

**OROFACIÁLIS FÁJDALOM ÉS MIGRÉN TRIGEMINÁLIS
SZENZITIZÁCIÓS FOLYAMATAINAK TRANSZKRIPTOMIKAI ÉS
METABOLOMIKAI VIZSGÁLATA SEJTKULTÚRÁBAN, ÁLLATI
MODELLBEN ÉS HUMÁN TANULMÁNYBAN**

Doktori (PhD) Értekezés



Takács-Lovász Krisztina

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Vezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Program: Neuroimmun interakciók szerepe
fájdalomban és gyulladásban

Programvezető: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna

Témavezetők: Dr. Bölskei Kata

Dr. Kun József

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM, ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET

OGYDHT PÉCS

2025

Bevezetés

Orofaciális fájdalom (OFF) és migrén

Az OFF és a fejfájás világszerte a legsúlyosabb fájdalomproblémák közé tartozik, és a lakosság 25%-át érinti.¹ A migréne és az OFF-en túlmutató patofiziológiai mechanizmusok eltérőek lehetnek, azonban a trigeminális primer afferensek aktivációja és szenzibilizációja nyilvánvalóan közös útvonalat jelenthet. A trigeminovaskuláris rendszer diszfunkciója feltehetően hozzájárul a fájdalom kialakulásához ezekben az állapotokban, a pontos kórélettani folyamatok azonban továbbra is feltáratlan. A nervus trigeminus szemüregi (V1), maxilláris (V2) és mandibuláris (V3) ágakból áll. A V1 ágat tartják a legfontosabbnak a primer fejfájási zavarokban, mint például a migrénben. Ugyanakkor leírták, hogy a V2 és a V3 a dura mater-t is innerválhatja, nem csak a fej maxilláris és mandibuláris régióit, ami átfedést jelent a régiók között.²

A trigeminovaskuláris rendszer molekuláris komponensei

A trigeminális neuronok a központi idegrendszerbe történő szenzoros átvitel szállítói. A nociceptív afferensek főként vékonyan myelinizált és nem myelinizált A és C rostokból állnak.² A trigeminális ganglion (TG) elsősorban primer afferens, peptiderg neuronok szomájából és axonjaiból, valamint gliasejtekből áll. A trigeminális neuronok sejttesteit szatellita gliasejtek veszik körül.³ A hízósejtek (Mast cells, MC-k) rendkívül alkalmazkodóképes immunsejtek, amelyek számos ingerre képesek reagálni, és közvetítőként működnek a külső és a belső környezet között. Az MC-k elsődleges funkciója az immunválaszban való részvételük az aktiváció és a degranuláció révén. E folyamat során olyan tárolt vazoaktív vegyületeket szabadítanak fel, amelyek növelik az ér permeabilitást, elősegítik a folyadék felhalmozódását, és más immunsejteket, például eozinofileket, természetes ölüsejteket, monocitákat, makrofágokat és neutrofileket toboroznak, felerősítve a gyulladásos választ.⁴⁻⁷ A meningeális MC-k szoros kapcsolatban állnak a dura nociceptoraival. Az általuk felszabaduló hisztamin és citokinek mennyisége migrénes betegeknél megnövekszik.^{8,9}

Hipofízis adenilát-cikláz aktiváló peptid (PACAP)

A PACAP egy neuropeptid, a VIP/glükagon/növekedési hormon felszabadító faktor/szekretin szupercsalád tagja, amely 27 és az emlősökben jellemző 38 aminosavat tartalmazó formában (PACAP-27 és PACAP-38) létezik. Három fő PACAP-receptort írtak le: VPAC1, VPAC2 és PAC1, amelyek mindegyike G-proteinekhez kapcsolódik.¹⁰ A hízósejteken leírták a

Mas-related G protein-coupled receptor (Mrgpr) aktiválását a PACAP-38 vagy annak rövidebb formái a PACAP(6-38) vagy a PACAP(6-27) által.¹¹ A PACAP(6-38) a PAC1 receptor antagonistája különböző neuronális sejtvonalakban, azonban korábbi eredményeink egyértelműen kimutatták, hogy a PACAP(6-38) kezelés nem gátolta a PACAP-38-at, hanem önmagában azonos hatást fejtett ki patkány primer szenzoros neuronokban. Mind a PACAP-38, mind a PACAP(6-38) gátolni tudta a neuropeptid felszabadulást izolált trachea szenzoros idegvégződésekből¹² és Ca^{2+} -beáramlást indukálnak a trigeminális ganglionsejtek primer kultúráiban.¹³ Egy vizsgálatban 12 résztvevőből 10-en számoltak be arról, hogy a PACAP infúzió után enyhe vagy közepes fokú fejfájást tapasztaltak, ami a PACAP és a fejfájás kialakulása közötti kapcsolatra utal.¹⁴

Hemokinin-1 (HK-1)

A tachykininek a peptiderg primer afferens neuronokban található neuropeptidek, amelyek fontos szerepet játszanak a neurogén gyulladásban és a nociceptív átvitelben. Ezek a neuropeptidek a célsejtek receptorainak aktiválásával járulnak hozzá a fájdalom jelzéséhez és a gyulladáshoz, tovább erősítve a fájdalomválaszt.^{15,16} A tachykinin család fontos tagjai közé tartozik a P-anyag (SP) és a neurokinin A, mindkettőt a Tac1 gén kódolja, a neurokinin B-t a Tac3, a HK-1-et pedig a Tac4. Ezek a tachykininek G-fehérje kapcsolt receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat: NK-1, NK-2 és NK-3 receptorok, amelyek kritikus szerepet játszanak a fájdalom jelátvitelben és a gyulladásban.^{17,18} A tachykinin család más tagjaitól eltérően a Tac4 viszonylag magas expressziót mutat a perifériás, nem idegrendszeri szövetekben, beleértve a tüdőt, a lépet, a mellékvesét és a különböző immunsejteket, például a B- és T-limfocitákat, makrofágokat és dendritikus sejteket. Ez arra utal, hogy a Tac4 szélesebb körű szerepet játszik mind az immunválaszban, mind a perifériás szervek működésében, ahol potenciálisan a gyulladás és a fájdalom mechanizmusaihoz kapcsolódhat.¹⁹⁻²²

Trigeminális szenzitizáció vizsgálati rendszerei

Míg a legtöbb vizsgálat kísérleti állatokból származó primer érzékelő neuronok felhasználására összpontosít, állandó sejtvonalak is rendelkezésre állnak, amelyek következetes és ellenőrzött környezetet biztosítanak a fájdalom jelátviteli útvonalak vizsgálatához.^{23,24} A primer szenzoros neuronok egyik előnye a heterogenitás, amely lehetővé teszi a különböző sejtípusok közötti kölcsönhatások vizsgálatát. Az egér vagy patkány TG-ből izolált érzékelő neuronok a preklinikai fájdalomkutatás elsődleges in vitro modelljei.

Több szakirodalmi áttekintés is kiemeli a fejfájáskutatás szempontjából releváns, validált fájdalom állatmodelleket. Az állatmodell egyik legnagyobb előnye, hogy a humán vizsgálatokban

korlátozottan hozzáférhető különböző szöveteket vagy szerveket külön-külön lehet vizsgálni. E modellek közé tartozik a trigeminális neuronok közvetlen elektromos ingerlése, gyulladásokeltő vagy algogén anyagok („gyulladásos koktél”, például bradikinin, szerotonin, hisztamin és prosztaglandinok) beadása az agyhártyába, valamint exogén vegyi anyagok, például nitroglicerinn és PACAP alkalmazása. Ezeket a modelleket viselkedési vizsgálatok, elektrofiziológia, áramlásmérés és immunhisztokémiai markerek kimutatása egészíti ki. Segítségükkel olyan migrénszerű jelenségek vizsgálhatók, mint a mechanikus allodinia (pl. von Frey-filamentumokkal vizsgálható a bajuszpárna vagy a periorbitalis régiója), a fényérzékenység (pl. hely- vagy fénykerülő tesztek) és a spontán válaszaktivitás változásai.^{25–27}

A teljes Freund-féle adjuváns (CFA) beadása rágcsálók bajuszpárnájába lokalizált gyulladást indukál, és mechanikus hiperalgéziát és allodiniát eredményez az orofaciális régióban.²⁸ Ezt a modellt gyakran használják a fájdalom mechanizmusainak és a gyulladásos mediátorok hatásának tanulmányozására az arcfájdalom állapotában.^{29–32} Bár a CFA injekciós modellt hagyományosan nem használják migrénes vizsgálatokhoz, hatékony trigeminális aktivációs modellként szolgál, mivel a megbízhatóság és a nagyfokú reprodukálhatóság előnyeit kínálja.³³

Transzkriptomika és metabolomika a klinikai vizsgálatokban

A transzkriptomika lehetővé teszi a különféle biomarkerek expressziójának vizsgálatát az RNS-transzkriptek elemzése révén, ezáltal segítve annak megértését, hogyan befolyásolják ezek a markerek a biológiai folyamatokat, valamint a mögöttes mechanizmusok feltárását. Ugyanakkor számos korlátja és kihívása van: az adatok nagysága és összetettsége, a funkcionális összefüggés hiánya, valamint a magas költségek és a mérések időigénye. Fontos, hogy a transzkriptomikai eredményeket közvetlenül összevegyük a funkcionális kimenetekkel, mivel a megemelkedett mRNS-szint nem feltétlenül jár együtt a fehérjeszint vagy aktivitás növekedésével.

A metabolomika a metabolitok vizsgálatára fókuszál, így betekintést nyújt az adott kóros vagy élettani állapot során aktív anyagcsereutakba. Bár ez a megközelítés hasznos a funkcionális biológia megértésében, hátrányt jelent, hogy a metabolitok lefedettsége korlátozott, mivel nem mindegyikük detektálható. E két megközelítés együttes alkalmazása részletes képet ad a betegségek vagy kezelések hatására bekövetkező molekuláris változásokról.³⁴

A multi-omikai adatelemzés során azonban további kihívások is jelentkeznek. Ezek közé tartozik az adatgyűjtés során felmerülő problémák – különböző típusú adatok –, az integrált elemzések számítási nehézségei, az eltérő jel-zaj arányok, a gyenge biológiai értelmezhetőség,

valamint az adatok közösségi megosztásának korlátai.^{35–38} A multi-omika ígéretes eszközt kínál biomarkerek azonosítására és validálására, különösen összetett esetekben.³⁹ A perifériás vér mononukleáris sejtjei (PBMC-k), amelyek közé tartoznak a limfociták (T- és B-sejtek, természetes ölősejtek) és a monociták, könnyen izolálhatók, mivel a vérvétel minimálisan invazív, az izolálási folyamat pedig egyszerű. Ennek következtében a PBMC-k ígéretes forrásai lettek a biomarker-jelölteknek a klinikai gyakorlatban. Ezek a sejtek képesek tükrözni a központi idegrendszerben zajló patofiziológiai változásokat különböző betegségek esetén, különösen neuroinflammatorikus folyamatokban, új lehetőségeket nyitva a biomarker-kutatásban és elősegítve a betegségmechanizmusok mélyebb megértését.^{40–42} A PBMC transzkriptomika kombinálása a vér metabolomikájával mélyebb betekintést nyújthat az összetett biológiai folyamatokba.

CÉLKITÚZÉSEK

1. A PACAP-38 és a HK-1 tachykinin hatásának és hatásmechanizmusának vizsgálata tenyésztett TG primer érzőneuronokon a potenciális célpontok azonosítása és a jelátviteli utak feltárása érdekében.
2. A TG transzkriptomikai profiljának és a plazma metabolitjainak elemzése a teljes Freund-féle adjuvánssal indukált orofaciális gyulladásos patkány fájdalommodellben a patofiziológiai útvonalak és célpontok azonosítása érdekében előzetes feltételezésektől mentes multi-omikai megközelítéssel és bioinformatikai eszközök segítségével.
3. Migrénes betegek plazmájának fejfájás- és betegségsspecifikus metabolitprofiljainak meghatározása iktális és interiktális periódusok alatt, egészséges önkéntesekkel összehasonlítva, továbbá az adatok elemzése a perifériás vér mononukleáris sejtjeinek (PBMC) transzkriptomikai változásaival együtt, a kulcsfontosságú patofiziológiai mediátorok és új farmakológiai célpontok azonosítása érdekében.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyésztési vizsgálatok

Az 1-4 napos Wistar patkány kölykök TG-neuronjait használtuk elsődleges sejtenyészetekhez. A kísérlethez a sejt kultúrákat 1 μ M PACAP-38 vagy PACAP6-38 hatóanyaggal kezeltük, a kezeletlen kultúrákat pedig kontrollként használtuk. Hat órával a PACAP-38 vagy a PACAP6-38 beadása után a mintákat RNS-izoláláshoz gyűjtöttük. A HK-1-et két koncentrációban adtuk: 500 nM (nincs kiváltott kalcium-beáramlás) és 1 μ M (van kiváltott kalcium-beáramlás).⁴³ A kezeletlen kultúrákat kontrollként használták. A HK-1 beadása után 6 és 24 órával mintákat gyűjtöttünk az RNS izolálásához.⁴⁴ A teljes RNS izolálását és tisztítását, szekvenálást, a *Rattus norvegicus* referencia genomhoz való igazítást, a fehérje-kódoló génekhez való illesztést végeztük el, és a génspecifikus olvasási számokat a HTSeq könyvtár (v0.11.1) segítségével kaptuk meg.^{44,45} A génszám adatok normalizálását az edgeR R/Bioconductor csomag (v3.28) trimmed mean of M values (TMM) módszerével végeztük, majd a statisztikai elemzéshez a limma csomaggal log-transzformáltuk a voom megközelítéssel.^{44,45} Validációhoz RT-PCR mérést használtunk.⁴⁶ A limma lineáris modellezési folyamat részeként kiszámították a „Fold change” (FC) értékeket és a moderált t-próbából származó p-értékeket. A differenciálisan expresszálandó (DE) géneket a következő küszöbértékek alkalmazásával azonosítottuk: $FC \geq 1,2$ és $p\text{-érték} \leq 0,05$ a HK-1 1 μ M (24 h) és HK-1 500 nM (6 h) kezelések és a kezeletlen kontroll közötti összehasonlításhoz, $FC \geq 1,3$ és $p\text{-érték} \leq 0,05$ a HK-1 1 μ M (6 h) és a kontroll közötti összehasonlításhoz, valamint $FC \geq 2,0$ és $p\text{-érték} \leq 0,05$ a HK-1 500 nM (24 h) és a kontroll közötti összehasonlításhoz. A PACAP-kezelések esetében a küszöbértékek a következők voltak: $FC \geq 2$ és $p\text{-érték} \leq 0,05$ a PACAP-38 vs. kezeletlen kontroll, valamint $FC \geq 1,5$ és $p\text{-érték} \leq 0,001$ a PACAP6-38 vs. kontroll. A p-értékeket a Benjamini-Hochberg módszerrel korrigáltuk a többszörös összehasonlításokra. A normalizált génexpressziót transzkriptum per millióban (TPM) fejeztük ki a feltáró elemzések során. A funkcionális elemzéshez a gén annotációkat a Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) és Reactome adatbázisokból nyertük. A funkcionális dúsulást a GO esetében a Fisher-féle egzakt teszt, a KEGG és a Reactome esetében pedig a hipergeometriai tesztek segítségével végeztük, a topGO (v2.37.0), a ReactomePA (v1.30.0) és a gage (v2.36.0) segítségével. A gén feldúsulási elemzést nem-parametrikus Kolmogorov-Smirnov-tesztekkel (GO és KEGG), illetve hipergeometrikus tesztekkel (Reactome) értékeltük ki. A KEGG útvonalak vizualizációját a pathview csomaggal (v1.26.0) generáltuk. A Revigo eszközt alkalmaztuk a GO fogalmak -összegzésére.^{44,45}

Állatmodell

Az állatkísérletet az európai jogszabályoknak (2010/63/EU irányelv) és a magyar kormányrendeletnek (40/2013., II. 14.) a tudományos célokra felhasznált állatok védelmére vonatkozó előírásainak megfelelően végeztük, és teljes mértékben megfelelt a Nemzetközi Fájdalomkutató Társaság ajánlásainak.

A vizsgálatot a Pécsi Tudományegyetem Állatjóléti Bizottsága és az Országos Állatkísérleti Tudományos Etikai Bizottság jóváhagyta, valamint a Baranya Megyei Kormányhivatal engedélyezte (BA02/2000-75/2023). Harmincnégy 200-300 g-os hím Wistar patkányt (Toxicoop Zrt., Magyarország) tartottunk a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet helyi állatházában, standard fény-sötét ciklus (12 órás fény/sötét ciklus) és hőmérséklet (24-25°C) mellett, *ad libitum* táplálékkal és vízzel ellátva. Az orofaciális lokalizált gyulladást 50 µL CFA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA; 1 mg/ml) egyoldali s.c. injekciójával idéztük elő a jobb bajuszpárnába ketamin (72 mg/kg) és xilazin (8 mg/kg) altatásban. A kontrollpatkányok ugyanilyen mennyiségű sóoldatot kaptak, a kontralaterális oldal érintetlen maradt. A mért mechanonociceptív küszöbértéket a továbbiakban statisztikailag elemeztük kétfaktoros ANOVA és Tukey-féle többszörös összehasonlító teszt segítségével. A vérmintákat a 3. napon vettük, amikor a korábbi tapasztalatok alapján a gyulladással az allodinia maximális volt. Az orofaciális régió mechanikai érzékenységét von Frey-filamentumokkal mértük a korábban leírtak szerint.⁴⁷ A vérmintákat az állatokból szívpunkcióval vettük, és antikoaguláns citrát-dextróz-A (ACD-A) csőbe (BD Vacutainer) gyűjtöttük, majd centrifugálás után (300×g 15 percig, kétszer 2500×g 15 percig) a plazmaminták aliquotjait -80 °C-on tároltuk a metabolitok elemzéséig. A nem célzott plazma-metabolomikai méréseket a Pécsi Tudományegyetemen és a Bialystoki Orvostudományi Egyetemen végeztük. A Mass Hunter Qualitative Analysis Software B.07.00 (Agilent, Santa Clara, Kalifornia, USA) szoftverben található Molecular Feature Extraction (MFE) algoritmust használtuk a nyers adatok megtisztítására a háttérzajtól és a nem kapcsolódó ionoktól. Az illesztést és az adatszűrést a Mass Profiler Professional 12.6.1 (Agilent, Santa Clara, Kalifornia, USA) programmal végeztük. Az összehangoláshoz alkalmazott paraméterek a következők voltak: 1% az RT és 15 ppm a tömegvariáció esetében. A többváltozós elemzést a SIMCA 15.0 (Sartorius Stedim Biotech) programban végeztük, és a főkomponens-elemzés (PCA) és az ortogonális parciális legkisebb négyzet diszkrimináns analízis (OPLS-DA) alkalmazására terjedt ki. A PCA-t az adatok minőségének ellenőrzésére, a minták szórásának és klaszterezésének értékelésére, valamint a potenciális kiugró értékek felderítésére használtuk. Az OPLS-DA-t a csoportok közötti elkülönítés

szemléltetésére és az elkülönítés alapjául szolgáló metabolitok kiválasztására használtuk. A statisztikailag szignifikáns metabolitoknak a 0,5 feletti $p(\text{corr})$ és az 1-nél nagyobb VIP értéket tekintettük. Az MS/MS fragmentáció alapján azonosítottuk a statisztikai elemzéssel kiválasztott metabolitokat. Ezeknek pontos tömegét egyidejűleg kerestük a METLIN, KEGG, LIPIDMAPS és HMDB adatbázisokban a CEU Mass Mediator segítségével (elérhető online keresőmotor, <http://ceumass.eps.uspceu.es/mediator/>). A metabolitok azonosságát a kísérleti MS/MS spektrumok és az adatbázisokból származó MS/MS spektrumok összevetésével erősítettük meg. A Semmelweis Egyetemen célzott plazma-metabolizációs profilalkotást végeztek, amelyet az adatok elemzése követett. A hemolízis jeleit mutató mintákat kizártuk. A profilalkotáshoz a Biocrates Life Sciences AG (Innsbruck, Ausztria) által vásárolt Biocrates MxP® Quant 500 Kit-et használták. A kit előkészítése a gyártó által leírtak szerint történt. Az analízist egy Shimadzu Nexera XR ultrateljesítményű folyadékkromatográffal (Simkon Kft, Budapest, Magyarország) végeztük, amelyhez egy elektrospray ionizációs egységgel felszerelt Sciex Qtrap 5500 tömegspektrométer csatlakozott, és többszörös reakciómonitorozási üzemmódban működött (Perform Hungária Kft, Budapest, Magyarország).

A patkányok TG-mintáiból történő teljes RNS kivonás és tisztítás a korábban már leírtak szerint történt. ⁴⁷A mintákat az Illumina HiSeq2500 műszerrel szekvenálták, 50 bp olvasási hosszúságú egyvégű szekvenálással a Vienna Biocenter Core Facilities GmbH (Bécs, Ausztria) Next Generation Sequencing Facility-ben. Az adatelemzést a sejtkultúra-vizsgálat szakaszban leírtak szerint végeztük.

A további útvonalelemzéshez a QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 122103623 verzióját használták. A szignifikáns metabolitokra és génekre ($p \leq 0,05$) alapelemzést futtattunk az Ingenuity Knowledge Base, mint referenciahalmazra nézve. Az elemzés kanonikus útvonalakat, upstream szabályozókat, ok-okozati összefüggéseket, betegségeket és funkciókat, valamint hálózatokat azonosított. A metabolitok és gének közös elemzéséhez mind a metabolitok, mind a gének esetében háttérlistát alkalmaztunk az analitikai platformjaink által detektált molekulák alapján. Az útvonalelemzést a lipidekre vonatkozó LIPID MAPS® reakciófeltáró segítségével végeztük el. A különböző lipidosztályokat különböző forrásokból származó reakciók alapján kapcsoltuk össze, beleértve a tudományos irodalmat, a lipidkutató közösséget és más meglévő adatbázisokat, mint például a Rhea, a WikiPathways, a KEGG, az Ecocyc és a MetaCyc. A KEGG metabolikus útvonalak alapján útvonalelemzést végeztünk a poláris és ionos metabolitok számára, megtalálva a kapcsolatot a kimutatott és a megkülönböztető metabolitok között.

Humán vizsgálat

A vizsgálatot az Emberi Erőforrások Minisztériuma Nemzeti Népegészségügyi Központjának jóváhagyásával végeztük (28324-5/2019/EÜIG), és minden résztvevő a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően írásbeli beleegyezését adta. A résztvevők között 20-65 év közötti, epizodikus migrénes betegek voltak, akiket a fejfájás-zavarok nemzetközi osztályozásának harmadik kiadása alapján választottunk ki, aurával vagy aura nélkül.⁴⁸

Összesen 37 résztvevőt (36 nő, 1 férfi) vontunk be a vizsgálatba, akik között 24 migrénes beteg és 13 egészséges kontrollszemély volt. Egy férfi résztvevőt a koherens adatelemzés miatt kizártunk. A vérmintákat (személyenként 13 ml) a cubitális vénából vettük, feldolgoztuk a metabolizmus elemzéséhez, a plazmát pedig -80°C-on tároltuk az elemzésig. A Biocrates MetIDQTM szoftver elemezte a metabolit koncentrációkat és végezte a minőségellenőrzést. A 42 LC-MS/MS-számszerűsített metabolit esetében hatpontos kalibrációs görbéket használtunk lineáris regresszióval (1/koncentrációs súlyok), kivéve a dopamint (kvadratikuss regresszió). A determinációs együtthatók 0,9894 és 0,9999 között mozogtak (medián: 0,9972). 64 LC-MS/MS metabolit esetében a csúcsterületeket belső standardokkal hasonlítottuk össze. 524 metabolit FIA-MS/MS analízisét automatizáltuk a MetIDQTM segítségével, a Biocrates MxP® Quant 500 kit algoritmusainak felhasználásával. Adatszűrést/korrekciót nem alkalmaztunk. Azokat a metabolitokat választottuk ki, amelyeknél a QC utáni kimutatási arány >80% és az RSD <15% volt. A kontrollok és a migrénes betegek (interiktális/iktális) metabolomikai profiljait ANOVA segítségével hasonlítottuk össze, Tukey post-hoc teszttel; páros t-próbával az iktális vs. interiktális mintákat elemeztük. Az FDR-korrekciót (Benjamini-Hochberg) 0,2-re állítottuk be a kontroll-interiktális összehasonlításoknál és p<0,05-re a páros elemzéseknél. A kontroll-interiktális összehasonlításoknál randomizálást alkalmaztunk. Minden statisztikai elemzést az R (4.3.3.3 verzió) segítségével végeztünk. Az R-ben a következő csomagokat használtuk: dplyr (1.1.4 verzió), tidyr (1.3.1 verzió), ggplot2 (3.5.1 verzió), multcomp (1.4-26 verzió), readxl (1.4.3 verzió). Korábbi PBMC transzkriptomikai adatokkal⁴⁹ összefűzött metabolit adatokat az IPA szoftverben elemeztük tovább.

Eredmények

Az 1), 2), 3) és részben a 4) fejezetben szereplő eredmények korábban már publikáltuk, azonban a dolgozatban módosított és dolgozathoz illesztett formában kerültek bemutatásra.

1) A PACAP-38 és PACAP6-38 által indukált transzkripció változások a TG-ben

A PACAP potenciális célpontjainak expressziója TG sejt kultúrában

A PAC1 (Adcyap1r1) és VPAC2 receptorokat, valamint számos Mrgpr receptort detektáltunk a legtöbb mintában.

PACAP-38- és PACAP(6-38) által indukált gének a TG sejtenyészetben

A kezelés után 6 órával végzett mintavétel 200 közös, DE gént eredményezett a PACAP-38 és a PACAP6-38 esetében. A PACAP-38 esetében 70 egyéb DE gént, a PACAP6-38 esetében 132 egyéb DE gént találtunk a 6 órás mintavételek során. A neurológiai folyamatokban potenciálisan szerepet játszó közös DE gének a PACAP-38 és PACAP(6-38) kezeléseket követően a kezeltlen kontroll sejt kultúrákhoz képest a következők: Cenpb, Gnal, Hsp90aa1, Hmga1, Tomm70, Gnai1, Prkacb és Tomm34 megemelkedett mind a PACAP-38-, mind a PACAP(6-38)-kezelt TG sejt kultúrákban. Mindkét kezelésben az Ndufb6 (NADH oxidoreductase subunit B6) expressziója jelentősen lecsökkent a kontrollcsoportéhoz képest (a PACAP-38 és a PACAP(6-38) kezelések esetében -50,7 és -80,9-es FC értékekkel) illetve F2R és az Slc25a5, míg a Trpm8 mindkét esetben megemelkedett. Ezenkívül az Fbl (fibrillarin), az Fhl2 (four and a half LIM domains 2), az Slc25a5 (solute carrier family 25 member 5) és a Tomm6 (translocase of outer mitochondrial membrane 6) mindkét kezelésben jelentősen csökkent expressziót mutatott.

Útvonalelemzés

A Reactome-elemzés azonosította a DE-géneket érintő kulcsfontosságú intracelluláris jelátviteli útvonalakat, mind a PACAP-38- és PACAP(6-38)-kezelt kultúrákban. A közös útvonalak a következők voltak: a CREB1 foszforilációjának adenilát-ciklázon keresztüli fokozódása, a PKA aktiválása a glükagon jelátvitelben, valamint az NMDA receptor aktiválódásához köthető folyamatok. A kalciumfüggő folyamatok aktiválódtak, míg a Komplex I biogenezis lecsökkent, amely potenciális mitokondriális diszfunkcióra utal. Mind a GO (Belső mitokondriális membrán fehérje komplex, mitokondriális membrán rész, belső membrán), mind a Reactome elemzések alátámasztják a peptidek mitokondriális funkciókra gyakorolt gátló hatását. A KEGG-elemzés a kalcium jelátviteli útvonalban közös DE géneket azonosított mind a PACAP-38, mind a PACAP(6-38) kezelés esetében.

Diszkusszió

A PACAP-38 és PACAP(6-38) megemelte az intracelluláris Ca^{2+} szintet TG sejtenyészetben korábbi eredményeink alapján, ¹³ ezt a jelen transzkriptomikai eredmény megerősíti, ugyanis

mindkét peptid estén a „calcium signaling pathway” szignifikánsan előtérbe került. A PACAP(6-38) agonista hatása váratlan volt, mivel hagyományosan a PAC1 és VPAC1/2 receptorok antagonistájaként ismert, amint azt CHO, Cos7 sejtekkel és *Xenopus oocitákkal* végzett vizsgálatok kimutatták.^{11,13,50} Korábbi és jelen eredményünk alapján feltételezhető, hogy a PACAP-indukált trigeminovaskuláris aktiváció¹⁴ – amely migrénben is jelen lehet – PAC1, VPAC1/2 független módon hízósejtek részvételével történhet.⁵ Az MrgB3 receptor mindkét peptid potenciális célpontja, mely révén a patkány agyhártya hízósejtjeinek aktiválására kerül sor.¹¹ A megnövekedett intracelluláris kalciumszint befolyásolhatja a mitokondriális működést, amit a funkcionális feldúsulási elemzés is mutat. A mitokondriális érintettséget az elektrontranszportlánc diszfunkciójával hozható összefüggésbe. A NADH-oxidoreduktáz (Komplex I) B6 alegységének expressziója szignifikánsan csökkent mind a PACAP-38, mind a PACAP(6-38) kezelések hatására. Ez az eredmény arra utal, hogy a PACAP hatásai és a migrén között összefüggés lehet. Hasonló metabolikus és mitokondriális diszfunkciókat, például az I-es, III-as, IV-es komplexek és a citrát-szintáz csökkent aktivitását korábban migrénes betegeknél is megfigyelték.^{51,52} Ez összhangban van a korábbi megállapításokkal, amelyek szerint a migrénes betegek perifériás vér mononukleáris sejtjeinek transzkriptom vizsgálata alapján a mitokondriális elektrontranszportlánc jelentősen érintett mind az iktális, mind az interiktális időszakokban.⁴⁹ A mitokondriumok és az endoplazmatikus retikulum kulcsfontosságú szabályozói az intracelluláris kalcium-homeosztázisnak, amely befolyásolja a neuronális excitabilitást. A mitokondriális diszfunkció fokozhatja a reaktív oxigéngyökök termelését, amely különböző útvonalakon keresztül hozzájárulhat a nociceptorok érzékenyítéséhez.⁵³ A légúti C-rostokban a mitokondriális III-as komplex gátlása fokozza az ingerlékenységet a TRP-csatornák és a protein kináz C aktiválásán keresztül.^{54,55} Ezenkívül a reaktív oxigéngyökök és a mitokondriális DNS felszabadulása gyulladást válthat ki, továbbfokozva a nociceptorok érzékenyítését. A DE gének között található egy másik jelentős, fájdalommal összefüggő gén, a TRPM8, amely upregulált volt. A TRPM8 egy mentol- és hidegérzékeny ioncsatorna, és a hátsó gyöki, valamint a TG-ben található meg.^{56,57} A TRPM8 mind nociceptív, mind nem nociceptív szenzoros neuronokban expresszálódik, és a nociceptív sejtekben TRPV1-gyel együtt is kifejeződik.^{58–60} Fiziológiailag a TRPM8 mind a nem káros, mind a káros hideg hőmérsékleteket érzékeli,^{61–63} csökkenti a nociceptorok aktivációját, ami magyarázza, hogy miért enyhíti a fájdalmat a hűtés vagy a mentol. Ugyanakkor a TRPM8 szerepet játszik a hideg allodiniában is krónikus fájdalom modellekben.⁶⁴ Kiemelendő, hogy a genom-szintű asszociációs vizsgálatok olyan polimorfizmusokat azonosítottak a TRPM8 gén régiójában, amelyek csökkenthetik a migrén kockázatát,^{65–67} továbbá a mentol helyi alkalmazásáról kimutatták, hogy enyhíti a migrénes fejfájást.⁶⁸

2) HK-1 indukálta transzkripció változások a TG-ben

A 24 órás 1 μ M HK-1 expozíció, amely korábban kalcium beáramlást indukált a trigeminális szenzoros neuronokban, csökkentette az *Asic3*, *Grin1* és *Ccl7* gének expresszióját. A korábbi, 6 órás időpontban az *Slc25a5* csökkent expressziója volt megfigyelhető, míg a *Mag* expressziója megnövekedett. A 6 órás időpontban, koncentrációtól függetlenül, a legnagyobb mértékben upregulált gének között szerepelt a *Mag*, *Itga4* és *Lbb*. Ezzel ellentétben, a 500 nM HK-1, amely a korábbi vizsgálatok szerint nem indukált kalcium beáramlást, 24 óra alatt csökkentette az *Slc25a5* expresszióját és megnövelte az *Ndufb6* szintjét. A 500 nM HK-1 kezelés hatására 6 órán belül az *Mt-nd6* expressziója csökkent. Az azonos HK-1 koncentráció mellett a 6 és 24 órás válaszokban megfigyelt DE gének kiemelik a kritikus mechanizmusokat. A 24 órás 500 nM HK-1 kezelés a legnagyobb mértékű expresszióváltozásokat eredményezte, ahol a *Nr4a1*, *Slc25a5*, *F2r*, *Ndufb6* és *Gnb2* mind upregulálódtak, amit qPCR is megerősített (FC: 1.726; 1.783; 2.205; 2.105; 1.445). A 1 μ M HK-1 kezelés utáni 6 órában az *Itga4*, *Fgf5* és *Gnai1* emelkedett, míg az *Ndufb6*, *Gnb2* és *F2r* csökkentek, amit mind a szekvenálás, mind a qPCR megerősített (FC: 2.942; 3.652; 1.14; -1.15; -1.01; -1.08). Az *Fgfr1* és *Gnai1* expressziója nem változott a 24 órás 1 μ M HK-1 kezelés hatására sem a transzkripció szekvenálás, sem a qPCR alapján (FC: 1.385; 1.365). Azonban a 24 órás 500 nM HK-1 csoportban az *Fgfr1* a transzkripció szekvenálás alapján csökkent, de qPCR mérés során megnövekedett (FC: 1.18). A 1 μ M HK-1 kezelés hatására az *Itga4*, *Antxr2* és *Tenm3* hasonló expresszió változásokat mutattak. A 500 nM HK-1 után csak egy DE gén, a *Cxcl9* csökkent. A 24 órás eredmények alapján a HK-1 koncentrációjától függő hatás erősebb, mint a kezelés utáni időpontokban vizsgált válaszok; 6 óra alatt 30 up- és 6 downregulált gén, míg 24 óra alatt 3 up- és 5 downregulált gén volt megfigyelhető. A 6 órás időpontban az *Antxr2* és *Itga4* koncentrációtól függetlenül emelkedést mutatott, valamint a *Prss12*, *Mal* és *Mag*, míg a *Scn4b* csökkent. A 24 órás időpontban, koncentrációtól függetlenül upregulálódott a *Fzd1* és *Hacd2*, míg a *Rph3a*, *Gabra2*, *Ryr2*, *Mag* és *Scn1a* downregulálódtak. A 24 órás 1 μ M HK-1 kezelés hatására a *Kcnip4* és *Mbp* csökkentek, míg a *Gpr108* emelkedett. A 6 órás 1 μ M HK-1 kezelés hatására az *Fgf9*, *Ndufb6*, *Myef2*, *Mpzc* és *GNDF* mRNS szintjük emelkedést mutatott. Érdekes módon a 500 nM HK-1 a PACAP mRNS kifejeződését csökkentette, míg a *Pmp2*-t és *GNDF*-t emelte 6 óra alatt, valamint a *Tmem128*-at és *Itgav*-t 24 óra alatt.

HK-1 potenciális célpontjai

A potenciális célmolekulák feltárása érdekében a génadatbázisok segítségével az idegi és gyulladásos mechanizmusokkal kapcsolatos receptorokat azonosítottunk. Egy figyelemre méltó

receptor, a MAS-related G protein-coupled receptor B5 (Mrgprb5) minden csoportban jelen volt, bár a TPM-je 2 alatti értéket mutatott. A receptor expresszió szintjei mindkét időpontban konzisztensnek bizonyultak. A Rack1, Ngfr és Ednrb magas TPM értékekkel rendelkeztek mindkét mintavételi időpontban, míg a Tnfrsf12a, Adipor1 és Adipor2 mindkét koncentrációnál kifejeződtek. Érdeemes megemlíteni, hogy olyan receptorok, mint az Ntrk1, P2rx3 és F2r szintén kifejeződtek, ami a fájdalom átvitelében és a kalciumion szabályozásában betöltött szerepükre utal. A Cxcr4 csak 6 óránál volt jelen. Az Adipor2 500 nM esetén 24 óra után lecsökkent, míg az F2r 1 μ M esetén 6 óránál, majd újra 500 nM esetén 24 óránál upregulálódott. Az F2r mellett az Egfr is upregulálódott 1 μ M után 6 óránál. Meglepő eredmény a Trpm3, Trpm7 és Trpm8 kationcsatornák expressziójának változása volt 500 nM esetén 24 óra után.

HK-1 kezelés hatására változott szignalizációs útvonalak

A 500 nM és 1 μ M HK-1 kezelést 6 órát követően a KEGG adatbázis alapján végzett útvonal-analízis azt mutatta, hogy a leginkább érintett útvonalak főként a kalcium jelátvitelhez és a Wnt jelátvitelhez kapcsolódtak. A receptorok közül az F2r lecsökkent, míg az Egfr upregulált volt. A transzkriptomikai szinten például a Slc25a5 és a Prkaca (protein kinase CAMP-activated catalytic subunit alpha) negatív változásokat mutattak, míg a Gna11 (G protein subunit Alpha 11) és a Prkacb (protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta) upreguláltak voltak. 1 μ M HK-1 esetén, kezelést követően 6 órával, a legérdekesebb GO kifejezések a protein kináz inhibitor aktivitás, protein kináz A szabályozó alegységének kötődése és a tiroid hormon receptor kötődés voltak. A szinaptikus rés függetlenül a HK-1 koncentrációjától egy jelentős eredmény volt a celluláris komponens kategóriában. A 500 nM HK-1 esetén, 6 óránál, a kulcsfontosságú biológiai folyamatok az adenylate cyclase-activating GPCR jelátvitel, a T sejt-mediált immunitás pozitív szabályozása, a neutrofil kemotaxis és a leukocita adhézio a vaszkuláris endotél sejteken voltak, ami potenciális immunológiai hatásokra utal. A celluláris komponensek közé tartozott a szinaptikus rés, a T-tubulus és a myelinhüvely, míg a molekuláris funkciók között figyelemre méltó volt az adrenerg receptor kötődés, NADH dehidrogenáz aktivitás és a cAMP kötődés. 1 μ M HK-1 esetén, 24 óránál, az olyan útvonalak, mint a glutamát és az inzulin receptor jelátvitel voltak érintettek, belső kalcium-ion válaszokkal. A szinaptikus vezikulum volt a kulcsfontosságú celluláris komponens, a molekuláris funkciók közé tartozott a ligand által aktivált ioncsatorna aktivitás, a posztzinaptikus neurotransmitter receptor aktivitás és a nátriumcsatorna aktivitás. 500 nM HK-1 esetén, kezelést követően 24 órával a preszinaptikus struktúra kialakulása, a mitokondriális ATP szintézis, a Schwann-sejt proliferáció és a dendritikus tüskék fejlődése

érintettek voltak. A molekuláris funkciók közé tartozott a palmitoyl-transzferáz aktivitás, FGF kötődés és oxidoreduktáz aktivitás. A Reactome útvonal adatbázis kiemeli a biokémiai folyamatokat a különböző HK-1 kezelési csoportokban: 1 μ M 6 óránál, 500 nM 6 óránál, és 500 nM 24 óránál. A 1 μ M HK-1 24 órás csoportban nem jelentkeztek jelentős eredmények. A 1 μ M HK-1 6 óránál a kulcsfontosságú útvonalak közé tartozott az apoptózis, jelátvitel felerősítése, programozott sejthalál, G alpha (s) jelátviteli események, chaperon által közvetített autofágia és opioid jelátvitel. Az 500 nM HK-1 6 órás csoport számára további fontos útvonalak voltak az ADP jelátvitel a P2Y purinoreceptor 12-n keresztül, az oxidatív stressz által indukált szenescencia, a GABA receptor aktiváció és az opioid jelátvitel. A 1 μ M és 500 nM kezelést követően 6 órával közös volt a G alpha (s) jelátviteli események, ami a HK-1 koncentrációtól és kalcium-beáramlástól független hatásokat jelez. A 500 nM HK-1 6 órás csoport szempontjából figyelemre méltó, hogy kizárólagos útvonalak voltak a GPCR jelátvitel, GPCR ligand kötődés és a glikoszfingolipid anyagcsere.

Diszkusszió

Tudomásunk szerint mi mutattunk be először patkány elsődleges szenzoros neuronjaiban az HK-1 jelátviteli útvonalairól transzkriptomikai adatokat, amelyek a HK-1 potenciális célpontjaira, hatásmechanizmusaira, valamint a fájdalomátvitelhez és gyulladásához kapcsolódó DE génekre összpontosítanak. Az HK-1 hatásai koncentráció- és időfüggők. Ez a neuropeptid nemcsak az elsődleges szenzoros neuronokat érinti, hanem a szatellita glia sejteket is; ez a kutatás betekintést nyújt ezen interakciókba, célja pedig, hogy tükrözze az *in vivo* körülményeket.^{69,70}

Cxcl9, nocicepció egyik mediátora⁷¹ downregulálódott 500 nM koncentrációnál mindkét időpontban. A CXCR3 receptor, amelyet a CXCL9 aktivál, szerepet játszik a glia aktivációjában és a fájdalom modulációjában.^{72,73} A Prss12, Mal és Mag upregulálódása, valamint a Scn4b downregulálódása figyelhető meg 6 órával a két HK-1 koncentrációval történő kezelés után. A Prss12 (motopszin) aktiválhatja az asztrocita PAR receptorokat, ami a neuronális NMDA receptor aktiválódását váltja ki.^{74,75} A Mal elsősorban az oligodendrocitákban és Schwann-sejtekben van jelen, és gátolja a perifériás idegek mielinizációját,⁷⁶ míg az Scn4b, a feszültségfüggő nátriumcsatornák egyik alegysége, kulcsszerepet játszik az akciós potenciálok generálásában és a krónikus fájdalom patológiájában.⁷⁷ A Fzd1 upregulációja, amely az asztrocita közvetítette kommunikációval kapcsolatos, szintén szerepet játszhat a fájdalomban,^{78,79} volt megfigyelhető mindkét koncentrációjú kezelés után 24 órával. Detektáltuk a fibroblast growth factor 9 (Fgf9) downregulációját, mely HK-1-hiányos egerekben is megfigyelhető volt.⁸⁰ A fibroblaszt növekedési faktorok (Fibroblast growth factors (Fgfs)) a neuron-glia interakcióban és glia

proliferáció által járulnak a neuroinflammációs folyamatokhoz.⁸¹ Az egyik fehérje, az integrin subunit alpha 7 (Itga7), amely a glia proliferációban fontos szerepet játszik,⁸² egér modelben is downregulálódott⁸⁰ hasonlóan a mi eredményünkhöz, illetve a glia sejteken expresszáldó Itgav szintén downregulálódott.⁸³ Stevens és mtsai a Kcnj9 és F2rl2 (PAR3) upregulációja a DRG-ben neuropátiás fájdalom során figyelték meg, ami hasonló az általunk talált F2r és PAR1 eredményekhez.⁸⁴

A Tacr gének expressziója a detektálhatóság határán volt, ami összhangban áll Linnarson és mtsai korábbi humán elsődleges szenzoros neuronokkal végzett kutatások eredményeivel⁸⁵ DRG-n (<http://linnarssonlab.org/drg/>), amely további kérdéseket vet fel a lehetséges célpontokra nézve.

3) A CFA indukálta orofaciális gyulladás metabolomikai és transzkriptomikai vizsgálata Wistar patkányban

CFA allodiniát indukál az injektálást követő 3 nappal

A CFA kezelés jelentősen csökkentette a mechanonociceptív küszöbértékeket a sóoldattal kezelt kontroll patkányokhoz képest a 3. napon. A bajuszpárna területén nem észleltek változásokat az ellentétes/sóoldatos küszöbértékekben, ahogy azt korábban is megfigyelték.^{47,80}

A nem célzott analízis kiemelte a plazma lipid változásokat a CFA-indukált orofaciális gyulladásban

A nem célzott mérés eredményeinek többváltozós statisztikai elemzése jó átfedést mutatott a MUB és UP két laboratóriumának eredményei között. Az LPC 16:0, LPC 18:1, LPC 18:0, PC 32:2, PC 34:4, PC 35:4, PC 36:6, PC 36:4, PC 36:5, PC 38:6, PC 38:5, PC 40:6 koncentrációi jelentősen csökkentek mindkét ion módban.

CFA-indukált orofaciális gyulladás nemcsak a lipidprofilt, hanem az aminosav- és monoamin-profilt is megváltoztatta a plazmában

Az LPC 17:0, LPC 18:2, LPC 20:3 a célzott mérésben, valamint a nem célzott mérésekben különböztek a két csoportban. A nemparametrikus Kruskal-Wallis teszt szerint a következő metabolitok esetében a p értékek $p < 0,1$ voltak: alanin, aszparagin, hisztidin, izoleucin, leucin, fenilalanin, prolin, triptofán, aszimmetrikus dimetil-arginin, indoleecetsav, Cer d18:1/24:0, Cer d18:1/25:0, PC 26:0, PC 32:2, PC 32:3, PC 34:3, PC 34:4, PC 36:1, PC 36:3, PC 36:4, PC 36:5, PC 36:6, PC 38:0, PC 38:3, PC 38:4, PC 38:5, PC 38:6, PC 40:1, PC O-38:0, PC O-38:4, PC O-

40:1, PC O-40:2, PC O-40:4, PC O-40:5, PC O-40:6, PC O-42:0, PC O-42:1, PC O-42:2, PC O-42:3, SM 41:2, TG 16:0_34:4, TG 18:0_36:5, TG 18:3_32:0.

A patkány TG-ben szignifikánsan változott gének

Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (Lhcgr), gonadotropin-releasing hormone receptor (GNRHR), AABR07072807.1, sorting nexin 31 (SNX31), vanin 1 (VNN1), AABR07044301.1, muscleblind-like splicing regulator 3 (Mbnl3), BPI fold containing family A, member 6 (Bpifa6), AABR07024757.1, AABR07063724.1 and FOS like 2, AP-1 transcription factor subunit (FOSL2) downregulálódtak, míg AABR07062758.1, AABR07026233.1, fibronectin type III and SPRY domain containing 2 (FSD2), solute carrier family 27 member 6 (Slc27a6), C-X-C motif chemokine receptor 3 (Cxcr3), AABR07022072.2, AABR07054361.1, similar to predicted gene ICRFP703B1614Q5.5 LOC499240, microRNA 770 (Mir770), similar to protocadherin gamma B1, AABR07031734.13, myomesin 3 (Myom3), peroxisomal biogenesis factor 11 gamma (Pex11g), insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit (Igfals) upregulálódtak.

A metabolitok és TG gének útvonal elemzése IPA szoftverrel

A megváltozott útvonalak az alábbiak voltak: Triptofán katabolizmus, Alanin bioszintézis III, Vízben oldódó vitaminok és koenzimek anyagcséréje, A/1 osztályú (Rhodopsin-szerű receptorok), Thio-molibdén kofaktor bioszintézis, Glicin bioszintézis III, Alanin anyagcsere, Alanin degradáció III, Alanin bioszintézis II, Molibdén kofaktor bioszintézis, Szklerózis multiplex patogenezise, Triptofán degradáció 2-amino-3-karboximukonát szemialdehiddé, Zsírsv aktiváció, NAD bioszintézis II (trptofánból), Mitokondriális vas-kén klaszter biogenezis, Fenilalanin és tirozinnal kapcsolatos anyagcsere, Glutamát és glutamin anyagcsere, Amin származék hormonok anyagcséréje, γ -linolénsav bioszintézis II (állatok), Mitokondriális L-karnitin transzport útvonal, Triptofán degradáció III (eukarióták), Glioxilát anyagcsere és glicin degradáció, Zsírsv β -oxidáció I, Nukleotid katabolizmus.

Disszkusszió

Az elemzésünk a triptofán katabolizmusát és az alanin és glicin III bioszintézisének megváltozását azonosította. Ez alátámasztja a korábbi eredményeket, amelyek csökkent aminosav-anyagcserét és bioszintézist (beleértve az alanint, fenilalanint, aszparaginsavat, glutamátot,

triptofánt, tirozinot, valint, leucin-t és izoleucint), valamint csökkent lipidszinteket (glicerolipidek, glicerofosfolipidek, szfingolipidek) mutattak ki patkányok vizeletében, amelyekben CFA-indukálta gyulladásos nocicepciót indukáltak.⁸⁶ A kinurenin útvonal metabolitjai proinflammatorikus, antiinflammatorikus, oxidatív, antioxidatív, neurotoxikus és neuroprotektív tulajdonságokkal rendelkeznek, és olyan enzimek, mint az indolamin-2,3-dioxygenáz, triptofán-2,3-dioxygenáz és mások jelentős szerepet játszanak az immun- és gyulladásos mechanizmusok befolyásolásában.⁸⁷ A migrénes betegek plazmájában csökkent kinurenin metabolit szintek (L-kinurenin, kinurénsav és mások) figyelhetők meg.⁸⁸ Figyelemre méltó, hogy míg a 5-hydroxy-indolecetsav szintje emelkedett a migrénes betegek plazmájában az iktális fázisok során,⁸⁸ CFA-val kezelt patkányokban alacsonyabb mennyiségű indol származékokat figyeltünk meg, ami arra utal, hogy ezek inkább az akut fejfájásos rohamokban játszanak szerepet, nem a krónikus állapotokban. A CFA kezelés lipid mediátorokban is változásokat eredményezett, mint például zsírsavak, dihidroceramid, koleszterin-észterek és lizofoszfokolinok. Ezek az eredmények összhangban vannak a CFA-val kezelt patkány DRG-ben megfigyelt változásokkal, ahol a glicerofosfolipid, retinol, linolsav és arachidonsav utak jelentős módosuláson mentek keresztül.⁸⁹ A glicerofosfolipid anyagcsere, beleértve az arachidonsavat és a többszörösen telítetlen zsírsavakat, kulcsfontosságú a proinflammatorikus jelátvitel szempontjából.⁹⁰ A többszörösen telítetlen zsírsavak oxidált lipideket képezhetnek, amelyek elősegítik a gyulladásos fájdalmat⁹¹ és mitokondriális diszfunkciót okozhatnak reaktív oxigéngyökök képződésén keresztül, amely kulcsfontosságú folyamat a migrénes betegeknél.⁹² Egy nagy kohort vizsgálatban a migrén összefüggésbe hozható a lipid anyagcsere megváltozásával, ahol az apolipoprotein A1, a HDL és a szabad koleszterin csökkent szintjét figyelték meg.⁹³ Továbbá, emelkedett nem alfa-hidroxiszfingozin ceramidok és csökkentett lizofoszfatidiletanolaminok voltak megfigyelhetők migrénes betegeknél,⁹⁴ ez összhangban van az OFF patkány modellünk eredményeivel. Ezzel ellentétben, magasabb szinteket figyeltek meg CE(20:4), CE(18:2) osteoarthritis fájdalom modellekben,⁹⁵ ami különböző mechanizmusokra utal degeneratív állapotokban. A triptofán, arginin és prolin anyagcserét, valamint az aminosav-észterezett t-RNS bioszintézist érintő utak ismertek a migrénnel való összefüggésben,⁹⁶ amelyeket megfigyeléseink is alátámasztanak. A migrénes betegek azonban jellemzően alacsony szérumszerotoninszintekkel rendelkeznek.⁹⁴ Különösen, karnozin, spermin és spermidin alacsonyabb szintjeit figyelték meg migrénes rohamok során.⁴⁹

4) Migrénes betegek metabolomikai mintázata és integrált elemzés a PBMC transzkriptomikával az IPA-ban

Különböző statisztikai tesztek eltérő szignifikáns metabolitokat eredményeztek

A PCA klaszterezést követően egyváltozós statisztikai elemzés történt egyutas ANOVA (FDR korrekcióval) alkalmazásával, poszthoc Tukey HSD teszttel. A következő marginálisan szignifikáns metabolitokat találtuk csoportok összehasonlításával: PC aa C34:1, PC aa C38:3, SM C26:1, PC aa C32:0, PC aa C36:3, PC aa C42:4, SM C24:1, arachidonsav (AA), DiCA(14:0). Az interiktális és egészséges csoportok közötti különbségek vizsgálatához t-tesztet alkalmaztunk, ahol a következő metabolitok szintjében voltak elérések: PC aa C32:0, PC aa C34:1, PC aa C36:3, PC aa C38:3, SM C26:1, PC aa C38:5, PC aa C40:6, PC aa C34:3, PC aa C38:6, SM C24:0, Hex3Cer(d18:1/16:0), DiCA(14:0), PC aa C42:4, PC ae C40:2, SM C24:1, AA, PC aa C36:4, PC aa C42:6, HexCer(d18:1/16:0). Ezt az eredményt a randomizált statisztikai t-teszt is megerősítette. Az interiktális és iktális betegek közötti jelentős különbséget nem figyeltünk meg, amit valószínűleg az iktális fázisban lévő nagyon alacsony mintaszám okozott.

Útvonalelemzés a szignifikáns metabolitok és korábbi PBMC transzkriptomikai eredmények alapján

Korábbi PBMC transzkriptomikai eredményeket ⁴⁹ használtunk fel további IPA analízisre a t-teszt által meghatározott marginálisan szignifikáns metabolitokkal együtt. A főbb kanonikus útvonalak az interiktális és egészséges csoportok között az alábbiak voltak: Interleukin-10 jelátvitel, NGF-indukált transzkripció. Ezek mellett a A/1 osztály (Rhodopsin-szerű)receptorok, S100 család jelátviteli útvonal, IL-17 jelátvitel upregulálódtak, míg a Granulocita adhézió és diapedézis nem változott. Az IL-10 jelátvitel, FXR/RXR aktiváció, LXR/RXR aktiváció és PPAR jelátviteli útvonalak csökkenő tendenciát mutattak.

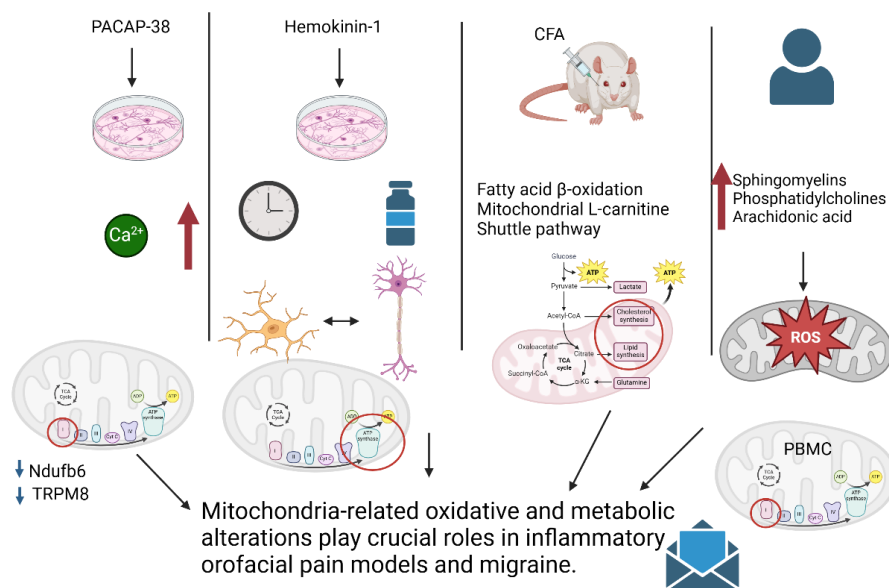
Diszkusszió

A csoportok közötti marginálisan szignifikáns metabolitokat t-próbával azonosítottuk, majd ANOVA FDR korrekcióval és Tukey post-hoc HSD teszttel, valamint randomizált tesztekkel elemeztük az interiktális és egészséges csoportok között. Ezek a metabolitok potenciálisan fontos szerepet játszanak a vizsgált állapotok megkülönböztetésében. Az általunk használt, összes statisztikai teszt esetén a marginálisan szignifikánsnak azonosított metabolitok a következők voltak: PC aa C32:0, PC aa C34:1, PC aa C36:3, PC aa C38:3, PC aa C42:4, SM C24:1, SM C26:1 az interiktális és egészséges csoportok között, ami összhangban van az SM18:0 és SM18:1 szfingomielin típusokkal, amelyek a migrén kockázatának növekedésével társulnak. ⁹⁷ A zsírsavak és lipid metabolitok, különösen a PC és SM, gyakran szerepet játszanak a jelátviteli és gyulladásos

válaszokban. Az olyan metabolitok, mint az AA (arachidonsav) és SM C24:1 jelentősége arra utalhat, hogy megváltozott lipid anyagcsere vagy jelátviteli utak állhatnak a migrénes állapot patológiai folyamatainak hátterében. Ez összhangban áll a korábbi megállapítással, miszerint az AA magasabb szintet mutatott a klaszteres típusú fejfájásos betegek szérumában^{98,99}, és az AA-ból származó reaktív oxigéngyökök termelése, amely mitokondriális diszfunkcióhoz vezet.¹⁰⁰

Az integratív elemzés főként pozitívan szabályozott kanonikus útvonalai az IPA-ban az interiktális és az egészséges csoport között a következők voltak: IL-10 jelátviteli út, NGF által serkentett transzkripció, A/1 osztályú (rodopszin-szerű) receptorok, S100 család jelátviteli út, IL-17 jelátvitel, míg a granulocita adhézió és diapédezis nem változott. Azonban az IL-10 jelátvitel, FXR/RXR aktiváció, LXR/RXR aktiváció és PPAR jelátviteli utak lecsökkentek. Ezek a változások neuroinflammációs folyamatokat, energiatermelést és egyéb metabolikus változásokat ölelnek fel. A szaglási transzdukció és a mitokondriális diszfunkció kiemelésre kerültek, amely összhangban van más kutatások eredményeivel⁴⁹ valamint azzal a ténnyel is, hogy bizonyos illatok vagy az ízek az egyik leggyakoribb migrént kiváltó tényezők.¹⁰¹

A tézis új eredményeinek összefoglalása



Az új eredmények sematikus ábrázolása. <https://BioRender.com>

- A PACAP-38 növeli az intracelluláris Ca^{2+} szintet és elindítja a kapcsolódó jelátviteli eseményeket, amelyek valószínűleg függetlenek a PAC1 és VPAC1/2 aktivációtól. A transzkriptomikai változások főként mitokondriális diszfunkcióra utaltak, mely folyamat része a Ndufb6 és TRPM8 csökkent kifejeződése.
- A HK-1 koncentráció- és időpontfüggő hatásokat gyakorol a trigeminális primer neuronokra, amely mitokondriális ATP szintézis-, oxidoreduktáz aktivitás változásában nyilvánul meg. A megváltozott T-sejt-mediált immunitás pozitív szabályozás, neutrofil kemotaxis és leukocita adhézioja a vaskos endotél sejtekhez potenciális immunmoduláló és glia-, Schwann-sejtek- és makrofágokkal kapcsolatos hatásokat jeleznek, amelyek a HK-1 szerepére utalnak a glia-neuron kommunikációban.
- Az inflammációs orofaciális patkánymodellben csökkent aminosav és lipid anyagcsere figyelhető meg., mely a fájdalom mértékével párhuzamosan változott, ami valószínűsíthetően a megváltozott mitokondriális folyamatokkal lehet összefüggésben.
- Migrénes betegek interictális plazmamintákban a PCs, SMs, arachidonsav enyhén szignifikánsan emelkedett. Az iktális fázisban nem tudtunk szignifikáns metabolomikai változásokat kimutatni, amely valószínűleg az alacsony mintaméret miatt történt.

Irodalomjegyzék

1. Ananthan S, Benoliel R. Chronic orofacial pain. *J Neural Transm.* 2020;127(4):575-588. doi:10.1007/s00702-020-02157-3
2. Bernstein C, Burstein R. Sensitization of the Trigemino-vascular Pathway: Perspective and Implications to Migraine Pathophysiology. *Journal of Clinical Neurology.* 2012;8(2):89. doi:10.3988/jcn.2012.8.2.89
3. Durham PL, Garrett FG. Development of functional units within trigeminal ganglia correlates with increased expression of proteins involved in neuron–glia interactions. *Neuron Glia Biol.* 2010;6(3):171-181. doi:10.1017/S1740925X10000232
4. Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, Conti P, Kalogeromitros D. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunol Rev.* 2007;217(1):65-78. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00519.x
5. Guan LC, Dong X, Green DP. Roles of mast cells and their interactions with the trigeminal nerve in migraine headache. *Mol Pain.* 2023;19:174480692311813. doi:10.1177/17448069231181358
6. Elich Ali Komi D, Wöhrl S, Bielory L. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020;58(3):342-365. doi:10.1007/s12016-019-08769-2
7. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol.* 2016;6. doi:10.3389/fimmu.2015.00620
8. Sarchielli P, Alberti A, Baldi A, et al. Proinflammatory Cytokines, Adhesion Molecules, and Lymphocyte Integrin Expression in the Internal Jugular Blood of Migraine Patients Without Aura Assessed Ictally. *Headache: The Journal of Head and Face Pain.* 2006;46(2):200-207. doi:10.1111/j.1526-4610.2006.00337.x
9. HEATLEY R V., DENBURG JA, BAYER N, BIENENSTOCK J. Increased plasma histamine levels in migraine patients. *Clinical & Experimental Allergy.* 1982;12(2):145-149. doi:10.1111/j.1365-2222.1982.tb01633.x
10. Harmar AJ, Fahrenkrug J, Gozes I, et al. Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR Review 1. *Br J Pharmacol.* 2012;166(1):4-17. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01871.x
11. Pedersen SH, la Cour SH, Calloe K, et al. PACAP-38 and PACAP(6–38) Degranulate Rat Meningeal Mast Cells via the Orphan MrgB3-Receptor. *Front Cell Neurosci.* 2019;13. doi:10.3389/fncel.2019.00114
12. Németh J, Reglődi D, Pozsgai G, et al. Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neuroscience.* 2006;143(1):223-230. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.07.028
13. Sághy É, Payrits M, Helyes Zs, et al. Stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 6-38, M65 and vasoactive intestinal polypeptide 6-28 on trigeminal sensory neurons. *Neuroscience.* 2015;308:144-156. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.08.043
14. Birk S, Sitarz JT, Petersen KA, et al. The effect of intravenous PACAP38 on cerebral hemodynamics in healthy volunteers. *Regul Pept.* 2007;140(3):185-191. doi:10.1016/j.regpep.2006.12.010
15. Fernandes ES, Schmidhuber SM, Brain SD. Sensory-nerve-derived neuropeptides: possible therapeutic targets. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(194):393-416. doi:10.1007/978-3-540-79090-7_11
16. Seybold VS. The Role of Peptides in Central Sensitization. In: ; 2009:451-491. doi:10.1007/978-3-540-79090-7_13
17. Garcia-Recio S, Gascón P. Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1-14. doi:10.1155/2015/495704
18. Brain SD, Cox HM. Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. *Br J Pharmacol.* 2006;147(S1). doi:10.1038/sj.bjp.0706461
19. Metwali A, Blum AM, Elliott DE, Setiawan T, Weinstock J V. Cutting Edge: Hemokinin Has Substance P-Like Function and Expression in Inflammation. *The Journal of Immunology.* 2004;172(11):6528-6532. doi:10.4049/jimmunol.172.11.6528
20. Nelson DA, Marriott I, Bost KL. Expression of hemokinin 1 mRNA by murine dendritic cells. *J Neuroimmunol.* 2004;155(1-2):94-102. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.06.005

21. Duffy RA, Hedrick JA, Randolph G, et al. Centrally administered hemokinin-1 (HK-1), a neurokinin NK1 receptor agonist, produces substance P-like behavioral effects in mice and gerbils. *Neuropharmacology*. 2003;45(2):242-250. doi:10.1016/S0028-3908(03)00150-3
22. Zhang Y, Lu L, Furlonger C, Wu GE, Paige CJ. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat Immunol*. 2000;1(5):392-397. doi:10.1038/80826
23. Wang LX, Wang ZJ. Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55(8):949-965. doi:10.1016/S0169-409X(03)00098-X
24. Chrysostomidou L, Cooper AH, Weir GA. Cellular models of pain: New technologies and their potential to progress preclinical research. *Neurobiology of Pain*. 2021;10:100063. doi:10.1016/j.ynpai.2021.100063
25. Romero-Reyes M, Akerman S. Update on Animal Models of Migraine. *Curr Pain Headache Rep*. 2014;18(11):462. doi:10.1007/s11916-014-0462-z
26. Harriott AM, Strother LC, Vila-Pueyo M, Holland PR. Animal models of migraine and experimental techniques used to examine trigeminal sensory processing. *J Headache Pain*. 2019;20(1):91. doi:10.1186/s10194-019-1043-7
27. Greco R, Demartini C, De Icco R, Martinelli D, Putorti A, Tassorelli C. Migraine neuroscience: from experimental models to target therapy. *Neurological Sciences*. 2020;41(S2):351-361. doi:10.1007/s10072-020-04808-5
28. Martinez-Garcia M, Miguelanez-Medran B, Goicoechea C. Animal models in the study and treatment of orofacial pain. *J Clin Exp Dent*. Published online 2019:0-0. doi:10.4317/jced.55429
29. Takeda M, Tanimoto T, Kadoi J, et al. Enhanced excitability of nociceptive trigeminal ganglion neurons by satellite glial cytokine following peripheral inflammation. *Pain*. 2007;129(1):155-166. doi:10.1016/j.pain.2006.10.007
30. Krzyzanowska A, Avendaño C. Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and inflammatory pain. *Brain Behav*. 2012;2(5):678-697. doi:10.1002/brb3.85
31. Gregory NS, Harris AL, Robinson CR, Dougherty PM, Fuchs PN, Sluka KA. An Overview of Animal Models of Pain: Disease Models and Outcome Measures. *J Pain*. 2013;14(11):1255-1269. doi:10.1016/j.jpain.2013.06.008
32. Ren K, Dubner R. Inflammatory Models of Pain and Hyperalgesia. *ILAR J*. 1999;40:111-118.
33. Perrino C, Barabási AL, Condorelli G, et al. Epigenomic and transcriptomic approaches in the post-genomic era: path to novel targets for diagnosis and therapy of the ischaemic heart? Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart. *Cardiovasc Res*. 2017;113(7):725-736. doi:10.1093/cvr/cvx070
34. Tarazona S, Arzalluz-Luque A, Conesa A. Undisclosed, unmet and neglected challenges in multi-omics studies. *Nat Comput Sci*. 2021;1(6):395-402. doi:10.1038/s43588-021-00086-z
35. Horgusluoglu E, Neff R, Song W, et al. Integrative metabolomics-genomics approach reveals key metabolic pathways and regulators of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2022;18(6):1260-1278. doi:10.1002/alz.12468
36. Wang X, Li Z, Li X, et al. Integrated metabolomics and transcriptomics reveal the neuroprotective effect of nervonic acid on LPS-induced AD model mice. *Biochem Pharmacol*. 2023;209:115411. doi:10.1016/j.bcp.2023.115411
37. Xi C, He L, Huang Z, et al. Combined metabolomics and transcriptomics analysis of rats under neuropathic pain and pain-related depression. *Front Pharmacol*. 2023;14. doi:10.3389/fphar.2023.1320419
38. Doty M, Yun S, Wang Y, et al. Integrative multiomic analyses of dorsal root ganglia in diabetic neuropathic pain using proteomics, phospho-proteomics, and metabolomics. *Sci Rep*. 2022;12(1):17012. doi:10.1038/s41598-022-21394-y
39. Maan K, Baghel R, Dhariwal S, Sharma A, Bakhshi R, Rana P. Metabolomics and transcriptomics based multi-omics integration reveals radiation-induced altered pathway networking and underlying mechanism. *NPJ Syst Biol Appl*. 2023;9(1):42. doi:10.1038/s41540-023-00305-5
40. Mosallaei M, Ehtesham N, Rahimirad S, Saghi M, Vatandoost N, Khosravi S. PBMCs: a new source of diagnostic and prognostic biomarkers. *Arch Physiol Biochem*. 2022;128(4):1081-1087. doi:10.1080/13813455.2020.1752257
41. Sullivan PF, Fan C, Perou CM. Evaluating the comparability of gene expression in blood and brain. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2006;141B(3):261-268. doi:10.1002/ajmg.b.30272
42. Rollins B, Martin M V., Morgan L, Vawter MP. Analysis of whole genome biomarker expression in blood and brain. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2010;153B(4):919-936. doi:10.1002/ajmg.b.31062

43. Borbély É, Hunyady Á, Pohóczky K, et al. Hemokinin-1 as a Mediator of Arthritis-Related Pain via Direct Activation of Primary Sensory Neurons. *Front Pharmacol.* 2021;11. doi:10.3389/fphar.2020.594479
44. Takács-Lovász K, Kun J, Aczél T, et al. PACAP-38 Induces Transcriptomic Changes in Rat Trigeminal Ganglion Cells Related to Neuroinflammation and Altered Mitochondrial Function Presumably via PAC1/VPAC2 Receptor-Independent Mechanism. *Int J Mol Sci.* 2022;23(4):2120. doi:10.3390/ijms23042120
45. Takács-Lovász K, Aczél T, Borbély É, et al. 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;16. doi:10.3389/fnmol.2023.1186279
46. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods.* 2001;25:402-408.
47. Aczél T, Kun J, Szőke É, et al. Transcriptional Alterations in the Trigeminal Ganglia, Nucleus and Peripheral Blood Mononuclear Cells in a Rat Orofacial Pain Model. *Front Mol Neurosci.* 2018;11. doi:10.3389/fnmol.2018.00219
48. International Headache Society. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia.* 2018;38(1):1-211. doi:10.1177/0333102417738202
49. Aczél T, Körtési T, Kun J, et al. Identification of disease- and headache-specific mediators and pathways in migraine using blood transcriptomic and metabolomic analysis. *J Headache Pain.* 2021;22(1):117. doi:10.1186/s10194-021-01285-9
50. Juhász T, Matta C, Katona É, et al. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Signalling Exerts Chondrogenesis Promoting and Protecting Effects: Implication of Calcineurin as a Downstream Target. *PLoS One.* 2014;9(3):e91541. doi:10.1371/journal.pone.0091541
51. Fuentes E, Araya-Maturana R, Urrea FA. Regulation of mitochondrial function as a promising target in platelet activation-related diseases. *Free Radic Biol Med.* 2019;136:172-182. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.007
52. Gross EC, Lisicki M, Fischer D, Sándor PS, Schoenen J. The metabolic face of migraine — from pathophysiology to treatment. *Nat Rev Neurol.* 2019;15(11):627-643. doi:10.1038/s41582-019-0255-4
53. Salvemini D, Little JW, Doyle T, Neumann WL. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(5):951-966. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.026
54. Hadley SH, Bahia PK, Taylor-Clark TE. Sensory Nerve Terminal Mitochondrial Dysfunction Induces Hyperexcitability in Airway Nociceptors via Protein Kinase C. *Mol Pharmacol.* 2014;85(6):839-848. doi:10.1124/mol.113.091272
55. Nesushvili L, Hadley SH, Bahia PK, Taylor-Clark TE. Sensory Nerve Terminal Mitochondrial Dysfunction Activates Airway Sensory Nerves via Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Mol Pharmacol.* 2013;83(5):1007-1019. doi:10.1124/mol.112.084319
56. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, et al. A TRP Channel That Senses Cold Stimuli and Menthol Reside within the Dorsal Root Ganglia (DRG). There, the The DRG Neurons Extend Long Axons to Peripheral Tar-Gets Such as Skin and Visceral Organs Where They Detect. Vol 108.; 2002.
57. McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature.* 2002;416(6876):52-58. doi:10.1038/nature719
58. Sarria I, Gu J. Menthol Response and Adaptation in Nociceptive-Like and Nonnociceptive-Like Neurons: Role of Protein Kinases. *Mol Pain.* 2010;6:1744-8069-6-47. doi:10.1186/1744-8069-6-47
59. Abe J, Hosokawa H, Okazawa M, et al. TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae. *Molecular Brain Research.* 2005;136(1-2):91-98. doi:10.1016/j.molbrainres.2005.01.013
60. Okazawa M, Inoue W, Hori A, Hosokawa H, Matsumura K, Kobayashi S. Noxious heat receptors present in cold-sensory cells in rats. *Neurosci Lett.* 2004;359(1-2):33-36. doi:10.1016/j.neulet.2004.01.074
61. Knowlton WM, Bifolck-Fisher A, Bautista DM, McKemy DD. TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain.* 2010;150(2):340-350. doi:10.1016/j.pain.2010.05.021
62. Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPM8 Is Required for Cold Sensation in Mice. *Neuron.* 2007;54(3):371-378. doi:10.1016/j.neuron.2007.02.024

63. Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, et al. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*. 2007;448(7150):204-208. doi:10.1038/nature05910
64. Colburn RW, Lubin M Lou, Stone DJ, et al. Attenuated Cold Sensitivity in TRPM8 Null Mice. *Neuron*. 2007;54(3):379-386. doi:10.1016/j.neuron.2007.04.017
65. Gormley P, Anttila V, Winsvold BS, et al. Meta-analysis of 375,000 individuals identifies 38 susceptibility loci for migraine. *Nat Genet*. 2016;48(8):856-866. doi:10.1038/ng.3598
66. Freilinger T, Anttila V, de Vries B, et al. Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nat Genet*. 2012;44(7):777-782. doi:10.1038/ng.2307
67. Chasman DI, Schürks M, Anttila V, et al. Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat Genet*. 2011;43(7):695-698. doi:10.1038/ng.856
68. Borhani Haghighi A, Motazedian S, Rezaii R, et al. Cutaneous application of menthol 10% solution as an abortive treatment of migraine without aura: a randomised, double-blind, placebo-controlled, crossed-over study. *Int J Clin Pract*. 2010;64(4):451-456. doi:10.1111/j.1742-1241.2009.02215.x
69. Theoharides TC, Tsilioni I, Bawazeer M. Mast Cells, Neuroinflammation and Pain in Fibromyalgia Syndrome. *Front Cell Neurosci*. 2019;13. doi:10.3389/fncel.2019.00353
70. Sakai A, Takasu K, Sawada M, Suzuki H. Hemokinin-1 Gene Expression Is Upregulated in Microglia Activated by Lipopolysaccharide through NF- κ B and p38 MAPK Signaling Pathways. *PLoS One*. 2012;7(2):e32268. doi:10.1371/journal.pone.0032268
71. Colvin RA, Campanella GSV, Sun J, Luster AD. Intracellular Domains of CXCR3 That Mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 Function. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(29):30219-30227. doi:10.1074/jbc.M403595200
72. Piotrowska A, Rojewska E, Pawlik K, et al. Pharmacological blockade of CXCR3 by ($\pm$)-NBI-74330 reduces neuropathic pain and enhances opioid effectiveness - Evidence from in vivo and in vitro studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2018;1864(10):3418-3437. doi:10.1016/j.bbadis.2018.07.032
73. Ransohoff RM. Chemokines and Chemokine Receptors: Standing at the Crossroads of Immunobiology and Neurobiology. *Immunity*. 2009;31(5):711-721. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.010
74. Wójtowicz T, Brzdęk P, Mozrzymas JW. Diverse impact of acute and long-term extracellular proteolytic activity on plasticity of neuronal excitability. *Front Cell Neurosci*. 2015;9. doi:10.3389/fncel.2015.00313
75. Lee CJ, Mannaioni G, Yuan H, Woo DH, Gingrich MB, Traynelis SF. Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. *J Physiol*. 2007;581(3):1057-1081. doi:10.1113/jphysiol.2007.130377
76. Buser AM, Schmid D, Kern F, Erne B, Lazzati T, Schaeren-Wiemers N. The myelin protein MAL affects peripheral nerve myelination: a new player influencing p75 neurotrophin receptor expression. *European Journal of Neuroscience*. 2009;29(12):2276-2290. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06785.x
77. Namadurai S, Yereddi NR, Cusdin FS, Huang CLH, Chirgadze DY, Jackson AP. A new look at sodium channel β subunits. *Open Biol*. 2015;5(1):140192. doi:10.1098/rsob.140192
78. L'Episcopo F, Serapide MF, Tirolo C, et al. A Wnt1 regulated Frizzled-1/ β -Catenin signaling pathway as a candidate regulatory circuit controlling mesencephalic dopaminergic neuron-astrocyte crosstalk: Therapeutical relevance for neuron survival and neuroprotection. *Mol Neurodegener*. 2011;6(1):49. doi:10.1186/1750-1326-6-49
79. L'Episcopo F, Tirolo C, Serapide MF, et al. Microglia Polarization, Gene-Environment Interactions and Wnt/ β -Catenin Signaling: Emerging Roles of Glia-Neuron and Glia-Stem/Neuroprogenitor Crosstalk for Dopaminergic Neurorestoration in Aged Parkinsonian Brain. *Front Aging Neurosci*. 2018;10. doi:10.3389/fnagi.2018.00012
80. Aczél T, Kecskés A, Kun J, et al. Hemokinin-1 Gene Expression Is Upregulated in Trigeminal Ganglia in an Inflammatory Orofacial Pain Model: Potential Role in Peripheral Sensitization. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8):2938. doi:10.3390/ijms21082938
81. Stork T, Sheehan A, Tasdemir-Yilmaz OE, Freeman MR. Neuron-Glia Interactions through the Heartless FGF Receptor Signaling Pathway Mediate Morphogenesis of Drosophila Astrocytes. *Neuron*. 2014;83(2):388-403. doi:10.1016/j.neuron.2014.06.026
82. Tan Z, Zhang Z, Yu K, et al. Integrin subunit alpha V is a potent prognostic biomarker associated with immune infiltration in lower-grade glioma. *Front Neurol*. 2022;13. doi:10.3389/fneur.2022.964590

83. Mapps AA, Thomsen MB, Boehm E, Zhao H, Hattar S, Kuruvilla R. Diversity of satellite glia in sympathetic and sensory ganglia. *Cell Rep.* 2022;38(5):110328. doi:10.1016/j.celrep.2022.110328
84. Stevens AM, Saleem M, Deal B, Janjic J, Pollock JA. Targeted cyclooxygenase-2 inhibiting nanomedicine results in pain-relief and differential expression of the RNA transcriptome in the dorsal root ganglia of injured male rats. *Mol Pain.* 2020;16:174480692094330. doi:10.1177/1744806920943309
85. LaPaglia DM, Sapio MR, Burbelo PD, et al. RNA-Seq investigations of human post-mortem trigeminal ganglia. *Cephalalgia.* 2018;38(5):912-932. doi:10.1177/0333102417720216
86. Liu Y, Chen H, Lu J, et al. Urinary metabolomics of complete Freund's adjuvant-induced hyperalgesia in rats. *Biomedical Chromatography.* 2017;31(6). doi:10.1002/bmc.3886
87. Török N, Tanaka M, Vécsei L. Searching for Peripheral Biomarkers in Neurodegenerative Diseases: The Tryptophan-Kynurenine Metabolic Pathway. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9338. doi:10.3390/ijms21249338
88. Tuka B, Nyári A, Cseh EK, et al. Clinical relevance of depressed kynurenine pathway in episodic migraine patients: potential prognostic markers in the peripheral plasma during the interictal period. *J Headache Pain.* 2021;22(1):60. doi:10.1186/s10194-021-01239-1
89. Li X, Wang X, Li Z, et al. A Metabolomic Study of the Analgesic Effect of Lappaconitine Hydrobromide (LAH) on Inflammatory Pain. *Metabolites.* 2022;12(10):923. doi:10.3390/metabo12100923
90. Osthues T, Sisignano M. Oxidized Lipids in Persistent Pain States. *Front Pharmacol.* 2019;10. doi:10.3389/fphar.2019.01147
91. Bochkov VN, Oskolkova O V., Birukov KG, Levonen AL, Binder CJ, Stöckl J. Generation and Biological Activities of Oxidized Phospholipids. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12(8):1009-1059. doi:10.1089/ars.2009.2597
92. Gross EC, Lisicki M, Fischer D, Sándor PS, Schoenen J. The metabolic face of migraine — from pathophysiology to treatment. *Nat Rev Neurol.* 2019;15(11):627-643. doi:10.1038/s41582-019-0255-4
93. Onderwater GLJ, Ligthart L, Bot M, et al. Large-scale plasma metabolome analysis reveals alterations in HDL metabolism in migraine. *Neurology.* 2019;92(16). doi:10.1212/WNL.0000000000007313
94. Ren C, Liu J, Zhou J, et al. Lipidomic analysis of serum samples from migraine patients. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):22. doi:10.1186/s12944-018-0665-0
95. Pousinis P, Gowler PRW, Burston JJ, Ortori CA, Chapman V, Barrett DA. Lipidomic identification of plasma lipids associated with pain behaviour and pathology in a mouse model of osteoarthritis. *Metabolomics.* 2020;16(3):32. doi:10.1007/s11306-020-01652-8
96. Ren C, Liu J, Zhou J, et al. Low levels of serum serotonin and amino acids identified in migraine patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;496(2):267-273. doi:10.1016/j.bbrc.2017.11.203
97. Peterlin BL, Mielke MM, Dickens AM, et al. Interictal, circulating sphingolipids in women with episodic migraine. *Neurology.* 2015;85(14):1214-1223. doi:10.1212/WNL.0000000000002004
98. Frago Y, Seim A, Stovner L, Mack M, Bjerve K, Sjaastad O. Cluster Headache: Increased Incorporation of (1-14C)Arachidonic Acid into Phosphatidylserine in Polymorphonuclear Cells. *Cephalalgia.* 1989;9(3):213-220. doi:10.1046/j.1468-2982.1989.0903213.x
99. Frago YD, Seim A, Stovner LJ, Mack M, Bjerve KS, Sjaastad O. Arachidonic Acid Metabolism in Polymorphonuclear Cells in Headaches: A Methodologic Study. *Cephalalgia.* 1988;8(3):149-155. doi:10.1046/j.1468-2982.1988.0803149.x
100. Kursun O, Yemisci M, van den Maagdenberg AMJM, Karatas H. Migraine and neuroinflammation: the inflammasome perspective. *J Headache Pain.* 2021;22(1):55. doi:10.1186/s10194-021-01271-1
101. Kelman L. The Triggers or Precipitants of the Acute Migraine Attack. *Cephalalgia.* 2007;27(5):394-402. doi:10.1111/j.1468-2982.2007.01303.x

List of Publications

Takács-Lovász K, Kun J, Aczél T, Urbán P, Gyenesei A, Bölcskei K, Szőke É, Helyes Z. PACAP-38 Induces Transcriptomic Changes in Rat Trigeminal Ganglion Cells Related to Neuroinflammation and Altered Mitochondrial Function Presumably via PAC1/VPAC2 Receptor-Independent Mechanism. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 14;23(4):2120. doi: 10.3390/ijms23042120. PMID: 35216232; PMCID: PMC8874739.

IF: 5,6 Quartile: Q1, D1

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.

IF:3,5 Quartile: Q2 (Q1 at the time of submission)

Takács-Lovász K, Aczél T, Mohos V, Harmath M, Pirkuliyeva J, Karvaly G, Farkas R, Ciborowski M, Godzien J, Bölcskei K, Kun J. and Zsuzsanna Helyes. Altered aminoacid and lipid metabolism in a rat orofacial inflammation model determined by omics approach: potential role in trigeminal sensitisation. *The Journal of Headache and Pain* – közlésre elfogadva 01.04.2025.

IF: 7,3 Quartile: Q1

Cumulative IF: 16,4

Egyéb publikáció

Zalai D, Hevér H, **Lovász K**, Molnár D, Wechselberger P, Hofer A, Párta L, Putics Á, Herwig C. A control strategy to investigate the relationship between specific productivity and high-mannose glycoforms in CHO cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016 Aug;100(16):7011-24. doi: 10.1007/s00253-016-7380-4. Epub 2016 Feb 24. PMID: 26910040; PMCID: PMC4947490.

IF:3,7 Quartile: Q1

Cumulative IF: 20,1

Hivatkozások száma (MTMT): 24

Értekezéshez kapcsolódó prezentációk:

Év	Konferencia	Poszter/előadás	Cím
2021	MEDPECS2021 Medical Conference for PhD students	Poszter	Transcriptomic changes in trigeminal ganglion cells induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-38 or PACAP6-38 treatment
2022	ICBEI2022 International Conference of Biomedical Engineering and Innovation	Poszter	Hemokinin-1-induced transcriptomic alterations in rat trigeminal ganglion primary sensory neurons related to pain signalling
2023	FAMÉ Hungarian Society of Experimental and Clinical Pharmacology	Poszter	Altered aminoacid, monoamine and glycerophospholipid metabolite profile in the rat plasma in an orofacial inflammatory pain model

	International bi-yearly conference		
2023	MOFT Magyarországi Fájdalomtársaság 2023- as évi kongresszusa	Poszter	Megváltozott aminosav-, monoamin- és glicerofosfolipid-metabolit-profil a patkányplazmában egy orofaciális gyulladásos fájdalommodellben
2024	INC2024 International Neuroscience Conference	Poszter	Altered purine, fatty acid and ester, amino acid and hormone profiles in migraineurs during the ictal and interictal periods
2024	HUPHAR2024 Hungarian Society of Experimental and Clinical Pharmacology	Poszter	Altered aminoacid, downregulated glycerophospho- and sphingolipid, and upregulated fatty acid metabolite profile in a rat model of inflammatory orofacial pain
2024	4th Nordic Metabolomic Conference	Poszter	Metabolomic Changes and Combined Analysis with Differentially Expressed Trigeminal Genes in a Neuroinflammatory Animal Model
2024	MOFT Magyarországi Fájdalomtársaság 2024- as évi kongresszusa	Előadás	Plazma metabolomikai és trigeminus ganglion transzkriptomikai változásainak kombinált elemzése orofaciális gyulladásos fájdalom patkánymodelljében