolites, prostaglandins and trigeminal vasoactive peptides in internal jugular vein blood during spontaneous migraine attacks. *Cephalalgia* 20(10):907-18.
- Sarchielli P, Alberti A, Baldi A, Coppola F, Rossi C, Pierguidi L, Floridi A, Calabresi P. 2006. Proinflammatory cytokines, adhesion molecules, and lymphocyte integrin expression in the internal jugular blood of migraine patients without aura assessed ictally. *Headache* 46(2):200-7.
- Schäfers M and Sorkin L. 2008. Effect of cytokines on neuronal excitability. *Neurosci Lett* 437(3):188-93.
- Scher AI, Stewart WF, Ricci JA, Lipton RB. 2003. Factors associated with the onset and remission of chronic daily headache in a population-based study. *Pain* 106(1-2):81-9.
- Schueler M, Neuhuber WL, De Col R, Messlinger K. 2014. Innervation of rat and human dura mater and pericranial tissues in the parieto-temporal region by meningeal afferents. *Headache* 54(6):996-1009.

- Schwenger N, Dux M, De Col R, Carr R, Messlinger K. 2007. Interaction of calcitonin gene-related peptide, nitric oxide and histamine release in neurogenic blood flow and afferent activation in the rat cranial dura mater. *Cephalalgia* 27(6):481-91.
- Seaman VY, Bennett DH, Cahill TM. 2009. Indoor acrolein emission and decay rates resulting from domestic cooking events. *Atmos Environ* 43(39):6199-204.
- Shimizu T, Toriumi H, Sato H, Shibata M, Nagata E, Gotoh K, Suzuki N. 2007. Distribution and origin of TRPV1 receptor-containing nerve fibers in the dura mater of rat. *Brain Res* 1173(1):84-91.
- Silva-Néto RP, Peres MFP, Valença MM. 2014. Odorant substances that trigger headaches in migraine patients. *Cephalalgia* 34(1):14-21.
- Sinclair AJ and Matharu M. 2012. Migraine, cerebrovascular disease and the metabolic syndrome. *Ann Indian Acad Neurol* 15(SUPPL.):72-7.
- Singer G. and Granger N. 2007. Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. *Microcirculation* 14(4-5):375-87.
- Spahn V, Stein C, Zöllner C. 2014. Modulation of transient receptor vanilloid 1 activity by transient receptor potential ankyrin 1. *Mol Pharmacol* 85(2):335-44.
- Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AFH. 2003. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: Results of the prospective population-based european prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)-potsdam study. *Diabetes* 52(3):812-7.
- Staruschenko A, Jeske NA, Akopian AN. 2010. Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. *J Biol Chem* 285(20):15167-77.
- Stevens JF and Maier CS. 2008. Acrolein: Sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res* 52(1):7-25.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, et al. 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112(6):819-29.
- Stovner LJ and Andree C. 2010. Prevalence of headache in europe: A review for the eurolight project. *J Headache Pain* 11(4):289-99.
- Stovner LJ and Andrée C. 2008. Impact of headache in europe: A review for the eurolight project. *J Headache Pain* 9(3):139-46.
- Stovner LJ, Hagen K, Jensen R, Katsarava Z, Lipton RB, Scher AI, Steiner TJ, Zwart J-. 2007. The global burden of headache: A documentation of headache prevalence and disability worldwide. *Cephalalgia* 27(3):193-210.

- Szallasi A., Cortright D.N., Blum C.A., Eid S.R. 2007. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* 6(5):357-72.
- Takeda M, Kitagawa J, Takahashi M, Matsumoto S. 2008. Activation of interleukin-1 β receptor suppresses the voltage-gated potassium currents in the small-diameter trigeminal ganglion neurons following peripheral inflammation. *Pain* 139(3):594-602.
- Taylor-Clark TE, Undem BJ, MacGlashan Jr. DW, Ghatta S, Carr MJ, McAlexander MA. 2008. Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Mol Pharmacol* 73(2):274-81.
- Theoharides TC, Donelan J, Kandere-Grzybowska K, Konstantinidou A. 2005. The role of mast cells in migraine pathophysiology. *Brain Res Rev* 49(1):65-76.
- Toda N, Usui H, Nishino N, Fujiwara M. 1972. Cardiovascular effects of capsaicin in dogs and rabbits. *J Pharmacol Exp Ther* 181(3):512-21.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21(3):531-43.
- Tóth A, Czikora Á, Pásztor ET, Dienes B, Bai P, Csernoch L, Rutkai I, Csató V, Mányiné IS, Pórszász R, et al. 2014. Vanilloid receptor-1 (TRPV1) expression and function in the vasculature of the rat. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 62(2):129-44.
- Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, Imamachi N, André E, Patacchini R, Cottrell GS, et al. 2007. 4-hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(33):13519-24.
- Trevisani M, Smart D, Gunthorpe MJ, Tognetto M, Barbieri M, Campi B, Amadesi S, Gray J, Jerman JC, Brough SJ, et al. 2002. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat Neurosci* 5(6):546-51.
- Tuncel D, Tolun FI, Gokce M, Imrek S, Ekerbiçer H. 2008. Oxidative stress in migraine with and without aura. *Biol Trace Elem Res* 126(1-3):92-7.
- Uddman R, Edvinsson L, Ekman R, Kingman T, McCulloch J. 1985. Innervation of the feline cerebral vasculature by nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide: Trigeminal origin and co-existence with substance P. *Neurosci Lett* 62(1):131-6.
- Uzar E, Evliyaoglu O, Yucel Y, Ugur Cevik M, Acar A, Guzel I, Islamoglu Y, Colpan L, Tasdemir N. 2011. Serum cytokine and pro-brain natriuretic peptide (BNP) levels in patients with migraine. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 15(10):1111-6.
- Van Buren JJ, Bhat S, Rotello R, Pauza ME, Premkumar LS. 2005. Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Molecular Pain* 1.

- Vanmolkot FH and De Hoon JN. 2007. Increased C-reactive protein in young adult patients with migraine. *Cephalalgia* 27(7):843-6.
- Verrotti A, Di Fonzo A, Penta L, Agostinelli S, Parisi P. 2014. Obesity and headache/migraine: The importance of weight reduction through lifestyle modifications. *BioMed Res Int* 2014.
- Vos T, Barber RM, Bell B, Bertozzi-Villa A, Biryukov S, Bolliger I, Charlson F, Davis A, Degenhardt L, Dicker D, et al. 2015. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: A systematic analysis for the global burden of disease study 2013. *Lancet* 386(9995):743-800.
- Wacogne C, Lacoste JP, Guilibert E, Hugues FC, Le Jeune C. 2003. Stress, anxiety, depression and migraine. *Cephalalgia* 23(6):451-5.
- Waeber C and Moskowitz MA. 2005. Migraine as an inflammatory disorder. *Neurology* 64(10 SUPPL. 2):S9-S15.
- Walker CS and Hay DL. 2013. CGRP in the trigeminovascular system: A role for CGRP, adrenomedullin and amylin receptors? *Br J Pharmacol* 170(7):1293-307.
- WHO. 2013. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. Geneva: World Health Organization.
- Wilde DW, Massey KD, Walker GK, Vollmer A, Grekin RJ. 2000. High-fat diet elevates blood pressure and cerebrovascular muscle Ca²⁺ current. *Hypertension* 35(3):832-7.
- Wonisch W, Falk A, Sundl I, Winklhofer-Roob BM, Lindschinger M. 2012. Oxidative stress increases continuously with BMI and age with unfavourable profiles in males. *Aging Male* 15(3):159-65.
- Wright L.J., Schur E., Noonan C., Ahumada S., Buchwald D., Afari N. 2010. Chronic pain, overweight, and obesity: Findings from a community-based twin registry. *J Pain* 11(7):628-35.
- Yan J, Melemedjian OK, Price TJ, Dussor G. 2012. Sensitization of dural afferents underlies migraine-related behavior following meningeal application of interleukin-6 (IL-6). *Molecular Pain* 8.
- Yan J, Edelmayer RM, Wei X, Felice MD, Porreca F, Dussor G. 2011. Dural afferents express acid-sensing ion channels: A role for decreased meningeal pH in migraine headache. *Pain* 152(1):106-13.
- Yilmaz G, Sürer H, Inan LE, Coskun Ö, Yücel D. 2007. Increased nitrosative and oxidative stress in platelets of migraine patients. *Tohoku J Exp Med* 211(1):23-30.
- Zagami AS, Goadsby PJ, Edvinsson L. 1990. Stimulation of the superior sagittal sinus in the cat causes release of vasoactive peptides. *Neuropeptides* 16(2):69-75.

- Zhang X, Burstein R, Levy D. 2012. Local action of the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 on intracranial meningeal nociceptors. *Cephalalgia* 32(1):66-72.
- Zhang X-, Kainz V, Burstein R, Levy D. 2011. Tumor necrosis factor- α induces sensitization of meningeal nociceptors mediated via local COX and p38 MAP kinase actions. *Pain* 152(1):140-9.
- Zhang X-, Strassman AM, Burstein R, Levy D. 2007. Sensitization and activation of intracranial meningeal nociceptors by mast cell mediators. *J Pharmacol Exp Ther* 322(2):806-12.
- Zhou C, Ye H-, Wang S-, Chai Z. 2006. Interleukin-1 β regulation of N-type Ca²⁺ channels in cortical neurons. *Neurosci Lett* 403(1-2):181-5.
- Zurberg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA. 2007. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat Neurosci* 10(3):277-9.

10.2. Saját közlemények



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/21/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Marics Balázs
Neptun kód: GMMTO4
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Marics, B.**, Peitl, B., Varga, A., Pázmándi, K. L., Bácsi, A., Németh, J., Szilvássy, Z., Jancsó, G., Dux, M.: Diet-induced obesity alters dural CGRP release and potentiates TRPA1-mediated trigeminovascular responses.
Cephalalgia. [Epub ahead of Print], 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0333102416654883>
IF: 6.052 (2015)
2. **Marics, B.**, Peitl, B., Pázmándi, K. L., Bácsi, A., Németh, J., Oszlács, O., Jancsó, G., Dux, M.: Diet-induced obesity enhances TRPV1-mediated neurovascular reactions in the dura mater.
Headache. [Epub ahead of Print] [1-30], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/head.13033>
IF: 2.961 (2015)





További közlemények

3. Docsa, T., **Marics, B.**, Németh, J., Hüse, C., Somsák, L., Gergely, P., Peitl, B.: Insulin sensitivity is modified by a glycogen phosphorylase inhibitor: glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin in streptozotocin-induced diabetic rats.
Curr. Top. Med. Chem. 15 (23), 2390-2394, 2015.
IF: 2.9

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11,913

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
9,013**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.02.09.



11. TÁRGYSZAVAK

fejfájás, migrén, elhízás, calcitonin gén-rokon peptid, tranziens receptor potenciál vanilloid 1, tranziens receptor potenciál ankyrin 1, kapszaicin, akrolein, szenzoros ideg, trigeminális ganglion, gyulladás, lézer Doppler véráramlás mérés

headache, migraine, obesity, calcitonin gene-related peptide, transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential ankyrin 1, capsaicin, acrolein, sensory neuron, trigeminal ganglia, inflammation, laser Doppler flowmetry

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni legmélyebb hálámat **Dr. Dux Máriának**, aki áldozatos munkájával, támogatásával és folyamatos iránymutatásával lehetővé tette az értekezésem alapjául szolgáló kísérletes munka és a PhD tanulmányaim elvégzését. Köszönettel tartozom Neki azért is, mert nem csak szakmai mentorként nyújtotta számomra a lehető legtöbbet, de emberi példamutatásával egy életre szóló mintául szolgált, melyhez csak remélhetem, hogy egyszer képes leszek felnőni.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Peitl Barnának**, aki lehetőséget adott, hogy bekapcsolódjak a tudományos kutatások világába, majd pedig szakmai elképzeléseimnek teret engedve hozzájárult a kísérletek elvégzéséhez.

Kiemelt köszönettel tartozom **Dr. Jancsó Gábor Professzor Úrnak**, amiért figyelmén, támogatásán és a Szegedi Tudományegyetem Élettani Intézetében működő tudománytörténeti jelentőségű szellemi műhelyén keresztül hozzájárult kísérletes munkánk sikeréhez és céljaim megvalósításához.

Köszönöm **Prof. Dr. Szilvássy Zoltánnak**, hogy a Debreceni Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében dolgozhattam.

Szeretném megköszönni szerzőtársaimnak **Dr. Varga Angelikának**, **Dr. Pázmándi Kittinek**, **Oszlács Orsolyának**, **Dr. Bácsi Attilának** és **Dr. Németh Józsefnek**, hogy értékes munkájukkal és észrevételeikkel emelték a kutatásunk színvonalát.

Szeretnék kiemelt köszönetet mondani **Dr. Benkő Iлона** tanárnőnek, aki a debreceni éveim során a legnagyobb hatást gyakorolta emberi- és szakmai fejlődésemre, akihez rengeteg teendője ellenére bármikor bizalommal fordulhattam, valamint aki szívügyének tekintette az igényes, minőségi gondolkodásmód kialakítását és az olyan értékek átadását, melyek által nem csak hogy többé válhattam, de egyúttal iránymutatást is adnak egész további életemre nézve.

Köszönöm **Dr. Drimba Lászlónak** a rengeteg baráti támogatást, melyet a közösen eltöltött évek során kaptam. Köszönöm **Dr. Pórszász Róbertnek**, hogy tanácsaival hozzájárult tudományos munkám és PhD tanulmányaim sikereihez. Köszönöm, **Dr. Hegedűs Csabának**, hogy matematika és statisztikai készségeire bármikor számíthattam. Köszönöm **Szegváriné Erdős Andreának** a mindig precíz és magas színvonalú asszisztenciát, valamint köszönöm a

Debreceni Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet valamennyi dolgozójának, aki valamilyen formában hozzájárult tudományos munkám sikeréhez.

Külön köszönettel tartozom **Oláh Zsuzsannának**, aki elkötelezettségével és önzetlen segítőkészségével számtalan PhD hallgató életében jelent biztos pontot, továbbá aki nap mint nap megmutatja, hogy egy ideális világban hogyan kellene az embereknek egymáshoz viszonyulniuk.

Köszönettel tartozom a **Richter Gedeon Talentum Alapítvány**, valamint a **GINOP-2.3.2-15-2016-00043 számú pályázat** által biztosított anyagi támogatásért.

A legnagyobb hálával pedig feleségemnek, **Tar Ibolyának** tartozom, az egyetlennek, aki tisztában van az éveken át tartó, hullámvölgyekkel és hullámhegyekkel tarkított munkám minden egyes percével, aki a számtalan nehézség, valamint a sokszor végeláthatatlannak tűnő munkaóra és nélkülözés ellenére mindvégig hittel, megértéssel és támogatással állt mellettem, továbbá aki megteremtette a munkám elvégzéséhez szükséges nyugodt családi hátteret. Nélküled nem sikerült volna. Köszönöm továbbá **szüleimnek**, **anyósomnak** és **apósomnak**, a **családom többi tagjának**, valamint **barátaimnak**, köztük **Aszalós Imrének** a folyamatos biztatást és támogatást.

13. FÜGGELÉK