

**A peptiderg Edinger-Westphal mag szerepe a migrén
neurobiológiájában és akut alkohol expozíció egérmodelljében**

Dr. Al-Omari Ammar

**Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet
Pécsi Tudományegyetem**

**Témavezető:
Dr. Gaszner Dr. Kormos Viktória**



Pécs, 2024

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI HÁTTÉR

1.1. Edinger-Westphal mag

A középagyban található Edinger-Westphal mag (EW) két különálló sejtcsoportból áll (Kozicz et al. 2011). Az egyik divízió a preganglionális (EWpg) terület, az okulomotor komplex része, kolinerg paraszimpatikus rostokat küld a ciliáris ganglion felé, szabályozva a pupilla motoros funkcióját (miosis) és a lencse akkomodációját. A másik sejtcsoport peptiderg, amelyet centrális projekciójú Edinger-Westphal magnak (EWcp) nevezünk, mivel számos agyi régióba küld kiterjedt projekciókat (Zuniga & Ryabinin 2020). Az EWcp-ben számos neuropeptid expresszálódik, beleértve az urocortin 1-et (UCN1), a kokain és amfetamin regulált transzkript peptidet (CART) és a kolecisztokinint (CCK). A peptiderg sejtek között néhány glutamaterg, kolin-acetiltransferáz (ChAT) immunreaktív és tirozin-hidroxiláz (TH) tartalmú neuront is azonosítottak (Kozicz et al. 2003; Zuniga & Ryabinin 2020; Li & Ryabinin 2022; Priest et al. 2023).

Az UCN1 a *corticotropin-releasing* hormon (CRH) család tagja, amely elsősorban az EWcp-ben expresszálódik (Vaughan et al. 2007). Az UCN1-nek nincs saját receptora, azonban mindkét CRH receptorhoz (CRH1R és CRH2R) képes kötődni, a CRH2R iránt nagyobb affinitást mutat, mint maga a CRH (Bale et al. 2002; And & Biol 2002; Kozicz et al. 2007; Im et al. 2015). Az UCN1 szerepet játszik a stresszválaszban, a jutalmazásban, az étvágy szabályozásában, a hőszabályozásban és a hangulat állapotának befolyásolásában (Fekete et al. 2007; Kormos & Gaszner 2013; Zuniga & Ryabinin 2020). A CART egy neuropeptid, amelyről ismert, hogy részt vesz az energiametabolizmusban (Kristensen et al. 1998; Elias et al. 2001; Lau et al. 2018), valamint a táplálkozás, a jutalmazás és az addiktív viselkedések szabályozásában (Vicentic & Jones 2007; Ong & McNally 2020; Zuniga & Ryabinin 2020). Érdekes módon az EWcp-ben az UCN1 immunreaktív neuronok teljesen mértékben kolokalizálnak a CART-tal (Zuniga & Ryabinin 2020). Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a tranziens receptor potenciál ankyrin 1 ioncsatorna (TRPA1) legnagyobb mennyiségben az EWcp/UCN1 pozitív neuronjaiban fejeződik ki egér központi idegrendszerben (Kormos et al. 2022). A TRPA1 egy nem szelektív kationcsatorna és aktivációja kalcium beáramlást eredményez. A megnövekedett intracelluláris kalcium szint számos jelátviteli utat elindíthat (Julius et al. 2013; Kádková et al. 2017; Talavera et al. 2020). A TRPA1 elsősorban a perifériás idegrendszerben expresszálódik, és fontos szerepet játszik számos élettani és kórélettani folyamatban, beleértve a nocicepciót és a gyulladásozó válaszokat, azonban szerepe a központi idegrendszerben még kevésbé tisztázott.

1.2. Migrén

A migrén rohamokban jelentkező visszatérő, lüktető féloldali fejfájás, melyet gyakran hányinger, hányás, foto- és fonofóbia kísér (Wood & Welch, 1993). Mivel a migrén a népesség 10%-át érinti, és pontos patomechanizmusa nem tisztázott, a téma kutatása egyértelműen nagy jelentőségű. A migrénes rohamokat kiváltó tényezők közé tartoznak hormonális változások, stressz expozíció, az alvást-ébrenlét szabályozásáért felelős napi ritmus zavarai és bizonyos időjárás körülmények is (Goadsby et al., 2018; Jiang et al., 2019; Kikkeri & Nagalli, 2022).

1.2.1. A migrén neuroanatómiai alapjai

A migrén legszélesebb körben elfogadott elmélete a trigeminovaszkuláris rendszer aktiválásán és érzékenyítésén alapul (Ashina et al., 2019). Az érzékszervi feldolgozás elsődleges diszregulációja olyan neurológiai tünetegyüttest eredményez, amely befolyásolja az érzékelést (Benemei et al., 2017). A trigeminovaszkuláris rendszer a meningeális erekből és a trigeminális ganglionban (TRG) elhelyezkedő elsőrendű érző neuronok C típusú és A δ típusú dendritikus axonjaiból áll,

amelyek nociceptív beidegzést biztosítanak az agyhártyák számára (Ashina et al., 2019). A pszeudounipoláris nociceptív TRG sejtek centrális (axonikus) axonjai a fájdalom jelet a *nucleus tractus spinalis nervi trigemini* (STN) felé közvetítik gyors hatású excitatorikus neurotranszmitter, a glutamát segítségével. A TRG neuronok aktiválódása különböző neuropeptidok felszabadulásához vezet a perifériás és centrális terminálisokból, amelyek ismert szerepet játszanak a migrén patogenezisében. Ezek közé tartozik a P anyag (SP), az adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) és a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) (Durham et al., 2016; Spekker et al., 2023).

Az STN felelős a protopátiás érzékelési modalitások továbbításáért, amelyek magukban foglalják a fájdalmat, a hőmérséklet és a durva tapintás érzékelését. Tekintve, hogy az arcbőrt, az orbitális struktúrákat, az orr- és szájüregeket főként a *nervus trigeminus* idegzi be, a fő bemenet innen érkezik az STN-be. A homlok felső része, a fejbőr és a meningeális területek az STN kaudális részébe projektálnak, amely a kaudális medulla oblongata legalsó részében, valamint az első és második nyaki gerincvelői szegmentumban helyezkedik el. Az STN másodrendű neuronjai a nociceptív jelet a *lemniscus trigeminális*-on keresztül a thalamus kontralaterális *nucleus ventralis posteromedialis* magjába továbbítják. A thalamusban található harmadrendű neuronok a *radiatio thalami superior*-on keresztül a primer szomatoszenzoros kéregbe továbbítják a nociceptív jelet. Az agyhártyák kortikális reprezentációs területe a parietális lebeny posztcentrális gyrusának laterális alsó részén található (Edvinsson et al., 2020). Kiemelendő, hogy az STN közvetlen kapcsolatokat küld több agytörzsi központba is. A rostrális ventromediális medullába és a *locus coeruleus*ba vetülő rostok irányíthatják a fájdalomérzékelést migrénben, beleértve az autonóm, endokrin, kognitív és affektív tüneteket. A ventrolaterális *periaqueductalis* szürkeállományba és a *nucleus raphe magnus*ba irányuló afferensek különösen fontosak, mivel ezek olyan központok, amelyek hozzájárulnak a lefelé irányuló antinociceptív szerotonerg és noradrenerg rendszerek szabályozásához. A *dorsalis raphe* mag (DRN) szintén része a szerotonerg középvonali magkomplexumnak, és szerepe az STN-en keresztüli fájdalommodulációban jól ismert (Li et al., 1993; Andrade et al., 2013; Rattanawong et al., 2022; Shibata et al., 2022).

Az STN a fájdalom jelet a CGRP- és PACAP expresszáló parabrachialis magon keresztül a magasabb rendű limbikus központokba küldi, melyek közül az *amygdala* és a *nucleus accumbens*, jelentősége a fájdalom affektív megélésében rejlik (Almeida et al., 2004).

Fontos megjegyezni, hogy a fent összefoglalt anatómiai komplexitás miatt a migrén pontos oka és patofiziológiája továbbra is a folyamatban lévő kutatások tárgyát képezi, és egyetlen mechanizmus sem képes magyarázni ennek a komplex állapotnak minden aspektusát.

1.2.2. Kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP)

A CGRP egy 37 aminosavból álló neuropeptid, amely elsősorban az érzőidegekből szabadul fel, erőteljes agyi értágító hatást eredményezve (Brain & Grant, 2004). Az értágító hatást a CGRP receptorok aktiválása segíti elő, amelyek G-proteinhez kapcsolt heterodimerek, amelyek a kalcitonin receptor-szerű receptorból (CLR) és a receptor aktivitás módosító protein-1-ből (RAMP1) állnak (McLatchie et al., 1998). A CGRP szerepét a migrén patogenezisében számos preklinikai és klinikai kutatási eredmény alátámasztja. A CGRP jelentős mennyiségben megtalálható a TRG neuronok nociceptív rostjaiban. A CGRP centrális idegvégződéseken történő felszabadulásakor az STN kaudális részének másodrendű neuronjainak CGRP receptorainak hathat, összekapcsolva a perifériát a központi idegrendszerrel (Bartsch et al., 2003; Iyengar et al., 2019). A CGRP hasonló affinitással kötődik a CLR-hez és a kalcitonin receptorhoz (CTR, amelyet a kalcitonin receptor mRNS (*Calcr*) gén kódol), amikor RAMP1-el együtt expresszálódik. A CLR/RAMP1 komplex CGRP receptort, míg a CTR/RAMP1 komplex amilin receptort (AMY1) képez (Salvatore et al., 2006). A CGRP receptor komponens fehérje (CRCP) nem szükséges a receptor aktivitásához, de növeli a CGRP hatékonyságát (Dickerson et al., 2013).

A trigeminális rendszer aktiválása a CGRP szintjének emelkedéséhez vezet migrénes roham során (Goadsby et al., 1990), amely visszafordítható 5-HT receptor agonisták (triptánok), például sumatriptan és dihidroergotamin alkalmazásával, egyidejűleg a fájdalom enyhülésével (Goadsby & Edvinsson, 1993; Juhasz et al., 2005).

Bár általánosan ismert, hogy a CGRP nem képes áthatolni a vér-agy gáton (Edvinsson et al., 2007), számos tanulmány kimutatta, hogy a CGRP perifériás (intravénás (i.v.) és intraperitoneális (i.p.)) és központi (intracerebroventriculáris (i.c.v.)) adása számos migrén-szerű tünetet idéz elő rágcsálókban. Ezenkívül, a CGRP által kiváltott migrén-szerű tünetek visszafordíthatók sumatriptan vagy anti-CGRP monoklonális antitestek egyidejű alkalmazásával (Kaiser et al., 2014; Mason et al., 2017; Rea et al., 2018). Mindezek alapján a CGRP központi idegrendszeri és perifériás hatásait is feltételezik migrénben (Raddant & Russo, 2011).

Humán klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy a CGRP intravénás adása fejfájást provokálhat migrénes betegeknél (Asghar et al., 2011; Kuburas & Russo, 2023), amelyet az intravénás CGRP receptor antagonistával, olcegepánttal történő szisztémás infúzió visszafordíthat (Olesen et al., 2004). Migrénes betegekben magas CGRP koncentrációkat mértek perifériás vérben rohamok nélkül is, így a CGRP-t lehetséges biomarkerként határozták meg a krónikus migrén diagnózisában (Cernuda-Morollon et al., 2013). Három anti-CGRP antitest (eptinezumab, fremantezumab és galcanezumab) és egy anti-CGRP receptor antitest (erenumab) terápiás hatékonysága bizonyított a migrén megelőzésében (Tepper et al., 2018; de Vries & MaassenVanDenBrink, 2019; Schiano di Cola et al., 2023). Mivel ez utóbbi gyógyszerek nem képesek átjutni a vér-agy gáton, hatásuk helye valószínűleg a központi idegrendszeren kívül található (Edvinsson et al., 2015; Ashina et al., 2017). Lehetséges célpontok lehetnek a trigeminális rendszer, az agyi véregek és a dura mater (Henson et al., 2020). A kis molekulájú CGRP receptor antagonisták (gepántok), mint például az atogepant és a remegepant, ígéretes jelöltek az akut migrénes rohamok kezelésére kisebb molekuláris méretük miatt (Negro & Martelletti, 2019; Henson et al., 2020; Dubowchik et al., 2020).

1.2.3. Az EWcp lehetséges szerepe migrénben

Korábbi tanulmányok igazolták, hogy az urocortinerg EWcp aktiválódik és több *Ucn1* mRNS-t expresszál akut fájdalomban (Kozicz et al., 2001; Rouwette et al., 2011). Az EWcp számos projekciót küld különböző fájdalomérzékeny agyi központokba, amelyek szerepet játszanak a migrén patofiziológiájában, beleértve a DRN-t, az STN-t és a laterális hipotalamuszt (IH) (Zuniga & Ryabinin, 2020). Az EWcp projekciós területei közül a DRN kulcsszerepet játszik a migrén patofiziológiájában a centrális 5-HT szintek szabályozásával (Rattanawong et al., 2022; Shibata et al., 2022). Az 5-HT hozzájárulhat a migrén patomechanizmusához a CGRP szintek szabályozásával és közvetlen érrendszeri hatásával (Puledda et al., 2023). Az 5-HT szintézisében a sebességmeghatározó enzim termeléséért felelős gén, az úgynevezett triptofán-hidroxiláz 2 (TPH2) polimorfizmusai potenciálisan növelhetik az egyének migrénre való fogékonyságát (Marziniak et al., 2009; Jung et al., 2010). A DRN mind CRH1R-t, mind CRH2R-t expresszál, viszonylag magas CRH2R expresszióval más agyi területekhez képest (Chalmers et al., 1995). Mivel az UCN1 ezeknek a receptoroknak az endogén ligandja, a CRH receptorok jelenléte a migrénhez kapcsolódó agyi területeken az EWcp lehetséges szabályozó szerepére utalnak a betegségben.

Ezt a hipotézist korábbi tanulmányok is alátámasztják, amelyek kimutatták, hogy több migrénhez kapcsolódó neurotranszmitter, neuromodulátor és receptor is jelen van az EWcp-ben, ideértve a PACAP-ot és annak specifikus receptorát (PAC1) (Markovics et al., 2012; Fehér et al., 2023; Priest et al., 2023). Ezen felül, az EWcp-ben neuronális nitrogén-monoxid szintetáz (nNOS), SP-t,

TRPA1 ioncsatornát (Kormos et al., 2022) és CGRP-immunreaktív rostokat is azonosítottak (Maciewicz et al., 1983; Smith et al., 1994; Spina et al., 2004).

Egyre növekvő számú kutatás veti fel a perifériás TRPA1 lehetséges szerepét a migrén patogenezisében (Souza Monteiro de Araujo et al., 2020; Shibata et al., 2021; Iannone et al., 2022a, 2022b; Spekker et al., 2022; Fila et al., 2023; Masood et al., 2023). Több olyan anyagot azonosítottak TRPA1 agonistaként, mint például a cigarettafüst, az ammónium-klorid, a formaldehid, a klór, és a fokhagyma (Bautista et al., 2005; McNamara et al., 2007; Andrè et al., 2008; Bessac et al., 2008; Fujita et al., 2008), amelyek ismertek a migrénes rohamok kiváltó tényezőiként (Courteau et al., 1994; Peatfield et al., 1995; Wantke et al., 2000; Irlbacher és Meyer, 2002; Kelman et al., 2007). Ezen tanulmányok arra utalnak, hogy azok a vegyületek, amelyek képesek a TRPA1 tartalmú idegvégződéseket deszenzitizálására, új terápiás célpontoknak tekinthetők a migrén kezelésében (Benemei és Dussor, 2019). Legújabb megállapításunk, miszerint a peptiderg EWcp sejtek magas *Trpa1* mRNS expressziót mutatnak, míg más agyi területeken az expresszió viszonylag alacsony, arra utal, hogy az EWcp/TRPA1 esetleges szerepének vizsgálata releváns lehet migrénben.

Ezzel összhangban az EWcp szerepet játszik a stresszadaptációban (Kormos és Gaszner, 2013), működését a cirkadián ritmus (Gaszner et al., 2009), valamint a nemi hormonok változásai is befolyásolják (Derks et al., 2007, 2010), melyek ismert kiváltó tényezői lehetnek a migrénes rohamoknak.

Mindezek alapján célunk az EWcp potenciális szerepének vizsgálata a migrén neurobiológiájában.

1.3. Alkoholfüggőség

Az etanol egy toxikus és pszichoaktív vegyület erős addiktív tulajdonságokkal (WHO 2022). Az alkoholfüggőség fontos közegészségügyi probléma, több mint 200 betegség rizikófaktora (Ilhan & Yapar, 2020; Shield et al., 2013), valamint évente több mint 3 millió haláleset okozójaként, az összes halálozás 5,3%-át teszi ki világszerte. Az addikció káros következményei közé tartoznak a mentális és viselkedésbeli változások, hangulati rendellenességek és depresszió, mely szintén rámutat a téma kutatásának jelentőségére.

1.3.1. Az EWcp szerepe az alkoholfogyasztásban

Számos irodalmi adat áll rendelkezésre az EWcp-ben expresszáldó UCN1 és CART neuropeptidok szerepéről az alkohol és más addiktív szerek hatásában (Ong & McNally, 2020; Zuniga & Ryabinin, 2020).

Több genetikai tanulmány bizonyította, hogy a magasabb alkoholpreferencia együtt jár emelkedett UCN1 szintekkel különböző egér- és patkány törzsekben is (Turek et al., 2005; Bachtell et al., 2003; Fonareva et al., 2009). Az EW léziója szignifikánsan csökkenti az etanolpreferenciát rágszálókban (Bachtell et al., 2004; Ryabinin & Weitemier, 2006). Az UCN1/CART pozitív neuronok erős FOS választ (akut neuronális aktivációs marker) mutatnak, akut alkohol adás és önkéntes alkohol fogyasztás hatására is (Bachtell et al., 1999; Ryabinin et al., 2001; Weitemier et al., 2001; Zuniga & Ryabinin, 2020). Az emelkedett neuronális aktivitás pozitív korrelációt mutat az elfogyasztott alkohol mennyiségével, ami dózisfüggő válaszra utal (Sharpe et al., 2005; Giardino et al., 2017). Hasonlóan, korábbi tanulmányok kimutatták az EWcp UCN1/CART neuronok FOSB aktivitásának növekedését (krónikus neuronális aktivációs marker) krónikus alkohol expozíció hatására egerekben (Bachtell et al., 1999; Ozburn et al., 2012).

Bár számos tanulmány igazolta a CART jelentőségét az addikcióban (Bakhtazad et al., 2016; Kuhar et al., 2016), korlátozott számú kutatás áll rendelkezésre az EWcp/CART szerepéről az alkoholfogyasztás szabályozásában. CART génhiányos (KO) egerek szabad választáson alapuló

alkoholfogyasztás modelljében lényegesen alacsonyabb alkoholpreferenciát mutattak, összehasonlítva a WT egerekkel (Salinas et al., 2014). Egy másik tanulmány arról számolt be, hogy az alacsony alkoholpreferenciájú DBA/2J egereknél csökken a CART expresszió mind mRNS, mind pedig fehérje szinten az EWcp-ben, összehasonlítva a magas alkoholpreferenciájú C57BL6J egerekkel (Giardino et al., 2017). Az UCN1 és CART teljes kolokalizációja az EWcp-ben, valamint emelkedett peptid- és mRNS-szintjük asszociációja a magasabb alkoholpreferenciával, arra utal, hogy az EWcp/UCN1/CART neuronok jelentős szerepet játszanak az alkoholfogyasztás szabályozásában.

Az EWcp/UCN1/CART neuronok több addikcióval összefüggésbe hozható, valamint CRH receptort kifejező agyi területre küldenek projekciót, közülük kiemelendő a ventrális tegmentalis area (VTA) és a DRN (Schreiber & Gilpin, 2018; Zuniga & Ryabinin, 2020).

A DRN a legfontosabb szerotonerg központ az agyban (Huang et al., 2019), mely kulcsfontosságú szerepet játszik a jutalmazás és addikció kialakulásában (Ren et al., 2018; Liu et al., 2020).

A VTA a mesokortikolimbikus dopaminerg rendszer része, mely szintén központi szereppel bír a jutalmazás és a hozzá szokás neurobiológiájában a dopamin felszabadulás közvetítésével (Cai et al., 2022).

1.3.2. A TRPA1 ioncsatorna lehetséges szerepe az alkoholfüggőségben

Komatsu és kollégái (2012) szerint az etanol aktiválja az TRPA1-t, melyet kalcium-*imaging*-gel bizonyítottak humán TRPA1-et expresszáló embrionális vese sejtekben (HEK293). Az etanolt az alkohol-dehidrogenáz enzim metabolizálja reaktív és mérgező acetaldehiddé, ami ecetsavvá alakul át (Cederbaum et al., 2012). Az acetaldehydnek kulcsszerepet tulajdonítanak az akut és krónikus alkoholfogyasztás káros hatásaiban, ideértve a bőrpírt, fejfájást, cirrhosist és a malignus tumoros elváltozásokat (Eriksson et al., 2001). Bang és kollégái (2007) fájdalommodellekben azt találták, hogy a humán és az egér TRPA1-et kifejező HEK293 sejteken, illetve egér trigeminális ganglion primer tenyészetben az acetaldehyd aktiválni képes a TRPA1-et. Az acetaldehyd nem aktivált más hőérzékeny TRP ioncsatornákat szenzoros idegvégződéseken. A TRPA1 antagonistá kámfor, a gadolinium és egy általános TRP blokkoló, a ruténium vörös gátolta az acetaldehyd által történő TRPA1 aktivációt. Egy másik kutatócsoport kimutatta, hogy a Schwann-sejtek kifejezik a TRPA1-t, amely az etanol által kiváltott neuropátiás fájdalom közvetítésében játszik szerepet egerekben (De Logu et al., 2019). Legutóbb Landini (2023) azt találta, hogy az acetaldehyd a CGRP receptoron és a TRPA1-en keresztül a Schwann-sejtekben közvetíti az etanol által kiváltott periorbitális mechanikus allodíniát egerekben. Wang kutatócsoportja (2011) szerint, az alkohol végső metabolitja, az ecetsav is aktiválhatja a TRPA1-et trigeminális ganglion sejttenyészetben végzett *patch clamp* és a Ca²⁺ mikrofluorometria alapján.

Ahogy az legutóbbi kutatásunkban kimutattuk, az EWcp-ben az urocortinerg neuronok egyedülálló módon jelentős mennyiségben fejezik ki a TRPA1-t az egér központi idegrendszerében (Kormos et al., 2022), és miután a) a CRH rendszer, azon belül is az UCN1 szerepet játszik az akut és krónikus alkoholfogyasztásban (Schreiber & Gilpin, 2018; Zuniga & Ryabinin, 2020), valamint b) az alkohol és az összes fent említett metabolitja hatékonyan átjut a vér-agy gáton, felmerül a kérdés, hogy közvetlenül aktiválhatják-e a TRPA1 receptorokat az EWcp-ben. A TRPA1 aktiválása kalcium beáramlást eredményez, ami több intracelluláris útvonalat indíthat el, és ez hozzájárulhat az UCN1 és/vagy CART peptid felszabadulásának szabályozásához.

Ezek alapján célunk, hogy megvizsgáljuk a TRPA1 szerepét akut alkoholexpozíció egérmodelljében az UCN1/CART expresszáló EWcp neuronokon.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. Az EWcp vizsgálata migrénben

Első célunk az EWcp urocortinerg neuronjainak vizsgálata volt a migrén neurobiológiájában. Feltételezzük, hogy az EWcp/UCN1 neuronok részt vesznek a migrén kialakulásának szabályozásában vagy a migrénre adott endogén válaszban, a betegséggel kapcsolatos agyterületekkel való közvetlen neuroanatómiai kapcsolatain keresztül.

I. A migrénnel összefüggő célpontok neuroanatómiai és kvalitatív morfológiai vizsgálata

Egér- és humán EWcp és DRN, valamint egér STN mintákon terveztük vizsgálni a CGRP receptor komponenseinek kifejeződését, továbbá az EWcp-ből a *Crhr1* és *Crhr2* pozitív neuronokra irányuló esetleges urocortinerg projekciót a STN-ben.

II. Az EWcp vizsgálata nitroglicerinnel (NTG) indukált migrén egérmodellben

Célunk a funkcionális és morfológiai változások vizsgálata volt egér EWcp-ben NTG indukált migrén modellben. Feltételezzük, hogy a NTG befolyásolhatja az EWcp működését, migrén-szerű állapotot előidézve.

III. Az EWcp és annak migrénnel kapcsolatos projekciós területeinek vizsgálata CGRP indukált migrén modellben

Az urocortinerg EWcp és annak migrénnel összefüggő projekciós területeinek (DRN és STN) funkcionális és morfológiai változásait terveztük vizsgálni CGRP által kiváltott migrénszerű állapotban. Feltételezzük, hogy a CGRP befolyásolja az EWcp, DRN és STN működését a vizsgált modellben.

IV. Az egér EWcp urocortinerg neuronok célzott ablációja leptin konjugált szaporinnal

Az EWcp/UCN1 neuronok szelektív ablációját terveztük, melyet követően az egereket CGRP-indukált migrén modellben vizsgáltunk viselkedésteztekkel az urocortinerg neuronok migrénben betöltött szerepének igazolása céljából. Hipotézisünk szerint az EWcp/UCN1 neuronok szelektív ablációja befolyásolja a CGRP által kiváltott migrénnel összefüggő viselkedésválaszokat.

V. A humán EW funkcionális kapcsolatainak feltérképezése fMRI vizsgálattal

Eredményeink humán transzláthatóságát vizsgálendő, miszerint az EW közvetlen anatómiai kapcsolatai révén befolyásolhatja a migrénnel összefüggő területek működését, azt terveztük, hogy megvizsgáljuk az EW funkcionális kapcsolatrendszerét egészséges emberekben, különös tekintettel az STN és a DRN területére küldött projekciókra, majd összehasonlítjuk az interiktális migrénesek funkcionális kapcsolatmátrixával. Végül azt is vizsgálni kívántuk, hogy van-e összefüggés a migrénes rohamok gyakorisága és az EW funkcionális kapcsolatrendszere között. Feltételeztük, hogy pozitív funkcionális kapcsolat van az EW és a STN, valamint a DRN között.

2.2. Az EWcp/TRPA1 vizsgálata akut alkohol expozíció egérmodelljében

Második célunk az EWcp/TRPA1 szerepének vizsgálata volt akut alkohol expozíció egérmodelljében. Hipotézisünk szerint az alkohol és annak metabolitjai befolyásolhatják az EWcp urocortinerg neuronjainak működését a TRPA1 ioncsatornák aktiválásával.

I. A TRPA1 funkcionális aktivitásának vizsgálata egér EWcp-ben

Megbízható antitest hiányában nem rendelkezünk bizonyítékkal a TRPA1 fehérje szintű expressziójára az EWcp-ben, ezért elsődleges célunk az volt, hogy elektrofiziológiai módszerekkel bizonyítékot szolgáltatassunk a TRPA1 funkcionális aktivitására akut egér EWcp agyszeleten. Feltételeztük, hogy az EWcp-ben kifejeződő TRPA1 ioncsatorna funkcionálisan aktív.

II. A *TRPA1* mRNS expressziójának vizsgálata humán EWcp-ben

Korábbi eredményeink transzlációs relevanciájának alátámasztása érdekében célunk az volt, hogy megvizsgáljuk az *TRPA1* mRNS kifejeződését humán EWcp/UCN1 neuronokon. Feltételeztük, hogy a humán EWcp/UCN1 neuronok -hasonlóan az egér EWcp/UCN1 neuronokhoz- expresszálják a TRPA1 ioncsatornát, mRNS szinten.

III. A *Trpa1*-expresszáló EWcp neuronok vizsgálata akut alkohol expozíció egérmódeljében

A TRPA1 ioncsatornák szerepét terveztük vizsgálni, hogy hozzájárulhatnak-e az EWcp urocortinerg neuronjainak aktiválásához/működéséhez akut alkohol expozíció során, *Trpa1* KO egerek bevonásával. Hipotézisünk az volt, hogy az alkohol szabályozhatja az UCN1 és/vagy CART peptid szinteket az EWcp-ben a TRPA1 aktiválásán keresztül.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Állatkísérletek

3.1.1. Az EWcp vizsgálata migrénben

3.1.1.1. A migrénnel összefüggő célpontok neuroanatómiai és kvalitatív morfológiai vizsgálata

Intakt C57Bl6/J egerek (n=6) bevonásával vizsgáltuk az AMY1 és a CGRP receptor komponenseinek expresszióját az EWcp, DRN és STN területén, valamint a *Crhr1* és *Crhr2* mRNS kifejeződését az STN-ben. CLR immunfluoreszcens festést, valamint *Ramp1*, *Calcr* és *Crcp* RNAscope *in situ* hibridizációs (ISH) vizsgálatot végeztük a következő immunjelölésekkel kombinálva: a) UCN1 immunfluoreszcens festés az EWcp-ben az urocortinerg neuronok azonosítására; b) TPH2 vagy 5-HT immunfestés a DRN-ben a szerotoninerg neuronok jelölésére; c) neuronális nukleáris marker NeuN immunfluoreszcens festés az STN-ben a gerincvelői hátsó szarvban található neuronok vizualizálására.

Az EWcp és az STN közötti lehetséges urocortinerg kapcsolat azonosításához egér (n=6) EWcp injektálását végeztük anterográd *tracer*-rel pályajelölés céljából, olyan adeno-asszociált vírus vektorral, mely a zöld fluoreszcens fehérje génjét tartalmazza (AAV8 Syn EGFP). A retrográd pályajelöléshez egér (n=6) STN-jét injektáltuk a C1-es gerincvelői szegmentum magasságában a hátsó szarvnak megfelelően retrográd *tracer*-rel, amely a kolera toxin B-alegységét (CTB) tartalmazta. Az injekciók helyes anatómiai lokalizációjának ellenőrzése érdekében CTB és zöld fluoreszcens fehérje (GFP) immunjelölését végeztük a gerincvelő C1-es szegmentumából származó STN mintákon, valamint az EWcp-ben. Az anterográd nyomkövetéshez UCN1 és GFP kettős immunfestést alkalmaztunk a C1-es gerincvelő szegmentum STN mintáin. A retrográd pályajelöléshez pedig UCN1 és CTB kettős immunfluoreszcens festést végeztünk az EWcp-t tartalmazó szeleteken.

A UCN1 receptor célpontjaiként a *Crhr1* és *Crhr2* expresszióját vizsgáltuk az STN I-III laminájában. A *Crhr1*, *Crhr2* és *NeuN* (neuronális markert) RNAscope ISH-t UCN1 immunfluoreszcens festéssel kombináltuk az STN területén a *Crhr1*- és *Crhr2*-pozitív neuronokat innerváló urocortinerg afferentáció kimutatása céljából.

3.1.1.2. Az EWcp vizsgálata NTG indukálta migrén modellben

C57Bl6/J egereket (n=6/csoport) három kísérleti csoportba osztottunk: NTG, mint kezelési csoport, vivőanyag és fiziológias sóoldat, mint kontroll csoportok. Az állatokat i.p. NTG-vel (10 mg/kg) vagy vivőanyaggal (6% etanol és 16% propilén-glikolt tartalmazó sóoldat) vagy fiziológias sóoldattal injektáltuk. A kezelést követően 4 órával az egerek transzkardiális perfúzióját végeztük,

majd agy és TRG mintákat gyűjtöttünk a morfológiai vizsgálatokhoz. Az EWcp szeleteken az akut neuronális aktivációs marker (FOS) immunhisztokémiai vizsgálatát diaminobenzidinnel (DAB) végeztük.

3.1.1.3. Az EWcp, valamint a migrénnel összefüggő projekciós területeinek vizsgálata CGRP által kiváltott migrén modellben

C57Bl6/J egereket (n=11-15/csoport) két hét kézhez szoktatást követően két kísérleti csoportba osztottunk: fiziológias sóoldattal kezelt kontroll és 0,1 mg/kg CGRP-vel (α -CGRP egér, patkány (CRB), Cat. No.: crb1000889) kezelt csoportok. Az i.p. injekció után 30 perccel a fény elkerülő magatartást vizsgáltuk sötét-világos doboz (LDB) teszt segítségével, hogy felmérjük a migrén-szerű állapothoz társuló fotofóbia mértékét. Egy másik független kísérletben (n=13/csoport) ugyanebben a modellben a periorbitális hiperalgéziát vizsgáltuk, a kezelés után 30 perccel von Frey filamentumok segítségével.

A TRG, az EWcp, a laterális periaqueductalis szürkeállomány (IPAG) és az STN I-III laminájában FOS, míg az STN-ben foszforilált cAMP-reszponzív elem kötő fehérje (P-CREB) immunfestéssel neuronális aktivitást vizsgáltunk. RNAscope ISH-t kombináltunk immunfluoreszcens festéssel az EWcp-ben az UCN1 mRNS és peptid szintű meghatározásához, valamint a DRN területén az 5-HT és a TPH2 denzitásának mérése érdekében kettős immunfestést alkalmaztunk.

3.1.1.4. Az egér EWcp urocortinerg neuronok célzott ablációja leptin-konjugált szaporinnal

Stereotaxiás eljárással leptinnel konjugált szaporint injektáltunk C57Bl6/J egerek (n=13) EWc magjába az UCN1 neuronok szelektív ablációja céljából. A szaporin egy riboszóma gátló fehérje, amely csak akkor jut be a neuronokba, ha olyan anyaggal van konjugálva, amelyet a sejt receptoron keresztül endocitózissal képes felvenni. A szaporin visszafordíthatatlanul gátolja a sejtek fehérje szintézisét (Wiley et al., 2000). Az EWcp-ben csak az UCN1 immunreaktív neuronok expresszálják a leptin receptorát, így ezek a sejtek szelektíven elpusztíthatók (Ujvári et al., 2022, Xu et al., 2022). A periorbitális hiperalgéziát a 0,1 mg/kg-os CGRP vagy sóoldat intraperitoneális injekciója után értékeltük a műtét előtt és 2 héttel a műtét után. Az EWcp/UCN1 neuronok számlálásához UCN1 immunfestést végeztünk, az abláció hatékonyságának értékelése céljából.

3.1.2. Az EWcp/TRPA1 vizsgálata akut alkohol expozíció egérmodelljében

3.1.2.1. Az egér EWcp/TRPA1 funkcionális aktivitásának vizsgálata

Patch clamp elektrofiziológiai vizsgálatot végeztünk túlélő egér EWcp agyszeleten, a TRPA1 funkcionális aktivitásának bizonyítása céljából, melyhez a szelektív és potens TRPA1 agonista JT010-et használtuk.

3.1.2.2. Az EWcp/UCN1/CART/*Trpa1* neuronok vizsgálata akut alkohol expozíció egérmodelljében

9-12 hetes hím *Trpa1* KO és WT egereket négy kísérleti csoportra osztottunk (n=6-8/csoport): i.p. 6%-os etanollal (D: 1g/Kg) kezelt *Trpa1* KO és WT egerek, valamint i.p. azonos térfogatú fiziológias sóoldattal kezelt kontrollok. 2 órával a kezelés után az egereket transzkardiálisan perfundáltuk, majd agymintákat gyűjtöttünk morfológiai vizsgálatokhoz, mely során a FOS, UCN1 és CART peptid immunreaktivitását, valamint a *Trpa1*, *Ucn1* és *Cart* mRNS expresszióját vizsgáltuk.

3.2. Humán vizsgálatok

3.2.1. Kvalitatív morfológiai vizsgálatok

A *TRPA1* mRNS, valamint az *AMY1* és *CGRP* receptor komponensek expresszióját *post mortem* humán EWcp és DRN mintákon vizsgáltuk, melyek neuropatológiai szempontból negatív anamnéziséű alanyokból származtak. A *TRPA1* RNAscope ISH-t UCN1 immunfestéssel kombináltuk az EWcp-ben, a két target kolokalizációjának vizsgálata céljából. A *RAMP1*, *CALCR* és *CRCP* RNAscope ISH-t, valamint a CLR immunfluoreszcens festést a következő markerekkel kombináltuk: a) UCN1 immunfluoreszcens festéssel az EWcp-ben az urocortinerg neuronok azonosítása céljából; b) TPH2 vagy 5-HT immunfestéssel a DRN-ben a szerotonerg neuronok markereként.

3.2.2. A humán EW funkcionális kapcsolatainak feltérképezése

Az EW funkcionális kapcsolati mátrixát vizsgáltuk kontroll alanyok bevonásával, különös tekintettel az STN és DRN területére fMRI segítségével, melyet összehasonlítottunk az interiktális migrénesek funkcionális kapcsolati mátrixával. Végül a migrénes rohamok gyakorisága és az EW funkcionális kapcsolatai közti összefüggést vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az EWcp vizsgálata migrénben

4.1.1. A migrénnel összefüggő célpontok neuroanatómiai és kvalitatív morfológiai vizsgálata

4.1.1.1. A CGRP receptor komponenseinek expressziója az EWcp-ben, DRN-ben és STN-ben

Igazoltuk, hogy a *Ramp1* és *Calcr* mRNS-ek, amelyek az *AMY1* receptor komponenseket kódolják, mind az egér, mind az emberi EWcp neuronokban kifejeződnek. Különösen érdekes, hogy a *Calcr* mRNS expressziós mintázata az EWcp-ben jelentős kolokalizációt mutat az UCN1 immunjellel. Emellett, majdnem az összes urocortinerg neuronban kimutattuk az CLR és a *Crcp* jelenlétét egér és humán EWcp mintákban is.

A DRN-ben a *Calcr*, *Ramp1* és CLR valamint a *Crcp* is kifejeződnek a szerotoninerg és nem szerotoninerg neuronokban, egérben és emberben is.

Kimutattuk a *Calcr*, *Ramp1* és *Crcp* mRNS expresszióját az egér STN I-III laminájában neuronokon és gliasejteken egyaránt. Ezen felül, egy korábbi tanulmánnyal összhangban, a CGRP receptor komponens CLR kifejeződését megerősítettük mind a neuronokon (Miller et al., 2016), mind az asztrocitákban.

4.1.1.2. Az EWcp urocortinerg afferentációja az STN-be

Az EWcp-ből az STN-be irányuló lehetséges urocortinerg projekció vizsgálatához anterográd és retrográd pályajelölést végeztünk. Az injekció pontos anatómiai helyzetét CTB és GFP immunfestéssel igazoltuk a C1 gerincvelői szegmentum magasságában és az EWcp-ben. CTB és UCN1 pozitív neuronokat találtunk az EWcp-ben, az STN-be történő CTB injekciót követően. GFP és UCN1 pozitív rostokat mutattunk ki az STN-ben az EWcp/AAV8-EGFP injektált egerekben.

Az STN I-III lamináiban igazoltuk a *Crhr1* és *Crhr2* receptorok (UCN1 receptorai) expresszióját neuronokon. UCN1 immunoreaktív rostokat mutattunk ki a *Crhr1* és *Crhr2* pozitív neuronok közvetlen közelében az STN I-III lamináiban.

4.1.2. Az EWcp szerepének vizsgálata nitroglicerín indukálta migrén egérmodellben

Az EWcp neuronális aktivitásának vizsgálata céljából FOS immunfestést végeztünk. Mind a vivőanyag, mind a NTG kezelés jelentősen növelte a FOS pozitív neuronok számát az EWcp-ben, összehasonlítva a sóoldattal. Azonban nem volt szignifikáns különbség a vivőanyaggal és NTG-vel kezelt csoportok között.

4.1.3. Az EWcp és a migrénnel összefüggő projekciós területeinek vizsgálata CGRP által kiváltott migrénmodellben

4.1.3.1. Modell validációja

A migrénhez gyakran társuló fotofóbia értékelésére LDB tesztet végeztünk. A CGRP kezelt egerek jelentősen hosszabb időt töltöttek a sötét kompartmentben a kontroll csoportokhoz képest.

A migrénszerű fejfájáshoz társuló periorbitális fájdalom értékelésének céljából von Frey-tesztet végeztünk. A CGRP-kezelés szignifikánsan csökkentette a periorbitális fájdalom küszöböt a sóoldathoz képest.

FOS immunofluoreszcens festést végeztünk a TRG neuronok aktiváltságának értékelésére. A CGRP-kezelés jelentősen megnövelte a FOS pozitív neuronok számát a TRG-ben, a kontroll csoporthoz képest.

Az STN-ben bár a CGRP-kezelés nem befolyásolta a FOS pozitív neuronok számát, megnövelte a P-CREB pozitív neuronok számát az I-III laminákban.

Közel kétszeresére növekedett az aktivált neuronok száma a IPAG területén a CGRP-kezelt csoportban, a kontroll csoporthoz képest.

4.1.3.2. Az EWcp funkcionális és morfológiai változásai a CGRP modellben

Az EWcp akut neuronális aktivitásának értékelésére FOS immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk. A CGRP-kezelés közel kétszeresére emelte a FOS-pozitív neuronok számát a kontroll csoporthoz képest.

Kettős immunofluoreszcens vizsgálattal azt találtuk, hogy a FOS immunreaktív magok túlnyomó része az UCN1 neuronokban lokalizálódott (91,79%), ami az urocortinerg EWcp neuronok aktivációjára utal.

Az EWcp-ben az *Ucn1* mRNA expressziójának és az UCN1 peptid tartalmának értékelésére RNAscope ISH-t végeztünk, immunofluoreszcens vizsgálattal kombinálva. A CGRP-kezelt állatokban jelentősen magasabb *Ucn1* mRNA expressziót és UCN1 peptid tartalmat mértünk a kontroll csoporthoz képest.

Annak érdekében, hogy felmérjük, hogy a migrén-szerű állapot hogyan befolyásolja a *Trpa1* mRNS expressziót az EWcp/UCN1 sejtekben, RNAscope ISH-t végeztünk UCN1 immunfestéssel kombinálva. A CGRP-kezelés közel kétszeresére növelte a *Trpa1* transzkriptumok számát az UCN1 neuronokban.

4.1.3.3. Morfológiai változások a DRN-ben CGRP modellben

Mind a 5-HT, mind a TPH2 tartalom csökkent a szerotonerg neuronokban CGRP-kezelés hatására a DRN-ben.

4.1.4. Az EWcp urocortinerg neuronok célzott ablációja leptinnel konjugált szaporinnal egereken

A leptinnel konjugált szaporin kezelés szignifikánsan csökkentette az UCN1 immunoreaktív neuronok számát az EWcp-ben a naív egerekhez képest. Von Frey tesztet végeztünk a migrénszerű fejfájással járó periorbitális fájdalom értékelésére. Az EWcp/UCN1 neuronok ablációja előtt a CGRP kezelés szignifikánsan csökkentette a periorbitális fájdalomküszöböt a sóoldathoz képest. Érdekes módon, az EWcp/UCN1 neuronok ablációját követően a sóoldat szignifikánsan csökkentette a periorbitális fájdalomküszöböt a naív kontrollhoz képest, melyen a CGRP kezelés további változást már nem okozott.

4.2. Humán fMRI vizsgálatok

4.2.1. A humán Edinger-Westphal mag funkcionális kapcsolatai

Kimutattuk az EW pozitív funkcionális kapcsolatait a DRN és STN területével, a frontális és temporális *gyrus*-szal, a kisaggyal, a *nucleus caudatus*-sal és a középaggyal a teljes populációban. Nem találtunk szignifikáns negatív kapcsolatokat.

4.2.2. Az Edinger-Westphal mag funkcionális kapcsolatainak összehasonlítása interiktális migrénesek és kontroll csoportok között

Nem találtunk szignifikáns különbséget az interiktális migrénes betegek és a kontroll csoport (egészséges önkéntesek) között az EW funkcionális kapcsolatait tekintve.

4.2.3. Összefüggés az Edinger-Westphal mag funkcionális kapcsolatai és a migrénes rohamok gyakorisága között

Pozitív korrelációt azonosítottunk az EW funkcionális kapcsolatai és a migrén gyakorisága között két *cluster*-ben. Az egyik csoport magában foglalja a *gyrus angularis*-t és a *gyrus temporalis superior*-t, míg a másik csoport a *gyrus frontalis medius*-t, és az *gyrus frontalis inferior pars triangularis*-t.

4.3. Az EWcp/TRPA1 vizsgálata akut alkohol expozíciós modellben

4.3.1. TRPA1 funkcionális aktivitásának vizsgálata egér EWcp-ben

A TRPA1 funkcionális aktivitását túlélő agyszeleteken vizsgáltuk *patch clamp* elektrofiziológiai módszerrel a TRPA1 ioncsatornákat kifejező EW-ben. Az összes vizsgált neuront biocytinnel való feltöltés után UCN1 immunhisztokémiának vetettük alá, a sejtek urocortinerg identitásának igazolása céljából. Az UCN1 immunreaktív sejtek nyugalmi membránpotenciálon spontán aktivitást mutattak, összhangban más kutatócsoport eredményeivel (Topilko et al., 2022). A TRPA1 aktiválásához potens és szelektív kovalensen kötődő JT010 agonistát alkalmaztunk (Takaya et al., 2015), mely során a membránpotenciál változását *current clamp* módban regisztráltuk. A sejtek nyugalmi membránpotenciálját az akciós potenciál kiváltásának küszöbértékénél tartottuk, hogy megakadályozzuk a spontán depolarizációkat. A TRPA1 által okozott mérsékelt membránpotenciál-depolarizáció magas frekvenciájú kisüléseket eredményezett. Az akciós potenciál frekvenciája szignifikánsan megnőtt a JT010 alkalmazásakor az UCN1 immunreaktív neuronokon. Az akciós potenciál frekvenciája a kiindulási helyzetben $0,14 \pm 0,07$ Hz volt, az agonista alkalmazása közben $0,87 \pm 0,17$ Hz, és a JT010 kimosását követően $0,22 \pm 0,07$ Hz ($n=9/4$ egér). Fontos megjegyezni, hogy az EW régióban található urocortinerg identitást nem mutató sejtek membránpotenciáljában és tüzelési frekvenciájában nem volt változás a JT010 alkalmazása során.

4.3.2. TRPA1 mRNS expresszió vizsgálata humán EWcp-ben

Kimutattuk a *TRPA1* mRNS expresszióját humán EWcp urocortinerg sejtjein *TRPA1* RNAscope ISH-val, melyet UCN1 immunfestéssel kombináltunk.

4.3.3. Az EWcp/TRPA1 vizsgálata akut alkohol expozíció egérmódelijében

4.3.3.1. A vizelet alkoholkoncentrációjának mérése

Az i.p. adott etanol megfelelő abszorpciójának megerősítése érdekében a vizelet alkoholkoncentrációját (UAC) gázkromatográfiás módszerrel mértük. A vártnak megfelelően a sóoldattal kezelt csoportokban nem volt mérhető etanol a vizeletben. Hasonló etanol koncentrációt mértünk mind az alkoholkezelt WT, mind a *Trpa1* KO állatok vizeletében.

4.3.3.2. FOS immunhisztokémia

Az EWcp akut neuronális aktivitásának értékelése érdekében FOS immunhisztokémiát végeztünk. Az alkoholkezelés szignifikánsan növelte a FOS pozitív neuronok számát mind a WT, mind a *Trpa1* KO egerek EWcp-jében, a megfelelő kontrollokhoz képest anélkül, a genotípus fő hatása nélkül.

4.3.3.3. *Trpa1* RNAscope *in situ* hibridizáció

Az alkohol *Trpa1* mRNS expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata céljából RNAscope ISH-t végeztünk az EWcp/UCN1 neuronokban a WT állatok mintáin. A *Trpa1* mRNS teljes mértékben kolokalizált az UCN1 peptid immunszignáljával az EWcp-ben. Az etanolkezelés szignifikánsan csökkentette a *Trpa1* transzkriptumok számát a kontrollhoz képest.

4.3.3.4. Az UCN1 mRNS és peptid mennyiségi változásának dinamikája akut alkohol kezelés hatására

Az *Ucn1* mRNS kifejeződésének és az UCN1 peptid tartalmának vizsgálata érdekében RNAscope ISH-t és immunfluoreszcens festést végeztünk. Kiemelendő a genotípus fő hatása az *Ucn1* mRNS expresszióra. A kontrollcsoportokban nem észleltünk különbséget, azonban az alkoholkezelés hatására az *Ucn1* mRNS expressziója csökkent a KO állatokban.

Az UCN1 peptid mennyiségi mérése esetén erős genotípus × kezelés interakció hatását észleltük. Az EWcp neuronok bazális UCN1 tartalma szignifikánsan alacsonyabb volt a *Trpa1* KO egerekben a WT-hez képest. Ezen felül az alkoholkezelés eltérő módon szabályozta az UCN1 peptid tartalmat az EWcp-ben a két genotípusban: szignifikánsan csökkent a WT egerekben, míg szignifikánsan megnövekedett a KO egerekben.

4.3.3.5. A CART mRNS és peptid mennyiségi változásának dinamikája akut alkohol kezelés hatására

A *Cart* mRNS kifejeződésének és a CART peptid tartalmának vizsgálata érdekében RNAscope ISH-t és immunfluoreszcens festést végeztünk.

A genotípus fő hatását tapasztaltuk a *Cart* mRNS kifejeződésére. Az *Cart* expressziója alacsonyabb volt a *Trpa1* KO egerekben függetlenül a kezeléstől.

5. DISZKUSSZIÓ

5.1. Az EWcp szerepének vizsgálata a migrén neurobiológiájában

Előtanulmányunkban azt láttuk, hogy az NTG beadása nem okozott jelentős aktivációt az EWcp-ben az oldószeres kontrollhoz képest. Mivel az oldószerinjekció erős neuronális aktivációt váltott ki a sóoldattal injektált kontrollhoz képest, arra a következtetésre jutottunk, hogy az NTG készítmény etanol tartalma okozta az aktivációt, nem pedig az NTG maga. Ezzel összhangban, jól ismert, hogy EWcp nagyon érzékeny az etanolra (Zuniga & Ryabinin, 2020; Al-Omari et al., 2023), és mivel az elérhető NTG készítmények mindegyike magas alkoholtartalmú oldószeret tartalmaz (Bates et al., 2010; Farkas et al., 2016; Kim et al., 2018), úgy döntöttünk, hogy a CGRP intraperitoneális injekciót használjuk, migrén modellként, Mason et al. (2017) szerint.

A CGRP, illetve receptorainak központi idegrendszeri eloszlását fehérje szinten már leírták patkányban, egérben és emberben is (Ma et al., 2003; Edvinsson et al., 2020; Huang et al., 2021). Korábban azonban nem történtek vizsgálatok abban a kérdésben, hogy az AMY1 és a CGRP receptor komponensek kifejeződnek-e az EWcp-ben. Munkánk során megerősítettük a *Ramp1*, *Calcr* és *Crcp* mRNS, valamint a CLR fehérje kifejeződését az EWcp/UCN1 neuronokban az ultraszenzitív és specifikus RNAscope ISH technika és immunfluoreszcencia kombinációjával (Wang et al., 2012) mind egér, mind humán szövetben. Ez egyrészt alátámasztja állatkísérleteink transzlációs jelentőségét másrészt megerősíti a korábbi mRNS vizsgálatok eredményeit (Ma et al., 2003; Edvinsson et al., 2020). Korábban az AMY1 és a CGRP receptor komponenseket jelenlétét is kimutatták a DRN és STN területén. Ezek egyben az EWcp olyan projekciós területei, amelyeknek szerepe van a migrénben. Ezért azt feltételezzük, hogy a CGRP közvetlenül is aktiválhatja a DRN-t és STN-t, de ez bekövetkezhet közvetve, az AMY1 és CGRP receptor-expresszáló EWcp/UCN1 neuronokon keresztül is. Ezt a lehetőséget úgy bizonyítottuk, hogy mind antero- és retrográd pályajelöléssel közvetlen kapcsolatot találtunk az EWcp és az STN között. Urocortinerg rostokat találtunk az STN neuronok közvetlen közelében, amelyek *Crh1r* és *Crh2r* mRNS-eket expresszálnak. Ezzel neuroanatómiai bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy az EWcp urocortinerg rostjai közvetlenül hathatnak az STN neuronokra, mely funkcionális jelentőséggel bírhat.

Ezután vizsgáltuk az EWcp választ migrén modellben. Számos jól validált *in vivo* modellt írtak le, mint a trigeminus neuronok közvetlen elektromos stimulációját, gyulladáskeltő anyagok alkalmazását a meningeális régióban, valamint algogén anyagok (pl. NTG, CGRP) használatát (Harriott et al., 2019). Fontos kiemelni, hogy a CGRP jelátvitel minden hasonló modellben szerepet játszik (Wattiez et al., 2019). A TRG elektromos stimulációja és a meningeális gyulladáskeltő anyagok beadása invazív eljárások, és figyelembe véve az EWcp akut fájdalomérzékenységet (Kozicz et al., 2001; Rouwette et al., 2011), ezek a modellek számunkra nem voltak megfelelőek.

Az NTG és a CGRP intraperitoneális beadása sikeresen utánozta a migrén akut és krónikus aspektusait rágcsálókban, amelyeket migrénellenes gyógyszerekkel, például sumatriptánnal enyhítettek (Bates et al., 2010; Farkas et al., 2016; Mason et al., 2017; Rea et al., 2018; Wattiez et al., 2019). Projektünkben az NTG használata nem lett volna megfelelő megközelítés, mivel minden a kereskedelemben elérhető készítmény etanolt tartalmaz oldószerként (Bates et al., 2010; Farkas et al., 2016; Kim et al., 2018), és az EWcp nagyon érzékeny az alkoholra (Zuniga & Ryabinin, 2020; Al-Omari et al., 2023). Ezért végül a Mason et al. (2017) által leírt intraperitoneális CGRP kezelés migrén modelljének alkalmazása mellett döntöttünk.

A CGRP perifériás és központi beadásakor emberekben és rágcsálókban is számos migrénnel összefüggő tünet megfigyelhető (Lassen et al., 2002; Kaiser, 2014; Mason et al., 2017), ami kombinált, perifériás és központi hatásmechanizmusra enged következtetni. Ez összhangban van

a CGRP és az AMY1 receptorok széles körű eloszlásával a periférián és a központi idegrendszerben (Iyengar et al., 2017; Edvinsson et al., 2020). A TRG neuronok expresszálják a CGRP-t és annak receptorát, valamint anatómiai kapcsolatot létesítenek a periféria és a központi idegrendszer között. A CGRP receptorok aktiválása a trigeminális neuronokban stimulálja a CGRP felszabadulását a) az agyhártyákat beidegző afferensek perifériás idegvégződéseiből, b) a TRG sejtekből és c) a STN-ben végződő centrális nyúlványokból (Durham et al., 2016). A központi terminálisokból felszabaduló CGRP elősegíti a centrális szenzitizációt a másodrendű nociceptív STN sejtek CGRP receptorainak érzékenyítésén keresztül (Durham et al., 2016; Iyengar et al., 2019), mely végső soron további CGRP felszabaduláshoz vezethet a CGRP-t expresszáló agyterületeken. Ez a centrális szenzitizáció egyik lehetséges mechanizmusa, amelyet a CGRP perifériás hatása közvetít, de több más jelenség is hozzájárulhat (Mason et al., 2017; Iyengar et al., 2017, 2019).

A CGRP modellt (Mason et al., 2017) a periorbitalis hiperalgémia és a fénykerülő viselkedés alapján validálták. Mason és munkatársai szerint a CGRP kezelés nem váltott ki szorongást egerekben, így az LDB-ben látott viselkedési anomáliát fotofóbiának tekinthetjük, mely migrén-szerű állapotra utal. A CGRP által kiváltott fénykerülésről azt is tudjuk, hogy nem korrelál a vérnyomással, mely kizárja a vazomotoros mechanizmusokat (Mason et al., 2020).

A CGRP kezelés hatására megemelkedő TRG/FOS és STN/P-CREB immunjel a migrén patogenezis kulcsrégióinak aktiválódására utal (Iyengar et al., 2017; Edvinsson et al., 2020). A CGRP kezelt egerekben megfigyelt megnövekedett IPAG/FOS immunjel a leszálló antinociceptív pályák aktiválódását jelezi, és utal a migrén-szerű fejfájás fellépésére.

A PAG neuromodulációs szerepe a migrénben jól ismert (Napadow et al., 2019; Vila-Pueyo et al., 2019). Annak ellenére, hogy az EWcp a PAG-ba beágyazva található, szerepét migrénben korábban nem vizsgálták. Az EWcp/UCN1 neuronok FOS pozitívításában látott kétszeres növekedés arra utal, hogy a CGRP kezelés a neuronok génexpresszió szintű adaptációt igénylő aktivációját idézi elő (Gaszner et al., 2012; Al-Omari et al., 2023). A CGRP adás után a sejtekben szintén növekvő *Ucn1* mRNS és UCN1 peptid tartalom azt sugallja, hogy több UCN1 peptid szabadul fel. Feltételezzük, hogy a perifériásan beadott CGRP közvetlenül aktiválhatja az EWcp/UCN1 neuronokat a centrálisan felszabaduló CGRP révén, vagy közvetetten, a centrális szenzitizáció eredményeként. A feltehetően növekvő UCN1 felszabadulás közvetlenül befolyásolhatja az STN működését a CRH1R és CRH2R receptorokon keresztül, melyet az STN-ben emelkedő P-CREB immunjel is alátámaszt. Korábbi tanulmányokkal összhangban (Bhatt et al., 2014, 2015) az STN-ben nem figyeltünk meg FOS aktivációt a CGRP kezelés hatására.

Mivel az egéragyban a *Trpa1* mRNS legnagyobb mennyiségben az EWcp-ben fejeződik ki (Kormos et al., 2022), és mivel az irodalom összefüggésbe hozta a TRPA1-et a migrénnel (Souza Monteiro de Araujo et al., 2020; Shibata et al., 2021; Iannone et al., 2022a, 2022b; Spekker et al., 2022; Fila et al., 2023; Masood et al., 2023), célunk volt a *Trpa1* mRNS kifejeződésének vizsgálata az EWcp-ben a migrén modellben. Az RNAscope ISH technikával kimutattuk, hogy az urocorinerg neuronok az EWcp-ben a CGRP kezelt csoportban szignifikánsan magasabb *Trpa1* mRNS transzkriptum számot mutattak, mint a kontroll csoportban. Feltételezzük, hogy a *Trpa1* kationcsatorna upregulációja magasabb kalcium beáramlást eredményezhet, mely növelheti az UCN1 felszabadulást. Ezt a feltételezést támasztják alá eredményeink, amelyek fokozott urocorinerg aktivitásra utalnak, bár ennek kísérletes bizonyítása megerősítésre vár.

Ismert, hogy a STN mellett a DRN is aktiválódik migrénben (Shibata et al., 2022). Az EWcp/UCN1 neuronok beidegzik a DRN-t (Dos Santos Júnior et al., 2015; van der Doelen et al., 2017; Zuniga & Ryabinin et al., 2020), ahol mindkét CRH receptor kifejeződik (Chalmers et al., 1995; Ma et al., 2003; Valentino et al., 2010; van der Doelen et al., 2017). A CRH1R aktivációja a DRN-ben csökkenti a 5-HT felszabadulást, míg a CRH2R jelátvitelnek ellentétes hatása van (Lukkes et

al., 2011; Fox & Lowry, 2013). A csökkent DRN/5-HT tartalom a CGRP kezelt egerekben a 5-HT felszabadulására utal a CGRP beadását követően. Ezt alátámasztja, hogy a migrénes rohamok során megnövekedett centrális 5-HT szinteket találtak (Drummond & Drummond, 2006; Sakai et al., 2008; Deen et al., 2018; Razeghi et al., 2019). Feltételezzük, hogy a CGRP növelte az UCN1 felszabadulást a DRN-ben, amely a DRN/5-HT neuronok CRH2R-jain keresztül végül növelte a 5-HT felszabadulást. Mindazonáltal, nem zárhatjuk ki a CGRP közvetlen hatását a szerotonerg neuronokra sem, mivel ezek is CGRP receptorokat hordoznak (Ma et al., 2003).

A CGRP kezelés csökkentette a TPH2 enzim szintjét a DRN-ben. A TPH2 a központi 5-HT szintézis sebességmeghatározó enzime (Walther et al., 2003), és génpolimorfizmusait összefüggésbe hozták migrénnel (Marziniak et al., 2009; Jung et al., 2010). A krónikus centrális UCN1 mikroinjekció növelte a *Tph2* mRNS kifejeződést a DRN kaudális és dorsális részlegében, míg ellentétes hatást figyeltek meg a ventrolaterális részben (Donner et al., 2020). Ez az eredmény ellentétben áll megfigyeléseinkkel, mivel mi növekvő UCN1 szinteket láttunk, de a TPH2 fehérje tartalom csökkent a CGRP kezelés hatására. Ezt az eltérést magyarázhatják módszertani különbségek, mivel tanulmányunkban a TPH2-t mi fehérje szinten vizsgáltuk. Másrészt, egyetlen CGRP kezelést alkalmaztunk, amely növelte az UCN1 szintet, míg Donner és munkatársai (2021) krónikus UCN1 beadást alkalmaztak. Harmadrészt, a DRN szubdivízióiban látott régióspecifikus CRH2R kifejeződés változás, továbbá az ott ismert stresszexpozió függő CRH1R és CRH2R receptor mennyiség, és az ebből fakadó eltérő ligand hozzáférhetőség a plazmamembránban (Waselus et al., 2009) magyarázhatja a különbséget e vizsgálatok kimenetele között. Összességében az UCN1 DRN szerotonerg neuronokra kifejtett komplex hatása hozzájárulhat a központi 5-HT anyagcsere zavaraihoz migrénben (Drummond & Drummond, 2006; Razeghi et al., 2019).

Mivel a CART és az UCN1 az EWcp-ben teljes kolokalizációt mutat (Zuniga & Ryabini, 2020; Priest et al., 2023), az EWcp/UCN1 abláció után észlelt periorbitalis fájdalomküszöb csökkenés összhangban van egy korábbi tanulmánnyal, ahol az EWcp/CART aktivitás növelése magasabb fájdalomküszöböt eredményezett a talpban. Mindez arra utal, hogy ezek a neuronok modulálják a fájdalmat (Priest et al., 2023).

Az EWcp azon képességét, hogy közvetlen neuroanatómiai kapcsolat révén befolyásolja a migrénnel összefüggő területeket, tovább erősíti az EW és a DRN és STN közötti szignifikáns pozitív funkcionális kapcsolat. Tudomásunk szerint ez az első tanulmány, amely leírja az EW funkcionális kapcsolatát az emberi agyban. Ezen kívül, fMRI vizsgálatunk erős pozitív korrelációt mutatott a migrénes rohamok gyakorisága és az EW funkcionális kapcsolatai között olyan agyterületekkel, amelyek az affektív fájdalom pályák részei, mint a *gyrus angularis*, *gyrus temporalis superior*, *gyrus frontalis medius* valamint *gyrus frontalis inferior pars triangularis* (Jia & Yu, 2017; Ong et al., 2019; Wang et al., 2019). Ez alátámasztja azokat a korábbi eredményeket, melyek miszerint az ezeken az agyterületek fellépő elváltozások hajlamosíthatnak fájdalommal járó kór állapotok, köztük migrén kialakulására.

5.2. Az EWcp/TRPA1 vizsgálata az akut alkoholexpozíció egérmodelljében

Kutatócsoportunk korábban bizonyította a *Trpa1* mRNS jelenlétét az egér és ember UCN1-immunreaktív neuronjaiban az EWcp-ben (Kormos et al., 2022). Jelen tanulmányunkban elektrofiziológiai módszert használtunk annak igazolására, hogy funkcionálisan aktív TRPA1 ioncsatorna van jelen az EWcp-ben.

Korábbi tanulmányok arra utaltak, hogy a TRPA1 ioncsatorna farmakológiai gátlása védő hatású lehet a szemcsesejtek degenerációjával szemben (Koch et al., 2011), azonban ezek a tanulmányok nem igazolták a csatorna jelenlétét szövettani módszerekkel. Nemrégiben az RNAscope *in situ* hibridizációs módszer segítségével kimutattuk, hogy a *Trpa1* transzkript jelen van az EWcp

urocortinerg neuronjaiban. Bizonyítottuk, hogy a TRPA1 funkcionálisan aktív ezekben a neuronokban. Az UCN1-immunreaktív neuronok spontán aktívak és akciós potenciálokat bocsátanak ki nyugalmi membránpotenciálon. Hipotézisünk az volt, hogy a TRPA1 aktiválása ezekben a neuronokban kalciumbeáramlást és membránpolarizációt eredményez, ami növeli a spontán tüzelési frekvenciát. Ezzel összhangban, a JT010, egy szelektív és potens TRPA1 agonista alkalmazása jelentősen növelte az UCN1 immunreaktív neuronok spontán tüzelési frekvenciáját, míg hatástalan volt a szomszédos UCN1-t nem tartalmazó neuronokra. Tudomásunk szerint ez az első bizonyíték arra, hogy a TRPA1-nek funkcionális szerepe van az egéragyban.

A modellünkben alkalmazott akut alkohol expozíció során a vizeletben mért alkoholkoncentrációval igazoltuk, hogy az etanol felszívódása az WT és a *Trpa1* KO egerekben azonos volt. Az etanol és összes metabolitja hatékonyan áthatol a vér-agy gáton (Nurmi et al., 1999; Quertemont & Tambour, 2004), és *in vitro* kísérletekben kimutatták, hogy aktiválják a TRPA1-et (Bang et al., 2007; Wang et al., 2011; Komatsu et al., 2012). Ezért azt feltételezzük, hogy ezek közvetlenül hatnak a TRPA1 receptorokra az EWcp-ben. Az alkoholkezelés utáni növekvő FOS expresszió bizonyítja, hogy az alkohol képes aktiválni az EWcp urocortinerg neuronjait a vad típusú egerekben, ami összhangban van a szakirodalommal (Bachtell et al., 1999; Ryabinin et al., 2001; Weitemier et al., 2001; Zuniga & Ryabinin, 2020). Jelen eredményeink szerint az alkoholkezelt *Trpa1* KO egerekben is megfigyelhető volt a FOS aktiválódása, ami arra utal, hogy a TRPA1 mellett más receptorok/ioncsatornák is hozzájárulhatnak az urocortinerg sejtek alkohol indukálta aktivációjához. Egy másik lehetséges magyarázat az, hogy az alkohol által előidézett FOS aktiváció az EWcp-ben legalább részben egy másik, TRPA1-től független mechanizmus által történik, ami egy másik alkoholérzékeny agyterületből az EWcp urocortinerg sejtjeihez érkező idegi kapcsolaton át valósulhat meg (Ryabinin et al., 1997; da Silva et al., 2013).

A FOS sejtszámokban tapasztalt genotípus hatás hiánya miatt az adatok nem egyértelműen jelzik a TRPA1 szerepét az EWcp-ben. Az etanolkezelés során a vad típusú állatokban megfigyelt *Trpa1* mRNS expressziócsökkenés is erre utal. Valóban jól ismert tény, hogy egy agonista hatása gyakran receptorának downregulációját idézi elő (Ann R Finch et al., 2009). Az a tény, hogy a *Trpa1* transzkriptumok kizárólag az UCN1 tartalmú sejtekben voltak jelen mindkét csoportban, egyrésztől reprodukálta a legutóbbi eredményeinket, miszerint kizárólag az EWcp urocortinerg sejtjei expresszálják a *Trpa1*-et (Kormos et al. 2022), másrészt pedig azt jelzi, hogy az akut alkoholkezelés nem indukálja a *Trpa1* mRNS transzkripcióját a nem urocortinerg EWcp sejtekben.

Az UCN1 peptid tartalom eltért a két genotípus között a sóoldattal kezelt csoportokban. Az UCN1 tartalom jóval magasabb volt a vad típusú egerekben, mint a *Trpa1* KO állatoknál. Az UCN1 peptid tartalom változásainak összehasonlítása az alkoholkezelés során ellentétes dinamikát mutatott: a vad típusú egerekben csökkenést, míg a *Trpa1* KO állatokban növekedést tapasztaltunk. Ez arra utal, hogy az WT egerekben az EWcp/UCN1 neuronok etanol hatására felszabadítják az UCN1-et, míg a *Trpa1* KO egerekben megfigyeltük az UCN1 peptidtartalom növekedését, amely a UCN1 peptid felhalmozódását sugallja, valószínűleg a csökkent felszabadulás miatt. Ezt részben alátámasztják az RNAscope ISH eredményei. Alacsonyabb *Ucn1* mRNS expressziót találtunk az alkoholkezelt *Trpa1* KO egerekben, mint a vad típusú állatoknál. Ez arra utal, hogy a peptid felhalmozódása alacsonyabb mRNS termeléssel jár, ami a lassabb lebomlás miatt következhet be (Gaszner et al., 2009).

Mind a kontroll, mind az alkoholkezelt *Trpa1* KO állatok alacsonyabb *Cart* mRNS expressziót mutattak, mint az vad típusú társaik. Mivel az alacsonyabb *Cart* mRNS expresszió összefügg az alkoholpreferencia csökkenésével (Giardino et al., 2012), folyamatban lévő kísérleteinkben azt vizsgáljuk, hogy ez valóban jellemző-e a *Trpa1* KO egerekre. Sem a *Cart* mRNS expresszió, sem az EWcp/UCN1 neuronok CART peptid tartalma nem változott az akut alkoholkezelés során egyik genotípus esetében sem, ami arra utal, hogy az akut alkohol expozíció nem gyakorol jelentős hatást az EWcp/CART rendszerre. Tekintettel arra, hogy a CART jelentőségére ismert addikcióban

(Vicentic és Jones, 2007, Zuniga & Ryabinin 2020; Zhi Yi Ong & Gavan P. McNally, 2020), azt feltételezzük, hogy egy krónikus alkoholexpozíciós modell bizonyíthatja az EWcp/CART szerepét alkoholabúzusban.

A fent tárgyalt megfigyelések összességében arra utalnak, hogy a TRPA1 jelátvitel szerepet játszhat mind az UCN1 peptid tárolásában az EWcp neuronokban, mind pedig az onnan történő felszabadulásukban. Korábbi tanulmányunkban azt is kimutattuk, hogy a funkcionálisan aktív TRPA1 hiánya hatással van az UCN1 tartalomra, mind a depresszió (Kormos et al., 2022), mind a poszttraumás stressz zavar modelljeiben (Konkoly et al., közlés alatt). Ezekben a modellekben a genotípussal összefüggő különbséget észleltünk a bazális *Ucn1* mRNS (de nem a peptid) tartalomban a naív kontroll állatokban (Kormos et al., 2022, Konkoly et al., 2022). Ezzel szemben, a jelen tanulmányban a sóoldattal injektált kontrollok nem mutattak genotípus-különbséget az *Ucn1* mRNS expressziójában, de a peptidnél igen. A különbséget a mag kifejezett akut stresszérzékenységgel (Gaszner et al., 2004, Kormos et al., 2016) és az ip. injekciós kezelés stresszhatásával magyarázhatjuk.

A TRPA1 aktiválódása a membránban kalcium beáramlást eredményez, több intracelluláris jelátviteli útvonalat is elindít (Song et al., 2019). Elektrofiziológiai kísérleteink ezzel összhangban azt mutatták, hogy a TRPA1 aktiválása növeli az UCN1 expresszálo neuronok spontán tüzelési frekvenciáját. A TRPA1 ioncsatorna nyílásának hatására emelkedő intracelluláris kalcium szint fokozhatja az exocitózist a neuropeptidet tartalmazó vezikulákból. További, farmakológiai eszközöket és elektrofiziológiai módszereket kombináló kísérletek szükségesek annak meghatározására, hogy pontosan hogyan járul hozzá a TRPA1 jelátvitel az UCN1 peptid tartalmának és felszabadulásának szabályozásához. Tekintettel arra, hogy habár a két peptid kolokalizáltan jelenik meg az EWcp neuronokban (Kozicz, 2003; Priest et al., 2023, Li and Ryabinin 2022), a TRPA1 hiánya csak az UCN1 mennyiségét befolyásolta, de a CART tartalmat nem érintette. Ez alapján úgy tűnik, hogy a TRPA1 ioncsatornák szerepe UCN1 specifikus lehet a peptiderg működés szabályozásában.

6. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- Igazoltuk a CGRP receptor komponensek expresszióját az egér és humán EWcp és DRN területén.
- Azonosítottunk egy EWcp-ből kiinduló közvetlen urocortinerg projekciót az STN-be.
- Kimutattuk az UCN1 receptorok (CRH1R és CRH2R) kifejeződését az STN hátulsó szarvának I-III laminájában.
- Viselkedési és morfológiai vizsgálatokkal bizonyítottuk a CGRP migrén egérmódel validitását.
- Igazoltuk az UCN1 neuronok aktivációját CGRP migrén modellben, növekedett UCN1 peptid tartalommal és *Ucn1*, valamint *Trpa1* mRNS expresszióval az EWcp-ben, mely csökkent 5-HT és TPH2 tartalommal járt együtt a DRN-ben.
- Bizonyítékot szolgáltatunk az EWcp/UCN1 neuronok szelektív ablációjának a periorbitális fájdalomküszöb csökkentésére kifejtett hatására.
- Pozitív funkcionális kapcsolatokat tártunk fel a humán EWcp és az STN, valamint a DRN között fMRI vizsgálattal.
- Igazoltuk a TRPA1 ioncsatorna funkcionális aktivitását az egér EWcp/UCN1 neuronokon elektrofiziológiai vizsgálattal.
- Kimutattuk a *TRPA1* mRNS expresszióját humán EWcp/UCN1 neuronokon.
- Bizonyítottuk az EWcp/UCN1 expresszálo neuronok aktivációját akut alkoholexpozíció egérmódeljében csökkent *Trpa1* mRNS és UCN1 peptid tartalommal.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Összefoglalva, eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy az EWcp/UCN1 neuronoknak szabályozó szerepük van a migrénben, jelentős humán transzlációs relevanciával, és hogy a TRPA1 ioncsatornák szerepet játszhatnak az UCN1 tárolásának és felszabadulásának szabályozásában, ami befolyásolhatja az alkoholfogyasztást.

8. PUBLIKÁCIÓK

A disszertáció alapját képező publikációk:

Al-Omari A, Kecskés M, Gaszner B, Biró-Sütő T, Fazekas B, Berta G, Kuzma M, Pintér E, Kormos V. Functionally active TRPA1 ion channel is downregulated in peptidergic neurons of the Edinger-Westphal nucleus upon acute alcohol exposure. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. 2023 Jan 10;10:1046559. doi: 10.3389/fcell.2022.1046559. PMID: 36704197; PMCID: PMC9872022. **IF: 4.6; Q1**

Al-Omari A, Gaszner B, Zelena D, Gecse K, Berta G, Biró-Sütő T, Szocsics P, Maglóczy Z, Gombás P, Pintér E, Juhász G, Kormos V. Neuroanatomical evidence and a mouse calcitonin gene-related peptide model in line with human functional magnetic resonance imaging data support the involvement of peptidergic Edinger-Westphal nucleus in migraine. **Pain**. 2024 Jun 14. doi: 10.1097/j.pain.0000000000003294. Epub ahead of print. PMID: 38875125. **IF: 5.9; Q1; D1**

A szerző egyéb publikációi:

Konkoly J, Kormos V, Gaszner B, Sándor Z, Kecskés A, **Al-Omari A**, Szilágyi A, Szilágyi B, Zelena D, Pintér E. The Role of TRPA1 Channels in the Central Processing of Odours Contributing to the Behavioral Responses of Mice. **Pharmaceuticals** (Basel). 2021 Dec 20;14(12):1336. doi: 10.3390/ph14121336. PMID: 34959735; PMCID: PMC8703823. **IF: 5,21; Q1**

Kormos V, Kecskés A, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, **Al-Omari A**, Hegedüs D, Renner É, Palkovits M, Zelena D, Helyes Z, Pintér E, Gaszner B. Peptidergic neurons of the Edinger-Westphal nucleus express TRPA1 ion channel that is downregulated both upon chronic variable mild stress in male mice and in humans who died by suicide. **Journal of Psychiatry and Neuroscience** 2022 May 4;47(3):E162-E175. doi: 10.1503/jpn.210187. PMID: 35508327; PMCID: PMC9074809. **IF: 4.3; Q1**

Orján EM, Kormányos ES, Fűr GM, Dombi Á, Bálint ER, Balla Z, Balog BA, Dágó Á, Totonji A, Bártai ZI, Jurányi EP, Ditrói T, **Al-Omari A**, Pozsgai G, Kormos V, Nagy P, Pintér E, Rakonczay Z Jr, Kiss L. The anti-inflammatory effect of dimethyl trisulfide in experimental acute pancreatitis. **Scientific Reports** 2023 Oct 5;13(1):16813. doi: 10.1038/s41598-023-43692-9. PMID: 37798377; PMCID: PMC10556037. **IF: 3.8; Q1; D1**

Kormos V, Kriszta G, **Al-Omari A**, Kovács-Rozmer K, Konkoly J, Pozsgai, Pintér E. TRP Channels as Therapeutic Targets. Chapter: TRP channels as potential target molecules for pharmacotherapy of neurological diseases. Elsevier, ISBN: 9780443186530 (accepted, in press)

Kumulatív IF: 23.81

MTMT azonosító: 10082296

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném kifejezni legmélyebb hálámat Dr. Gaszner Dr. Kormos Viktóriának, témavezetőmnek, akinek szakértelme, türelme, mentorálása és korlátlan támogatása elengedhetetlen volt számomra. Őszinte visszajelzései és konstruktív kritikái alakították tudományos fejlődésemet. Nagyon szerencsés vagyok, hogy lehetőségem volt az irányítása alatt dolgozni.

Hálás vagyok Prof. Dr. Pintér Erikának, a Doktori Iskola vezetőjének és intézetünk vezetőjének, tudományos tanácsaiért és támogatásáért tanulmányaim során. Legmélyebb hálámat fejezem ki Dr. Gaszner Balázsnak kivételes hozzájárulásáért, amely nagyban gazdagította e projekt minden részét.

Szeretném megköszönni az előbírálói bizottság tagjainak az iránymutató visszajelzéseit és a konstruktív kritikai észrevételeit.

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni Biró-Sütő Tündének jelentős segítségéért a laboratóriumi munkában, Prof. Dr. Zelena Dóranak a sztereotaxiás műtétek elvégzéséért, Dr. Kecskés Miklósnak az elektrofiziológiai kísérletek megtervezéséért és kivitelezéséért, Prof. Dr. Maglóczky Zsófiának, Dr. Gombás Péternek, és Dr. Szocsics Péternek az emberi agyminták biztosításáért, Dr. Juhász Gabriellának és Dr. Gecse Kingának az fMRI tanulmány elvégzéséért, Dr. Berta Gergelynek a konfokális mikroszkópnál nyújtott segítségéért, Dr. Kuzma Mónikának a vizelet alkohol koncentrációjának méréséért és Dr. Fazekas Balázsnak TDK munkájáért. Hálás vagyok azoknak a munkatársaknak és támogatóknak, akik Pécsi Tudományegyetem Orvostudományi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében elősegítették a hatékony kutatási környezet kialakítását.

Szeretném kifejezni őszinte hálámat és elismerésemet családomnak az állandó szeretetükért, szilárd támogatásukért és kitartó bátorításukért, amely még a legmélyebb pillanatokban is világosságot árasztott az úton.

Végül, köszönetemet fejezem ki annak a számtalan ismerősnek, barátnak és kollégának, akik támogattak minden kedvességükkel. A hozzájárulásotok, bármilyen kicsi is, nem maradt észrevétlen, és mélyen értékeltem.

Ez a dolgozat a fent említett mindenki közös erőfeszítéseinek tanúbizonysága, és hálás vagyok mindenkinek a szerepért, amit betöltött.