

Záró beszámoló

*A migrénnel összefüggő trigeminovaszkuláris aktivációs hálózatok vizsgálata
transzlációs megközelítéssel című, 132587 számú OTKA pályázathoz*

Migrénes betegek – transzkriptomikai vizsgálatok

A projekt első évében a tervezettnél megfelelően megkezdtük a vérminták gyűjtését migrénes betegektől fejfájás közben (ictalis) és fejfájásmentes (interictalis) időszakban. A vérmintákból perifériás mononukleáris sejteket izoláltunk és új-generációs RNS szekvenálást végeztünk. A funkcionális bioinformatikai analízis során mind az interictalis és ictalis minták szignifikánsan különböztek az egészséges kontrolloktól. Az érintett folyamatok közül a mitokondriális funkció és citokin hatások a kiemelendők.

Rohammentes (interictalis) időszakban huszonnégy, illetve nyolc roham alatti (ictalis) minta gyűlt össze. Az interictalis, ictalis és kontroll csoportok között demográfiai és klinikai jellemző tekintetében eltérés nem volt megfigyelhető. Az interictalis vs. egészséges összehasonlításból származó DE gének ismertetése Az interictalis csoportot összehasonlítva az egészséges csoporttal, 163 differenciáltan expresszált gént találtunk ($|FC| > 1.5$, p -érték $\leq 0,05$). Az interleukin IL-1 β (IL1B), a ciklooxygenáz 2 (COX2), a tumor nekrozis faktor (TNF) és számos kemokin, például az IL-8 (IL8) szerepelt az analízis során feltárt listán. Az ictalis vs. interictalis összehasonlításból származó DE gének ismertetése Az ictalis - interictalis összehasonlításban 144 DE gént detektáltunk ($|FC| > 1.3$, p -érték $\leq 0,05$): 64 up-, 80 downregulálódott. A heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C like 1 (HNRNPCL1), az olfactory receptor family 10 subfamily G member 2 (OR10G2) és az interleukin 20 receptor alegység alfa (IL20RA) megtalálhatóak a DE gének toplistájában. A hamis felfedezési arány (FDR) korrekciója után két gén maradt a listában, amelyek korrigált p -értéke 0,25 alatt volt: HNRNPCL1 és a cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 3 (CNIH3). Az ictalis vs. egészséges összehasonlításból származó DE gének ismertetése Az ictalis mintákban az egészségesekhez képest 131 gén expressziója volt eltérő ($|FC| > 1,5$, $p \leq 0,05$): 118 up-, 13 downregulálódott. Az IL1B gén is érintett volt ebben az

összehasonlításban, többek között a PTGS2, a TNF és az IL8 mellett. Mitokondriális diszfunkció jellemzi a migrénes betegek perifériás vér mononukleáris sejtjeit A DE és az összes gén rangsorolt listának funkcionális elemzése során (GO, KEGG, Reactome) betekintést nyertünk a migrénben esetlegesen szerepet játszó funkcionális eltérésekbe, hálózatokba és biológiai folyamatokba. Az egészséges csoportot a rohammentes állapottal összehasonlítva, a citokin és kemokin receptorok kötődése, az interleukin-10 (IL-10) jelátvitel és az oxidatív foszforiláció érintettsége mutatkozott szignifikánsnak. A roham alatti és rohammentes időszakokat összehasonlítva, a hormon- és citokinaktivitás, az oxidatív foszforiláció és a 13 kemoszenzoros receptorok voltak szignifikánsan érintettek. Továbbá az ictalis-egészséges összehasonlításban az IL-4, IL-10 és IL-13, valamint a kemokin, a növekedési faktor és a neuroaktív ligand-receptor kölcsönhatások szerepeltek. Az összes gén rangsorolt listájának dúsítási elemzése statisztikailag szignifikánsan az oxidatív foszforiláció metabolikus útvonalát emelte ki az interictalis-egészséges és az ictalis-interictalis összehasonlításban. A mitokondriális működés mindkét összehasonlításban érintett volt. Jelen tanulmány az első olyan transzkriptomikai analízis leírását tartalmazza, melyben az eredmények migrénes betegek véreből izolált PBMC mintákból származnak, önkontrollal megvalósítással. Az ictalis és interictalis illetve egészséges kontrollokból származó mérések összehasonlítása betegség- és fejfájás specifikus változások detektálására egyaránt lehetőséget nyújtottak. A vizsgálati elrendezés, a felhasznált PBMC minták hiánypótlóak az aktuális migrénhez köthető irodalomban. Eredményeink arra utalnak, hogy fokozott gyulladáshoz és immunsejt-aktivitás, valamint mitokondriális diszfunkció fontos szerepet játszhat a migrénre való hajlam és a fejfájás kialakulásában. A perifériás vérben kimutatott génexpresszió változások a betegség szisztémás természetére utalnak. Tanulmányunk eredményei új irányvonalat adhatnak a betegség diagnosztizálásban, továbbá növelhetik a jelenlegi terápiás potenciál spektrumát: citokineket célzó gyógyszerek vagy oxidatív stressz csökkentése értékes lehet a migrén kezelésében vagy profilaxisában.

Migrénes betegek – metabolomikai vizsgálatok

A vérmintákból párhuzamosan feldolgozott plazmamintákból tömegspektrometriás mérést végeztünk metabolitok mennyiségi és minőségi azonosítására. Célunk az volt,

hogy a migrénes betegek plazma metabolitszintjének változásait önkontrollos módon elemezzük a rohamok alatt és a rohamok között, hogy jobb betekintést nyerjünk a mögöttes metabolizmusbeli változásokba. Mellékbetegségek nélküli migréneseket toboroztunk, és öt plazmamintát gyűjtöttünk a fejfájás alatt (ictal) és tizenkettőt a fejfájásmentes időszakban (interictal). Hét kontrollmintát nyertünk korban és nemben illeszkedő egészséges önkéntesektől. A mintákat nem célzott plazma-ujjlenyomat-elemzéssel, tömegspektrometriás módszerrel elemezték. A célzott vizsgálatra tervezett MxP® Quant 500 kitet is használták, amely lehetővé tette a kvantitatív mérést és a nem célzott elemzés eredményeinek validálását.

Bizonyos metabolitok, mint a foszfatidil-kolin (PC) aa C34:1, PC aa C38:3, szfingomielin (SM) C26:1, PC aa C32:0, PC aa C36:3, PC aa C42:4 és SM C24:1 megváltozott a migrénes betegeknél. A marginálisan jelentős metabolitok, a PC aa C32:0, a PC aa C34:1 és az SM C26:1 mind szignifikáns t-test eredményeket ($p < 0,05$ és $FDR < 0,1$), mind alacsony empirikus p-értékeket mutatnak, ami arra utal, hogy jelentőségük van az interiktális és a kontrollcsoportok megkülönböztetésében. Az arachidonsav (AA) és a tetradecanedioinsav (DiCA (14:0)) szignifikáns, t-teszt p-értékekkel és 0,01 alatti empirikus p-értékekkel. Amikor az interiktális mintákat párosított t-próbával hasonlítottuk össze az ictális csoporttal, a PC ae C44:4, Dopamin, TG (18:0_34:3), Tryptophan betain, PC aa C38:4, Cer(d18:1/20:0), Spermidin, Spermine, PC aa C38:6, PC ae C40:4 szignifikánsan különbözött. Az alacsony mintaszám miatt azonban egyik metabolit sem maradt szignifikáns a többszörös tesztelésre történő korrekció után.

A lipid metabolitok, mint például az SM-metabolitok, például a ceramid, kulcsfontosságúak a sejtek jelátvitelében, és befolyásolhatják a gyulladással kapcsolatos válaszokat és az oxidatív stressz állapotát. Az SM-ek hozzájárulnak a sejtmembrán szerkezeti integritásához is. A PC-k részt vehetnek a lipid-homeosztázisra és a gyulladásra ható anyagcsere-útvonalakban. Az AA szélesebb körű metabolikus diszregulációra utal a migrénben. E metabolitok megváltozott szintjei a lipidanyagcsere egyensúlyhiányát tükrözik, ami fokozott gyulladással és fájdalomjelző útvonalakkal jár együtt. A spermin és a spermidin nélkülözhetetlenek számos sejt-folyamathoz, beleértve a transzkripció és a transláció szabályozását, az ioncsatornák működését, a nitrogén-oxid-szintáz aktivitását és a mitokondriumok védelmét. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a lipidanyagcsere és a mitokondriumok működésének egyensúlyhiánya jelentősen hozzájárulhat a migrénre való hajlamhoz és a

patogenezishez.

Differenciáltan kifejeződő géneket azonosítottunk a fejfájáskor levett és a fejfájásmentes minták között, valamint a tünetmentes betegek és a kontrollok között. Funkcionális bioinformatikai elemzéssel kimutattuk, hogy a fejfájás alatt vett és a fejfájásmentes mintákban a kontrollokhoz képest feldúsult útvonalak közé tartozott a gyulladás, a citokinaktivitás és a mitokondriális diszfunkció. A migrénes betegeknél, ill. a rohamok alatt eltérő mennyiségben jelen lévő metabolitokat azonosítottunk. Transzkriptomikai és előzetes metabolomikai eredményeink alapján a fokozott gyulladáshoz és immunsejt-aktivitás, valamint az oxidatív stressz szerepet játszhat a migrénre való hajlamban és a fejfájás kialakulásában.

Migrénes betegek – miRNS vizsgálat

A migrénes betegek PBMC mintáiból miRNS szekvenálást és kapcsolódó adatelemzést végeztünk. Előzetesen azonosítottunk differenciáltan kifejeződő miRNS-eket, amelyek mRNS célpontjait bioinformatikai módszerekkel azonosítottuk. Megkezdjük teljes Freund-féle adjuváns (CFA) által kiváltott orofaciális gyulladást, mint a trigeminális érzékenyítés patkány modelljében vérplazma metabolomikai vizsgálatát. A migrénes betegektől fejfájásos (ictalis) és fejfájás nélküli (interictalis) periódusokban gyűjtött mintákból szeparált perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) a korábbi RNS-szekvenálást követően kis RNS-szekvenálásnak vetették alá. Differenciálisan expresszálandó miRNS-eket azonosítottak a fejfájásos és fejfájásmentes minták, valamint a tünetmentes betegek és a kontrollok között. A miRNS-mRNS-célpont-előrejelzés és az útvonal-elemzés számos olyan mRNS-t mutatott ki, amelyek az immun- és gyulladáshoz kapcsolódó válaszokkal (toll-like receptor és citokinreceptorok jelátvitelle), a neuroinflammációval és az oxidatív stresszrel kapcsolatosak, amit az mRNS-transzkriptomika is megerősített. Néhány eredményt korábbi metabolomikai eredményeink is alátámasztottak.

Gyulladáshoz kapcsolódó arcfájdalom patkánymodellje – transzkriptomika

Állatkísérletes vizsgálatainkban gyulladáshoz kapcsolódó arcfájdalom modellt vizsgáltunk patkányokon és egereken, amelyben közelebbről a tachykininek közé tartozó hemokinin-1 expresszióváltozását vizsgáltuk a trigeminus ganglionban. A hemokinin-1 expressziója a gyulladás következtében fokozódott a neuronokban és a szatellita glia sejtekben is. Hemokinin-1 (Tac4) génhiányos egerekben csökkent szatellita gliamarker expressziót mutattunk ki. Eredményeink alapján a hemokinin-1 részt vehet az arcgulladás következtében kialakuló gliaaktivációban a trigeminus ganglionban.

Az arcgulladását komplett Freund adjuváns (CFA) bajuszpárnába injektálásával váltottuk ki (n=5-7/ csoport), a mechanonociceptív küszöböt Von Frey filamentummal mértük a 3. napon. A vérplazmából 106 metabolit folyadékromatográfiás és 524 metabolit áramlásos injekciós analízisét végeztük. A trigeminus ganglionban differenciáltan expresszálódó géneket új generációs szekvenálással meghatároztuk, a metabolomikai adatokkal együtt elemeztük. Bioinformatikai analízist Ingenuity Pathway Analysis (IPA) és Lipidmaps szoftverekkel végeztünk.

A karnozin és szerotonin emelkedett, míg a triptofán, kynurenin, tirozin, fenilalanin, aszparagin és metionin csökkent a CFA-kezelt patkányokban. Az IPA elemzés a sejtműködés, aminosav-anyagcsere, gyulladáshoz és immunmechanizmusok érintettségét, a lipidanalízis a glicerolipidek, glicerofosfolipidek, szfingolipidek és szterol-lipidek downregulációját és a zsírsavak upregulációját mutatta. A differenciált metabolitok és transzkriptom összevetése arc- és fejfájásban alkalmazott gyógyszereket azonosított (pl), amely a modell transzlációs relevanciáját mutatja.

Az omikai megközelítés és komplex bioinformatikai elemzés hasznos platformot jelent a gyulladáshoz kapcsolódó trigeminális aktiváció kulcsmediátorainak és célmolekuláinak meghatározására, a CFA-val kiváltott arcfájdalom patkánymodell validálására. Az azonosított útvonalakra ható vegyületek tesztelése e modellben transzlációs jelentőségű eredményeket hozhat.

Eredményeinket a 2023 júniusában Mátraházán megrendezésre kerülő FAMÉ konferencián mutattuk be.: *ALTERED AMINOACID, MONOAMINE AND GLYCEROPHOSPHOLIPID METABOLITE PROFILE IN THE RAT PLASMA IN AN OROFACIAL INFLAMMATORY PAIN MODEL*, Krisztina Takács-Lovász, Tímea Aczél, Kata Bölcskei, József Kun, Mihai Ciborowski, Witold Bauer, Barna Vásárhelyi, Gellért B. Karvaly and Zsuzsanna Helyes. A CFA injekció beadása után 3 nappal az érintett területen körülbelül 30%-os arcallódia alakult ki. A CFA-val kezelt patkányoknál megnövekedett plazma szerotonin, karnozin, csökkent szarkozin és metionin-szulfoxid

szintet mutattak ki a sóoldathoz képest. A két csoport között szignifikánsan megváltozott metabolitok listája alapján a Reactome-elemzés a Na^+/Cl^- -függő neurotransmitter-transzporterek, az aminosav transzport a plazmamembránon keresztül, a triptofán katabolizmus, az aminosavak és származékaik metabolizmusának feldúsulását mutatta. A metaboanalízis megváltozott fenilalanin-, tirozin- és triptofán-bioszintézist, valamint triptofán-anyagcserét mutatott ki. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a metabolizmus-elemzés értékes betekintést nyújt a fájdalommal kapcsolatos trigeminovaszkuláris aktiváció mechanizmusába, és hasznos platformot nyújthat a trigeminális fájdalomállapotok, köztük a migrén vizsgálatához.

A Tac4 mRNS szintje az orofaciális allodíniával párhuzamosan változott CFA-indukált gyulladást követően patkány trigeminális ganglionban. A CFA-injektált patkányok bajuszpárna-területének mechanonociceptív küszöbe mindhárom napon szignifikánsan csökkent a sóoldattal kezelt patkányokhoz képest, és a harmadik napon érte el a minimumot. A Tac4 mRNS expressziós szintje a TG-ban korrelált a von Frey-küszöb eltolódásával, és a harmadik napon érte el a maximumát. 14 A CFA Tac4 mRNS upregulációt okozott a patkány trigeminális ganglion primer szenzoros neuronjaiban és a szatellita gliasejtekben. A Tac4 mRNS expressziójának alap- és megváltozott szintjének vizsgálatára a patkány TG-ban sóoldat vagy CFA injekcióját követően fluoreszcens RNSscope in situ hibridizációt végeztünk. A Tac4 transzkriptumok elsősorban a szatellita gliasejteken és az érzékelő neuronokon lokalizálódtak. A CFA kezelés mindkét sejtípusban jelentős upregulációt okozott. A Tac4 pozitív transzkriptumokat Schwann-sejteken is kimutattuk. Viselkedési tesztek szorongásszerű viselkedésre utaltak a Tac4 génhányos egerekben. A Tac4 gén hiányának a viselkedésre gyakorolt hatásának vizsgálatára az orofaciális gyulladós modellű Tac4^{-/-} egereken alkalmaztuk. A CFA beadása szignifikánsan csökkent mechanonociceptív küszöböt okozott egy és három nappal az injekció beadása után mind a WT, mind a Tac4^{-/-} egereknél. A sóoldatos injekció azonban hasonló, bár nem szignifikáns változásokat eredményezett. A WT és a Tac4^{-/-} egerek küszöbértékei között nem volt szignifikáns változás. A sóoldattal és CFA-val kezelt csoportok jobban elkülönültek a WT egereknél. A CFA injekció hatására a spontán viselkedésben nem történt lényeges változás (sóoldat vs. CFA). A Tac4^{-/-} egerek azonban kevesebb időt töltöttek a nyitott aréna középső zónájában vad típusú társaikhoz viszonyítva, ami

szorongásszerű viselkedésre utal. A CFA Tac4 mRNA upregulációt okozott az egér trigeminális ganglion primer szenzoros neuronjaiban és a szatellita gliasejtekben. A patkány TG-ban talált Tac4 expresszióhoz hasonlóan, a Tac4 transcriptumát egér TG szenzoros neuronjaiban és szatellita gliasejtekben is kimutattuk. Továbbá, a CFA által kiváltott Tac4 upreguláció az egérben is megfigyelhető volt. CFA-indukált változások a neuronális és glia aktivációs markerek szintjén a Tac4 génhíányos egerek trigeminális ganglionjában. WT egerekben a neuronális FosB génexpresszió a harmadik napon jelentősen megemelkedett az intakt mintákhoz képest. Azonban mind a CFA injekció, mind a sóoldat beadása növelte a FosB expressziós szintjét. A sóoldattal és CFA-val kezelt minták közötti különbségek csak az első napon voltak szignifikánsak. A Tac4^{-/-} állatokban csak egy későbbi időpontban, a hetedik napon mutatott a FosB szignifikáns emelkedést. A neuronális marker upregulációja a harmadik és a hetedik napon szignifikánsan alacsonyabb volt a Tac4^{-/-} egerek esetében, összehasonlítva a WT csoportokkal. Az intakt állatokban a mikroglia/makrofág aktivációs marker (Aif1) alacsonyabb expressziós szintet mutatott a génhíányos egerekben a WT csoporthoz képest. Kezelés hatására az SGC/asztrocita aktivációs marker minden csoportban minden napon megemelkedett az intakt mintákhoz képest. A 15 CFA szignifikáns emelkedést idézett elő a WT csoportokban a megfelelő sóoldattal kezelt csoporthoz képest az első és a harmadik napon. Érdekes módon a gyulladás nem okozott változást a Gfap szintekben a génhíányos egerekben. A legtöbb összehasonlítás azt mutatta, hogy a Gfap mRNA expressziós szintje a Tac4^{-/-} csoportokban alacsonyabb volt. A neuroinflammációhoz kapcsolt gének különbözőképpen változtak a sóoldattal vagy CFA-val kezelt Tac4 génhíányos és WT egerek trigeminális ganglionjában. A WT és Tac4^{-/-} egerek bajuszpárnájából a CFA vagy sóoldatos injekciót követő harmadik napon gyűjtött TG RNS mintákon NanoString nCounter® analízist végeztünk. Az eredmények különböző neuroinflammációval kapcsolatos DE géneket és jelentős sejt-típus-specifikus korrelációkat mutattak ki. A sóoldattal kezelt Tac4^{-/-} csoportban 15 gén expressziója változott (9 up-, 6 downregulálódott) a sóoldattal kezelt WT mintákhoz képest. Sóoldattal való kezelés elemzése mikroglia/makrofág és citotoxikus sejt-specifikus szignifikáns változásokat mutatott ki (Tac4 génhíányos csoport vs. WT csoport). A CFA-val kezelt Tac4^{-/-} csoportban 22 gén expressziója változott (13 up-, 9 downregulálódott) a CFA-val kezelt WT csoporthoz képest (Tac4 génhíányos csoport vs. WT csoport). A CFA kezelés elemzése a neutrofil granulocitákra specifikus gének

változásait mutatta ki a CFA kezelt Tac4^{-/-} vs. CFA kezelt WT összehasonlításban. Ebben a fejezetben eredményeink megerősítették a Tac4 mRNA jelenlétét a trigeminális ganglionban és annak expresszióemelkedését az orofaciális gyulladás következtében. Tac4 transzkriptumokat mutattunk ki a trigeminális ganglion primer szenzoros neuronjain, illetve gliasejtjein. Ezenkívül a Tac4 jelentős gyulladás-indukált upregulációját mutattuk ki mind a neuronokban, mind a szatellita gliasejtekben, melynek időbeni változása az allodínia kialakulásával párhuzamosan történt, ami a szenzitizációs folyamatban betöltött potenciális szerepére utalhat. Összefoglalva, jelen eredményeink alátámasztják a HK-1 jelentőségét az orofaciális fájdalom hátterében álló gyulladós folyamatokban és a nociceptív szenzitizációban. Azt is kimutattuk, hogy a HK-1 részt vesz a neuron-glia kölcsönhatásokban fiziológias körülmények között és gyulladás következtében is. Eredményeink kizárólag mRNA szintű expressziós változásokra szolgáltatnak bizonyítékot, ami a vizsgálat limitációját képezi, azonban az ezzel párhuzamosan bekövetkező viselkedésbeli változások arra utalnak, hogy a vizsgált mRNA-ek fehérjetermékei is érintettek lehetnek.

Hemokinin-1 kezelés hatása patkány trigeminális gangliontenyészetben

A Tac4 transzkriptumok ko-lokalizálódtak az Aif1 (Iba1), Gfap, Olig2 expresszáló sejtekkel egerek vegyes gliasejt kultúráin. A Tac4 mRNA expresszió bazális szintjének vizsgálatára egér MGC-ben fluoreszcens RNSscope in situ hibridizációt végeztünk. Minden gliasejttípusban kimutathatóak voltak a Tac4 transzkriptumok, mind a sejtmagban, mind a citoplazmában. A koexpresszió nagyobb mértékű az oligodendrocitákban és az asztrocitákban, mint a mikroglia esetében. A hemokinin-1 kezelés radioaktív $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételét indukálta a kevert gliasejt kultúrákban. Az MGC-k HK-1-gyel történő inkubálása koncentrációfüggő radioaktív $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételhez vezetett. Míg az 1 μM HK-1 az ECS-hez képest növelni tudta a sejtek $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételét, addig az 5 μM HK-1 kezelés szignifikáns beáramlást generált. A hemokinin-1 kezelés növelte a gyulladós citokinek termelését. A sejt kultúra HK-1-gyel történő 24 órás kezelését követően a felülúszóból nem volt kimutatható az IL-1 β . Az MCP-1 és a TNF α esetében szignifikáns koncentráció emelkedést tapasztaltunk 5 μM -os HK-1 kezeléssel. Bár a különböző HK-1 kezelések nem befolyásolták szignifikánsan a

RANTES, KC és IL-6 szintjét, a megfigyelt tendenciák hasonlóak voltak a korábban említett citokinekhez. A Tac4 mRNS jelenlétét mutatjuk ki egér agyszövetből származó gliasejtekben. Eredményeink az elsők, amelyek bemutatják a Tac4 transzkriptumok lokalizációját sejtszinten. Elsőként mutattuk ki, hogy több proinflammatorikus molekula is részt vesz a HK-1 által közvetített jelátvitelben. Így eredményeink alátámasztják, hogy a gliasejtek aktivációja mikrokörnyezet formálásával elősegíti a gyulladásos progressziót. Fontos megjegyezni, hogy adataink sejt kultúrákból származnak, ezért további in vivo validációra van szükség.

Vizsgáltuk továbbá patkány trigeminalis primér ganglionsejt-tenyészetben hemokinin-1 (HK-1) kezelés hatására bekövetkező transzkriptomikai változásokat. A HK-1 a tachykinin család tagja, amely részt vesz az immunológiai folyamatokban, a gyulladásban és a fájdalomban. A neurokinin-1 receptor (NK1R) az irodalom szerint a fő célpontja, de számos hatást jelenleg nem azonosított receptor(ok) közvetítenek.

Ezért transzkriptomikai szinten megvizsgáltuk a HK-1 feltételezhetően nem NK1R közvetítésű hatásait a trigeminalis ganglionsejtekre. A HK-1-et a sejteken alkalmaztuk, ami kalcium beáramlást okozott ezekben a neuronokban. Az izolált RNS-ből következő generációs RNS szekvenálást végeztünk, és a transzkriptomikai változásokat elemeztük a differenciálisan expresszált (DE) gének azonosítása érdekében. Funkcionális elemzést végeztünk a gén annotálásához a Gene Ontology (GO), a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) és a Reactome adatbázisok segítségével. Számos olyan gént találtunk, amelyek termékéről ismert, hogy részt vesznek a kalcium jelátvitelben, a fájdalom jelátvitelében, a neuronális túlélésben, valamint a mielin termelésében és fenntartásában.

NK1R és Neurokinin receptor 2 (NK2R) nem volt kimutatható. A Neurokinin receptor 3 (NK3R) a kimutatási határ körül volt, ami arra utal, hogy más NKR izoformák vagy más receptorok is részt vesznek a HK-1 által kiváltott szenzoros neuronális aktivációban. A proteáz-aktivált receptor 1 (PAR1) és az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) DE géneket találtunk a kalcium jelátvitelben. A transzmembrán fehérje, az anthrax toxin receptor 2 (ANTXR2), egy potenciális új, fájdalommal kapcsolatos célpont, felszabályozott volt. A savérzékelő ioncsatorna 1; 3 (ASIC1,3), az N-metil-D-aszpartát (NMDA) és az alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav (AMPA) glutamát receptorok csökkentek, a mielin termelésével és fenntartásával kapcsolatos gének (Mbp, Pmp2, Myef2, Mpz) és a GDNF változott HK-1 kezelés hatására. Adataink a HK-1 idő- és dóziszfüggő hatását mutatták TRG sejt kultúrában. Eredményünk a

kalcium jelátvitelt mutatta ki megváltozott eseményként, azonban nem mutattunk ki semmilyen NK receptort. Feltehetően a TRG neuronok aktivációja független az NK receptoroktól. Az ANTXR2 egy potenciális új célpont, a PAR-1-nek szintén fontos szerepe van a fájdalomban, azonban a HK-1-gyel való kapcsolatuk ismeretlen. Néhány kulcsfontosságú eredményünket qPCR segítségével is validáltuk. Ezek az eredmények új célpontokat vagy kulcsfontosságú mediátorokat emelhetnek ki annak megoldására, hogy a HK-1 hogyan hat a TRG-re. Eredményeinket közzétettük: *Takács-Lovász K, Aczél T, Borbély É, Szőke É, Czuni L, Urbán P, Gyenesei A, Helyes Z, Kun J, Bölcskei K. Hemokinin-1 induces transcriptomic alterations in pain-related signaling processes in rat primary sensory neurons independent of NK1 tachykinin receptor activation. Front Mol Neurosci. 2023 Oct 27;16:1186279. doi: 10.3389/fnmol.2023.1186279. PMID: 37965042; PMCID: PMC10641776.*

Főbb eredményeink összefoglalása

- A trigeminovaskuláris rendszer elsődleges és másodlagos szenzoros neuronjainak szintjén leírtunk up- és downregulált géneket, amelyek szerepet játszhatnak a perifériás és központi szenzitizációs mechanizmusokban.
- A neuronális szövetekben észlelt változásokhoz hasonló transzkriptomikai változásokat mutatunk ki a perifériás vér mononukleáris sejtjeiben. Ezek az eredmények új perspektívákat nyithatnak és további vizsgálatokat indíthatnak el a trigeminális fájdalombetegségek kutatásában.
- Migrénes betegek ictalis és interictalis mintáiból izolált mononukleáris sejtjeit transzkriptomelemzésnek vetettük alá. E csoportok egészséges kontrollokkal való összehasonlítása lehetővé tette mind a betegség-, mind a fejfájásspecifikus változások azonosítását, és feltárta a gyulladással járó útvonalak fontosságát, valamint a különböző citokinek potenciális hozzájárulását a migrénre való hajlamhoz.
- Eredményeink továbbá a mitokondriális diszfunkció, az oxidatív stressz, a citokin- és az immunaktivitás lehetséges szerepére utalnak a migrénben.
- Kimutattuk a Tac4 mRNS expresszióját és lokalizációját sejtszinten a trigeminális ganglion szenzoros neuronjain és a gliasejtek minden típusán. Továbbá, a Tac4 jelentős gyulladási indukált upregulációját mutattuk ki mind a

neuronokban, mind a szatellita gliasejtekben. Eredményeink alátámasztják a HK-1 jelentőségét az orofaciális fájdalom hátterében álló gyulladási folyamatokban és a nociceptív szenzitizációban.

- Megerősítettük a Tac4 mRNS jelenlétét, illetve a transzkriptumok sejtszintű lokalizációját sejtmagban és citoplazmában oligodendrociták, asztrociták és mikroglia esetében is.
- Kimutattuk, hogy a HK-1 által közvetített jelátvitelben gyulladási molekulák, főként az MCP-1 és a TNF α , esetleg a RANTES, KC, IL-6 is részt vesznek.
- A PACAP-38 növeli az intracelluláris Ca²⁺ szintet és elindítja a kapcsolódó jelátviteli eseményeket, amelyek valószínűleg függetlenek a PAC1 és VPAC1/2 aktivációtól, mivel a PACAP(6-38), amely ismert, hogy ezeknél a célpontoknál antagonistaként működik, hasonló változásokat indukál. A transzkriptomikai változások főként mitokondriális diszfunkciókat mutatnak, mint például a Ndufb6 és TRPM8 lecsökkent kifejeződése.
- Az HK-1 koncentráció- és időpontfüggő hatásokat gyakorol a trigeminális elsődleges érzékszervi neuronokra. Megváltozott mitokondriális ATP szintézis, oxidoreduktáz aktivitás, valamint más útvonalak, mint a T-sejt-mediált immunitás pozitív szabályozása, neutrofil kemotaxis és leukociták adhézioja a vaskos endotél sejtekhez, amelyek potenciális immunmoduláló és glia-, Schwann-sejtek- és makrofágokkal kapcsolatos hatásokat jeleznek, amelyek hatással vannak az HK-1 szerepére a glia-neuron kommunikációban.
- Az inflammációs orofaciális fájdalom patkánymodellben csökkent aminosav anyagcsere és bioszintézis, valamint csökkent lipid anyagcsere figyelhető meg a plazma metabolitok alapján, ami potenciálisan a csökkent mitokondriális folyamatokkal van összefüggésben.
- Az interictális plazmamintákban a migréneseknél a PCs, SMs, arachidonsav enyhén szignifikánsan emelkedett. Az ictális fázisban nem tudunk szignifikáns metabolomikai változásokat kimutatni, amely valószínűleg az alacsony mintaméret miatt történt.