

**A pigmentáción túl: A POMC-eredetű opioid jelátvitel szerepe a sugárzási
fáradtságban, addikcióban és a fájdalomban**

Hermann Andrea, MSc.

PhD értekezés

Szeged

2025

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi
Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola

**A pigmentáción túl: A POMC-eredetű opioid jelátvitel szerepe a sugárzási
fáradtságban, addikcióban és a fájdalomban**

PhD értekezés

Hermann Andrea, MSc.

Felügyelő: Hideghéty Katalin MD, PhD, DSc.

Onkoterápiás osztály

Szegedi Tudományegyetem

Szeged, Magyarország

2025

A szakdolgozat témájához szorosan kapcsolódó cikkek

- I. **Hermann AL**, Fell GL, Kemény LV, Fung CY, Held KD, Biggs PJ, Rivera PD, Bilbo SD, Igras V, Willers H, Kung J, Gheorghiu L, Hideghéty K, Mao J, Woolf CJ, Fisher DE. β -Endorphin mediates radiation therapy fatigue. Sci Adv. 2022. **IF: 13**
- II. Kemény LV, Robinson KC, **Hermann AL**, Walker DM, Regan S, Yew YW, Lai YC, Theodosakis N, Rivera PD, Ding W, Yang L, Beyer T, Loh YE, Lo JA, van der Sande AAJ, Sarnie W, Kotler D, Hsiao JJ, Su MY, Kato S, Kotler J, Bilbo SD, Chopra V, Salomon MP, Shen S, Hoon DSB, Asgari MM, Wakeman SE, Nestler EJ, Fisher DE. Vitamin D deficiency exacerbates UV/endorphin and opioid addiction. Sci Adv. 2021. **IF: 13.934**
- III. Robinson KC, Kemény LV, Fell GL, **Hermann AL**, Allouche J, Ding W, Yekkirala A, Hsiao JJ, Su MY, Theodosakis N, Kozak G, Takeuchi Y, Shen S, Berenyi A, Mao J, Woolf CJ, Fisher DE. Reduced MC4R signaling alters nociceptive thresholds associated with red hair. Sci Adv. 2021. **IF: 13.934**

A szakdolgozat témájához szorosan nem kapcsolódó cikkek

- I. Mujahid N, Liang Y, Murakami R, Choi HG, Dobry AS, Wang J, Suita Y, Weng QY, Allouche J, Kemeny LV, **Hermann AL**, Roider EM, Gray NS, Fisher DE. A UV-Independent Topical Small-Molecule Approach for Melanin Production in Human Skin. Cell Rep. 2017. **IF: 8.03**

A teljes publikációk száma: 4

Kumulatív impakt faktor (tézishez kapcsolódóan): 40.868

Összesített impakt faktor (összesen):48.898

1. BEVEZETÉS

A pro-opiomelanocortin (POMC) egy multifunkcionális prekursor fehérje, amelynek fontos élettani szerepe van endokrinológiában, de a bőr fiziológiájában is számos élettani folyamatot befolyásol. Az elsősorban az elülső agyalapi mirigyben szintetizálódó POMC poszttranszlációs hasításon megy keresztül, és számos aktív peptidet, nevezetesen adrenokortikotrop hormont (ACTH) és melanocita-stimuláló hormont (MSH) állít elő. Ezek a származékok különböző hatásokat fejthetnek ki, a stresszválasz modulációjától az immunszabályozásig és az energiahomeosztázisig. A bőrben a POMC egyik legismertebb funkciója a pigmentációban betöltött szerepe az α -MSH a hatása révén. Az α -MSH a melanocortin 1 receptorhoz (MC1R) kötődik a melanocitákon, serkentve az eumelanin termelését, amely a bőr és a haj barna és fekete színéért felelős pigment. Az MC1R gén mutációi vagy polimorfizmusai megváltozott pigmentációhoz vezethetnek, ahogyan az a vörös hajú és világos bőrű egyéneknél megfigyelhető, akikben a feomelanin-termelés irányába tolódik a melanin szintézis elégtelen MC1R szignalizáció következtében.

POMC a bőrbiológiában

Szisztémás endokrin funkcióin túl a POMC jelentős szerepet játszik magában a bőrben is. Az epidermiszben a keratinociták és a melanociták egyaránt képesek POMC-t és származékait, köztük α -MSH-t és ACTH-t termelni. Ezek a helyileg termelt peptidek hozzájárulnak a melanogenezishez, és szerepet játszanak a gyulladásos válaszok modulálásában és az ultraibolya (UV) sugárzásnak való kitettséget követő DNS-javító mechanizmusok elősegítésében. Ez arra utal, hogy a POMC-ból származó peptidek védő, autokrin/parakrin szerepet játszanak a bőr homeosztázisának fenntartásában.

A POMC endokrin és szisztémás szerepe

Az endokrin rendszerben a POMC-ból származó ACTH döntő fontosságú a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese (HPA) tengely szabályozásában, befolyásolja a kortizoltermelést, és ezáltal modulálja a stresszreakciókat. Ezenkívül a hipotalamuszban lévő POMC-neuronok részt vesznek az energiaegyensúly és az étvágy szabályozásában, az α -MSH a központi melanocortin-receptorokra hatva csökkenti a táplálékfelvételt. A POMC-feldolgozás vagy a receptorok jelátviteli útvonalainak zavarait metabolikus rendellenességekkel, pl. elhízással és mellékveseelégtelenséggel hozták összefüggésbe.

Bár a POMC-eredetű peptidek sokrétű szerepet töltenek be számos élettani folyamatban, a bőrből származó POMC-termelés szerepe még mindig fontos kutatási területet jelent, különösen az összetett viselkedésekben, amelyekben a bőrnek jelentős szerepe lehet, mint például a fáradtságérzés, az addiktív magatartások és a nocicepció szabályozása.

1.1. Sugárzás okozta fáradtság és a bőr

Számos sugárterápiában részesülő daganatos beteget frakcionált külső sugárkezeléssel kezelnek, amelynek során egy külső forrásból származó ionizáló sugárzás egy meghatározott anatómiai helyen elhelyezkedő szilárd daganatot céloz meg. A sugárkezelést követően gyakran megfigyelhető fáradtságérzés, amely rontja a daganatos betegek életminőségét. Bár régóta ismert jelenségről van szó, a sugárzás okozta fáradtságot kiváltó mechanizmus(ok) továbbra sem teljesen ismertek. Az emlődaganatban szenvedő betegek körében a teljes emlő besugárzását kapó betegeknél magasabb a kezeléssel összefüggő fáradtság, mint a részleges emlő besugárzást kapó betegeknél, amely kisebb bőrfelületet érintő besugárzást jelent.

A közelmúltban végzett tanulmányok azonosítottak egy olyan, az ultraibolya (UV) fénynek való kitettséget követően aktiválódó bőrfolyamatot, amelyben az epidermális keratinociták aktiválják a p53 fehérjét, ami transzkripcionálisan aktiválja a pro-opiomelanokortin (POMC) expresszióját, amely poszt-transzlációsan bioaktív peptidekké hasad, beleértve a pigmentációt indukáló α -MSH hormont és az endogén opioid β -endorfin-t. A β -endorfin szérumszintjének növekedése UV-expozíciót követően ópiát-szerű hatásokat eredményez, amit a helyi UV-expozíciót követő szisztémás β -endorfin emelkedése okoz. Az opiát gyógyszerek szedációt okozhatnak, ami gyakran együtt jár a fáradtság érzésével. Ez felvetette a kérdést, hogy vajon az ionizáló sugárzás által kiváltott β -endorfin emelkedés hozzájárulhat-e a sugárkezeléssel járó fáradtságérzés kiváltáshoz.

1.2. D-vitamin és szerepe a bőr-endorfin hatásaiban

Humán vizsgálatok azt sugallják, hogy az ultraibolya (UV) sugárzás olyan jellegű függőséget okozhat, amelynek jellemzői erősen emlékeztetnek az opioidok okozta dependenciára. Új preklinikai vizsgálatok egy endogén opioidok által közvetített, függőséghez hasonló útvonalat azonosítottak, amelyet az UV által kiváltott β -endorfin szintézis vált ki. Ismeretes, hogy az UV-függő D-vitamin (VitD) szintézis fenntartása érdekében evolválódott a humán bőr pigmentációja az elmúlt 20-30.000 évben, így a halványabban pigmentált bőr engedte a D vitamin szintézisét olyan földrajzi régióban is, ahol az éves UV sugárzás jelentősen kisebb, mint az egyenlítő körül. Ez demonstrálja a D vitamin fontosságát az emberi bőr pigmentációjának meghatározásában. Mi feltételeztük, hogy az endorfin által közvetített UV-kereső viselkedést a VitD-hiány vezérelheti a VitD-szintézis maximalizálása érdekében. Ebben az esetben a VitD-hiány érzékennyé teheti az egyéneket az exogén (UV-független) opioidokra

is, hozzájárulva a manapság rendkívül gyakori opioidfüggőség kialakulásához. Hipotézisünk szerint létezhet egy negatív visszacsatolás, amelynek során az D vitamin szintjének helyreállása csökkenti az UV/opioid-kereső viselkedést, mikor D vitamin hiány már nem áll fent. Ez a visszacsatolás a VitD-szintézis maximalizálásának evolúciós előnyét hordozhatja magában. Az UV-expozícióval ellentétben azonban az exogén opioidhasználatot nem követi a VitD-szintézis (és annak opioid-szuppresszív hatása), ami hozzájárulhat egy maladaptív addiktív zavarhoz, mely az opioid-függőség kialakulásának rizikóját fokozhatja.

1.3. Vörös haj és nocicepció

A vörös hajú emberek és egerek megváltozott fájdalomküszöböt, megnövekedett lokális fájdalomcsillapító igényt és fokozott választ mutatnak az opioid fájdalomcsillapítókra. A vörös szőrzetet mindkét fajban a melanokortin 1 receptor (MC1R), a melanocitákon, a bőr pigmenttermelő sejtjein expresszálandó $G\alpha_s$ -kapcsolt receptor funkcióvesztéses allélváltozata okozza. Az MC1R mutáns vörös szőrű egerek kevésbé érzékenyek a termikus, mechanikus és kémiai ingerekre, azonban ennek a megváltozott nocicepciónak a mechanizmusa nem ismert. Ez arra ösztönzött minket, hogy megvizsgáljuk az MC1R és a nocicepció modulációja közötti mechanisztikus kapcsolatot.

A vörös hajú genetikai háttér megváltozott nocicepciójára vonatkozó korábbi bizonyítékok alapján feltételeztük, hogy az endogén opioid és melanokortin jelátvitel megváltozhat az vörös *Mc1r^{e/e}* egerekben, ami magasabb nociceptív küszöbértékeket eredményezhet.

2. MÓDSZEREK

2.1. A besugárzás okozta fáradtság vizsgálatának módszerei

Állatok

Minden felhasznált egér 8 hetes volt, C57BL/6 háttérrel (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Ezenkívül olyan egereket használtunk, amelyekből hiányzott a POMC polipeptid C-terminális vége a POMC gén mindkét példányában bekövetkezett mutáció miatt, ami a β -endorfin hiányát eredményezte. A keratinocita-specifikus p53-expresszió ablálására a p53 floxált alléljával rendelkező egereket kereszteztük a Keratin 14 promóter által vezérelt Cre-rekombinázt expresszáló törzzsel. A *Vdr^{-/-}* egereket M. Damay biztosította.

A patkányokkal végzett open-field aktimétriás kísérletekhez 8 hetes hím Sprague-Dawley patkányokat (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) használtunk. Minden

állatkísérletet az intézményi irányelveknek és az intézményi állatgondozási és -használati bizottság által jóváhagyott etikai engedélyeknek megfelelően végeztünk.

Az egér farok besugárzását Cs-137 sugárforrással (MDS Nordion) ellátott Gammacell 40 Exactorral végeztük. Patkányok farok besugárzását egy Siemens Stabilipan 2 besugárzóval végeztük, amely 250 kVp-nál, 0,4 mm Cu HVL-rel és 1,89 Gy/perc dózisteljesítménnyel működött, vagy egy Precision X-ray 225 kVp készülékkel, 0,5 mm Cu sugárzással és 2,07 Gy/perc dózisteljesítménnyel. A cső kimeneti teljesítménye rendszeresen ellenőrzés alatt volt, a röntgensugár-dozimetria a National Institute of Standards and Technology szabványai szerint történt.

A vérvételhez az állatokat egy standard rögzítőbe helyeztük, és 100 μ L vért vettünk a farokvénából EDTA-t tartalmazó mikrovettás csövekbe 0,6 TIU aprotininnel. A mintákat 4°C-on 3500 RPM-en 20 percig centrifugáltuk, majd a plazmát külön csövekbe gyűjtöttük, és a β -endorfin méréséig – 80°C-on tároltuk. A vért hetente egyszer vettük le a napi farokbesugárzás előtt. A β -endorfin mérése radioimmunoassay-vel (Phoenix Pharmaceuticals) történt. A Straub-farok mérése a korábban leírtak szerint történt.

Az egerek mechanikai nociceptív küszöbérték-vizsgálatnak vetettük alá a von Frey-teszt és a Hot-plate teszt segítségével, a korábban leírtak szerint.

Open-field aktimetria

Nyolchetes Sprague-Dawley patkányokon nyílt terepi (Open-field) aktimetriás vizsgálatot végeztünk. A vizsgálatot a fényciklus alatt végeztük reggel 8 és este 7 óra között. A csoportokat lehetőség szerint kezelések szerint, kezelési idő szerin is randomizáltuk, így minden csoport egyforma valószínűséggel került vizsgálatra a reggeli/délutáni órákban. A készülék egy 17" x 17" méretű, plexifalakkal és nyitott tetejű kamrából áll, amely három, 16 sugárból álló, mozgásérzékelővel és egy számítógéppel van felszerelve (Med Associates, St. Albans, VT). Az állatok hetente egyszer estek át aktimetriás vizsgálaton.

UV besugárzás

Az egereket 1 nappal a sugárterhelés kezdete előtt hátulról leborotváltuk. Az egereket 2 hetente egyszer újraborotváltuk, vagy korábban, amint a szőrzet foltokban visszanőtt. Az UV-indukált fájdalomcsillapítás értékeléséhez az UV-expozíció előtt az alap fájdalomküszöböt meghatároztuk. Ezután az egereket naponta 50 mJ UVB sugárzásnak tettük ki (G15T8E UVB izzókkal, amelyek 305-310 nm-es csúcsemisszióval rendelkeztek) a délutáni órákban, és az

analgéziát az alábbiakban leírtak szerint vizsgáltuk. Az UV CPP vizsgálatához az eljárásokat a leírtak szerint követtük.

Kvantitatív polimeráz láncreakció és Western blot agyi mintákból

A nucleus accumbens (NACC) és a ventrális tegmentális terület (VTA) minták kinyeréséhez az egereket intraperitoneálisan morfiummal (5 mg/kg) vagy sóoldattal injektáltuk, majd az injekciókat követően különböző időpontokban (30, 60, 90 vagy 180 perc) cervicalis diszlokációval euthánázia történt. A sóoldatos injekciót kapott egereket 60 perccel az injekció beadása után elaltattuk és kontrollcsoportként használtuk őket az összes morfínnal kezelt csoporthoz. Az agyakat azonnal lefagyasztottuk izopentánban és -80°C-on tároltuk. Az agyagyi koronális metszeteiből micropunchokat készítettünk mind a NACC, mind a VTA esetében.

PAG kanülálás

A kanüláláshoz az egereket izofluránnal altattuk. A kanülöket úgy pozícionáltuk, hogy a ventrális laterális PAG-ot célozzák (a koordinátákat bregma -4,5 mm és laterális 0,5 mm) egy egyedi készítésű infúziós rendszerrel (P1 Technologies, VA, USA). Az egyedi készítésű vezető kanülöket 2,2 mm hosszúságúra vágtuk. A PAG-on belüli injekciókhoz egy 2,5 mm hosszúságú belső kanült használtunk a foszfát-pufferelt sóoldat (PBS), naloxon vagy melanotán beadására izoflurán-anesztéziában, 2µl térfogatban. A nociceptív küszöbértékeket ezután a hot-plate teszt segítségével mértük. A kísérlethez ugyanazokat az állatokat használtuk az összes farmakológiai szer tesztelésére.

cAMP mérések

Az RPHN-eket (Lonza, R-HTH-507) POLI-D-LIZIN és laminin bevonatú lyukakba helyeztük, lyukanként 50 000 sejt sűrűséggel. Az RPHN-eket primer neuron növekedési táptalajban (Lonza, CC-3256) tenyésztettük, amely növekedési kiegészítőket (Lonza, CC-4462) tartalmazott. A táptalajt 48-96 óránként cseréltük. A sejtek kihelyezését követő 11. napon 30 percig szérumszerű éhezést végeztünk, majd a sejteket először 1 µM DAMGO-val vagy PBS-szel kezeltük 7,5 percig, majd 1 µM [Nle4,D-Phe7]-α-MSH-val (M8764, Sigma-Aldrich) vagy vízzel (vehicle kontroll) 10 percig. A sejteket 37°C-on inkubáltuk a kezelések alatt. Tíz perccel a [Nle4,D-Phe7]-α-MSH vagy kontroll (víz) kezelés után a sejteket lizáltuk, és a cAMP-GLO Assay (V1501, Promega, WI, USA) cAMP-méréshez a gyártó utasításai szerint dolgoztuk fel.

Statisztika

A statisztikai elemzésekhez a Prism 8.0-t használtuk. A kísérletek elemzéséhez 2-way ANOVA-t használtunk a Holm-Šídák többszörös összehasonlítási teszttel, valamint csoportok között T-tesztet végeztünk.

3. EREDMÉNYEK

Annak érdekében, hogy az összes projektet teljeskörűen bemutassam az Eredmények részben, utalok néhány korábbi eredményre is, amelyek megosztott első szerzős kéziratomban jelentek meg. Azonban ezen eredmények ábráit nem használtam ebben a disszerzációban, mivel azokat a kollégám és társ-első szerzőm, Dr. Gillian Fell végezte - ezen eredményekre korábban végzett eredményekként referálok a továbbiakban. Az említett korábbi eredmények ismertetése azonban fontos ahhoz, hogy teljes mértékben értékelni lehessen az ebben a szakdolgozatban szereplő, általam elért összes eredményt.

3.1. A bőr β -endorfin kiválthatja a sugárzás okozta fáradtságot

A farok helyi besugárzása fáradtsághoz hasonló viselkedést vált ki patkányokban a plazma β -endorfin és az opioid fenotípusok emelkedésével együtt.

Korábban munkacsoportunk először arra volt kíváncsi, hogy a β -endorfin szintje szisztémásan megemelkedik-e a farok besugárzásával végzett kezelések hatására. A plazma β -endorfin szintje a napi farokbesugárzás megkezdése után jelentősen megemelkedett, és egy héttel a besugárzás befejezése után visszatért a kiindulási szintre. A plazma β -endorfin nem emelkedett szignifikánsan a sugárzást nem kapó csoportban a kísérlet során, ami arra utal, hogy a sugárzás beadásához szükséges technikai eljárások nem stresszválasz kiváltásával idézték elő az endorfinszint emelkedését. Korábban azt is megvizsgálta csoportunk, hogy ez a sugárkezelési protokoll okozhat-e fáradtsághoz hasonló tüneteket, az emberi állapot modelljeként. Megfigyelték, hogy a besugárzást követően a patkányok fokozatosan nyugodtabbá, kevésbé aktívvá váltak, amit a nyílt terepi (open-field) aktimetriával számított mozgásmérések is demonstráltak.

E fáradtság-szerű fenotípus opioidfüggőségének vizsgálatához korábban 10mg/kg naloxon intraperitoneális beadásával előkezelték a patkányokat az aktimetriás vizsgálat előtt. Annak ellenére, hogy a plazma β -endorfinjának sugárzás által kiváltott emelkedése fennmaradt, a naloxon megakadályozta az a sugárzás által kiváltott aktivitáscsökkenést. A

kontroll, nem besugárzott patkányok nem mutattak változást az aktivitásban vagy a plazma β -endorfin szintjében. Ezek azt sugallták, hogy a sugárzás okozta fáradtság a β -endorfin szisztémás emelkedésével jár, ami ópiátreceptor-antagonista adásával csökkenthető.

Mivel mind a β -endorfin szisztémás emelkedését, mind a szisztémás ópiátok emelkedését többféle viselkedési hatással hozták összefüggésbe, feltettük a kérdést, hogy a plazma β -endorfin ionizáló sugárzás után megfigyelt emelkedése összefüggésbe hozható-e más, az opioid jelátvitellel kapcsolatos fenotípusokkal is. Exogén ópiátok beadásával a rágcslók μ -opioid receptor-függő nociceptív küszöbérték-emelkedést és Straub-fenotípust mutattak, ami a farok tövében lévő sacrococcygeus dorsalis izom központi μ -opioid receptor-függő összehúzódását jelenti, ami a farok merevségét és megemelkedését eredményezi. A farok besugárzását követően megfigyeltük a Straub-farok, valamint a nociceptív küszöb emelkedését is.

Tekintettel arra, hogy a perifériás β -endorfin szintézisre szükség van ezekben az ópiát-szerű fenotípusokban, megvizsgáltuk a perifériás idegrendszer szerepét a fáradtsághoz hasonló viselkedésben. Mivel korábban megfigyeltük, hogy a vér-agy gáton átjárható antagonistá naloxon patkányokban képes megakadályozni a fáradtsághoz hasonló viselkedést, ezért a vér-agy gáton átjárhatatlan metilnaltrexon vegyületet vizsgáltuk, amely perifériásan beadva csak a perifériás opioidreceptorokat blokkolja. A perifériás metilnaltrexon azonban nem akadályozta meg a fáradtsághoz hasonló viselkedés egyik végpontjának (sebesség, nem mozgással töltött idő és megtett távolság) kialakulását sem, ami arra utal, hogy a központi opioid jelátvitel kritikus a fáradtsághoz hasonló viselkedés közvetítésében.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a minimálisan átható, helyi, krónikus besugárzás növelheti a β -endorfin szisztémás emelkedését és fáradtsághoz hasonló viselkedést idézhet elő, számos más ópiát-fenotípus mérhető változásával együtt.

A plazma β -endorfin szintjének emelkedése farok-sugárzott egerekben.

A sugárzás által kiváltott vér β -endorfinszint emelkedés mögött meghúzódó mechanizmusok tisztázására több genetikai egérmodellt használtunk. Az egerek ismertén paradox hiperlokomotív válaszokat mutatnak az ópiátokra, ellentétben a patkányokkal és az emberekkel, ezért nem jelentenek ideális modellrendszert a bőrből származó endogén opioidok részvételének vizsgálatára a farok-besugárzás által kiváltott fáradtságmodellben. Továbbá, korábbi megfigyelések szerint a β -endorfin nem változtatja meg a lokomotoros aktivitást egerekben.

Korábban napi farok besugárzással kezeltünk egereket (a test árnyékolásával, hasonlóan a fenti patkányvizsgálatokhoz), és 6 hét után a 2 csoportot kölcsönösen terápia váltáson esett át az ionizáló sugárzás adása, illetve nem adása között. A plazma β -endorfin szintje két héttel a napi farok besugárzás megkezdése után jelentősen megemelkedett, és egy héttel a farok besugárzás abbahagyását követően visszatért a kiindulási szintre. A plazma β -endorfin nem emelkedett szignifikánsan sugárzás hiányában, de a farok besugárzás megkezdésekor a korábban nem kezelt csoportban a β -endorfin után szignifikánsan emelkedett.

Bár az egerek farkán a sugárzás hatására következetes hiperpigmentációt tapasztaltunk, a patkányok farkán nem tapasztaltunk hiperpigmentációt a sugárzás hatására, mivel a Sprague-Dawley patkányok a tirozináz génben olyan mutációt hordoznak, amely albínóvá teszi őket. Ez a miszense mutáció (R299H) minden albínó patkánytörzsben konzerválódott, és leírták az I. típusú oculocutan albinizmusban szenvedő betegeknél. A tirozináz aktivitás hiánya miatt várható, hogy e patkányok melanocitái képtelenek pigmentet termelni, annak ellenére, hogy a POMC-eredetű MSH aktiválja őket. Összességében eredményeink összhangban vannak a korábbi megfigyelésekkel, miszerint az ionizáló sugárzás DNS-károsodási válaszokat indukál, amelyek az UV-sugárzáshoz hasonlóan p53 által közvetített downstream hatásokat válthatnak ki.

A helyi ionizáló sugárzás opioid-mediált viselkedést indukál, párhuzamosan a plazma β -endorfin emelkedésével, amelyet a farmakológiai opioid-antagonizmus gátol.

Korábban feltettük a kérdést, hogy a plazma β -endorfinban megfigyelt növekedés funkcionálisan jelentős-e egerekben. A patkányoknál tapasztaltakhoz hasonlóan megfigyeltük, hogy a farok besugárzott egereknél a Straub-farok jelet mutatják. A jel a besugárzás megkezdését követő négy héten belül észlelhető volt, és a farok a besugárzás leállítását követő egy héten belül normalizálódott, míg a kezdetben nem kezelt kontrollok nem mutatták a Straub-phenotípust, de a farok besugárzásának megkezdése után a Straub-phenotípus kialakult. A besugárzott állatokban a Straub-jelenség naloxon beadásával megelőzhető volt, sóoldattal azonban nem, ami egy endogén opioid útvonal részvételére utal. Bár ezekben a vizsgálatokban hím állatokat használtak, külön összehasonlítottuk a farok besugárzásának hatásait nőstény egereken, és azonos hatásokat figyeltünk meg.

Korábbi vizsgálatokban a mechanikai (von Frey-féle vizsgálat) és a termikus (hot-plate vizsgálat) fájdalomérzékenységet is mértük a farok helyi besugárzása során. Mind a mechanikus nociceptív küszöbértékek, mind a termikus nociceptív válaszlátenciák jelentősen megnöttek a farok besugárzását követően, és a farok besugárzás leállítását követő 1 héten belül

visszatértek a kiindulási szintre. Ezek a változások a plazma β -endorfin szintjének növekedésével párhuzamosan zajlottak. A fájdalomküszöb-vizsgálati ülés előtt naloxonnal, ópiát-antagonistával kezelt, farokbesugárzott egereknél a plazma β -endorfinszint emelkedése ellenére nem mutatkozott fájdalomküszöb-növekedés.

A sugárzás által kiváltott opioid-mediált viselkedés függ a β -endorfin és a keratinocita-specifikus p53 expressziótól

Annak tesztelésére, hogy a sugárzás által kiváltott változások az érzékszervi nociceptív küszöbértékben függenek-e a β -endorfintól, β -endorfin knockout egereket vizsgáltunk. A β -endorfin null egerek nem mutattak szignifikáns változást a mechanikus vagy termikus fájdalomküszöbben a sugárzást követően. Hasonlóképpen, a β -endorfin null egerek nem mutattak Straub-jelenséget a besugárzást követően. Ezek a vizsgálatok arra utalnak, hogy a sugárzás által kiváltott β -endorfinszint-emelkedés tehető felelőssé az opioidreceptor-függő fenotípusok kiváltásáért.

Mivel a POMC és a bőr β -endorfin termelése UV-expozíció hatására p53-függőnek bizonyult, megvizsgáltuk, hogy a p53 keratinocita-specifikus deléciójával rendelkező egereknél nem emelkedik-e a plazma β -endorfin szintje a farok besugárzására adott válaszként. Megfigyeltük, hogy a p53 hiányában az egerekben a plazma β -endorfin szint nem emelkedett meg krónikus, kis dózisú farok besugárzás hatására, ami összhangban van a keratinocita-specifikus p53-függő folyamattal. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a keratinocita p53-POMC- β -endorfin útvonal szükséges a plazma β -endorfin szintjének emelkedéséhez farok besugárzást követően. A plazma β -endorfin emelkedés hiányával összhangban a keratinocita-specifikus p53 kiütéssel rendelkező egereknél nem volt megemelkedett nociceptív küszöbérték és nem mutattak Straub-jelenséget. Ezek az eredmények együttesen alátámasztják azt a modellünket, hogy a sugárzás által kiváltott DNS-károsodás a keratinocitákban növeli a plazma β -endorfin szintjét, amely szükséges az opioid viselkedések kialakulásához.

3.2. A D-vitaminhiány az UV sugárzást kereső viselkedést ösztönzi

A VitD-hiány növeli az UV-sugárzás okozta jutalmat

Feltettük a kérdést, hogy a VitD-hiány érzékenyíthet-e az UV-sugárzásra adott fiziológiás endogén opioid hatásokra. Mivel korábban kimutatták, hogy az UV addikciót okozó hatásait a bőrből felszabaduló endorfin opioid jelátvitelen keresztül közvetíti, arra számítottunk, hogy vitamin D receptor nélkül (VDR^{-/-}) állapot derepresszálja (fokozza) az UV

függőséget okozó hatását. *Vdr*^{-/-} egereket használtunk, ahol az UV által kiváltott de novo cutan VitD-szintézisnek nincsenek VDR hiánya miatt hatásai. Megvizsgáltuk, hogy a VitD-hiány megváltoztathatja-e az UV-kereső viselkedést. Az egerek egy részét CPP-készülékben UV-sugárzáshoz kondicionáltuk, és teszteltük a helypreferenciát. Az UV-expozíció erős addiktív magatartásformát (CPP-t) indukált *a Vdr*^{-/-} egerekben, ellentétben *a Vdr* vad típusú egerek minimális és jelentéktelen preferencia tendenciájával. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a VitD jelátvitel hiánya érzékenyíti az egyedeket az UV jutalmazó hatásaira, összhangban egy adaptív visszacsatolási körrel, amelyben a VitD jelátvitel hiányosságai növelik az UV / opioid jutalmat (*a VitD* szintézis maximalizálása érdekében), míg a VitD jelátvitel korrekciója visszaállítja a normál érzékenységet az UV-ra .

Az opioidok által indukált c-fos transzkripciót a nucleus accumbensben a VDR elnyomja

Feltételeztük, hogy ha a D-vitamin-hiány érzékenyíti az opioidok okozta jutalomérzés kiváltására, akkor fokozott neuronális aktiváció lehet jelen a központi idegrendszer azon régióiban, amelyek a jutalmazó viselkedést szabályozzák. Ezért megvizsgáltuk a morfium által kiváltott *c-Fos* mRNS- és fehérjeszint kinetikáját a nucleus accumbensben, ahol a *c-Fos* bizonyítottan szükséges az opioid jutalom kiváltásához. E kísérletekhez micropunchokat vettünk fagyasztott olyan agyszövetekből, amelyeket sóoldattal vagy morfinnal i.p. kezelt egerekből nyertünk. .

Azt találtuk, hogy *a c-Fos* mRNS maximális morfium indukciója szignifikánsan magasabb volt a *Vdr*^{-/-} egerekben, mint a vad típusú állatokban 30 és 60 perccel az injekció beadása után. A nagyobb *c-Fos* mRNS indukciót *a Vdr*^{-/-} egerekben a *c-FOS* fehérje expressziójának nagyobb indukciója kísérte 90 perccel a morfium beadása után. A *c-Fos* mRNS és fehérje fokozott expressziója a nucleus accumbens fokozott aktivitására utal a morfiumra adott válaszként. Mivel a VDR viszonylag alacsony expressziója a VTA-ból származó RNS-seq adatokban, valamint a humán agymintákban a nucleus accumbensben való nagyon alacsony / hiányzó expressziója miatt ezek az adatok arra utalnak, hogy a VDR a morfium által kiváltott nucleus accumbens aktivitást egy nem sejt-autonóm úton, például a nucleus accumbens bemenetének fokozott aktiválásán keresztül szabályozza.

3.3. Az MC1R jelátvitel megváltoztatja a nocicepciót a periaqueductalis szürke állomány befolyásolásával

Emelkedett opioidfüggő nociceptív küszöbértékek vörös szőrű egerekben

Mc1r^{e/e} és *Mc1r^{wt/(wt)}*(C57Bl6/J) egerekben kimutattuk, hogy az MC1R jelátvitel hiánya megnövekedett nociceptív küszöbértékeket eredményez. Először is azt kérdeztük, hogy a megnövekedett küszöbértékek opioidfüggőek-e, és ha van igen, akkor a nocicepció opioid modulációja centrálisan vagy perifériásan történik. A fekete és vörös szőrű egerek között megfigyelt nociceptív különbség csökkent a vér-agy gáton (BBB) átjutni képes opioid receptor antagonistá, a naltrexon perifériás (intraperitoneális) beadását követően. A metilált naltrexon, egy BBB-n át nem jutó opioidantagonista perifériás beadása azonban nem csökkentette a fekete és vörös szőrű egerek közötti nociceptív különbségeket, ami minimális perifériás befolyásra utal. Így, a vörös szőrű egerek opioid jelátvitelének relatív növekedése centrálisan, nem pedig perifériásan történik, és az α -MSH lehetséges szerepét sugallja a központi nocicepció opioid receptorok által közvetített szabályozásának kiegyensúlyozásában.

Korábbi tanulmányok kimutatták a cAMP jelátvitel szerepét az opioid analgézia modulálásában. Ezért megmértük a melanokortin és az opioid jelátvitel közötti antagonizmus hatását a patkány primer hipotalamikus neuronok (RPHN) cAMP-tartalmára. Megfigyeltük, hogy a melanokortin agonista [Nle4,D-Phe7]- α -MSH növelte a cAMP-tartalmat, míg az opioid agonista morfium jelentősen gátolta a melanokortin által kiváltott cAMP-emelkedést, összhangban a korábbi megfigyelésekkel. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a melanokortin és az opioid jelátvitel sejt-autonóm módon antagonizálhatja egymást.

A központi opioid-melanokortin antagonizmus meghatározza a nociceptív küszöbértékeket vörös szőrű egerekben

Az MC4R-GFP (zöld fluoreszcens fehérje) neuronok OPRM1-gyel történő festése egerekben korábban azt sugallta, hogy mindkét receptort expresszáló neuronok léteznek a periaqueductalis szürke területen (PAG). Megvizsgáltuk a PAG lehetséges szerepét a nocicepció modulálásában, és azt találtuk, hogy az opioid receptorok helyi antagonizmusa naloxonnal, a μ -opioid receptor-specifikus naloxonazinnal vagy a melanokortin receptorok agonizmusa (*Mc1r*-től függetlenül) PAG-kanális *Mc1r^{e/e}* egerekben jelentősen csökkenti a nociceptív küszöbértékeket. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a lehetőséggel, hogy a melanokortin és az opioid jelátvitel sejt-autonóm módon antagonizálhatja egymást. Lehetséges azonban az is, hogy más közvetett vagy nem sejt-autonóm mechanizmusok is hozzájárulhatnak a vörös szőrű *Mc1r^{e/e}* egerek fokozott opioid tónusához. Például a G-fehérje-kapcsolt receptorok heterodimerizációja befolyásolhatja a receptorfunkciót, és korábban kimutatták, hogy az OPRM1 kölcsönhatásba lép az MC3R-rel; ezért lehetséges, hogy a különböző heterodimerek kialakulása is hozzájárulhat a megnövekedett opioid tónushoz.

Eredményeink hozzájárulnak annak megértéséhez, hogy vörös genetikai háttér miért változtatja meg a fájdalomérzést. A vörös hajú genetikai háttérben talált megemelkedett nociceptív küszöbértékek az α -MSH szintjének csökkenéséből erednek, amelyet a melanociták csökkent POMC-termelődése okoz, ami csökkent centrális MC4R jelátvitelt eredményez. Az alacsonyabb MC4R jelátvitel viszont csökkenti az opioid jelátvitel antagonizmusát a CNS-ben. Ez együttesen nettó melanokortinhányt eredményez az opioid jelátvitelhez képest, ami megváltoztatja az egyensúlyt a μ -opioid receptor által kiváltott fájdalomcsillapítás javára a vörös hajjal asszociált genetikai háttérben.

4. DISZKUSSZIÓ

4.1. Sugárterápia okozta fáradtság és a bőr szerepe

Ez a tanulmány betekintést nyújt a daganat elleni sugárterápia egy rossz prognózisú, életminőséget rontó mellékhatásába. A sugárzás okozta fáradtság korábbi alapkutatási vizsgálatai a szisztémás gyulladás szerepét feltételezték, amelyekben összefüggést figyeltek meg a citokinszintek és a fáradtság között. További kutatások azt sugallták, hogy a sugárzás okozta fáradtság a rákbetegség érzelmi és pszichológiai áldozataiból eredhet, azonban a klinikai szorongás vagy depresszió és a fáradtság közötti összefüggést nem figyelték meg következetesen. Míg a jelenlegi tanulmány a sugárzás általi β -endorfin termelésének a fontos szerepére utal a fáradtságérzet kiváltásában, valószínűsíthető, hogy a klinikai szindróma ezen és más mechanizmusok együttes hatásait foglalja magában.

A pontos mechanizmus, amelyen keresztül a β -endorfin szedációt, fáradtságot idézhet elő, még nem ismert, de figyelemre méltó, hogy az UV-sugárzás szintén megemeli a keringő β -endorfinszintet, és fáradtsággal hozható összefüggésbe (bár anekdotikusan, pl. "egy nap a tengerparton"). Míg az exogén opiátokkal járó szedációt más, a sugárzás okozta fáradtság szindrómában nem megfigyelhető tünetek kísérhetik, valószínűsíthető, hogy az endogén β -endorfin nem teljesen azonos hatásokkal jár.

Ez a tanulmány rávilágít egy lehetséges terápiás stratégiára: a naloxon vagy más opioidantagonisták alkalmazására a sugárzás okozta fáradtság farmakológiai kezelésére vagy megelőzésére bizonyos daganatos betegségeekben. Bár a vizsgálatban naloxont használtunk, hogy röviddel az injekció beadása után vizsgáljuk az opioid jelátvitel szerepét több végpontban, a naltrexon klinikailag jobb választás lehet a hosszabb hatástartam, valamint az orális adagolás lehetősége miatt. Azoknak a betegeknek, akiknek fájdalomcsillapítás céljából opiátokra van szükségük, egyértelműen nem ajánlott az ilyen kezelés, de az opioid-antagonista szerek, például a naltrexon alkalmazása várhatóan viszonylag jóindulatú farmakológiai

beavatkozás lehet az ilyen specifikus ellenjavallatokkal nem rendelkező betegeknél. A sugárterápia okozta fáradtságot észlelő daganatos betegek számára az opioidantagonizmus biztonságos és előnyös eszközt jelenthet az életminőség és az aktivitási szint javítására a sugárterápia alatt. A jövőbeni vizsgálatokra lesz szükség egy ilyen megközelítés klinikai alkalmazásának potenciális biztonságosságának és hatékonyságának értékeléséhez.

4.2. A D-vitamin szerepe az UV/endorfin kereső viselkedés elősegítésében

Evolúciós szempontból az ultraibolya B (UVB) sugárzástól való függőség kialakulása növelheti egyes populációk túlélését annak ellenére, hogy annak bőrrákot okozó hatásai főként a reprodukzív kor utáni években jelentkeznek. A VitD-hiány negatív hatásai feltehetően hozzájárulnak az ember világos bőr pigmentációjának evolúciós hajtóerejéhez, és valószínűsíthető, hogy további mechanizmusok, mint például az UV-kereső viselkedés, hozzájárulhatnak a VitD-szint fenntartásához az emberben és más fajokban. A párdackaméleonok a természetes napfénynek való kitettséget a napozási viselkedés finomhangolásával optimalizálják, a VitD-állapotuktól függően. A VitD-hiányhoz kapcsolódó endogén opioid érzékenység és jutalmazás modulációja talán azért fejlődött ki, hogy elősegítse a napkereső viselkedést, amely a fejlődés és növekedés során nélkülözhetetlen VitD-szinteket biztosíthatja, a bőr gyorsabb fényöregedésének és a bőrrák megjelenésének késői negatív következményei ellenére. Az exogén opioidok (morfium) fogyasztása azonban nem jár a VitD szintézisével, így azt nem kíséri a VitD gátló hatása az opioidok okozta jutalomérzésre. Emiatt, a D vitamin hiánya hozzájárulhat az opioid függőség kialakulásához.

Bár léteznek hatékony gyógyszeres kezelések az opiát abúzusra (OUD-ra), a valóságban további beavatkozásokra van szükség a meglévő terápiák hatékonyságának fokozására. Ezenkívül korlátozott adatok állnak rendelkezésre az OUD kialakulásának megelőzésére irányuló hatékony beavatkozásokról. Eredményeink több különböző terápiás lehetőséget vetnek fel: Tekintettel arra, hogy a VitD-hiányos egyéneknél fennáll a tolerancia és a fiziológiás opioidfüggőség gyorsabb kialakulásának kockázata, jelentősebb elvonási tüneteket tapasztalnak, és nagyobb jutalmat tapasztalnak az opioid-expozícióból. A VitD-pótlásnak így preventív előnye lehet azáltal, hogy csökkenti az opioidok jutalmazó hatásait és esetleg csökkenti az OUD kockázatát. A VitD-pótlás valamint kiegészítheti az OUD-ban jelenleg is alkalmazott terápiás lehetőségeket. A kezeletlen OUD gyakorisága indokolja, hogy időben klinikai vizsgálatokat végezzenek e terápiás megközelítések közvetlen tesztelésére, különösen tekintettel arra, hogy a VitD-adagolás kiemelkedően biztonságos és elérhető.

4.3. A vörös haj megváltoztatja a nocicepciót a központi melanokortin/opioid jelátvitel modulálásán keresztül

A vörös szőrű *Mc1r^{ee}* egerek magas nociceptív küszöbértékére vonatkozó megfigyeléseink megfelelnek a genotípus által vezérelt és nemtől független emberi és egér nociceptív mintázatokra vonatkozó korábbi eredményeknek. Eredményeink bizonyítják az MC1R variáns (vörös szőrzet) funkcióvesztésének szerepét az OPRM1 és a melanokortin jelátvitel közötti fiziológiai antagonizmus egyensúlyának megváltoztatásában. Azonban más mechanizmusok is hozzájárulhatnak a megfigyelt különbségekhez. Az OPRM1 heterodimerizációja a melanokortinreceptorokkal (esetleg MCR3) vagy további nemtől függő mechanizmusok is hozzájárulhatnak a melanokortinhiányos egerekben megfigyelt nociceptív különbségekhez. Alternatívaként a melanokortin jelátvitel közvetlenül befolyásolhatja a nocicepciót azáltal, hogy módosítja az OPRM1 receptorok bazális aktivitását, például az ioncsatorna-aktivitást, a G-protein csatolást vagy a cAMP gátlását. Ezek a lehetőségek jövőbeli vizsgálatokat igényelnek.

Bár vizsgálatunk a vörös haj fenotípusára összpontosított, a melanokortin/opioid jelátviteli egyensúly a nem vörös hajú egyének fájdalmának eltéréseit is magyarázhatja. Megfigyelések szerint az *Mc4r* null egerek az *Mc1r^{ee}* egerekhez hasonlóan magas nociceptív küszöbértékeket mutatnak, de nem vörös szőrűek, ami a melanokortin-opioid egyensúly megváltoztatásának alternatív módját tükrözi. Az MC4R-polimorfizmussal rendelkező egyéneknél is előfordulhat, hogy a vörös hajú egyéneknél tapasztaltakhoz hasonlóan emelkedett fájdalomküszöbökkel és megváltozott fájdalomcsillapító érzékenységgel rendelkeznek. Tanulmányunk korábban ismeretlen és váratlan betekintést nyújtott a bazális nociceptív küszöbök molekuláris és jelátviteli meghatározóiról.

5. Összefoglaló

Ez az értekezés a **POMC-eredetű opioid jelátvitel** korábban fel nem ismert szerepét vizsgálja a pigmentáción túl, a sugárzás okozta fáradtságban, az opioid-függőségre való hajlamban és a fájdalom modulációjában való részvételére összpontosítva. Míg a POMC-t régóta a melanogenezissel hozzák kapcsolatba, szélesebb élettani funkciói további vizsgálatokat igényelnek.

A munka egyik legfontosabb felfedezése, hogy a **bőrből származó β -endorfin hozzájárul a sugárzás okozta fáradtságához**, ami közvetlen kapcsolatot mutat a perifériás opioidtermelés és a szisztémás fáradtság tünetei között. Ez a tanulmány bizonyítékot szolgáltat arra, hogy a sugárterápia megemeli a keringő β -endorfin szintjét, ami olyan viselkedési hatásokhoz vezet, amelyek az opioid expozíciót utánozzák. Fontos, hogy ezeket a hatásokat az opioid-antagonisták visszafordítotják, és a β -endorfin knockout modellekben hiányoznak, ami egy **lehetséges terápiás lehetőségre utal: az opioidreceptor-blokkolók felhasználása** felmerül a daganat elleni sugárterápiát követően kialakuló fáradtságérzésben.

A fáradtságon túlmenően ez a munka a **D-vitamint az endogén opioid jutalmazási útvonalak modulátoraként** azonosítja. Eredményeink szerint a **D-vitamin hiánya erősíti az UV/ β -endorfin kereső viselkedést**. Ezen új megközelítés betekintést nyújt a **napfény-expozíció, az opioid jelátvitel és az addikcióra való hajlam közötti összefüggésekre**, potenciális terápiás lehetőségeket javasolva az opioid addikció és dependencia megelőzésére, kezelésére.

Végül, ez a tanulmány feltárja a **melanokortin és az opioid jelátvitel funkcionális antagonizmusát a fájdalomérzékelésben**, ami megmagyarázza, hogy az MC1R funkcióvesztéses verzióját hordozó egyének (vörös hajú fenotípus) miért mutatnak megnövekedett fájdalomküszöböt és fokozott opioidérzékenységet.

Ezek az eredmények együttesen bővítik a **POMC-eredetű opioidok biológiájának** megértését, és hidat képeznek a bőrgyógyászat, az onkológia, az addiktológia és a fájdalomkutatás között. Eredményeink számos olyan mechanizmus vizsgálatát, valamint terápiás modalitás használatát javasolják, amelyek az opioid jelátvitelt kihasználva javíthatják számos betegség kimenetelét a **rákbetegséggel összefüggő fáradtság, az opioidfüggőség és a fájdalom kezelése** terén.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítettek és inspiráltak a kutatásban és a PhD disszertáció megírásában.

Szeretném kifejezni mély és őszinte hálámat témavezetőmnek, Prof. Dr. Hideghéty Katalinnak a folyamatos támogatásáért és útmutatásáért. Széleskörű tudása és gondolkodásmódja nagy értéket jelentett számomra. Megértése és bátorítása kiváló alapot nyújtott jelen dolgozatom elkészítéséhez.

Szeretnék köszönetet mondani kollégáimnak és barátaimnak, Dr. Gillian Fellnek, Dr. Kemény Lajos Vincének és Dr. David E. Fishernek is a tudományos és érzelmi támogatásért, szórakozásért és gondoskodásért, amit a kísérletek elvégzéséhez szükséges évek során nyújtottak.

Ez a munka nem valósulhatott volna meg a Rosztóczy Alapítvány szíves támogatása nélkül.

Végül szeretném kifejezni legmélyebb hálámat a családomnak a végtelen szeretetükért, támogatásukért és rendíthetetlen türelmükért. Legjobb barátomnak, aki azóta már a férjem - köszönöm, hogy a legnehezebb időszakokban is mellettem álltál, bátorításoddal és állandó támogatásoddal mindig erőt adtál. A szüleimnek, akik évekig fáradhatatlanul biztattak - és persze sosem mulasztották el megkérdezni: „Na, mikor fejezed már be a doktori dolgozatot?” - köszönöm, hogy hittek bennem. Édesapám sajnos már nem lehet itt, hogy tanúja legyen ennek a pillanatnak, de megígértem neki, hogy végigcsinálom - mely ígéretet megtartottam. Tudom, mennyire büszke lenne most. Végül, de nem utolsósorban külön köszönetet mondok az apósomnak és anyósomnak a rengeteg segítségért és szívből jövő támogatásukért. Az ő támogatásuk és biztatásuk nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg.

Mindezért, ezt a munkát szeretett, támogató családomnak ajánlom - teljes szívemből.