

**TRPV1 és TRPA1 receptorok szerepe meningeális  
trigeminovaskuláris reakciókban: krónikus  
adriamycin kezelés hatása**

PhD értekezés tézisei

**Dr. Deák Éva**

Témavezető: Dr. Dux Mária

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola  
Szegei Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,  
Élettani Intézet

Szeged

2018

**A dolgozat alapját képező közlemények:**

I. Dux M, **Deák É**, Tassi N, Sántha P, Jancsó G.: Endovanilloids are potential activators of the trigeminovascular nociceptor complex. *J Headache Pain*. 2016;17:53. doi: 10.1186/s10194-016-0644-7. Impakt faktor: 3.58

II. **Deák É**, Rosta J, Boros K, Kis G, Sántha P, Messlinger K, Jancsó G, Dux M.: Chronic adriamycin treatment impairs CGRP-mediated functions of meningeal sensory nerves. *Neuropeptides* 2018; Epub: 10 April 2018. Impakt faktor: 2.486

## BEVEZETÉS

A primer fejfájások pathomechanizmusának vizsgálatával foglalkozó kutatások a fájdalomérző beidegzéssel rendelkező intrakraniális szövetekben lejátszódó folyamatokra fókuszálnak. Az anatómiai és funkcionális hasonlóságoknak köszönhetően a patkány intrakraniális struktúráiban lejátszódó neuronális és vaszkuláris reakciók jól modellezik a humán fejfájások háttérében álló lehetséges pathofiziológiai folyamatokat. Mivel igen kevés intrakraniális szövet rendelkezik fájdalom érző beidegzéssel – mindössze az agyburkokban és az agyalapi artériák környezetében mutatható ki szenzoros innerváció – a kutatások előszeretettel foglalkoznak a kemény agyhártyában lejátszódó nociceptív reakciók vizsgálatával. A dura mater encephali szenzoros innervációját döntően a nervus trigeminus három ága szolgáltatja, melyek vékony velős A $\delta$ - és velőtlen C-rostjai kötegek formájában hálózatot alkotva kísérik az arteria meningeae media ágait, de innerválják az erektől távolabb elhelyezkedő kötőszövetes állományt is.

A ganglion trigeminale neuronjainak egy különleges funkcióval rendelkező populációját képezik a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) és tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) receptorokat expresszáló ún. kemoszenzitív neuronok. A TRPV1 receptort magas hőmérséklet (>43°C), savas pH és számos exogén (pl. capsaicin) és endogén eredetű agonista aktiválja. A receptor endogén eredetű aktivátorai közé tartozik az arachidonylethanolamide (anandamid) és az N-arachidonoyl-dopamine (NADA), melyek jelenlétét hátsó gyöki ganglionsejtekben korábban már kimutatták és amelyek egyaránt aktiválják a TRPV1 és a cannabinoid (CB) receptorokat.

A TRPA1 receptor jelenléte a TRPV1 ion csatornát expresszáló kemoszenzitív neuronok egy kisebb csoportján igazolható. A TRPA1 receptor aktivátorai kövé tartozik a mustárolaj (allyl isothiocyanate), az allicin, a cinnamaldehyd és a gingerol. Az acrolein és más légúti irritánsok is a TRPA1 receptorok izgatása útján váltanak ki fejfájást az arra hajlamos emberekben.

A TRPV1 és TRPA1 receptorokat expresszáló trigeminális nociceptorok jelentős hányada tartalmaz neuropeptideket; calcitonin gén-rokon peptidet (CGRP), P-anyagot (SP) és neurokinin A-t. A dura mater afferenseinek retrográd jelölésével igazolták, hogy a meningeális TRPV1 receptort expresszáló afferensek jelentős hányada tartalmaz

CGRP-t. A CGRP-t tartalmazó afferensek kötegeket alkotva követik az arteria meningeae media ágait és a vénás szinuszokat.

Korábbi kutatások egyértelműen igazolták a TRPV1 és a TRPA1 receptorokat expresszáló kemoszenzitív neuron populáció kettős élettani szerepét. Ezek aktiválódása a nociceptív információ centrális irányú továbbítása mellett a perifériás végződésekből felszabadított vasoaktív neuropeptidok, a CGRP és SP révén lokális vazodilatációt, érfal permeabilitás fokozódást és hízósejt degranulációt vált ki az innervált szövetben. A primer szenzoros neuronok neuropeptid felszabadító képességét számos mediátor befolyásolja. A kemoszenzitív neuronok CB1 receptorainak aktivációja az intracelluláris ciklikus adenozin monofoszfát (cAMP) koncentrációjának csökkentése révén gátolja a neuropeptidok felszabadulását. A n. maxillaris és a n. mandibularis érző ganglionsejtjei különösen gazdagok CB1 receptorokban. A CB1 receptorok aktivációja különleges szabályozó funkcióval bír a TRPV1 receptorokat expresszáló neuronok neuropeptid felszabadítására, mivel endogén lipid metabolitok, mint az anandamid és a NADA eltérő affinitással, de mindkét receptort aktiválhatják.

A meningeális erek, nociceptorok és hízósejtek szoros funkcionális együttműködése meghatározó a meningeális nocicepció pathofiziológiai folyamataiban. Bár a neurogén plazma extraváció szerepe a fejfájások pathogenezisében alárendelt jelentőségűnek látszik, a CGRP felszabadulás vazodilatátor hatása kétséget kizáróan fontos szerepet játszik benne. A roham ideje alatt migrénes betegek vena jugularisának vérében kimutathatóan emelkedik a CGRP koncentrációja.

Az antraciklin származék adriamycin széles körben alkalmazott citosztatikum. Az adriamycin terápia súlyos mellékhatásként károsíthatja a szív működést és neurotoxikus hatással is rendelkezik. Korábbi vizsgálatok jelentős szerkezeti-, neurokémiai- és funkcionális károsodást igazoltak adriamycinnel kezelt állatok primer szenzoros neuronjaiban. A bőr afferenseket érintő károsodások az intraepidermális axonvégzések eloszlására és denzitására korlátozódtak, a szubepidermális rostokat nem érintették. Mivel a szomatikus és viscerális kemoszenzitív afferensek számos tulajdonságukban megegyeznek, a meningeális nociceptorok adriamycin kezelést követően észlelt funkcionális változásai információt szolgáltathatnak az egyéb szervekben bekövetkező változásokra vonatkozóan is.

## CÉLKITŰZÉSEK

A dura matert innerváló, TRPV1 és TRPA1 receptorokat expresszáló kemoszenzitív afferensek jelentős szerepet játszanak a fejfájások pathomechanizmusában. Kísérleteink során vizsgálni kívántuk az endovanilloidok lehetséges szerepét a TRPV1 receptor aktiváció és következményes CGRP felszabadulás következtében kialakuló meningeális véráramlás változásokban, illetve a CB1 receptorok egyidejű stimulációjának következményét ezen reakciókra. Kísérleteinkben olyan endovanilloid/endokannabinoid anyagok hatását vizsgáltuk, melyeket korábban hátsó gyöki ganglionsejtekben azonosítottak.

Mivel a szomatoszenzoros és viszceroszenzoros afferensek számos funkcionális tulajdonságukban megegyeznek, a trigeminovaskuláris rendszer működésében bekövetkező változások támpontként szolgálhatnak más szervek működésében bekövetkező változások megítéléséhez olyan állapotokban, amikor a szisztémás változások egyaránt érintik mindkét rendszert. Kísérleteink során vizsgálni kívántuk a szisztémás adriamycin kezelés hatását a dura mater TRPV1 és TRPA1 receptorokat expresszáló afferenseinek stimulációját követő CGRP felszabadulásra és következményes vazodilatációra. Vizsgáltuk a szisztémás adriamycin kezelés hatását a ganglion trigeminale TRPV1 fehérje tartalmára és a dura mater TRPV1 receptor-, CGRP- és vaszkuláris CGRP receptor komponens-immunreaktív képleteinek megoszlására.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### *In vivo* meningeális véráramlás mérés

Kísérleteinket kontroll, szisztémás capsaicin- illetve szisztémás adriamycin kezeléssel átesett 270-350 g tömegű hím Wistar patkányokon végeztük. A méréseket 2-7 nappal a kezelések befejezését követően végeztük.

Kísérleteink során a meningeális nocicepció kísérletes vizsgálatára elfogadott nyitott koponyaablak preparátumot használtuk. Az altatott állatok fejét rögzítettük, a koponya parietális területén a koponyacsontot eltávolítottuk. A véráramlást lézer Doppler módszerrel az arteria meningea media ágai felett mértük. Az anyagok topikális applikációját megelőzően 3-5 percen keresztül regisztrált perfúzió átlagát tekintettük bazális értéknek, az applikációt követően 3 percig mért perfúzió változásokat ennek

százalékában (átlag  $\pm$  SEM) határoztuk meg. Kísérleteink során a TRPV1 receptorokat aktiváló capsaicin (100 nM), anandamid (100 nM - 10  $\mu$ M) és NADA (10 nM - 1  $\mu$ M) meningeális véráramlásra kifejtett hatásait vizsgáltuk. Vizsgáltuk a TRPV1 receptor antagonistájaként capsazepin (10  $\mu$ M), a CGRP receptor antagonistájaként CGRP<sub>8-37</sub> (100  $\mu$ M) és a CB1 receptor antagonistájaként AM 251 (100  $\mu$ M) előkezelés hatását az endogén vanilloidok meningeális véráramlást fokozó hatására.

A szisztémás adriamycin kezelés meningeális véráramlásszabályozásra kifejtett hatásának tanulmányozása során meghatároztuk a TRPV1 receptor agonista capsaicin (100 nM), a TRPA1 receptor agonista acrolein (300  $\mu$ M) és a CGRP (10  $\mu$ M) ismételt topikális applikációjával kiváltott véráramlás válaszokat. Kontroll és adriamycin-kezelt állatokban összehasonlítottuk a hisztamin (10  $\mu$ M), acetilkolin (100  $\mu$ M) és a forskolin (10  $\mu$ M) egyszeri applikációjának hatásait is.

### **A meningeális CGRP felszabadulás *ex vivo* meghatározása**

Kontroll és szisztémás adriamycin kezeléssel átesett patkányokat mély általános érzéstelenítésben dekapitáltunk. A bőr és izmok eltávolítását követően a koponyát a középvonalban megfeleztük, az agyféltekéket eltávolítottuk, majd 30 percig 37°C-os karbogénnel átáramoltatott szintetikus intersticiális folyadékban (SIF) inkubáltuk. Ezt követően az intakt dura materrel fedett koponyagödörbe 300  $\mu$ l SIF-ot pipettáztunk. A folyadék 100  $\mu$ l-ét 5 perc elteltével 25  $\mu$ l enzyme-linked immunoassay (EIA) pufferrel összekeverve Eppendorf csőbe gyűjtöttük és -70°C-on tároltuk a minták CGRP tartalmának leméréséig.

Kontroll állatokban a bazális CGRP felszabadulás meghatározását követően vizsgáltuk a NADA (100 nM), majd a capsaicin (100 nM) applikációjának hatását. Néhány preparátumban meghatároztuk a CB1 receptor antagonistájaként előkezelés hatását az anandamiddal kiváltott CGRP felszabadulásra. Ezekben a kísérletekben a bazális CGRP felszabadulás meghatározását követően két alkalommal applikáltunk anandamidot (10  $\mu$ M) a koponyagödörbe 5 perc időtartamra, a második applikációt megelőzően AM 251 (100  $\mu$ M) oldattal blokkoltuk a CB1 receptorok működését.

Másik kísérlet sorozatunkban a capsaicin (100 nM) és az acrolein (300  $\mu$ M) ismételt applikációjának CGRP felszabadító hatását vizsgáltuk kontroll és szisztémás adriamycin kezeléssel átesett állatokban. A capsaicin és acrolein stimuláció hatását

három egymást követő alkalommal teszteltük. Kísérleteink során meghatároztuk a KCl (60 mM) applikáció depolarizáló hatásának következtében felszabaduló CGRP mennyiségét is.

A minták CGRP tartalmát EIA kit segítségével fotometriás méréssel határoztuk meg. A pg/ml egységekben mért CGRP koncentrációkat a bazális CGRP felszabadulás százalékában fejeztük ki.

### **A ganglion trigeminale TRPV1 fehérje tartalmának meghatározása**

Kontroll és szisztémás adriamycin kezeléssel átesett patkányokat mély általános érzéstelenítésben dekapitáltunk. A bőr és izmok eltávolítását követően a koponyát a középvonalban megfeleztük, az agyféltekéket eltávolítottuk. A kétoldali ganglion trigeminale-t eltávolítottuk, a szövetmintákat homogenizáltuk és  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Kétszeri fagyasztás-felolvasztás után a mintákat centrifugáltuk, a felülúszót  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A minták TRPV1 tartalmát EIA kit segítségével mértük és pg/mg szövet értékekben határoztuk meg.

### **Immunhisztokémia**

Kontroll és adriamycinnel szisztémásan kezelt állatokat fiziológiás sóval, majd 4% paraformaldehidet tartalmazó oldattal (pH 7.4) transzkardiálisan perfundáltunk. A dekapitált állatok koponyáját a bőr és izmok eltávolítását követően a középvonalban megfeleztük. Az agyféltekék eltávolítását követően a dura materből az arteria meningeae media ágait is tartalmazó darabot vágunk ki, melyet 2 óráig utófixáltunk, majd indirekt immunfluoreszcens módszerrel megfestettünk. Mintáinkban nyúlban termeltetett anti-TRPV1 és egérben termeltetett anti-CGRP antitestekkel, illetve egérben termeltetett anti-RCP és kecskében termeltetett anti-RAMP1 antitestek kombinációjával végeztünk kettős immunhisztokémiai festést. A primer antitestek kimutatására Cy3 és DyLight 488, valamint Alexa 555 és Alexa 488 másodlagos antitestek kombinációit használtuk. A dura mater totálpreparátumok immunhisztokémiai festésének kiértékelése konfokális fluoreszcens mikroszkóppal történt.

### **Az eredmények statisztikai kiértékelése**

Valamennyi eredményünket átlag  $\pm$  SEM értékek formájában határoztuk meg. Eredményeink statisztikai elemzéséhez a Statistica 12 és 13 programokat használtuk. A csoportok eloszlásának jellegéről a Shapiro-Wilk teszt segítségével bizonyosodtunk meg. Ennek eredményétől függően a csoportokat Student-féle t-próbával vagy Wilcoxon teszt segítségével hasonlítottuk össze. A capsaicin, acrolein és CGRP ismételt applikációival kiváltott változások statisztikai elemzéséhez ANOVA és Fisher féle post-hoc analízist használtunk. Az endogen vanilloidok véráramlás fokozó hatását ANOVA és Bonferroni tesztekkel hasonlítottuk össze. Eredményeinket  $p < 0.05$  érték mellett tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## **EREDMÉNYEK**

### **Endogén vanilloidok hatása a trigeminovaskuláris rendszerben**

NADA applikációja szignifikánsan és dóziszfüggő módon fokozta a meningeális véráramlást, bár az általunk vizsgált legmagasabb koncentráció esetében (1  $\mu$ M) enyhe fokú véráramlás csökkenést mértünk. Az állatok szisztémás capsaicin deszenzitizációja teljes mértékben kivédte a capsaicin és a NADA (10 nM) véráramlás fokozó hatását. A TRPV1 és CGRP receptorok blokkolása hasonló módon gátolta a NADA meningeális véráramlás fokozó hatását. Bár az anandamid 10  $\mu$ M koncentrációban kontroll állatokban a meningeális véráramlás  $2.1 \pm 0.8$  %-os csökkenését okozta, AM 251 applikációját követően annak  $4.1 \pm 0.6$  %-os emelkedését váltotta ki. Ez a véráramlás fokozódás teljes mértékben kivédhető volt a CGRP receptorok előzetes gátlásával. Anandamid (10  $\mu$ M) a CB1 és CGRP receptorok egyidejű gátlása mellett csökkentette a meningeális véráramlást.

A kontroll dura mater preparátumokban mért bazális CGRP felszabadulás  $22.6 \pm 5$  pg/ml volt. NADA (100 nM) a CGRP felszabadulást a bazális érték  $140.3 \pm 16.2$  %-ára emelte. Ezekben a kísérletekben capsaicin applikációja  $328.8 \pm 63.6$  %-ra fokozta a CGRP felszabadulást. Az anandamid (10  $\mu$ M) applikációjával kiváltott  $122.2 \pm 9.6$  %-os CGRP felszabadulás a CB1 receptorok blokkolását követően (AM 251 100  $\mu$ M)  $170.4 \pm 23.7$  %-ra emelkedett.



### **Adriamycin kezelés hatása a dura mater TRPV1 és TRPA1 receptort expresszáló nociceptorainak működésére**

Kontroll állatokban a capsaicin ismételt applikációjával kiváltott véráramlás fokozódás  $28.6 \pm 7.9 \%$ ,  $30.3 \pm 4$  és  $21.5 \pm 3.4 \%$  volt. Adriamycinnel kezelt állatokban a véráramlás fokozódás már az első applikáció alkalmával is csökkent volt ( $11 \pm 3 \%$ ), ezt követően pedig gyakorlatilag nem volt kiváltható, mindössze  $2.6 \pm 1.8$  illetve  $1 \pm 0.6 \%$  véráramlás fokozódást mértünk.

Hasonló hatású volt az acrolein ( $300 \mu\text{M}$ ) applikációja is. Kontroll állatokban a három egymást követő applikáció  $14.4 \pm 2.4$ ,  $13.3 \pm 3.7$  és  $8.9 \pm 2.5\%$ -os véráramlás fokozódást váltott ki, míg adriamycinnel kezelt állatokban mindössze  $4.1 \pm 1.1$ ,  $2.6 \pm 1.3$  illetve  $1.4 \pm 1.8\%$  véráramlás fokozódást mértünk. Adriamycin-kezelt állatokban az ismételt CGRP applikációval kiváltott véráramlás fokozódás szintén elmaradt a kontroll állatokban mérttől, azzal a különbséggel, hogy itt nem tapasztaltunk csökkenő tendenciát az egymást követő applikációk hatásainak összehasonlításakor. A hisztamin ( $21.3 \pm 3.9$  illetve  $22.3 \pm 4.6 \%$ ), acetilkolin ( $15.8 \pm 3.7$  illetve  $16.9 \pm 4.5 \%$ ) és forskolin ( $22 \pm 8$  illetve  $22.9 \pm 9.8 \%$ ) véráramlás fokozó hatásában nem tapasztaltunk különbséget a két állatcsoport között.

Kontroll állatok *ex vivo* dura mater preparátumaiban a három egymást követő capsaicin applikáció ( $100 \text{ nM}$ ) hasonló mértékben fokozta a felszabaduló CGRP mennyiségét ( $294.2 \pm 51.6$ ,  $229.5 \pm 56.7$  illetve  $251.4 \pm 101.4 \%$ ). Adriamycinnel kezelt állatok dura mater preparátumában az első capsaicin applikáció a kontrollban mért értéket meghaladó mértékű CGRP felszabadulást eredményezett, mely a bazális CGRP felszabadulás  $564.1 \pm 71.2 \%$ -a volt. További capsaicin applikációk ellenben már nem váltottak ki CGRP felszabadulást, a második és harmadik stimulációt követően mindössze  $117.1 \pm 19.9$  és  $80.1 \pm 12.5 \%$ -ra változott a kiindulási érték.

Kontroll állatokban a TRPA1 receptorok acroleinnel ( $300 \mu\text{M}$ ) történő stimulációja  $277.2 \pm 25.9$ ,  $361.9 \pm 50.6$  illetve  $385.6 \pm 83.3 \%$ -ra emelte a CGRP felszabadulást. Adriamycin kezelést követően az első applikáció hatása összemérhető volt a kontroll állatok értékeivel (a bazális érték  $273.9 \pm 56.2 \%$ -a), az ezt követő applikációk azonban csak a kontrolltól elmaradó, mérsékelt emelkedést tudtak kiváltani; a bazális érték  $162.5 \pm 40.3$  illetve  $189.1 \pm 56.8 \%$ -ára emelkedett a CGRP koncentráció. A KCl ( $60 \text{ mM}$ ) depolarizáló hatása mindkét állatcsoportban fokozta a

CGRP felszabadulását (kontroll:  $141.2 \pm 24 \%$ , adriamycin-kezelt  $189.3 \pm 29 \%$ ). A csoportok közötti különbség nem volt szignifikáns mértékű.

A kontroll állatokból származó ganglion trigeminale minták TRPV1 fehérje tartalma  $6.25 \pm 2.7$  pg/mg volt. Adriamycin kezelés hatására ennek értéke  $4 \pm 0.5$  pg/mg-ra csökkent.

Dura mater totálpreparátumokban a TRPV1- és CGRP-immunreaktív axonok mennyiség és lokalizáció tekintetében nem mutattak eltérést a két állatcsoport esetében. Az idegrostok kötegeket alkotva kísérték az arteria meningeae media ágait, de megfigyelhetőek voltak az erek től távolabb elhelyezkedő területeken is. A legtöbb axon esetében a TRPV1 receptor és a CGRP kolokalizációja volt megfigyelhető.

Kontroll állatok dura mintáiban a meningeális artériák és vénák falában mindkét vizsgált CGRP receptor komponens (RCP és RAMP1) kimutatható volt. Adriamycin-kezelt állatok dura ereiben a RAMP1-immunreaktivitás a kontrollhoz hasonló volt, RCP-immunreaktivitás azonban egyáltalán nem volt kimutatható.

## **MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK**

A jelen tézisben összefoglalt kísérleteink eredménye igazolta az endogén eredetű vanilloidok potenciális aktivátor szerepét a trigeminovaszkuláris rendszerben, valamint azt, hogy szisztémás adriamycin kezelés jelentős funkcionális változásokat eredményez ebben a rendszerben.

Az endovanilloidok endogén membrán lipid metabolitok, melyeket a szenzoros ganglionok neuronjai szintetizálhatnak, vagy a környezetükből transzport útján felvehetnek. Bár a szövetek fiziológiás körülmények között mért anandamid koncentrációja alacsony, pathofiziológiás körülmények között, pl. neurogén gyulladással járó állapotokban jelentősen emelkedhet.

Az anandamid és a NADA egyaránt aktiválja a TRPV1 és a CB1 receptorokat, bár a receptorok iránti affinitásuk eltérő. Eredményeink a trigeminovaszkuláris rendszerben is eltérő véráramlás-válaszokat igazoltak a két vizsgált endogén vanilloid esetében. A NADA erőteljes, míg az anandamid igen gyenge meningeális vazodilatátor hatással rendelkezett. Ez a különbség a két anyag TRPV1 és CB1 receptorokon kifejtett eltérő erősségű hatásával magyarázható. Capsaicin deszenzibilizáció megszüntette a NADA meningeális véráramlás fokozó hatását, nem befolyásolta azonban a hisztamin

közvetlen endothel- és simaizom sejteken kifejtett véráramlás fokozó hatását. Eredményeink igazolták a meningeális TRPV1 receptort expresszáló nociceptorok aktivációjának és következményes CGRP felszabadulásnak a szerepét az endogén vanilloidokkal kiváltott véráramlás fokozódás mechanizmusában. Az általunk vizsgált mindkét endogén vanilloid magasabb koncentrációban csökkentette a meningeális erek véráramlását. A capsaicin és endogén vanilloidok magasabb koncentrációi mellett egyaránt megfigyelhető véráramlás csökkenés hátterében ezen anyagok vaszkuláris TRPV1 vagy egyéb receptoron kifejtett közvetlen hatása állhat. *In vivo* állatmodellünkben az anandamid véráramlás fokozó hatása jelentősen elmaradt a NADA hatásától, ami az anandamid neuropeptid felszabadulást gátló CB1 receptoron kifejtett erősebb hatásának tulajdonítható. Az anandamid CB1 receptoron keresztül érvényesülő gátló hatása mérsékli a TRPV1 receptor aktiválása útján kiváltott CGRP felszabadulás mértékét, amit a CB1 receptor gátlásának véráramlás fokozódást potenciózó hatása is alátámaszt.

Vizsgálataink szisztémás adriamycin kezelést követően a meningeális véráramlás szabályozás jelentős károsodását tárták fel, mely ismételt stimuláció mellett vált még nyilvánvalóbbá. Kontroll állatokban a capsaicin és acrolein applikációk ismétlése jól reprodukálható mértékű CGRP felszabadulást eredményezett, míg adriamycinnel kezelt állatokban eltérő jellegű volt: a CGRP felszabadulás csak a második és harmadik stimuláció esetén maradt el a kontrollban mért értéktől, az első capsaicin applikációval kiváltott CGRP felszabadulás még meg is haladta a kontrollban mért értéket. A jelenség hátterében a kalcium háztartásban bekövetkezett zavar állhat, mely a neuropeptid felszabadulást is befolyásolja. Mivel az első capsaicin applikációt kísérő fokozott CGRP felszabadulás nem eredményezte adriamycin-kezelt állatokban a vazodilatációs válasz fokozódását, megvizsgáltuk a meningeális erek más vazodilatátor anyagok esetében mutatott reakcióit is. Mivel korábbi vizsgálatok apoptózisra és nekrozisra utaló jeleket igazoltak a vaszkuláris simaizomsejtekben adriamycin kezelést követően, megvizsgáltuk a hisztamin-, acetilkolin-, valamint exogén CGRP applikációval kiváltott véráramlás változásokat. Mivel ezek a vazodilatátorok közvetlenül hatnak az érfal endothel-, illetve simaizom sejteiben lévő receptoraikra, vazodilatátor hatásuk nem igényli az nociceptorok közreműködését. Mivel a hisztamin és az acetilkolin vazodilatátor hatásában nem tapasztaltunk különbséget a két állat

csoport között, kizárhatjuk az érfalban bekövetkező morfológiai károsodásokat, mint a neurogén szenzoros vazodilatáció elmaradásáért felelős mechanizmust. Immunhisztokémiai vizsgálataink valószínűsítik a CGRP receptor RCP komponensében adriamycin kezelést követően bekövetkező változást, mely hatással lehet a receptor CGRP kötő képességére is. Mivel az RCP alapvető szerepet játszik a receptor G-fehérjén keresztül megvalósuló intracelluláris jelátviteli folyamataiban, alapvetően meghatározza a CGRP *in vivo* megfigyelhető hatásait.

Funkcionális vizsgálataink megváltozott TRPV1 és TRPA1 receptor funkciót igazoltak adriamycinnel kezelt állatok meningeális afferenseiben. Erre utaló jel a ganglion trigeminale csökkent TRPV1 fehérje tartalma, bár a dura mater immunhisztokémiai festésével nem tudtunk kimutatni detektálható változást a perifériás kemoszenzitív afferensek mennyiségében és eloszlásában.

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az endogén vanilloidok a capsaicinhoz hasonlóan hatásosan aktiválják a trigeminális nociceptorokat, ami CGRP felszabadulás révén meningeális véráramlás változásokat generál. Eredményünk figyelemre méltó, mivel a perifériás nociceptorok aktiválódása nem csak lokális véráramlás változásokat eredményez, hanem a nociceptív információ centrális továbbítása révén a fejfájások pathomechanizmusában is fontos szerepet játszhat. Az endogén vanilloidok fokozott termelődése, vagy a szenzoros neuronokba irányuló fokozott transzportja a trigeminális rendszer aktiválódásához, akár a nociceptív pálya következményes perifériás és/vagy centrális szenzitizációjához vezethet.

Adriamycinnel végzett kemoterápiás kezelés károsítja a peptiderg meningeális afferensek TRPV1 és TRPA1 receptor függő vazodilatátor működését, melynek hátterében a kemoszenzitív afferensek megváltozott CGRP felszabadító képessége és a vaszkuláris CGRP receptor RCP komponensének szerkezetében bekövetkező változás egyaránt tetten érhető. Az adriamycin kezelés következtében károsodhatnak a perifériás szövetek szenzoros afferensek által mediált védekező mechanizmusai is, mint például a neurogén gyulladásoz reakció.

**KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Szeretném megköszönni Dr. Jancsó Gábor Professor Úrnak és Dr. Dux Máriának, témavezetőmnek, hogy bekapcsolódhattam az Élettani Intézet Neuromorfológiai Laboratóriumának munkájába. Köszönöm a türelmüket és a támogatásukat. Köszönöm laboratóriumunk és intézetünk valamennyi munkatársának a közös munkát és a segítséget. Hálás vagyok Dr. Jancsó Gábor és Dr. Sály Gyula Professor Uraknak, az Élettani Intézet korábbi és jelenlegi vezetőjének, hogy munkámat lehetővé tették és támogatták. Külön köszönettel tartozom Dr. Horváth Viktornak, aki felkeltette bennem az érdeklődést a tudományos kutató munka iránt.