

**A SZISZTÉMÁS GYULLADÁS RECEPTORIÁLIS ÉS
MOLEKULÁRIS MEDIÁTORAINAK VIZSGÁLATA
KÜLÖNBÖZŐ ÁLLATMODELLEKBEN**

Ph.D. értekezés tézisei

Garaminé Pákai Eszter

Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola

Vezető: Prof. Dr. Kemény Lajos

Transzlációs Medicina Program

Programvezető: Prof. Dr. Hegyi Péter

Témavezető:

Dr. Garami András

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Transzlációs Medicina Intézet Termofiziológia Tanszék

Szeged

2020

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- I. **Pakai E**, Tekus V, Zsiboras C, Rumbus Z, Olah E, Keringer P, Khidhir N, Matics R, Deres L, Ordog K, Szentes N, Pohoczky K, Kemeny A, Hegyi P, Pinter E, Garami A. The neurokinin-1 receptor contributes to the early phase of lipopolysaccharide-induced fever, *IMMUNOLOGY* 9 pp. 166, 15 p. (2018) **IF: 4,716**
- II. **Pakai E**, Garami A, Nucci TB, Ivanov AI, Romanovsky AA. Hyperbilirubinemia exaggerates endotoxin-induced hypothermia, *CELL CYCLE* 14:8 pp. 1260-1267, 8 p. (2015) **IF: 3,952**
- III. Banki E*, **Pakai E***, Gaszner B, Zsiboras Cs, Czett A, Bhuddi PRP, Hashimoto H, Toth G, Tamas A, Reglodi D, Garami A. Characterization of the thermoregulatory response to pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in rodents, *JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE* 54:3 pp. 543-554, 12 p. (2014) **IF: 2,343**
- IV. Wanner SP, Garami A, **Pakai E**, Oliveira DL, Gavva NR, Coimbra CC, Romanovsky AA. Aging reverses the role of the transient receptor potential vanilloid-1 channel in systemic inflammation from anti-inflammatory to proinflammatory, *CELL CYCLE* 11:2 pp. 343-349, 7 p. (2012) **IF: 5,321**
- V. Garami A, **Pakai E**, Oliveira DL, Steiner AA, Wanner SP, Almeida MC, Lesnikov VA, Gavva NR, Romanovsky AA. Thermoregulatory phenotype of the trpv1 knockout mouse: thermoeffector dysbalance with hyperkinesis, *JOURNAL OF NEUROSCIENCE* 31:5 pp. 1721-1733, 13 p. (2011) **IF: 7,115**

**Osztott elsőszerzőség.*

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények száma:	5	(3 elsőszerzős)
Az értekezéshez szorosan nem kötődő közlemények száma:	9	
Könyvfejezetek száma:	2	
Kumulatív impakt faktor:	59,865	

Tartalomjegyzék

Rövidítések listája	
1. Bevezetés és irodalmi háttér	5
2. Célkitűzések	8
3. Anyagok és módszerek	9
4. Eredmények	11
4.1. A bilirubin szerepe szisztémás gyulladásban	11
4.2. A tranziens receptor potenciál vanilloid-1 csatorna szerepe a termoregulációban fiziológias körülmények között és szisztémás gyulladásban	12
4.3. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid termoregulatórikus hatásának karakterizálása	13
4.4. A neurokinin-1 receptor szerepe a szisztémás gyulladásban	14
5. Megbeszélés	15
6. Összefoglalás és következtetések	17
Köszönetnyilvánítás	19

Rövidítések listája

ALT	alanin-aminotranszferáz
AST	aszpartát-aminotranszferáz
CLP	cökális ligatúra és punkció
COX	ciklooxigenáz
GGT	gamma-glutamil transzferáz
HLI	hőleadási index
i.c.v.	intracerebroventrikuláris(an)
i.p.	intraperitoneális(an)
i.v.	intravénás(an)
IL	interleukin
KIR	központi idegrendszer
KO	„knockout”, génkiütött
LPS	lipopoliszacharid
MnPO	medián preoptikus nukleusz
MPO	mediális preoptikus area
NK1	neurokinin-1
PACAP	hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid
PG	prostaglandin
ROS	reaktív oxigén gyökök
SIRS	„systemic inflammatory response syndrome”, szisztémás gyulladásos válasz szindróma
SP	„substance P”, P anyag
T _a	környezeti hőmérséklet
T _{ab}	abdominális hőmérséklet
T _b	testhőmérséklet
T _c	kolon hőmérséklet
TNF	tumor nekrosis faktor
TRPV1	transziens receptor potenciál vanilloid-1
T _{sk}	farokbőr hőmérséklet
VO ₂	oxigénfogyasztás

1. Bevezetés és irodalmi háttér

A szisztémás gyulladás általánosított patológiai fogalom, amely klinikailag különböző formákban jelenhet meg, úgymint „betegség viselkedés/szindróma”, „szisztémás gyulladással válasz szindróma” (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), szepszis, súlyos szepszis, szeptikus sokk és „többszervi működészavar szindróma”. A gyulladással válasz komplex kóreltani folyamatok sorozata, amelyeket fertőző és nem-fertőző faktorok, például trauma, égés és pankreatitisz válthat ki. Egy nemrég készült tanulmány szerint a szepszis globális terhet jelent az egészségügy számára, világszerte évente körülbelül 48,9 millió új esettel és 11 millió szepszishoz köthető halállal. Továbbá, incidenciája 30% körüli az intenzív osztályra kerülő betegek körében. Fontos megjegyezni, hogy a szepszis nem csak akután vezethet halálhoz, hanem 5-8 évvel később is jelentősen növelheti a halálozás kockázatát. Az Egyesült Államokban a szepszis miatti kórházi ellátások száma körülbelül 50%-kal emelkedett 2003 és 2009 között, amelynek gazdasági vonzata becslések szerint az évi 17 milliárd dollárt is meghaladja, többek közt, a hosszabb kórházi ellátás miatt. Egy friss tanulmány szerint azonban a szepszis és hozzá köthető halálozások száma az Egyesült Államokban nem változott 2009 és 2014 között.

Mint szisztémás gyulladással válasz, a szepszis gyakran társul a testhőmérséklet (T_b) eltéréseivel, amelyek láz vagy hipotermia formájában jelenhetnek meg emberekben és kísérleti állatokban egyaránt. Elsősorban állatokban végzett kísérletek eredményei alapján feltételezhető, hogy a láz és a hipotermia egyaránt kialakulhat jellemző adaptív mechanizmusként betegség szindrómában. A láz tipikusan a fertőzés kezdetén jelenik meg, a patogén ágens elleni aktív védőharcot reprezentálja, míg a hipotermia általában a betegség előrehaladottabb fázisával és súlyosságával van összefüggésben, és célja a gazdaszervezet létfontosságú rendszereinek biztosítása. A két adaptív stratégia egymás után is megjelenhet (például korai lázas fázist követő késői hipotermiás fázis) a betegség súlyosságának előrehaladásával, azonban a hipotermia az egyik elsőként megjelenő tünet is lehet endotoxin sokk állatmodellekben. Egy friss meta-analízis szintén alátámasztotta ezeket az eredményeket azzal, hogy több, mint 10 ezer szeptikus beteg adatai alapján kimutatta, hogy a láz alacsonyabb, míg a hipotermia magasabb halálozási esélyt jósol normál T_b -hez képest. Fontos kiemelni, hogy a hipotermia prognosztikus értéke szepszisben nem jelenti automatikusan magának a T_b -nek a káros hatását. Ehelyett, a hipotermia és mortalitás közötti összefüggés egyszerűen a hipotermia

gyakoribb előfordulására utalhat a szepszisz súlyos eseteiben. A láz és hipotermia különböző kóroki háttérének ellenére, mind a T_b emelkedése, mind pedig csökkenése egyformán jelentős jelzésként szerepelhet a klinikumban. Összeségében, gyakori előfordulása és magas halálozási aránya miatt, a szisztémás gyulladás fontos területet jelent mind az alapkutatás, mind pedig a klinikai gyakorlat számára.

Amikor a gyulladás kiváltó oka fertőző ágens, endotoxin hatására gyakran aktiválódik a gyulladáshoz vezető kaskád, majd különböző szignálok aktiválják az immunválaszt. Összefoglalva, az immunrendszer sok sejtje hordoz olyan receptorokat, amelyek az idegen organizmusok közös, általános makromolekuláit ismerik fel. Például a CD14, amely egy makrofágok által expresszált emberi fehérje, felismeri és kötődik a lipopoliszacharidhoz [(LPS), a Gram-negatív baktériumok külső membránjának legfontosabb alkotóeleméhez] és aktiválja a Toll-like receptor 4-t, amely egy többlépcsős intracelluláris folyamatot indít el, ezzel létrehozva az immunválaszt. A válasz során citokinek szabadulnak fel, többek között tumor nekrozis faktor (TNF)- α , interleukin (IL)- 1β , IL-6 és más mediátorok, amelyeket együttesen „gyulladáshoz vezető”-nek is neveznek és ezek, vagy más immunsejteket vonzanak a gyulladás helyszínére, vagy más perifériás szöveteken hatva a gyulladás további kémiai mediátorait szabadítják fel. Ezek közé tartoznak a prosztaglandinok (PG), amelyek kulcsfontosságú szerepet játszanak a szisztémás gyulladás sok különböző folyamatának mediálásában. A PG-ok az arachidonsav származékai, amely PGH_2 -vé konvertálódik ciklooxygenáz (COX) enzim által. Utóbbinak két izoformája létezik: COX-1 és COX-2. Különböző további enzimek végtermékekké alakítják a PGH_2 -t: más PG-okká, prosztaciklinekké vagy leukotriénekké. A PGE_2 négy különböző EP receptoron hat, amelyek a központi idegrendszer (KIR) különböző területein expresszálódnak. Rágcsálókban végzett kísérletek során kimutatták, hogy kis dózisu LPS által indukált láz elsősorban COX-2 aktiváció miatt jön létre, és, hogy az egyik legfőbb mechanizmus a lázválasz kialakulásában a PGE_2 hatása EP3 receptorokon keresztül. A lázzal ellentétben, amikor patkányokat magas dózisu LPS-dal injektálnak hipotermia alakul ki, amely elsősorban a COX-1 enzim aktivációjának az eredménye. Az endogén mediátorok által aktivált receptorális és intracelluláris jelátviteli útvonalak összetettek és magukba foglalnak lipid, peptid, gázszerű és egyéb - máig ismeretlen - jelátviteli molekulákat.

A gyulladáshoz vezető válasz közös és jelentős biokémiai részeként, reaktív oxigén gyökök (ROS) is termelődnek. Amíg a ROS termelése különböző bakteriális lázkeltőknek kitett sejtek

és szövetek által jól dokumentált, nem sokat tudunk a ROS oki szerepéről a T_b -i válaszok szabályozásában gyulladás és fertőzés során, amely elsősorban a hatékony vizsgálati módszerek hiányára vezethető vissza. A bilirubint, egy lipofil molekulát, gyakran tartják potenciálisan mérgezőnek, amit a szervezetből ki kell üríteni. Néhány tanulmány azonban felhívta a figyelmet a bilirubin erős antioxidáns hatására, amely révén hatékonyan köthet meg mesterséges- vagy sejtthártyából származó lipoperoxid gyököket, és hangsúlyozzák sejtvédő szerepét. Ezek alapján a bilirubin használható lehet szelektív eszközként a vízben nem oldható, lipid-eredetű ROS hatástalanítására. A ROS mellett arra is fény derült, hogy a tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1) ioncsatorna, amely főként szenzoros idegvégződéseken expresszálódik, szintén szerepet játszhat különböző gyulladási folyamatok mediálásában. A TRPV1 sokféle stimulussal aktiválható, amelyek közül több megtalálható a gyulladási levesben is. A génkiütés (KO, itt: *Trpv1*^{-/-}), capsazepine-nel (TRPV1 antagonist) elért gyógyszeres gátlás vagy resiniferatoxinnal (TRPV1 agonista) deszenzitizált kísérletek kimutatták, hogy a TRPV1 anti-inflammatórikus szerepet játszik LPS-indukálta SIRS-ben, többek között a TNF- α termelésének gátlása révén, feltehetően szenzoros idegekben. A legtöbb tanulmányt azonban fiatal rágcsálókban végezték. Tekintvén, hogy a SIRS-t az öregek betegségének vélik az idősebb populációban jelentősen magasabb előfordulási aránya miatt, azt is fontos lenne tisztázni, hogy a TRPV1 idős korban is a fiatalokhoz hasonló prominens anti-inflammatórikus szereppel bír-e. A TRPV1 szisztémás gyulladásban betöltött szerepének vizsgálatára irányuló kísérletek elvégzése magában foglalja genetikailag módosított (*Trpv1*^{-/-}) egerek használatát, azonban irodalmi adatok alapján a genetikailag módosított egerekben végzett kísérletek nem vezettek eredményre az egerek termoregulatórikus fenotípusának meghatározása szempontjából. Következésképpen, alapvető fontosságú, hogy előbb a *Trpv1*^{-/-} egerek termoregulatórikus fenotípusát derítsük fel normál körülmények között, hogy el lehessen dönteni vajon alkalmasak-e ezek az egerek a TRPV1 ioncsatorna szerepének vizsgálatára szisztémás gyulladásban.

A TRPV1 csatornák aktivációja az idegvégződéseken (úgynevezett kapszaicin-érzékeny afferens idegrostokon) gyulladási mediátorok markáns felszabadulását is eredményezi. A felszabaduló anyagok közé tartozik a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)38, kalcitonin gén-kapcsolt peptid és a P anyag (SP). A PACAP38 különös figyelmet érdemel, mert ennek a viszonylag újonnan felfedezett peptidnek a komplex szerepe

erősen megalapozott különböző gyulladási folyamatokban. Továbbá, a polipeptid és receptorai széleskörben megtalálhatók az agy legfontosabb termoregulatórikus területein, köztük a hipotalamusz preoptikus areájában, amely a lázválasz kiváltásának kiemelt fontosságú helye. Élettani kísérletekben a PACAP38 KIR-be injektálása a T_b emelkedését hozta létre, amely a nem-didergéses hőtermelés és a lokomotoros aktivitás fokozása révén alakult ki, de nem derült fény arra, hogy a PACAP38 kiváltja-e az autonóm termoeffektorok egyidejű aktivációját is, amely a lázszerű válaszhoz mutatna hasonlóságot. A hiány pótlására és azért, hogy felderítsük, hogy a TRPV1-expresszázó neuronokból felszabaduló PACAP38 a szisztémás gyulladás mediátorának tekinthető-e, vizsgálataink egy részében célul tűztük ki a PACAP38 termoregulatórikus hatásainak meghatározását.

Figyelembe véve, hogy a neurokinin-1 (NK1) receptor, korábbi nevén SP receptor, szintén szerepet játszik lokális és szisztémás gyulladási folyamatokban, a SP jelátviteli út szerepe is felmerült a láz mediálásában. Rágcsálók kezelése antagonistá SP analógokkal, a LPS-ra adott lázválasz gátlását okozta, a LPS-indukálta láz hasonló csökkenése patkányokban megfigyelhető volt NK1 receptor blokkoló adása esetén is. Ezek a tanulmányok erősen altámasztják, hogy a SP jeátviteli útvonal hozzájárul a LPS-indukálta láz kialakulásához, de az nagyrészt tisztázatlan maradt, hogy a láz folyamatainak mediátorai közül melyeket befolyásolja a SP és receptorai. Alternatív lehetőségek, például KO egerek használata segíthet annak jobb megítélésében, hogy a láz klasszikus molekuláris mechanizmusai közül, melyiket befolyásolhatja a NK1 receptor.

2. Célkitűzések

A tanulmány átfogó célja volt olyan új mechanizmusok felderítése, amelyek, legalább részben, szerepet játszhatnak a szisztémás gyulladás mediálásában. Tekintettel arra, hogy a szisztémás gyulladás gyakran jár együtt a T_b megváltozásával, a legtöbb kísérletben termofiziológiai megközelítést alkalmaztunk a vizsgált mediátor gyulladáshoz való hozzájárulásának felfedésére. A gyulladási folyamatok kóreltani hátterének jobb megértése érdekében vizsgálatainkban a szisztémás gyulladás kialakulásához köthető endogén (a szervezetben fiziológiásan termelt) anyagok és receptorális mechanizmusok tanulmányozását tűztük ki célul.

Ennek megfelelően, a gyulladássos folyamatokban ismert szerepük miatt, különböző állatmodellekben:

- vizsgáltuk a bilirubin szerepét szisztémás gyulladásban;
- megkíséreltük karakterizálni a TRPV1 csatorna szerepét a termoregulációban élettani körülmények között;
- tisztázni kívántuk a TRPV1 csatorna szerepét aszeptikus és mikrobiális sepszisben;
- tanulmányoztuk a PACAP hatását termoregulatórikus folyamatokra;
- és elemeztük a NK1 receptor szerepét gyulladássos mechanizmusokban.

Jelen Ph.D. értekezés téziseiben összefoglaljuk a legfontosabb célokat és eredményeket, míg azok részletes ismertetése a Ph.D. értekezés alapjául szolgáló közlemények teljes változatában található (ezeknek listáját a 2. oldalon ismertettük). A jelen tézisekben található kijelentésekhez tartozó további referenciák a Ph.D értekezés teljes szöveges változatában lelhetők fel.

3. Anyagok és módszerek

Kísérleteinkben felnőtt hím Wistar patkányokat, valamint normobilirubinémiás (heterozigóta, aszimptomatikus; J/+) és hiperbilirubinémiás (homozigóta, ikterusos; J/J) ún. Gunn patkányokat használtunk. További vizsgálatainkat hím és nőstény egerekben végeztük, amelyek *Trpv1* génje homozigóta módon vagy meg volt (*Trpv1^{+/+}*) vagy hiányzott (*Trpv1^{-/-}*); vagy *Tacr1* génjük (amely a NK1 receptort kódolja) homozigóta módon vagy meg volt (*Tacr1^{+/+}*) vagy hiányzott (*Tacr1^{-/-}*); vagy *Pacap* génjük homozigóta módon vagy meg volt (*Pacap^{+/+}*) vagy hiányzott (*Pacap^{-/-}*). Az állatokat standard állatházi körülmények között tartottuk. Minden vizsgálatot az állatkísérletek etikai elveinek és szabályainak betartásával végeztünk.

A műtéteket ketamin-xylozin altatásban végeztük patkányokon [55,6 illetve 5,5 mg/kg intraperitoneálisan (i.p.)] és egereken (81,7 és 9,3 mg/kg i.p.). Az anyagok stresszmentes beadása érdekében, az állatokba a kísérleteket megelőzően intravénás (i.v.) vagy i.p. katétert vagy intracerebroventrikuláris (i.c.v.) kanült implantáltunk. A kísérleteket a műtétet követő 4-7. napon végeztük.

Szabadon mozgó egerekben az abdominális hőmérséklet (T_{ab} , a T_b egyik formája) és lokomotoros aktivitás méréséhez, az állatokba egy miniatűr telemetria transzmittert implantáltunk (G2 E-Mitter series; Mini Mitter). Az egereket ezután saját ketrecükben a telemetria rendszer jelfogóira helyeztük (ld. alább).

Cökális ligatúra és punkció (CLP): a cökális bélfalat az antimezenterialis oldalon egy tüvel teljesen átszúrtuk. A túlélési arányt és a T_b -et 108 órán keresztül monitoroztuk, majd a kísérlet végén minden túlélő állatot túlaltattunk.

A patkányok és egerek különböző termofiziológiai paramétereinek méréséhez élettani körülmények között és szisztémás gyulladásban három különböző kísérleti rendszert használtunk. A termoelem rendszerben az állatokat hengerszerű ketrecekbe helyeztük és két réz-konstantán termoelemmel (Omega Engineering) szereltük fel a kolon hőmérséklet (T_c) és farokbőr hőmérséklet (T_{sk}) méréséhez. Az állatokat, hengerszerű ketrecükben, aztán egy környezeti kamrába (Forma Scientific) helyeztük, amelynek környezeti hőmérsékletét (T_a) az állatok számára neutrális értékre állítottuk.

A respirometria rendszerben minden, hengerszerű ketrecbe helyezett, állatot négykamrás, nyíltrendszerű kaloriméter (Oxymax Equal Flow, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) egyik plexiüveg kamrájába helyeztünk. Más kísérletekben a ketrecbe helyezett állatok légmentesen zárt, hengerszerű plexiüveg kamrákba kerültek (Sable Systems). A plexiüveg kamrákon át folyamatosan levegőt áramoltattunk. Az oxigénfogyasztás (VO_2) mértékét egy üres kamrát elhagyó és az állatot tartalmazó kamrát elhagyó levegő oxigéntartalma közti különbség kiszámításával határoztuk meg.

A telemetria rendszerben az egereket saját ketrecükben tanulmányoztuk. Az egerekbe előzetesen telemetria transzmittert implantáltunk, majd saját ketrecükkel együtt telemetria jelfogókra (model ER-4000; Mini Mitter) helyeztük őket és regisztráltuk a szabadon mozgó állatok T_{ab} -ét és lokomotoros aktivitását.

SIRS kiváltásához a kísérleti állatok bólusban LPS injekciót kaptak (10 vagy 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. patkányokban; 0,12 vagy 40 mg/kg i.p. egerekben) az i.v. vagy i.p. katéter toldalékán keresztül. Az AMG 517-et, amely egy nagyon potens és szelektív TRPV1 antagonist, vagy vivőanyagát, bólusban adtuk be (210 $\mu\text{g}/\text{kg}$ szubkután) egy órával a lázkeltő vagy sóoldat adása

előtt. A PACAP38 beadott dózisa a következők voltak: 100 µg/kg i.v., valamint 10 és 100 µg/kg i.c.v. patkányoknak. A SP-t a laterális agykamrába infundáltuk 100 µg/kg dózisban.

A teljes bilirubin, renális diszfunkció és hepatikus károsodás markereinek szérumszintjei a patkányok szívéből LPS adást követően 24 órával gyűjtött vérmintákból kerültek meghatározásra. A c-Fos pozitív sejtek számát immunhisztokémiai módszerekkel határoztuk meg a medián preoptikus nukleusz (MnPO) és a mediális preoptikus area (MPO) területén *Pacap*^{-/-} és *Pacap*^{+/+} egerekben. A COX-2 LPS-indukálta változásainak RT-qPCR és Western blot technikákkal való meghatározásához tüdő, máj és agyi szövetmintákat gyűjtöttünk és folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottunk. A mintákat -80°C-on tároltuk.

Statisztikai analízisekhez, az irányelveknek megfelelően, a következő módszereket használtuk: két- vagy háromutas ANOVA Fisher féle LSD post hoc teszttel, Student's t teszt, χ^2 teszt, logrank teszt és Cox regressziós modell. A különbségeket, akkor értékeltük szignifikánsnak ha $P < 0.05$. Minden adatot átlag \pm standard hiba formátumban ismertetünk.

4. Eredmények

4.1. A bilirubin szerepe szisztémás gyulladásban

Kis dózisú (10 µg/kg) LPS adására a J/J és J/+ patkányok három fázisú lázzal reagáltak, amelynek csúcsai anyagadás után ~50, 130 és 280 percnél alakultak ki, de a genotípusok között nem volt szignifikáns különbség a T_b dinamikájában. Nagy dózisú (1000 µg/kg) LPS hatására a J/+ patkányokban korai hipotermia alakult ki, amelyet láz követett. A J/J patkányokban ettől eltérő T_b válasz volt megfigyelhető: a korai hipotermia lényegesen kifejezettebb volt, az azt követő lázválasz pedig szignifikánsan attenuált.

A teljes plazma bilirubin szint a sóoldattal kezelt J/J patkányokban szignifikánsan (két nagyságrenddel) magasabb volt, mint J/+ patkányokban, továbbá kis dózisú LPS adása nem volt hatással a bilirubin szintre egyik genotípusban sem. Ezzel ellentétben, nagy dózisú LPS adása után, a teljes bilirubin szint J/+ és J/J patkányokban is megemelkedett, de J/J patkányokban továbbra is magasabb maradt, mint a J/+ kontrollokban.

A vesefunkció markerek esetében, sem a karbamid, sem a kreatinin szintje nem különbözött szignifikánsan sóoldattal, illetve kis dózisú vagy nagy dózisú LPS-dal kezelt J/J és

J/+ patkányok között. A plazma alanin-aminotranszferáz (ALT), aszpartát-aminotranszferáz (AST) és gamma-glutamil transzferáz (GGT) aktivitás normál tartományban maradt mind J/J, mind J/+ patkányokban sóoldat és kis dózisú LPS kezelés után. Nagy dózisú LPS adás hatására azonban a patkányokban kifejezetten emelkedett az ALT, AST és GGT. A J/J patkányokban a GGT emelkedése teljesen elmaradt, míg ALT és AST esetén tendenciózusan csökkent mértékű volt a J/+ patkányokban megfigyeltekhez képest.

4.2. A TRPV1 csatorna szerepe a termoregulációban fizioológiai körülmények között és szisztémás gyulladásban

A TRPV1 csatorna termoregulációban betöltött szerepének vizsgálatához nagyszámú *Trpv1^{+/+}* és *Trpv1^{-/-}* egérben tanulmányoztuk a T_b és termoeffektorok aktivitásának cirkadián változásait telemetria és respirometria rendszereinkben. A *Trpv1^{-/-}* egerek T_b -e mindkét rendszerben kismértékben, de szignifikánsan ($P < 0,05$) alacsonyabb volt a kontrollokénál a világos fázisban. A sötét (aktív) fázisban azonban a genotípusok közti különbség csökkent a respirometria rendszerben és teljesen eltűnt telemetriában. Arra is fényt derítettünk, hogy a *Trpv1^{-/-}* egerek alacsonyabb anyagcserével és fokozottabb bőr vazokonstriktióval rendelkeztek, mint *Trpv1^{+/+}* társaik sötét-világos fázistól függetlenül. Összefoglalva, a *Trpv1^{-/-}* egerek termoregulatórikus fenotípusára specifikus termoeffektor mintázat jellemző: ezek az egerek hipometabolikusak és jobban vazokonstrikáltak, miközben T_b -ük alacsonyabb a kontroll egereknél, mindazonáltal ez a KO egérmodell alkalmas a TRPV1 csatorna szerepének tisztázására szisztémás gyulladásban.

LPS (40 mg/kg, i.p.) adására fiatal felnőtt egerek kifejezett, gyorsan kialakuló SIRS megjelenésével válaszoltak. Az egerek előzetes kezelése AMG 517-tel, amely egy potens és szelektív TRPV1 antagonist, lényegesen csökkentette a túlélési esélyt több időpontnál is (például 50-ről 5%-ra 26 óránál, $P < 0,001$) és rövidítette az átlagos túlélési időt is (26 ± 2 órától 19 ± 1 órára, $P = 0,003$). Összességében, kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy a TRPV1 gyógyszeres gátlása fokozza a LPS-indukálta SIRS mortalitását fiatal egerekben. A LPS által kiváltott SIRS kimenetele idősebb egerekben sokkal súlyosabb volt, mint fiatal egerekben. Az idősebb egerek előkezelése AMG 517-tel növelte a túlélési arányt, megnyújtotta a halálozásig eltelt átlagos időtartamot és csökkentette a halálozás esélyét, amely hatások teljes mértékben ellentettjei a fiatal egerekben megfigyelt eredményeknek.

Ezek után azt vizsgáltuk, hogy a TRPV1 genetikai eltávolításának ugyanolyan hatása van-e SIRS-re középkorú egerekben, mint a gyógyszeres gátlásnak. LPS hatására az összes vad típusú egér elhalálozott, míg a *Trpv1*^{-/-} egereknek csak a 80%-a. A TRPV1 genetikai eltávolítása csökkentette a halálozás esélyét és tendenciózusan késleltette a halál bekövetkezését. Fontos megjegyezni, hogy a *Trpv1*^{-/-} egerek a TNF- α válasz 70%-os csökkenését mutatták 12 órával LPS adása után.

Azt is megfigyeltük, hogy a CLP nagymértékű mortalitást okozott az idősebb egerekben, azonban a *Trpv1*^{-/-} egerek szignifikánsan gyorsabban haláloztak el, mint a *Trpv1*^{+/+} kontrollok. A halálig eltelt átlagos idő *Trpv1*^{-/-} egereknél 20 \pm 2 óra, *Trpv1*^{+/+} egereknél 52 \pm 11 óra volt (P<0,01), a túlélési arány pedig 3,9-szer magasabb volt a *Trpv1*^{+/+} egerekben, mint *Trpv1*^{-/-} társaikban (86% vs. 22%, P<0,001).

4.3 A PACAP termoregulatórikus hatásának karakterizálása

A PACAP38 termoregulatórikus hatásának részletes felderítéséhez, 10 vagy 100 μ g/kg dózisban infundáltuk a peptidet (vagy fiziológiás sóoldatot) patkányok laterális agykamrájába és mértük az állatok T_c, T_{sk} és VO₂ értékeit respirometria rendszerben. A PACAP38 mindkét alkalmazott dózis esetén nagyfokú T_c emelkedést váltott ki már 10 perccel az anyagadást követően. A PACAP38-indukálta hipertermia mértéke dóziszfüggő volt. Magasabb dózis esetén megfigyelhető volt szignifikáns bőr vazokonstrikció [a csökkent hőleadási index (HLI) alapján; P<0,05] és fokozott VO₂, amelynek maximális értékei 21 \pm 6 és 14 \pm 6 ml/kg/min voltak, sorrendben a 100 és 10 μ g/kg dózisok esetén (P<0,001 mindkettőnél). Eredményeink azt mutatták, hogy mindkét autonóm hidegellenes termoeffektor (bőr vazokonstrikció és barna zsírszöveti hőtermelés) egyidejű azonnali aktivációja hozzájárul a PACAP38 hatására kialakuló hipertermiás válaszhoz. Amikor PACAP38-at 100 μ g/kg dózisban infundáltunk i.v., mind a maximális T_c emelkedés, mind pedig a hipertermia időtartama lényegesen elmaradt az i.c.v. adott azonos dózishoz képest (P<0,05), amely arra utal, hogy a PACAP38 termoregulatórikus hatásának támadáspontja a KIR-ben található.

A *Pacp*^{-/-} egerek aktívabbak voltak vad típusú társaiknál a nap mindkét (sötét és világos) fázisában (P<0,001). A világos fázis túlnyomó részében a KO egerek fokozott lokomotoros aktivitása magasabb T_{ab}-et eredményezett a kontrollokhoz képest (P<0,05); ugyanakkor éjszaka nem volt szignifikáns különbség a két egércsoport T_{ab}-e között. A nyugalmi

VO₂ szignifikánsan alacsonyabb volt *Pacap*^{-/-} egerekben a kontrollokhöz képest a respirometria rendszerben (P<0,001). Immunhisztokémiai kísérleteinkben nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a két genotípus között a c-Fos pozitív sejtek számában a MnPO területén, azonban a c-Fos expresszió csaknem háromszor magasabb volt (p<0,05) a MPO-ban a *Pacap*^{-/-} egerekben kontroll társaikhoz képest.

4.4. A NK1 receptor szerepe a szisztémás gyulladásban

LPS (120 µg/kg, i.p.) kezelés hatására a *Tacr1*^{-/-} és *Tacr1*^{+/+} egerekben egyaránt láz alakult ki a sóoldattal kezelt egerekhez képest. A *Tacr1*^{-/-} egerekben azonban a lázválasz kevésbé volt kifejezett, szignifikáns különbség csak 40-140 perc között mutatkozott a sóoldattal kezelt állatokhoz képest (P<0,05). A LPS-indukálta T_b emelkedést fokozott VO₂ hozta létre, amely hasonló dinamikával változott mint a T_b mindkét genotípusban. A *Tacr1*^{-/-} egerekben a LPS-indukálta T_b és VO₂ emelkedés mértéke lényegesen elmaradt a *Tacr1*^{+/+} társaikban megfigyeltekhez képest a LPS adást követő 40. perctől egészen a kísérlet végéig; mindkét paraméter szignifikánsan kisebb volt 40-120 percig (P<0,05 a genotípusok közötti különbség). Eredményeink azt mutatták, hogy a LPS-indukálta lázválasz csökkent mértékű a *Tacr1*^{-/-} egerekben már a kialakulás korai fázisában.

I.c.v. PGE₂ adás hatására mindkét genotípusban jelentős T_b és VO₂ emelkedés alakult ki, azonban sem a T_b, sem a VO₂ fokozódás mértéke nem maradt el *Tacr1*^{-/-} egerekben a *Tacr1*^{+/+} társaikéhoz képest. LPS adására masszív emelkedés volt megfigyelhető a TNF-α (P<0,001 sóoldathoz képest mindkét genotípusban) és IL-6 (P<0,01 a *Tacr1*^{+/+} egerekben és P<0,001 a *Tacr1*^{-/-} egerekben), de nem találtunk szignifikáns különbséget a genotípusok között sem a TNF-α, sem az IL-6 szintjében. LPS hatására fokozódott a COX-2 mRNS transzkripció a tüdőben, májban és az agyban mindkét genotípusban (P<0,001 sóoldathoz képest mindhárom szövetmintában), de a genotípusok között nem volt szignifikáns különbség. A *Tacr1*^{+/+} egerekben LPS hatására a COX-2 fehérje expressziója is jelentősen emelkedett a tüdőben (P<0,01 sóoldathoz képest) és a májban (P<0,05 sóoldathoz képest), de az agyban nem (P=0,264). LPS-dal kezelt *Tacr1*^{-/-} egerekben a COX-2 fehérje expressziója sem a tüdőben sem a májban nem fokozódott szignifikánsan a sóoldattal kezelt kontrollokhöz képest. A különböző genotípusú LPS-dal kezelt egerek összehasonlításakor azt találtuk, hogy a COX-2 fehérje expressziója szignifikánsan csökkent mértékű volt a tüdőben a *Tacr1*^{-/-} egerekben vad típusú társaikhoz képest (P<0,01), a májban pedig tendenciaszerű csökkenés mutatkozott a

Tacr1^{-/-} egerek COX-2 fehérje expressziójában (P=0,101). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy NK1 receptor hiányában a COX-2 fehérje expressziójának fokozódása zavart szenved.

5. Megbeszélés

A kísérletes munka során olyan új mechanizmusokat azonosítottunk, amelyek hozzájárulnak a szisztémás gyulladás folyamatainak modulációjához.

Kimutattuk, hogy a hiperbilirubinémia a J/J Gunn patkányokban jelentősen felerősítette a nagy dózisú LPS-dal kiváltott korai hipotermiát, feltehetően a nem-didergéses hőtermelés bilirubin általi direkt gátlása, illetve, esetlegesen, direkt vazodilatátor hatás által. Ez az új, hipotermiát felerősítő hatás lehet felelős, legalábbis részben, a J/J patkányokban megfigyelt tendenciózusan csökkent mértékű májkárosodás kialakulásáért nagy dózisú LPS hatásra. A hiperbilirubinémia Gunn patkányokban a nagy dózisú LPS-ra adott késői lázválasz nagyfokú csökkenését is eredményezte, ugyanakkor nem volt hatása a kis dózisú LPS által kiváltott lázvászra. A nagy dózisú LPS által kiváltott láz mértékének csökkenése vagy a bilirubin direkt hatásának eredménye a termoeffektorokra (nem-didergéses hőtermelés gátlása és bőr vazodilatáció kiváltása) vagy a bilirubin ROS-fogó hatásának köszönhető, amely gátolja a lázkeltő jelátviteli útvonalakat. Megjegyzendő azonban, hogy a kis dózissal végzett kísérletek eredményei határozottan arra utalnak, hogy a ROS jelátvitel nem játszik szerepet a kis dózisú LPS-dal kiváltott láz kialakulásában. A tanulmány részletei az eredeti közleményben találhatóak: Pakai et al. 2015 (II. számú az értekezés alapjául szolgáló közlemények listájában a 2. oldalon).

Azt találtuk, hogy a *Trpv1* KO egerek egy különleges termoregulatórikus fenotípussal rendelkeznek, amelynek részei hipometabolizmus, fokozott bőr vazokonstrikció, alacsonyabb T_a preferencia és magasabb lokomotoros aktivitás. A fő hőszabályozási eltérés a *Trpv1*^{-/-} egerekben úgy tűnik, hogy nem a megváltozott T_b, hanem a T_b fenntartásához felhasznált termoeffektorok mintázata különböző körülmények között. Miután direkt módon kizártuk, hogy a két fő autonóm effektor lényegesen károsodott lenne és tudatában voltunk annak, hogy az alacsonyabb T_a preferencia gyakran másodlagosan alakul ki fokozott lokomotoros aktivitás miatt, azt feltételeztük, hogy a magasabb lokomotoros aktivitás az elsődleges eltérés a *Trpv1*^{-/-} egerek fenotípusában. A tanulmány részletei az eredeti közleményben találhatóak: Garami et al. 2011 (V. számú az értekezés alapjául szolgáló közlemények listájában a 2. oldalon).

Kimutattuk, hogy a TRPV1 csatorna fiatal rágsálókban jól meghatározott anti-inflammatórikus szerepe az életkor előrehaladtával ellenkezőjére fordul. A TRPV1 gyógyszeres vagy genetikai gátlása csökkenti a túlélési rátát aszeptikus SIRS-ben és antibiotikummal kezelt szepszisben fiatalokban, azonban mindkét típusú TRPV1 gátlás ellentétes hatásúnak bizonyult aszeptikus SIRS-ben középkorú egerekben. A TRPV1 szerepének anti-inflammatórikusról pro-inflammatórikusra változása az életkor előrehaladtával feltehetően, legalábbis részben, a TRPV1 csatorna TNF- α termelésre gyakorolt szuppresszív hatásának megfordulásával magyarázható. Ezeknek a patobiokémiai változásoknak a jelentőségét mutatja, hogy az idősebb *Trpv1*^{-/-} egerek sokkal kevésbé tudtak ellenállni a polimikrobiális szepszisnek. A tanulmány részletei az eredeti közleményben találhatóak: Wanner et al. 2012 (IV. számú az értekezés alapjául szolgáló közlemények listájában a 2. oldalon). Eredményeink befolyásolhatják a TRPV1 antagonisták fejlesztését, amelyeket a fájdalomcsillapítók új generációjának is tekintenek. Amennyiben az egerekben talált eredményeink humán szepszisben is megerősítésre találnak, akkor a TRPV1 gátló terápia csökkentheti a szisztémás gyulladási választ a korábban nem fertőzött (antibiotikummal nem kezelt) idősekben, így ezáltal csökkentheti az ellenálló-képességüket bakteriális fertőzésekkel és szepszissel szemben. Egy ilyen lehetséges mellékhatás súlyos lehet, mert a fertőzések felismerése idős betegekben gyakran nehézségekbe ütközik többek között a láz elmaradása miatt, amely a kezelés késleltetését eredményezheti.

Bizonyítottuk, hogy a PACAP38 a KIR-ben található támadásponton keresztül vált ki hipertermiát. A PACAP38-indukálta hipertermia kialakulásáért mindkét autonóm hidegellenes effektor egyidejű aktivációja felelős: fokozott nem-didergésses hőtermelés és bőr vazokonstriktió. Feltételezzük, hogy a MnPO-ban található gamma-aminonovajsav ergicitású neuronok vesznek részt a PACAP38 termoregulatórikus hatásának kialakulásában. A PACAP hiánya hiperkinézishez és világos fázis alatti hipertermiához vezet szabadon mozgó *Pacap*^{-/-} egerekben egyelőre tisztázatlan mechanizmusokon keresztül, de a TRPV1 csatornák és megváltozott centrális biokémiai folyamatok szerepe feltételezhető. A magasabb lokomotoros aktivitás feltehetően kompenzatórikus mechanizmus a hipometabolizmus és hipotermia miatt, amelyek nyugalmi állapotban jelennek meg PACAP hiányában. A PACAP és TRPV1 hiány termoregulatórikus következményei között fellelhető hasonlóságok egy közös idegi útvonal megváltozásával lehetnek magyarázhatók, különös tekintettel arra, hogy a PACAP38

felszabadul az aktivált kapszaicin-érzékeny (vagyis TRPV1-expresszázó) idegi afferensekből a szisztémás keringésbe. A tanulmány részletei az eredeti közleményben találhatóak: Banki et al. 2014 (III. számú az értekezés alapjául szolgáló közlemények listájában a 2. oldalon).

Fényt derítettünk arra, hogy *Tacr1*^{-/-} egerekben a LPS-ra adott lázválasz már a korai fázisban csökkent mértékű volt. A molekuláris mechanizmusok tanulmányozása során nem találtunk különbséget a PGE₂ által indukált lázválaszban a *Tacr1*^{+/+} és *Tacr1*^{-/-} egerek között. A LPS hatására kialakult szérum citokin szintek és COX-2 mRNS expresszió a tüdőkből, májban és agyban szintén nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget a genotípusok között. A mRNS transzkripcióval ellentétben, amikor a COX-2 expressziót fehérje szinten vizsgáltuk, azt találtuk, hogy *Tacr1*^{-/-} egerekben a LPS-indukálta emelkedés szignifikánsan csökkent a tüdőkből és tendenciaszerűen elmaradt a májban a *Tacr1*^{+/+} egerekhez képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a NK1 receptor hozzájárul a LPS által indukált lázválasz korai fázisának létrejöttéhez a COX-2 fehérje expressziójának fokozása révén a perifériás szövetekben. A NK1 receptor LPS lázban betöltött szerepéről szóló eredményeink elősegítik a SP jelátvitel és a citokin-COX-2-PGE₂ tengely közti interakciók megértését kísérletes lázmodellben. Perspektívaként felmerül, hogy eredményeink révén a NK1 receptor új gyógyszer támadáspont lehet, ahogy azt napjainkban be is jelentette a Vanda Pharmaceuticals az új koronavírus (COVID-19) elleni gyógyszerek fejlesztése kapcsán.

6. Összefoglalás és következtetések

Összefoglalva, azt találtuk, hogy 1) a hiperbilirubinémia felerősíti a bakteriális endotoxinra adott hipotermiás választ; 2) a TRPV1 genetikai eltávolítása egerekben kismértékű termoregulatórikus fenotípusbeli változásokat eredményez, mert az egerek megváltozott termoeffektor mintázatot használnak a T_b fenntartásához; 3) szisztémás gyulladásban a TRPV1-nek fiatalokban anti-inflammatórikus szerepe van, amely idősebb életkorban pro-inflammatórikusra változik; 4) a PACAP38 termoregulatórikus hatásai a peptidet a szisztémás gyulladás kapcsán megfigyelhető lázválasz lehetséges mediátorává teszik; és 5) a SP jelátvitel befolyásolja a LPS láz perifériás COX-2 fehérje expresszió keresztül. Összeségében, eredményeink elősegítik a gyulladásos folyamatokban résztvevő kórélettani mechanizmusok jobb megértését és, perspektívikusan, alapjául szolgálhatnak új prognosztikai

és terápiás megközelítések fejlesztésének szisztémás gyulladásban, így például szepszisben, szenvedő betegek esetében. Felfedeztünk ligand, receptor és neurotranszmitter mechanizmusokat, amelyek szerepet játszanak a szisztémás gyulladásban. A gyulladásos mediátorok palettájának további kiterjesztésével eredményeink növelhetik tudásunkat a szisztémás gyulladás kórélettanáról, és transzlációs kutatási szempontból, új utakat nyithatnak meg diagnosztikai és prognosztikai eszközök, valamint prevenciós és talán gyógyszerek fejlesztéséhez.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Garami Andrásnak az elmúlt évek alatt nyújtott szakmai útmutatásait. Nagyon hálás vagyok Székely Miklós és Szelényi Zoltán Professzor Uraknak a kutatásaimban nyújtott szakmai segítségükért, folyamatos támogatásukért és bátorításukért, valamint köszönettel tartozom Koller Ákos Professzor Úrnak tanulmányaim alatt nyújtott segítőkész tanácsaiért. Külön köszönöm Andrej A. Romanovsky Professzor Úrnak a segítségét és támogatását, valamint, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy laboratóriumában tölthessek néhány évet a phoenix-i St. Joseph's Hospital and Medical Center-ben (Arizona, USA). Hálás vagyok a laboratóriumból Dr. Samuel Wanner-nek a közös munkánk során történt segítő és ösztönző beszélgetéseinkért. Hálámat szeretném kifejezni továbbá Hegyi Péter Professzor Úrnak, a Transzlációs Medicina Program, valamint Intézetünk vezetőjének, hogy inspiráló környezetet teremtett kutatásaim lefolytatásához. Kutatócsoportunk tagjainak szeretném megköszönni, hogy átsegítették ezeken az éveken mind elméleti, mind gyakorlati téren. Külön köszönöm Várnagyné Rózsafi Anikónak a kísérleteimben nyújtott értékes technikai segítségét. Köszönöm a PTE ÁOK Anatómiai Intézetéből Reglődi Dóra Professzor Asszonynak, hogy lehetővé tette számomra a PACAP kutatási projektekből való részvételemet. Köszönöm továbbá Dr. Tamás Andreának, Dr. Gaszner Baláznak és Dr. Bánki Eszternek a PACAP-pal kapcsolatos immunhisztokémiai vizsgálatok során nyújtott magas szintű szakmai segítségét. Köszönettel tartozom a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetből Pintér Erika Professzor Asszonynak odaadó segítőkészségéért, és az NK1 receptor vizsgálatához kapcsolódó kísérleteimben nyújtott szakmai támogatásáért, valamint Dr. Tékus Valériának, Dr. Kemény Ágnesnek és Dr. Pohóczky Krisztinának munkájáért a molekuláris biológiai vizsgálatokban. Köszönet illeti Ördög Katalint, Dr. Deres Lászlót és Dr. Mátics Róbertet a Western Blot vizsgálatok lefuttatásában nyújtott szakértői segítségükért. Végül, de nem utolsó sorban, hálámat szeretném kifejezni családomnak, a Ph.D. tanulmányaim során tanúsított végtelen támogatásukért és türelmükért

A szerző által jelen dolgozatban összefoglalt kutatások támogatása részben a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (FK 124483); a GINOP “Stay alive - translational medicine for better healthcare” (2.3.2-15-2016-00048); az EFOP “Live longer” (3.6.2-16-2017-00006), valamint az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj által valósult meg.