

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Proinflammatorikus gén-és fehérje expresszió vizsgálata
gerincevelői felületen hátsó szarvban CFA indukálta
krónikus gyulladás során**

Ducza László

Témavezető: Dr. Holló Krisztina



DEBRECENI EGYETEM
Idegtudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2022

**Proinflammatorikus gén-és fehérje expresszió vizsgálata
gerincvelői felületen hátsó szarvban CFA indukálta
krónikus gyulladás során**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudomány tudományágában

Írta: Ducza László, okleveles molekuláris biológus

Témavezető: Dr. Holló Krisztina, PhD

Idegtudományi Doktori Iskola, Debreceni Egyetem

A doktori szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Fülesdi Béla, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szőke Éva, PhD

Dr. Boczán Judit, PhD

A doktori szigorlat időpontja: DE-ÁOK, Aneszteziológia és Intenzív Terápiás
Tanszék oktatóterme, 2023.01.18. 10.00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Pál Balázs, PhD

Dr. Puskár Zita, PhD

A bírálóbizottság elnöke:

Prof. Dr. Fülesdi Béla, az MTA doktora

A bírálóbizottság tagjai:

Dr. Szőke Éva, PhD

Dr. Boczán Judit, PhD

Dr. Pál Balázs, PhD

Dr. Puskár Zita, PhD

Az értekezés védésének időpontja: DE-ÁOK, Sürgősségi Orvostani
Tanszék előadóterme, 2023.01.18. 12.00 óra

1. BEVEZETÉS

1.1 Krónikus gyulladás

A krónikus fájdalom rendkívül nagy terhet ró az egyén fizikai és mentális egészségére is, jelentősen lerontva az életminőséget. A munkaképesség csökkenése vagy elvesztése, és az egészségügyi rendszer fokozott igénybevétele kihat a társadalom egészére is. A krónikus fájdalom jellege a jelenleg érvényes szempontok alapján lehet nociceptív, neuropátiás, vagy nociplasztikus. A nociceptív fájdalomérzet (szomatikus vagy viscerális) előzménye, hogy mechanikai, kémiai és termális ingerek perifériás szöveti sérülés vagy gyulladás által magas ingerküszöbű idegvégződéseket aktiválnak, melyek jeleket továbbítanak a központi idegrendszerbe. Ezzel szemben a neuropátiás fájdalomérzet kiváltó oka maga a jeltovábbító rendszer, tágabb értelemben a szomatoszenzoros rendszer sérülése. A nociplasztikus fájdalom során szöveti sérülés nem történik, de a nociceptív jelfeldolgozó rendszer változásai miatt fájdalomérzet alakul ki. A nociceptív és a neuropátiás fájdalom létrejöttének fontos mediátorai a proinflammatorikus citokinek, amelyek hatásukat a neuraxis minden szintjén kifejezhetik. Az interleukin-1 családba tartozó proinflammatorikus citokinek termelődésében fontos szerepet játszik az inflammaszómális rendszer is.

1.2 Neuron-glia interakció, háromrészes szinapszis

A kutatók által sokáig „csak” passzív, a neuronális homeosztázis biztosításának szerepére alkalmasnak ítélt nem excitábilis sejtek jelentős funkcióval bírnak a fájdalom kialakulásában és annak fenntartásában is. A gliasejtek számos nociceptív stimulussal aktiválhatók, melynek során jelentős számbeli, morfológiai és funkcionális változáson mennek keresztül. Az aktivált állapot eredményeként kialakuló szignálútvonalak szereplői a mitogén-aktivált protein kinázok (MAP kinázok), extracelluláris szignál által regulált kinázok (ERK), p38-kinázok, c-jun N-terminális kináz (JNK) sokféle mediátor termelődését szabályozhatják, beleértve a proinflammatorikus citokineket is.

A centrális szenzitizációban a hagyományos pre- és posztzinaptikus elemeken kívül fontos szerepe van a neuron-glia kommunikációnak. A gliasejtek ugyanis képesek aktívan hozzájárulni a szinaptikus információ feldolgozásához és a neuronális plaszticitáshoz. Működésük következménye a

serkentő neurotranszmisszó állandósulása. A glia aktiváció során termelődő proinflammatorikus citokinek pozitív feedback szabályozás révén növelik a serkentő tónust. Az asztrocita sejtekben ezenfelül csökkenhet a glutamát visszavétele is, így a neurotranszmitter hosszabb időn keresztül fejtheti ki hatását a szinapszisban.

1.3 A citokinek jelentősége

A citokin egy összefoglaló kategóriánév, ide sorolhatóak a lymphokinek a monokinek, és a kemokinek is. A sejtekre kifejtett hatásuk távolsága alapján megkülönböztethetünk autokrin, parakrin vagy endokrin mechanizmusokat, amelyek eredménye sokszor szerteágazó és redundáns. Termelődésük gyakran kaszkádszerűen történik, az adott citokin stimulációjával aktiválódott célsejtek újabb citokinek állítanak elő. Felszabadulásuk kiváltható az idegrendszerben is, többek között a gerincvelőben vagy a hátsó gyöki ganglionokban. Jelenlétük elengedhetetlen a sejtnövekedéshez és a szöveti regenerációhoz, valamint a szervezet fertőzésekre és szöveti sérülésekre adott válaszáinál.

Egyik fő csoportjuk, a proinflammatorikus citokinek a korai immunválasz szervezése során immunsejteket vonzanak a sérülés vagy fertőzés helyére. Ezen fehérjék hatáserőssége olyan nagy mértékű, hogy kevesebb, mint tíz receptor-ligand interakció elegendő lehet a fiziológiai válasz kiváltásához. A kialakuló reakció káros hatású is lehet, ugyanis nemcsak a behatoló patogének, de a szervezet maga is károsodhat a kialakuló ún. „citokin vihar” következtében. A citokin vihart elsősorban patogén vírusok és baktériumok indukálhatják azáltal, hogy eltolja az egyensúlyt a kívánatos gyulladásos választól a gazdaszervezetre káros immunválasz felé, amely súlyos következményekkel jár.

1.4 Az IL-1 β és receptora az IL-1R1

A proinflammatorikus citokinek közé tartozó interleukin-1 β (IL-1 β) megnövekedett termelődése kóros folyamatok bekövetkezését jelzi. Az IL-1 β perifériás injekciója markáns mechanikai és termális hyperalgesiát idéz elő, illetve hozzájárul más pronociceptív mediátorok hatásának kifejtéséhez is. A citokin receptorán ható interleukin-1 receptor antagonistá (IL-1ra) (Anakinra) beadása szignifikánsan csökkenti a komplett Freund adjuváns (CFA) intraplantaris injekcióját követő mechanikai hyperalgesiát. Jelenléte

nem korlátozódik a perifériára, az IL-1 β -t azonosították a gerincvelőben és az agyvelőben is. Az IL-1 β intracerebroventrikuláris injekciója termális hyperalgesiát vált ki, míg intratekális beadása mechanikai allodyniát és hyperalgesiát. Az IL-1 β közvetlenül növeli a neuronális excitabilitás mértékét a tranziens receptor potenciál csatorna (alcsalád V) (TRPV1), a feszültségfüggő nátriumcsatornák, illetve gamma-amino-vajsav (GABA)- és N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorok modulálása révén. Az ionotróp NMDA receptorok kiemelt szerepet töltenek be az aktivitásfüggő szinaptikus plaszticitásban és a krónikus fájdalomban. Az NMDA receptor NMDA receptor 1 (NR1) alegysége és az interleukin-1 receptor 1 (IL-1R1) kolokalizációja kimutatható neuronokban. A sérülés indukálta centrális szenzitizáció során a gerincvelőben aktiválódott gliasejtek termelte proinflammatorikus citokinek, köztük az IL-1 β hozzájárulnak a krónikus fájdalom fenntartásához.

Az IL-1 β -t számos neuropátiás állatmodellben is vizsgálták, melynek eredményeként hátsó gyöki ganglionokban, és a gerincvelőben megemelkedett fehérje expressziót detektáltak. Az IL-1 β receptora az IL-1R1, melynek ligandjai közé tartoznak az IL-1 α és az IL-1ra is. Egy másik fehérje az IL-1R3 (korábbi nevén IL-1R járulékos fehérje) koreceptorként funkcionál, a ligandkötő receptorral és annak ligandjaival (IL-1 α , IL-1 β) egy trimer szignálkomplexet alkotva indítja el a jelátviteli kaszkádot. Az IL-1ra bekötődése megakadályozza a receptor és a koreceptor kapcsolódását, ezáltal szignál transzdukció nem alakulhat ki. A trimer jelátviteli komplex működésének kulcseleme az IL-1R1 és az IL-1R3 TIR doménjainak dimerizációja, amely a myeloid differenciáció és elsődleges válasz gén (MYD88), a Toll-interaktív protein (TOLLIP), és az IL-1 receptor asszociált kináz 4 (IRAK4) nevű adaptorfehérjéket sorozza be. A MYD88 kapcsolódása indítja el az IRAK4, IRAK2 és az IRAK1 foszforilációját, amely a tumor nekrozis faktor asszociált faktor 6 (TRAF6) csatlakozását és oligomerizációját váltja ki. A TRAF6 együtt a foszforilált IRAK1 és IRAK2 fehérjékkel a TGF- β aktivált kináz 1 (TAK1) enzimhez, és annak kötőfehérjéihez a TAK kötőfehérje 2 és 3-hoz (TAB2 és TAB3) asszociálódnak. Ezt követően a TRAF6 ubiquitinálódik, a TAK1 pedig foszforilálódik. Foszforilációt követően a jelátvitel két úton folytatódhat.

Az egyik útvonalon a foszforilált TAK1 aktiválja az NF κ B beta alegység inhibitor (IKKb), amely foszforilálva az NF κ B inhibitor (I κ B) kiváltja a fehérje degradációját, ezáltal a nukleáris faktor kappa β (NF κ B) képes sejtmagba transzlokálódni, és célgének transzkripcióját iniciálni.

A másik útvonalon a TAK1 enzim MAPK-kináz (MKK) fehérjékkel interakcióba lépve MAPK, JNK és ERK enzimeket aktivál, amelyek szubsztrátjai a sejtproliferációban fontos szerepet játszó c-Jun, c-Fos, c-Myc és az aktiváló transzkripciós faktor 2 (ATF2).

1.5 Az IL-1 β keletkezése, az inflammaszómális rendszer alapjai

A gyulladáshoz vezető folyamatokban fontos szerepet játszó interleukin-1 család több tagja enzimátikus hasítást követően alakul aktív, receptorai által is felismert formává. Az aktív citokin előállításában az *inflammaszómának* nevezett fehérje komplex játszik szerepet.

Az inflammaszómák három főbb szerkezeti elemmel rendelkeznek: citoszolikus NLRP, (pro)kaspáz-1 enzim, és a kettő közötti interakciót biztosító adaptorfehérjék. Az NLRP fehérjék a karboxiterminálison leucin-gazdag ismétlődést (LRR) tartalmaznak, középen egy konzervált ún. NACHT domén található (rövidítése a neuronális apoptózis inhibitor fehérje-*NAIP*, MHCII. transzkripciós aktivátor- *CIITA*, inkompatibilis lókuszos protein *Podospora anserina* fajból- *HET-E*, és telomeráz-asszociált fehérje-*TPI* betűszavakból), amely a nukleotidkötésért és a fehérjeoligomerizáció létrejöttéért felelős, illetve az aminoterminálison egy variábilis pyrin (PYD) domén helyezkedik el, amely az NLR fehérjék elkülönítésének alapja.

A kanonikus útvonal szerinti aktiválódás során az addig inaktív állapotú NLR fehérjék homotipikus összekapcsolódásra válnak képessé (triggering lépés), majd egy PYD, és egy kaspáz aktiváció és toborzó domén (CARD) elemet tartalmazó adaptor apoptózis-asszociált foltfehérje (ASC) révén komplexet képeznek a prokaspáz-1 enzimmel, amely annak autokatalitikus aktivációjához vezet. A kaspáz-1 pro-IL-1 β (31 kDa) fehérjén történő hasítása az aktív IL-1 β (17 kDa) extracelluláris szekrécióját készíti elő.

Az inflammaszómális rendszer genetikai beágyazottságáért a NF κ B nevű transzkripciós faktor felelős, amely számos proinflammatorikus citokin, köztük a pro-IL-1 β *de novo* szintézisét is iniciálja. Az IL-1 β keletkezésének egy másik lehetséges módja a nem kanonikus útvonal, amely a kaspáz-11 (emberben kaspáz 4/5) enzimátikus működésének eredménye. A lipopoliszacharid (LPS) volt az első molekula, amelyet a kaspáz-11 nonkanonikus útvonalának direkt aktivátoraként felfedeztek. Internalizálódás után az LPS-t a kaspáz-11 ismeri fel, a kialakult LPS-kaspáz-11 komplexek CARD domének részvételével oligomerizálódnak, majd autoproteolitikus

aktiváción esnek át. Az enzimatis hasítás érint egy másik fehérjét, a gasdermin D-t is (GSDMD), amely egy aminoterminális pórúformáló doménre, és egy karboxiterminális autoinhibitorikus doménre válik. A pórúformáló domén a sejtmembránhoz asszociálódva számos citoplazmatikus molekula extracelluláris felszabadítását irányíthatja, köztük az IL-1 β -t is.

1.6 Inflammaszómalis rendszerek a központi idegrendszerben

Az inflammaszómalis rendszer intracelluláris NLRP fehérjéi közül a következőknek tulajdonítanak leginkább fontos szerepet a központi idegrendszerben: az NLRP1-nek neuronokban, az NLRP2-nek asztrocitákban, illetve az NLRP3-nak mikroglia sejtekben.

1.6.1 NLRP1 inflammaszóma

A neuronális NLRP1 inflammaszóma a kaszpáz-1 enzim aktivációját két útvonalon képes befolyásolni. A direkt út során a CARD domén révén, az indirekt során pedig a PYD domén által ASC adaptorfehérjén keresztül jön létre a kapcsolat. Egyedülálló szerkezeti sajátága, hogy a legtöbb NLR fehérjével ellentétben az NLRP1 a karboxiterminálison tartalmazza a CARD domént, illetve rendelkezik egy ún. „funkciója megtalálni” (function to find) autoproteolitikus hasításra képes FIIND doménnal is, amely processzálas után két, egymással nem kovalens módon összekapcsolt polipeptidet eredményez. A FIIND domén esszenciális az NLRP1 működéséhez, amelynek génje csak egy humán fehérjét, míg egerekben számos paralóg enzimet kódolhat.

Az NLRP1 megértésében áttörést hozott, hogy az eger NLRP1B paralóg fehérjéről kiderült, hogy a kaszpáz-1-et a *Bacillus anthracis* letális toxinja (LeTx) révén is képes aktiválni. A kétkomponensű toxin letális faktor proteázt (LF), illetve egy csatornaformáló protektív antigént (PA)-t tartalmaz, amely képes a sejtekbe továbbítani a toxint. Az aminoterminálisnál történő LeTx hasítás ugyan destabilizálja az NLRP1 szerkezetét, ubiquitinációt és proteozóma mediált degradációt vált ki, paradox módon mégis így aktiválja a rendszert. A FIIND domén autoprocesszálasa ugyanis nem engedi a proteozómalis proteáz végighaladását a fehérjeláncon, a hasítással létrejövő karboxiterminális közeli bioaktív fragmentumok kapcsolódási platformot alakítanak ki a kaszpáz-1 számára. Ezt a jelenséget proteozómalis degradáció általi inflammaszóma aktivációnak vagy „funkcionális degradációnak”

nevezik. Az NLRP1 komplex érintettsége kognitív zavarokkal járó kórképekben és neurodegeneratív betegségekben kellően bizonyított.

1.6.2 NLRP2 inflammaszóma

Az NLRP2 inflammaszóma számos egyéb néven is ismeretes (NALP2, NBS1, PAN1, PYPAF2). Hasonlóan a többi NLR receptorhoz, képes az ASC fehérjével együttműködve aktiválni a kaspáz-1 enzimet, azonban gátolja az NFkB útvonalat is. Egyik allélvariánsa nem képes erre a gátlásra, ezért krónikus gyulladásos megbetegedések, például a *Muckle-Wells* szindróma kialakulásában kóroki szerepe bizonyított.

Az NLRP2 humán asztrocita sejtekben nagy mennyiségű IL-1 β termelődést vált ki. Pannexin csatorna blokkoló probenecid és a purinerg P2 receptor X7 (P2X7) receptor inhibitor Brilliant Blue G (BBG) szignifikánsan csökkenti az ATP indukálta NLRP2 aktivációt. Hasonló következtetésre jutottak az NLRP2 kis interferáló RNS (siRNS) alkalmazását követő csendesítése során is.

1.6.3 NLRP3 inflammaszóma

Az NLRP3 inflammaszóma multiprotein komplexe a leginkább tanulmányozott NLR receptor. Az összeszerelésben résztvevő elemek az NLRP3, ASC, és a kaspáz-1, amelyek egymáshoz való kapcsolódásával reagálnak a felismert ligandokra, de az inflammaszóma a kaspáz-11 mediálta nonkanonikus útvonalon keresztül is képes aktiválódni.

Az NLRP3 komplex mikroglialis aktivációja bizonyítást nyert egyes degeneratív betegségekben. A fibrilláris α -synuclein felhalmozódása dopaminerg neuronokban indukálhatja az NLRP3 aktivációját perifériás vérből származó monocitákban és mikroglia sejtekben, amelyek IL-1 β , IL-18 és egyéb neurotoxikus termékek felszabadításával a környező neuronok pusztulását idézik elő Parkinson kórt eredményezve. A legújabb eredmények szerint az NLRP3 hozzájárulhat az amyloid- β fehérje (A β) plakkok felhalmozódásához is Alzheimer kórban és frontopoláris dementiában.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Mivel a krónikus fájdalom kialakulásáról még jelenleg is sok ponton hiányosak ismereteink, ezért kísérleteink kezdetén rendszerszintű megközelítést tűztünk ki célul. A nociceptív jelfeldolgozó rendszer három szintjét vizsgáltuk (hátsógyöki ganglion, gerincvelői hátsó szarv és gyrus cinguli). A jelen munkában a rendszer első kapcsolóállomásának tekintett gerincvelő hátsó szarvában elvégzett kísérleteink eredményeit tárgyaljuk.

Kísérleti modellként a komplett Freund adjuváns (CFA)-indukált gyulladáshoz (újabb terminológiával nociceptív) fájdalommodellt alkalmaztuk, amelyet a laboratóriumunkban már korábbi munkákban is vizsgáltunk.

Kísérleteink kiindulásaként 45 gént kiterjedő vizsgálatot végeztünk el, kontroll és CFA-kezelt állatok gerincvelői hátsó szarvából izolált mintákon. A génextpressziós (TLDA) kísérletekben négy gén szignifikáns mértékű változását találtuk a CFA-indukált modellben - kiemelkedő (hatszoros mértékű) expressziós változást az interleukin-1 receptor-1 (IL-1R1) esetében találtunk, amely az interleukin-1 receptor ligandkötő egysége.

Az IL-1R1 gerincvelői expresszióját korábbi munkák már bizonyították, azonban a receptor és ligandjának (IL-1 β) pontos celluláris megoszlásáról nem álltak rendelkezésre adatok a gerincvelő hátsó szarvának területén. Ezért a kísérletek következő lépésében a TLDA eredmények alapján az IL-1R1 és ligandjának gerincvelői megoszlásának felderítésére végeztünk vizsgálatokat kontroll és CFA-injektált állatokban.

Felmerült az a kérdés is, hogy az IL-1R1 hiánya hogyan befolyásolja a kísérleti állatok nociceptív válaszkészségét. Ezen kérdés vizsgálatára IL-1R1 génhányos és C57/BL6 vad típusú egerek esetén elvégeztük az elektronikus von Frey és a Hargreaves viselkedési teszteket.

Mivel a gerincvelői szövetextraktumban a fehérje expressziós vizsgálatok során kimutattuk az IL-1 β hasított (aktív, 17 kDa) formájának megjelenését a 3. kísérleti napon, ezért célul tűztük ki az IL-1 β aktív formájának előállításában szerepet játszó inflammaszoma típus vizsgálatát, amelyről nem álltak rendelkezésre korábbi irodalmi adatok a CFA modellben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Kísérleti állatfelhasználás, a krónikus gyulladás állatmodellje

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények kísérletes munkái során hím *Wistar-Kyoto* patkányokat (Gödöllő, Magyarország $n=78$), vad típusú hím C57/BL6 egereket ($n=18$), illetve Labow és mtsai által genetikailag módosított hím IL-1R1KO egereket ($n=18$) használtunk (B6.129S7-Il1r1 tm1/mx./J stock #:003245), amelyeket a *Jackson Laboratories* cégtől szereztünk be. A felhasznált állatokat normál fényviszonyok között tartottuk *ad libitum* takarmányozással.

A krónikus gyulladással járó fájdalom indukálásához 100 μ l (egér) vagy 150 μ l (patkány) CFA (víz, paraffinolaj és hővel előlt *Mycobacterium* szuszpenziója és fiziológiai sóoldat 1:1 arányú keverékét) injektáltuk intraplantarisán az állatok jobb hátsó talpába korábbi közlemények leírásai alapján. A vad típusú C57/BL6 egértörzs és az IL-1R1 KO egerek egyes csoportjai ($n=6-6$) CFA oltás helyett álkezelést, fiziológiai sóoldatot kaptak a jobb hátsó talpukba. A kontroll csoportba tartozó patkányok és egerek nem kaptak kezelést.

3.2 TaqMan alacsony denzitású array módszer (TLDA)

A TLDA módszerrel a gerincvelői hátsó szarv génexpressziós változásainak vizsgálatára nyílt lehetőség. A gerincvelő laminektómiával történő feltárását követően az L4-L5 lumbális szegmentumok eltávolításra kerültek a kontroll állatokból ($n=9$), illetve a CFA-val kezelt patkányokból az injekciót követő 3. napon ($n=9$). A kezelt állatok injekcióval ipsilaterálisan (jobb oldal) elhelyezkedő gerincvelői hátsó szarvát (kezelt oldal) a többi gerincvelői résztől elkülönítettük további feldolgozás céljára. A szövetek eltávolítását követően RNS-t izoláltunk, amely minőségét Agilent mikroelektroforézissel és Nanodrop fotometriás rendszerrel ellenőriztük. Ezt követően cDNS könyvtárát hoztuk létre, amelynek 100 ng mennyiségét töltöttük rá a TLDA kártyák portjaira. A 8 porton keresztül 48 gén expressziójának vizsgálata vált elérhetővé meghatározásához. A kapott adatok három párhuzamos kísérletből származnak. Az egyes gének expressziójának értékeit Livak és mtsai $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszere alapján definiáltuk.

3.3 Mechanikai és termális viselkedési tesztek

A kísérletek során felhasznált állatok nociceptív válaszkészségét patkányoknál mechanikai allodynia teszttel (*Dynamic plantar aesthesiometer, Ugo Basile*), egereknél pedig mechanikai- és termális allodynia teszttel is (*Plantar Test Instrument-Hargreaves Apparatus, Ugo Basile*) vizsgáltuk. Az állatok mechanikai- és/vagy termális nociceptív talpvisszahúzási ingerküszöbét (továbbiakban MTT és TTL) mindkét talpon megmértük CFA, illetve fiziológiás sóoldat beadása előtt és után is, naponta ismételve. Azoknál az egér- (n=36) és patkány (n=18) kísérleti csoportoknál, amelyeknél kizárólag mechanikai és/vagy termális allodynia tesztet végeztünk, de azt követően nem használtuk fel más kísérletek során, az injekció utáni 11. napig történtek mérések, míg azoknál a patkányoknál, amelyeket más vizsgálatokra is felhasználtunk (n=60) a 3. napig, ugyanis ekkor volt mérhető a legalacsonyabb mechanikai nociceptív ingerküszöb.

A mechanikai allodynia teszt során az állatokat egy hálós, kemény műanyagplatform alappal rendelkező felülről zárt plexiüveg dobozba helyeztük, amely a mérés idejére csökkentette a mozgásteret. A kísérlet során az állatok hátsó talpára egy fémből készült, mintegy 0,5 mm átmérőjű *von Frey* típusú filamentumot ráirányítva, fokozatosan erősödő nyomást (g) fejtettünk ki, ameddig az állat a hátsó talpát vissza nem húzta. A mérőberendezés a visszahúzásnál jelentkező értékeket regisztrálta.

A termális allodynia mérése során az állatokat egy hasonló, az előzőekben leírt plexiüveg dobozban helyeztük el, ahol a hátsó talpukra egy infravörös fényforrást irányítottunk standard intenzitással. A fényforrásból érkező hőstimulust egészen a hátsó talp visszahúzásának idejéig (s) alkalmaztuk. A visszahúzásnál a rendszer megszakította a sugárnyalábot, az eltelt időt a berendezés detektálta.

3.4 Western blot

A célfehérjék kimutatását, azok mennyiségében CFA-val történő oltás hatására bekövetkező változások detektálását immunoblotal végeztük. A lumbális gerincvelői szövetek mintagyűjtése a TLDA módszerrel megegyezően történt a kontroll (n=6) és a CFA-val kezelt (n=6) patkányokból. A szövetmintákat először szonikáltuk proteáz inhibitorokat tartalmazó lízispufferban, majd a sejttörmeléseket centrifugálással eltávolítottuk. A minták

fehérjekoncentrációját detergens kompatibilis BCA assay segítségével határoztuk meg, majd redukáló mintapufferben történő feloldásuk után 10%-os nátrium-dodecil-szulfát (SDS)-poliakrilamid gélen futtattuk meg majd elektroforetikus transzferáltuk polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra, amelyet 10%-os borjúsérum albumint tartalmazó Tritont tartalmazó Tris-pufferelt fiziológiás sóoldat (TTBS) oldattal blokkoltunk, majd inkubáltuk az alábbi primer antitestek egyikével: Kecske anti-IL-1R1 receptor antitest (1:500, RnD Systems), nyúl anti-IL-1 β antitest (1:500, Peprotech), nyúl anti-NLRP1 antitest (1:1000, Abcam), nyúl anti-NLRP2 antitest (1:500, Abcam), nyúl anti-NLRP3 antitest (1:500, Abcam), és belső kontroll antitest (egér anti- β -tubulin, 1:2000, Sigma).

Számos TTBS-ben történő mosási lépés után, a blotokat nyúl anti-kecske-, kecske anti-nyúl vagy nyúl anti-egér IgG tormaperoxidázzal konjugált szekunder antitesttel inkubáltuk (1:1000 DakoCytomation). A fehérjesávokat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kromogén reakció révén vizualizáltuk. Az immunblottok kvantifikációját Image J szoftver használatával végeztük, az optikai denzitások értékeit β -tubulinra normalizálva határoztuk meg.

3.5 Enzim-kapcsolt immunoszorbens assay (ELISA) módszer

A patkány IL-1 β Quantikine ELISA kit révén az IL-1 β fehérje össz mennyiségét kontroll (n=3) és CFA kezelt (n=3/nap) állatok gerincvelői homogenizátumaiból izoláltuk az injekciót követő 1-4. napokon. A szövetmintákat mechanikusan homogenizáltuk proteáz inhibitorokat tartalmazó jéghideg RIPA pufferban, majd 20 perces rázatást és centrifugálást követően eltávolítottuk az oldhatatlan szövetörmelégeket. A felülúszó 50 μ l-es térfogatát triplikátumban használva detektáltuk a homogenizátumok IL-1 β mennyiségét. A további lépések során a kitet gyártó utasításai alapján jártunk el.

3.6 Immunohisztokémia

3.6.1 Szövetelőkészítés

Az immunohisztokémiai vizsgálatokat kontroll (n=7), és CFA-val kezelt (n=8) patkányokon végeztük az injekció utáni 3. napon. Az állatoknál nátrium-

pentobarbitál beadásával mélyaltatást kiváltva, transzkardiális perfúziót végeztünk fiziológiás sóoldat és 4 % paraformaldehidet tartalmazó 0,1 M koncentrációjú foszfát puffer alkalmazásával. A felhasznált állatok gerincvelői lumbális L4-L5 szegmentumainak eltávolítása után a mintákat posztfixáltuk 4 órán keresztül, majd 10- és 20 %-os szacharózt tartalmazó 0,1 M PB oldatba helyeztük éjszakára. Folyékony nitrogénes feltárást, majd agarba történő beágyazást követően, 50 μ m vastag szeleteket készítettünk Vibratome használatával. Az így készült metszeteket használtuk a következőkben leírt módszerek során.

3.6.2 Immunoperoxidáz reakciók

Az immunoperoxidáz reakció során a célfehérjék lamináris expresszióját és eloszlását tanulmányoztuk gerincvelői hátsó szarvban úszó metszeteken. Endogén peroxidázgátlást követően a metszeteket 0,01 M Tris-PBS (TPBS)-t tartalmazó 10 %-os normál kecske- vagy nyúl sérumban ráztuk 50 percig, majd 1%-os TPBS alapú NGS vagy NRS oldattal történő 15 perces mosás után inkubáltuk a Western blotnál is alkalmazott primer antitestek egyikével 3 éjszakát:

1%-os NRS-ban vagy NGS-ban történő mosási lépéseket követően a metszeteket 1% biotinilált nyúl anti-kecske (1:200, Vector Labs) vagy biotinilált kecske anti-nyúl szekunder IgG antitestet (1:200, Vector Labs) tartalmazó 0,01 M TPBS oldatban inkubáltuk 5 órán keresztül. A korábban leírt mosási lépéseket követően a metszeteket avidin-biotinilált tormaperoxidáz komplex (ABC 1:100, Vector Labs) hozzáadásával inkubáltuk éjszakára. Mosást követően az immunreakciót DAB reagenssel vizualizáltuk. TRIS és PB oldatban történő mosást követően a metszeteket dehidráltuk felszálló alkoholsorban. Xilolos kezelést követően a metszeteket DPX médium (Sigma) segítségével rögzítettük tárgylemezre. A metszetekről Olympus CX-31 epifluoreszcens mikroszkóp használatával készítettünk felvételeket.

3.6.3 Kettős immunofluoreszcens festések

Az IL-1R1 kolokalizációs vizsgálatánál 1%-os NDS-t tartalmazó 0,1 M PBS oldatban a következő primer antitesteket alkalmaztuk: kecske anti-IL-1R1 receptor antitest (1:500), illetve a következő antitestek egyike: tengerimalac anti-CGRP (1:2000, Peninsula Labs), biotinilált IB4 (1:2000, Sigma),

tengerimalac anti-VGLUT2 (1:2000, Chemicon), egér anti-VGAT (1:2000, Synaptic Systems), egér anti-glia fibrilláris savas protein (GFAP, 1:1000, Chemicon), egér anti-CD11b (1:500, Bachem), nyúl anti-KCC2 (1:2000, Upstate Biotechnology), egér anti-posztszinaptikus denzitás fehérje 95 (PSD95, 1:100, Frontier), vagy egér anti-gephyrin (1:100, Synaptic Systems) antitestek. Az egyes reakciókat 3 napig hagytuk végbemenni 4 °C-on.

Az 1%-os NDS-t tartalmazó 0.1M PBS oldatban történő mosások után a metszeteket Alexa Fluor 555-tel konjugált számár anti-kecske IgG (1:1000, Molecular Probes) szekunder antitesttel, és az alábbi antitestek egyikével inkubáltuk 2 órán keresztül: Alexa Fluor 488-al konjugált számár anti-tengerimalac IgG (1:1000, Molecular Probes), Alexa Fluor 488-al konjugált streptavidin (1:1000, Molecular Probes), Alexa Fluor 488-al konjugált számár anti-egér IgG (1:1000, Molecular Probes) vagy Alexa Fluor 488-al konjugált számár anti-nyúl IgG (1:1000, Molecular Probes).

Az IL-1 β - és az inflammaszómális NLRP1, NLRP2 és NLRP3 fehérjék expresszióját gliasejtekben a nyúl anti-IL-1 β (1:500), nyúl anti-NLRP1 (1:100), nyúl anti-NLRP2 (1:500), és nyúl anti-NLRP3 (1:500) antitestekkel, illetve a következő antitestek egyikével vizsgáltuk: egér anti-GFAP (1:1000), vagy tengerimalac anti-ionizált kalciumkötő adaptor molekula 1 (Iba1, 1:2000, Synaptic Systems). A primer antitesteket az előzőekben leírt időtartamban és normál szérumos hígításban (NGS) használtuk a mosási lépésekkel együtt. A szekunder antitestekkel történő inkubálást Alexa Fluor 488-al konjugált kecske anti-nyúl IgG, (1:1000, Thermo Fisher Scientific), illetve Alexa Fluor 555-tel konjugált kecske anti-egér IgG, (1:1000, Thermo Fisher Scientific), vagy Alexa Fluor 555-tel konjugált kecske anti-tengerimalac IgG, (1:1000, Thermo Fisher Scientific) és a mosásokat (1% NGS szérum, majd PBS) követően a metszeteket tárgylemezre szedtük fel, és Vectashield médiummal (Vector Labs) fedtük le.

3.6.4 Konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal végzett kvantitatív analízis

A metszetekről ún. z-stack, 1 μ m vastag optikai szeletekből felépülő felvételeket készítettünk a gerincvelői hátsó szarv Rexed I és II-es laminájában Olympus FV1000 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal. A kolokalizáció kvantitatív mértékét egy 10x10-es egyenként 4 μ m-es élhosszúsággal rendelkező négyzetekből álló laprács (grid) segítségével határoztuk meg.

Az IL-1R1 esetén a rácsvonalakra eső immunreaktív foltokat

megszámolva, ellenőriztük, hogy azok kolokalizálnak-e az axonális (CGRP, IB4, VGLUT2, VGAT), gliális (GFAP, CD11b), illetve posztszinaptikus membrán markerek (PSD95, gephyrin) immunreaktív foltjaival. A KCC2 neuronális markerfehérjével történő összevetés esetén külön megszámloltuk azokat az IL-1R1 immunreaktív foltokat, amelyek a KCC2 pozitív profilok membránjában vagy citoplazmájában helyezkedtek el.

Az IL-1 β esetén a receptorról azonos módon határoztuk meg a kolokalizációs értékeket gliális (GFAP, Iba1) markerekkel. Az IL-1 β expressziójában bekövetkező változásokat, illetve GFAP pozitív asztrociták térfogat változásait IMARIS szoftver (Bitplane) használatával is modelleztük. Az IL-1 β immunoreaktív foltok távolságát a GFAP pozitív asztrocita nyúlványoktól távolságmátrix révén modelleztük. Az inflammaszómális marker NLRP1, NLRP2 és NLRP3 fehérjék esetén GFAP-val történő átfedést vizsgáltunk, valamint az egyes markerek GFAP pozitív asztrocita nyúlványoktól való távolságát szintén távolságmátrix révén elemeztük.

A kontroll és CFA kezelt állatokból származó adatokat minden állat 3 véletlenszerűen kiválasztott metszetén kvantifikáltuk a Rexed lamina I és II mediálisan és laterálisan elhelyezkedő területeinek értékeiből.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A TLDA módszerrel kapott génextpressziós változások eredményei

A krónikus gyulladáshoz fájdalom kialakulását befolyásolható gének, köztük az IL-1R1 génextpressziós változását patkány gerincvelői felületes hátsó szarvban vizsgáltuk CFA injekció beadása után. A TLDA módszerrel arra kerestük a választ, hogy detektálható-e szignifikáns génextpressziós változás a receptor mRNS szintjében. Emellett kíváncsiak voltunk arra is, hogy a 43 általunk szelektált egyéb gén expressziója miként változik patkány gerincvelői felületes hátsó szarvban CFA injekció beadása után.

Az IL-1R1 mRNS szintjét összehasonlítva kontroll- és CFA kezelt állatok gerincvelői hátsó szarv mintáiból, azt tapasztaltuk, hogy az IL-1R1 expressziója kezelt állatokban szignifikánsan emelkedett (6,02-szeresére, $p=0,0002$) a kontrollhoz viszonyítva

Az általunk vizsgált többi gén (serkentő- és gátló neurotranszmitterek, citokinek, fehérjekinázok, ionszoptornák) kifejeződése közül az endogén kannabinoid enzimek szintézisében szerepet játszó NAPE-PLD génextpressziója kismértékben nőtt (1,11-szeresére, $p=0,0016$), a kannabinoidok lebontását végző Faah gén expressziója viszont csökkent (0,78-szeresére, $p=0,0368$). Ezen felül a serkentő ionotróp glutamát AMPA receptor 2-es alegységének (Gria2) génextpressziója szintén csökkent mértéket mutatott (0,77-szeresére, $p=0,0447$).

4.2 Mechanikai viselkedési teszt eredményei patkányokban

A fentebb részletezett módszerek elvégzése előtt, a nociceptív válaszkészség meglétét mechanikai viselkedési teszttel ellenőriztük a kísérleteinkhez felhasznált hím Wistar patkányokban. Az MTT kontroll-, és a kezelt hím patkányok bal oldali hátsó talpából (kontralaterális) mért értékei hasonlóan bizonyultak. CFA injekció hatására azonban szignifikáns csökkenés ($p=0,001$) következett be az MTT jobb hátsó talpból (ipsilateralis) származó értékeiben a kontrollhoz képest. A legalacsonyabb átlagértékeket az injekció beadását követő 3. napon detektáltuk ($11,46\pm 1,01$ g).

4.3 Mechanikai és termális viselkedési teszt eredményei egerekben

Az általunk vizsgált IL-1R1-IL-1 β szignalizáció kiemelt jelentőségére való tekintettel vad típusú C57BL6- és IL-1R1 KO hím egerek mechanikai és termális ingerküszöbét is lemértük CFA oltást követően (0. nap) a 11.napig. CFA oltás helyett egyes állatok fiziológias sóoldatot tartalmazó oldatot (álkezelés) kaptak. A vad típusú és az IL-1R1 KO állatok kontroll csoportjainak MTT értékei a kísérlet során végig stabilnak bizonyultak. Vad típusú egerek esetén 4,8-5,0 g közötti MTT adatokat rögzítettünk $4,81\pm 0,29$ g átlagértékkel, míg IL-1R1 KO egereknél 3,0-5,0g közötti tartományt regisztráltunk $3,94\pm 0,51$ g átlagértékkel a vizsgálati periódus alatt. A vad típusú és az IL-1R1 KO állatcsoportok CFA oltás előtt mért alapértékei közötti különbség szignifikánsnak bizonyult ($p=0,0000002$). A fiziológias sóoldat jobb hátsó talpba történő injekciója nem váltott ki érzékelhető különbséget, sem a vad típusú, sem a KO állatok esetén. A CFA jobb hátsó talpi injekciója azonban markáns csökkenést váltott ki a vad típusú egerek MTT értékeiben. A csökkenés az injekciót követő 4. napon érte el a maximumát ($1,68\pm 0,06$ g. Az IL-1R1 KO egerek CFA injekció után mért MTT értékeiben mérsékelt csökkenést tapasztaltunk, amely az injekció beadása után mindössze egy hétig tartott. Az MTT értékeinek csökkenését az injekció utáni 1-7. napig sikerült szignifikáns módon regisztrálni ($p=0,00004-0,006$), azonban a vad típusú és a KO állatok közötti szignifikáns MTT különbségek már az 1-9. napig voltak kimutathatóak ($p=0,000004-0,01$).

A termális allodynia CFA injekció által kiváltott mértéke és lefolyása a mechanikai allodyniához hasonlóan bizonyult, mind a vad típusú, mind az IL-1R1 KO állatok esetén. Vad típusú egerek esetén 4,9-10,2 s közötti TTL értékeket detektáltunk $7,47\pm 1,22$ s átlagértékkel, míg az IL-1R1 KO állatoknál 6,3-10,0 s közötti időintervallumot regisztráltunk $8,15\pm 0,85$ s átlagértékkel a kísérlet időtartama alatt. A fiziológias sóoldat injekciója a mechanikai viselkedési teszthez hasonlóan a TTL adatokban sem váltott ki érzékelhető különbséget. A CFA beadása viszont jelentős csökkenést váltott ki a vad típusú egerek jobb hátsó talpából származó TTL értékeiben. A csökkenés az injekciót követő 2. és 3. napon érte el a maximumát ($1,74\pm 0,01$ s, valamint $1,72\pm 0,08$). A KO egerek CFA oltás után mért TTL adataiban csak kismértékű csökkenést figyeltünk meg, amely az injekció beadása utáni 1-7. napig tartott. A statisztikailag szignifikáns csökkenés ezen időtartam alatt végig kimutathatóan bizonyult ($p=0,0005-0,029$). A CFA-val oltott vad típusú és

KO állatok közötti szignifikáns TTL különbségek az 1-9. napig voltak detektálhatók ($p=0,000003-0,021$).

4.4 Az IL-1R1 fehérjeexpressziós változásának eredményei

4.4.1 Kontrollok

Az immunhisztokémiai protokoll részeként rekombináns patkányból származó IL-1R1-(Sino Biological Inc Peking) fehérje alkalmazásával teszteltük az anti-IL-1R1 primer antitest specificitását. A metszeteken a rekombináns peptid és a megfelelő antitest ekvivalens keverékét inkubáltuk primer szérumként, hogy antitest depléciót váltsunk ki. A keverékeket 4 °C-on tároltuk 18 órán keresztül, majd centrifugáltuk. Ezt követően az immunoperoxidáz reakciónál leírtak szerint jártunk el, amelyek eredményeként a specifikus immunreakciók nem jelentek meg. Egyéb kontrollként az immunoblot korábban leírt protokollja szerint elvégzett antitest specificitás vizsgálatot alkalmaztuk. Az immunfestés az IL-1R1 esetén egy 80 kDa tömegű sávot mutatott ki, amely megfeleltethető a receptor irodalomban leírt molekulatömegének.

4.4.2 Az IL-1R1 fehérjeexpressziójának vizsgálata immunoblot módszerrel

A TLDA módszer során kapott IL-1R1-et érintő génextpressziós eredményeinket fehérszinten is validálni kívántuk, ezért Western blot vizsgálatot végeztünk kontroll (0. nap) és CFA kezelt patkányokból (3.nap) származó gerincvelő hátsó szarvi szövetmintákon. A denzitometriás analízis közel 1,5-szeres szignifikánsnak mutató emelkedést mutatott ki a kezelt állatok IL-1R1 fehérje mennyiségében a kontrollhoz viszonyítva ($p=0,029$).

4.4.3 Az IL-1R1 fehérje expressziójának vizsgálata immunhisztokémiai módszerekkel

4.4.3.1 Immunoperoxidáz vizsgálat eredményei

Az IL-1R1 fehérje expresszióját és eloszlását peroxidáz alapú immunfestéssel is vizsgáltuk patkány gerincvelői hátsó szarvban kontroll- és gyulladási körülmények között is. Pontszerű immunreakciót detektáltunk a felületes Rexed I és II-es laminákban, amely leginkább a II-es lamina belső részén

mutatott intenzív sávos megjelenést.

A CFA oltás hatására bekövetkező gyulladás során az ipsilaterális oldalon a megfigyelt immunreakció denzitása a kontrollhoz viszonyítva sokkal intenzívebbnek bizonyult a II-es lamina belső részében.

4.4.3.2 Kettős immunofluoreszcens festés eredményei

4.4.3.2.1 IL-1R1 expressziója axonterminálison

Annak érdekében, hogy tanulmányozhassuk a receptor axonális kifejeződését, kolokalizációs vizsgálatokat végeztünk az IL-1R-1- és a peptiderg (CGRP), nonpeptiderg (IB4) primer afferens rostok, valamint a serkentő (VGLUT2) és a gátló (VGAT) gerincvelő hátsó szarvi interneuronok axonterminálisai között.

A kettős immunfestések eredményei szerint kontroll körülmények között szinte teljes szegregáció figyelhető meg az IL-1R1 és ezen markerek között. Az IL-1R1 receptor immunoreaktív foltjainak axonális eloszlása a következő: 0,1 ± 0,01% CGRP markeren, 0,3±0,10% IB4 markeren, 1,2±0,46% VGLUT2 markeren, illetve 0,1±0,04% VGAT markeren. A CFA oltás érdemben nem változtatott ezeken a kontrollban is elhanyagolható értékeken.

4.4.3.2.2 IL-1R1 expressziója neuronális citoplazmában és szomatodendritikus membránon

A sejtek intracelluláris klorid koncentrációját főként a korábban említett KCC2 transzporter fehérje expressziójának mértéke szabja meg. A fehérje kizárólag neuronokon fejeződik ki, ahol a szomatodendritikus membránba ágyazva a kloridáram mediálta posztzinaptikus hiperpolarizációért felelős, axonterminálisokon nem fordul elő. Az IL-1R1 és a KCC2 marker közötti kolokalizáció vizsgálatánál a teljes receptorkészlet immunoreaktív foltjait a KCC2-vel jelölt szomatodendritikus felszínen (membránjelölés) vagy a marker által körülhatárolt területen (citoplazmatikus jelölés) találtuk meg. A kontroll kettős immunofluoreszcens festések felvételeinek kvantifikációja során a teljes IL-1R1 készlet 19,9±2,27%-át azonosítottuk a KCC2 pozitív membránon belül, ugyanakkor 49,9±2,56%-a citoplazmatikus jelnek bizonyult.

CFA kezelt állatokban a neuronális szomatodendritikus membrán kompartmentumban talált IL-1R1 immunoreaktív foltok számának százalékos aránya szignifikánsan nőtt, ($p=0,002$) 19,9±2,27%-ról 35,1±1,5%-ra, a

citoplazmatikus részarány pedig $44,39 \pm 0,56\%$ -ra csökkent.

4.4.3.2.3 Az IL-1R1 expressziója serkentő- és gátló szinapszisok posztszinaptikus membránjában

A receptor lehetséges átfedését a serkentő-, illetve gátló szinapszisok posztszinaptikus membránmarkereivel is vizsgáltuk. Korábbi irodalmi adatok alapján a PSD95 a serkentő glutamaterg- a gephyrin pedig a gátló GABAerg és glicinerg posztszinaptikus denzitás specifikus markere.

Az IL-1R1 immunoreaktivitás főként a serkentő posztszinaptikus denzitásban megfigyelhető. A PSD95 markeren a receptorkészlet $9,04 \pm 0,43\%$ -a volt megtalálható, ami a KCC2-vel jelölt szomatodendritikus membránfelszínen detektált immunreaktív foltok majdnem felét teszi ki. Az IL-1R1 és a gephyrin közötti kolokalizáció mértéke sokkal kisebbnek bizonyult, a receptor mintegy $1,2 \pm 1,1\%$ -a fordult elő gátló posztszinaptikus denzitásban.

CFA kezelt állatokban a receptor eloszlásában nem tapasztaltunk számottevő eltérést a kontrollhoz képest. PSD95 markerrel az IL-1R1 $9,93 \pm 0,4\%$ -a, míg gephyrinnel mindössze $1,43 \pm 1,14\%$ -a kolokalizált.

4.4.3.2.4 Az IL-1R1 expressziója asztrocita és mikroglia sejteken

Ahhoz, hogy az IL-1R1 asztrocita és mikroglia profilokon történő expresszióját vizsgáljuk, kolokalizációs vizsgálatokat végeztünk a receptor és az asztrocitákat szelektíven jelölő GFAP, illetve a mikroglia marker CD11b között. A kontroll esetén a receptor mennyiségének mintegy $9,3 \pm 0,65\%$ -a expresszálódott asztrocitákon, míg elenyésző $1,2 \pm 0,30\%$ -át mikroglia sejteken detektáltuk.

CFA oltás hatására az asztrocitákon jelenlévő receptorszám százalékos aránya elhanyagolható mértékben $9,23 \pm 0,41\%$ -ra csökkent, míg a mikroglia sejteken mintegy $2,5 \pm 0,35\%$ -ra nőtt.

4.5 Az IL-1 β és az NLRP szenzorok fehérje expressziójának eredményei

4.5.1 Kontrollok

Az IL-1R1-hez hasonlóan anti-IL-1 β antitest specificitását is teszteltük rekombináns fehérje alkalmazásával az előbbieken vázolt kimerítési protokoll szerint (Peprotech, katalógusszám:400-01B), melynek eredményeként specifikus immunfestődést szintén nem tapasztaltunk. Az inflammaszómális fehérjék elleni a primer antitestet mellőző, csak szekunder antitestet tartalmazó eleggyel történő inkubálást valósítottuk meg antigénpeptid hiányában. Ennek eredményeként specifikus immunjelölést az előzőekhez hasonlóan ismét nem tapasztaltunk. Az NLRP2 markerrel kapcsolatos eredményeink további alátámasztására hematoxylinnel festett tüdőmetszeten pozitív (primer antitestet tartalmazó) és negatív immunoperoxidáz (primer antitest kihagyásával) reakciót is végrehajtottunk.

4.5.2 Az IL-1 β mennyiségének vizsgálata immunoblottal és ELISA módszerrel

Az anti-IL-1 β antitest validitását a kimerítésen túl az immunoblot eredménye is alátámasztja. A 31 kDa-nál megjelenő gyenge immunoreaktív sáv a kontroll gerincvelői szövetextraktumból származó pro-IL-1 β irodalomban leírt molekulatömegét mutatja (0. nap). Azonban a CFA oltás utáni 3. napon, a mechanikai allodynia maximumán, mind a pro-IL-1 β , mind annak aktív, érett 17 kDa molekulatömegű kaszpáz 1 által hasított formája is nagy mennyiségben megtalálható a gerincvelői hátsó szarvában.

Nem találtunk adatokat arra vonatkozóan, hogy az IL-1 β szintjét időfüggő módon is vizsgálták volna gyulladáscsökkentő fájdalomban, ezért a vizsgálatainkat ebben az irányban folytattuk tovább ELISA módszerrel. A citokin bazális szintje $124 \pm 20,05$ pg/ml-nek mutatkozott az L4-L5-ös szegmentumokból származó gerincvelő hátsó szarvi szövetmintákban, amely szignifikánsan ($p=0,040$) $255 \pm 37,4$ pg/ml-re nőtt a CFA oltás utáni 3. kísérleti napon, amely harmonizál a korábban leírt patkány mechanikai viselkedési teszt eredményeivel. A 4. napon az IL-1 β koncentrációja az előző naphoz képest markánsan csökkent $174 \pm 12,03$ pg/ml-re.

4.5.3 Az IL-1 β expressziója immunohisztokémiai módszerekkel

Az immunoblot és az ELISA vizsgálat eredményeit megerősítette az IL-1 β immunoperoxidáz reakciója is. A receptorhoz hasonlóan itt is pontszerű

immunreakciót detektáltunk a felületes Rexed laminákban, amelynek intenzitása gyulladás során az ipsilaterális oldalon sokkal intenzívebbnek bizonyult. A kvantifikálás során a CFA kezelt mintákból (3.nap) származó metszetek IL-1 β immunoreaktív foltjainak számát összehasonlítva a kontroll állatokéval (0. nap) szignifikáns ($p=0,0000064$) növekedést tapasztaltunk, a termelődött IL-1 β mennyisége mintegy $78\pm 7,48$ %-al nőtt.

Az IL-1 β gliasejtekkel történő kolokalizáció vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a kontroll állatokból származó metszeteken a mikroglia pozitív profilok mindössze $3,31\pm 1,48\%$ -a expresszálta az IL-1 β -t, míg CFA oltás után a kolokalizáció értéke elhanyagolható mértékben nőtt $4,03\pm 1,57\%$ -ra. Asztrocita sejtek esetén a GFAP profilok mintegy $15,15\pm 3,38\%$ -a termelte a citokint, míg CFA kezelés után ez az arány szignifikánsan megnőtt ($p=0,002$) $39,3\pm 5,24\%$ -ra.

4.5.4 Az IL-1 β expressziójának vizsgálata IMARIS analízissel

A CFA indukálta krónikus gyulladással járó fájdalom tetőpontján az asztrocita sejtek IL-1 β termelése eredményeink szerint szignifikánsan megnőtt. A kontroll és a CFA oltott állatok asztrocita sejtjeinek morfofunkcionális vizsgálatára, és azok IL-1 β termelése közötti különbségeinek feltárására IMARIS szoftveres analízist is végeztünk. A CFA oltott állatokból származó metszeteken, mind az IL-1 β immunreaktív foltok abszolút száma (IL-1, $n=1337\pm 229,2$), mind az asztrocitával való kolokalizáció száma (COLOC, $n=76\pm 15,35$) szignifikánsan megnőtt ($p=0,009032$, illetve $p=0,022896$), a kontrollhoz viszonyítva (IL-1, $n=272,33\pm 174$ és COLOC, $n=23,33\pm 9,76$). Ezenkívül a kezelt állatokból származó GFAP pozitív asztrocita profilok térfogata (GFAP) szintén markánsan ($p=0,194406$), de nem szignifikánsan nőtt ($5620 \mu\text{m}^3\pm 1623$) a kontrollal összehasonlítva ($3630 \mu\text{m}^3\pm 1020$). Abban az esetben, ha a kolokalizáció értékeit az IL-1 β immunoreaktív foltok teljes számára normalizáltuk (COLOC/IL-1), akkor a kolokalizáció százalékos mértéke a kontrollban ($12,21\%\pm 2,95$) bizonyul szignifikánsan magasabbnak ($p=0,0366$) a CFA kezeléssel összehasonlítva ($5,99\%\pm 1,05$).

Összességében elmondható, hogy a krónikus gyulladással járó fájdalomban az IL-1 β immunoreaktív foltok száma (IL-1), és a kolokalizáció abszolút értéke (COLOC) szignifikánsan magasabb a kontroll állatokéhoz képest, viszont ennek ellenkezője tapasztalható a kolokalizáció teljes IL-1 β mennyiségre vonatkoztatott adataiban (COLOC/IL-1). A GFAP profilok térfogata, bár

nagymértékben emelkedett a CFA oltott állatokban, ez nem bizonyult szignifikánsnak. Az IL-1 β immunreaktív foltok asztrocita profiloktól való távolságát szintén megmértük IMARIS használatával kontroll és gyulladásozó körülmények között. A távolságmátrix elemzése nem mutatott ki szignifikáns különbséget a két csoport között, az IL-1 β foltok többségét a szoftver 1 μ m-es távolságon belül detektálta mindkét csoport esetében.

4.5.5 Az NLRP markerek vizsgálata immunoblot és kettős immunofluoreszcens jelöléssel

Az IL-1 β citokin termelődése az előzőekben említett inflammaszómális rendszerek közreműködésével valósul meg, amelyek gerincvelői hátsó szarvi expressziójáról és eloszlásáról viszonylag kevés információ áll rendelkezésre. Immunoblot révén mind a három általunk vizsgált inflammaszómális fehérjemarker molekulatömegét (NLRP1, NLRP2 és NLRP3) detektáltuk gerincvelői hátsó szarvi szövetextraktumából (NLRP1: 165 kDa, NLRP2 és NLRP3: 120 kDa molekulatömegnél).

A három inflammaszómális marker vizsgálata közül egyedül az NLRP2 fehérjénél tapasztaltunk nagymértékű expresszió növekedést immunoblottal CFA oltott állatokban (3.nap) a kontrollhoz viszonyítva (0.nap).

Eredményeink szerint az IL-1 β fő forrása az asztrocita sejt a CFA indukálta krónikus gyulladásozó modellben. A következő kísérlet során arra voltunk kíváncsiak, hogy ezekben a sejtekben melyik inflammaszómális marker expresszálódása váltja ki a kaszpáz-1 aktivációját és az IL-1 β produkciót. A kvantitatív analízis szerint az NLRP1 fehérje immunreaktív foltjai teljes elkülönülést mutattak a GFAP pozitív profiloktól a gerincvelői hátsó szarvban kontroll és gyulladásozó körülmények között is. A kolokalizáció kiértékelése során mind kontrollban, mind CFA oltott állatokból származó kettős immunjelöléseknél megfigyeltük az asztrociták nagymértékű NLRP2 expresszióját. Az NLRP2 pozitív immunreaktív foltok mintegy 8,34 \pm 1,5%-a kolokalizált asztrocitával kontroll állatokból származó metszeteken, azonban CFA oltás után szignifikáns ($p=0,000000148$) több mint kétszeres emelkedést tapasztaltunk (20,59 \pm 1,6%). Az NLRP3 fehérje asztrocitával történő kolokalizációjának mértéke kontrollban 5,36 \pm 1,21%-nak bizonyult, amely elenyésző mértékben 6,21 \pm 1,29 %-ra nőtt gyulladásozó fájdalomban.

Előzetesen immunoblot révén azt tapasztaltuk, hogy a NLRP szenzorok közül az NLRP2 fehérje mennyisége emelkedett meg markánsan a CFA kezelt

állatok gerincvelőjében a kontrollhoz viszonyítva. Ezt támogatandó, kvantifikáltuk az NLRP2 immunreaktív foltok abszolút számát is, (kontroll $n=20,66\pm 1,32$, CFA kezelt állatok: $n=37,5\pm 1,53$) amely CFA oltott állatokban szintén szignifikánsan ($p=0,00000011$) $81,5\pm 7,65\%$ -al nőtt a kontrollhoz képest.

4.5.6 Az NLRP fehérjék távolságanalízise

Az IL-1 β -val azonos módon, az NLRP szenzor fehérjék esetén is távolságmátrixot hoztunk létre IMARIS szoftver segítségével, melynek során a három NLRP marker asztrocita nyúlványoktól való távolságát modelleztük. Az NLRP1 és az NLRP3 esetében nem, az NLRP2 szenzornál azonban szignifikánsan nőtt ($p=0,0004$) az immunreaktív foltok száma gyulladásoos fájdalom esetén 0-1 μ m távolságon belül a kontrollhoz viszonyítva.

5. MEGBESZÉLÉS

Vizsgálataink génextpressziós (TLDA) kísérlet eredményeire épültek, amelynek alapján munkánk első részében az IL-1R1 receptor gerincevelő hátsó szarvi megoszlását vizsgáltuk. Munkánk második részében arra kerestük a választ, hogy a gerincevelő hátsó szarvában melyek azok a sejtek, amelyek az IL-1R1 ligandjának szekréciójában részt vesznek.

Az állatmodellek fontos eszközei az orvosi biológiai kutatásoknak, így a krónikus fájdalom tanulmányozására is számos modellt fejlesztettek ki. Kísérleteink során a krónikus (perzisztens) fájdalom vizsgálatára CFA intraplantaris beadásával kiváltott gyulladásoos (nociceptív) modellt alkalmaztunk. A CFA modell a korábbi leírások alapján a krónikus gyulladásoos fájdalom modellje (a disszertáció alapját képező első, 2017-ben megjelent, közlemény idejében ez volt az érvényes definíció), az újabb, 2020-ban kiadott IASP (International Association for the Study of Pain) fogalomtár szerint pedig a nociceptív fájdalom kategóriába sorolható.

5.1 Az IL-1R1 vizsgálatával kapott eredményeink következtetései

A TLDA vizsgálat során az elsőik között mutattunk ki szignifikáns, több mint hatszoros emelkedést tapasztaltunk az IL-1R1 génextpresszióban CFA oltás után a gerincevelő hátsó szarv ipsilateralis oldalán.

Az IL-1R1 hozzájárulását a mechanikai és termális allodynia kialakulásához, illetve a gerincevelő centrális szenzitizációhoz génmódosított IL-1R1 KO egerekkel végzett kísérleteink is megerősítik. Mind a mechanikai, mind a termális viselkedési tesztek eredményei azt támasztják alá, hogy a szubkután intraplantaris CFA injekciójának gyulladást kiváltó hatása IL-1R1 génhányos állatokban is érvényesül. Ezen állatok azonban méréseink szerint szignifikánsan csökkent mértékben és időtartamban mutattak fájdalomérzetet a vad típusú állatokhoz képest.

A proinflammatorikus citokin IL-1 β által kiváltotta nociceptív válaszok az IL-1R1 közreműködésével alakulnak ki, amely számos szövetben expresszálódik. Munkánk során immunoblot és immunoperoxidáz vizsgálatall igazoltuk, hogy az IL-1R1 szignifikáns fehérje expresszió növekedése is hozzájárul a CFA indukálta krónikus gyulladás és centrális szenzitizáció

létrejöttéhez a gerincvelői hátsó szarvban. Az IL-1R1 fehérje gerincvelői expresszióját előttünk mások is tanulmányozták, de mi vagyunk az elsők, akik a receptor pontos celluláris eloszlását feltérképezték. A kettős immunofluoreszcens festéseink eredményei alátámasztják, hogy a receptor több mint kétharmada a neuronális szomatodendritikus kompartmentben, kisebb mértékben pedig gliális, főként asztrocita sejteken lokalizálódik.

A neuronális IL-1R1 aktivációs mechanizmusa kapcsolatban áll a serkentő glutamaterg transzmisszióval. Az IL-1 β -IL-1R1 szignalizációban részt vevő kinázok foszforilálják az NMDA receptorok GluN1 és/vagy GluN2B alegységeit, amely a receptorok aktivációjához vezet.

Az IL-1 β spinalis injekciója a C rostok tüzelését fokozza, illetve a széles dinamikus sávú neuronok (nociceptív és alacsony ingerküszöbű mechanoreceptor afferensek egyaránt végződnek itt) utótüzelését váltja ki (wind-up), melynek következménye a hosszú távú potenciáció (LTP) és a centrális szenzitizáció.

Eredményeinkből következtetni lehet az IL-1R1 serkentő neurotranszmisszióval való lehetséges kapcsolatára. A KCC2 pozitív szomatodendritikus membránban lévő IL-1R1 szám közel fele kolokalizált a serkentő posztzinaptikus PSD95 markerrel is. A CFA-val kiváltott krónikus gyulladás során a meglévő szomatodendritikus populáció aránya majdnem kétszeresére nő, de nem a PSD95 markerrel összefüggésben, ez azt valószínűsíti, hogy az IL-1R1 receptor által kiváltotta hatások inkább extraszinaptikus jellegűek lehetnek. Az IL-1R1-t a gátló szinapszisok posztzinaptikus membránjában is kimutattuk. Bár elenyésző itt a receptorszám, és CFA oltás hatására sem nőtt érdemben, egyes kutatók azt feltételezik, hogy glicinerg szinapszisok GABAerg sejteken végződve diszinhíbiót váltanak ki IL-1 β hatására, amely tartós serkentő állapotot idéz elő.

Az IL-1R1-t glia sejtek is expresszálhatják a gerincvelőben. Gruber-Schoffnegger és mtsai kimutatták, hogy a gliális IL-1R1-on keresztüli gliotranszmitter termelődés is szükséges az AMPA és NMDA receptorok aktivációjához. A mi leleteink is alátámasztják a receptor közel 10 %-ának expresszióját asztrocita sejteken, viszont a mikroglia sejtekkel történő kolokalizáció elenyészőnek bizonyult. CFA oltás hatására nem figyeltünk meg érdemi változásokat a receptorszámokban egyik gliatípusban sem.

Végző konklúzióként feltételezhetjük, hogy a CFA indukálta perifériás

gyulladás során a primer afferens rostok által felszabadított különböző mediátorok, például ATP révén az asztrocita sejtek IL-1 β -t szekretálnak, amely neuronális IL-1R1-hoz kötődve potenciózza az NMDA receptor mediálta szinaptikus áramokat, illetve glicinerg interneuronokon is hatva GABAerg neuronok gátlását (diszinhibíció) idéz elő. A serkentő neurotranszmisszió fokozása, és a gátló szinapszisok kiesése végül mind a centrális szenzitizáció irányába hatnak.

5.2 Az IL-1 β és az inflammaszómák vizsgálatával kapott eredményeink következtetései

Jelen munka második részében az IL-1R1 ligandját az IL-1 β citokint, illetve a keletkezéséért felelős inflammaszómális fehérjék expresszióját tanulmányoztuk. Az elsők között vagyunk, akik a citokin mennyiségének időfüggését is vizsgálták és validálták viselkedési teszttel.

Altalánosan elfogadott, hogy a gerincvelői mikroglia sejtek aktiválódnak elsőként krónikus fájdalomban, de ellentmondásos adatok vannak arról, hogy a fájdalom kései szakaszában milyen típusú gliasejtek a dominánsak. Néhány modellben a mikroglia sejtek, míg másokban az asztrocita sejtek aktiváltak inkább, és termelnek proinflammatórikus citokineket. A mi adataink szerint a CFA indukálta gyulladásos fájdalomban az IL-1 β expressziója szignifikánsan megnő. A citokin fő forrásának az aktivált asztrocita sejteket találtuk, amely egybevághat más szerzők munkájával is.

Az IL-1 β nemcsak gerincvelői neuronokon, hanem akár gliasejteken expresszált IL-1R1-okon is kifejtheti hatásait. Az IL-1R1 nemcsak a neuronális excitabilitást befolyásolhatja, de az asztrocita sejtek révén gyulladásos faktorok termelődését is elősegítheti. Az IMARIS vizsgálat bizonyította, hogy ezen aktivált asztrociták morfológiájukat és méretüket tekintve is nagymértékben különböznek a kontrollból származóktól. Az IL-1 β biológiai aktivitásának eléréséhez a pro-IL-1 β prekursor protein kaspáz-1 általi hasítása szükséges, ugyanis csak az érett forma kötődhet a receptorhoz.

A gerincvelői inflammaszóma aktivációról alkotott kép jelenleg még hiányos. A legtöbb kísérletes adat neuropátiás modellekből származik. Az NLRP1 és NLRP3 fehérjéket korábban már kapcsolatba hozták a krónikusfájdalom kialakulásával, azonban a mi kísérleti modellünkben, bár ezen fehérjéket azonosítottuk a gerincvelői hátsó szarvban, nem tapasztaltunk

szignifikáns eltérést mennyiségükben a kontrollhoz viszonyítva. Az NLRP2-t vizsgálták már bőrléziókban, kromoszóma károsodás esetén, légúti megbetegedésekben, illetve egerek embrionális fejlődése során is, de a központi idegrendszeri eloszlásáról csak kevés kísérletes adat áll rendelkezésre. Az NLRP2 inflammaszóma lehetséges központi idegrendszerben betöltött szerepére Minkiewicz és mtsai hívták fel a figyelmet, akik kimutatták, hogy az NLRP2 teljesen funkcionális humán kortikális asztrocita tenyészetekben.

Eredményeiket mi is alátámaszthatjuk a gerincvelői hátsó szarvban, ahol az NLRP2 mind abszolút mennyiségben, mind asztrocita sejtben történő expressziót tekintve is szignifikánsan megnőtt. A lelet értelmezésének egyik fontos eleme lehet, hogy az NLRP2-ről azt találták makrofágokban trophoblasztban, és glioblasztóma sejtvonalakban, hogy képes az NF κ B gátlására, és limitálni a citokin szekréciót. Lehetséges, hogy bár a fehérje elindítja citokintermelést, önszabályozás révén a szöveti károsodást megakadályozandó idővel le is képes gátolni a proinflammatorikus NF κ B út vonalat.

Végső konkúzióként a receptornál leírtakkal egyetértésben elmondhatjuk, hogy a gerincvelő hátsó szarvi IL-1 β termelés valószínűleg az NLRP2 asztrocitában végbemenő aktivációjaként keletkezik. Ezt követően a citokin vagy neuronális, főként extraszinaptikus IL-1R1 receptorához kötődve a korábban említett serkentő neurotranszmisszióban, és/vagy diszinhibícióban vesz részt, vagy gliális receptorhoz kötődve autokrin módon további proinflammatorikus citokinek termelését váltja ki.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Napjainkban a krónikus fájdalommal kapcsolatos közlemények száma rohamosan növekszik. Ennek fő oka, hogy az állapot a betegek számára jelentős életminőség csökkenéssel jár, amely hosszú távon súlyos depresszióhoz vezethet. A munkaképesség esetleges csökkenése jelentős terhet ró a társadalomra is, így a kiváltó okok felismerése és kezelése közös érdek. Bár tudásanyagunk egyre inkább bővül azokról a patológiás folyamatokról, amelyek kiválthatják ezt a szenzoros túlműködést, a fájdalom kialakulásához vezető ok-okozati összefüggések feltárásának hiánya még mindig kihívást jelent a kutatói- és a gyógyászati alkalmazásoknak.

Munkánk során a fentieket szem előtt tartva CFA indukálta gyulladással fájdalommodell segítségével vizsgáltunk gén- és fehérjeexpressziós változásokat a gerincvelői hátsó szarvban különös tekintettel az IL-1R1 szignalizáció elemeire.

Adataink egyrészt megerősítik, másrészt újdonságot szolgáltatnak az IL-1R1 gerincvelőben játszott szerepét illetően, hiszen eddig viszonylag kevesen vizsgálták a receptor eloszlását, illetve annak kvantitatív eloszlását a központi idegrendszer ezen részén. Az elsők között voltunk, akik a TLDA módszer és egyéb morfológiai eljárások ötvözésével időfüggő korrelációt mutattunk ki a felületes Rexed laminákban a receptor gén- és fehérjeexpresszióban bekövetkező változása között perifériás gyullasztást követően. Kísérleteink eredményei rámutattak, hogy nemcsak az IL-1R1 ligandja, de maga a receptor expressziója is szignifikáns mértékben megnő főként a neuronok extraszinaptikus részén, intenzívebbé téve a gyulladással kapcsolatos folyamatok lezajlását.

Az IL-1R1 ligandja az IL-1 β esetén igazoltuk azokat a korábbi feltevéseket, miszerint a citokin termelődése a gyulladás későbbi fázisában elsősorban asztrocitákhoz köthető, amelyek morfológiája jelentősen eltér a kontroll sejtekhez képest.

Az elsők között vagyunk, akik az inflammaszómális fehérje NLRP2-t a gerincvelői centrális szenzitizációval kapcsolatba hozták. Ezen fehérje asztrocitákban történő szignifikáns expresszió növekedése szintén hozzájárulhat a gyulladás amplifikációjához, az IL-1 β és egyéb proinflammatorikus mediátorok termelődéséhez.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Antal Miklós** korábbi intézetvezető egyetemi tanár Úrnak, hogy lehetőséget biztosított nekem az Anatómia, Szövet-és Fejlődéstani Intézetben Ph.D. tanulmányaim elkezdéséhez, illetve szakmai tanácsaival segítette a munkámat!

Hálásan köszönöm **Dr. Holló Krisztinának**, hogy témavezetésével folytathattam Ph.D. tanulmányaim a Molekuláris és celluláris neurobiológiai munkacsoportban!

Köszönet illeti **Dr. Szücs Péter** jelenlegi intézetvezető egyetemi docens Urat, hogy Ph.D. tanulmányaimat az Anatómiai Intézetben támogatta!

Külön köszönettel tartozom **Bakk Erzsébetnek** és **Hegedüs Krisztinának** számtalan gyakorlati tanácsukért, illetve hogy szakmai és baráti támogatásukkal, türelmükkel mindvégig segítették munkámat!

Köszönöm **Gajtkó Andreának**, **Dr. Gaál Botondnak**, **Kókai Évának**, **Spisákné Dr. Balázs Anitának**, **Dr. Takács Rolandnak**, **Vidáné Varga Ritának**, **Dr. Weber Ildikónak** baráti és szakmai tanácsaikat.

Hálásan köszönöm **Prof. Dr. Matesz Klára munkacsoportjának**, hogy támogatták a Ph.D. disszertációm elkészítését, és további szakmai lehetőséget biztosítottak az intézetben.

Szeretném megköszönni az **Anatómia, Szövet-és Fejlődéstani Intézet minden dolgozójának** is szakmai munkám támogatását.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni **Családom** biztató támogatását, nélkülük ez a disszertáció nem készülhetett volna el!

Kutatásaink kivitelezését a Nemzeti Agykutatási program **KTIA_NAP_13-1-2013-0001**, **KTIA_NAP_13-2-2014-0005** és **2017-1.2.1-NKP-2017-00002** számú projektjei tették lehetővé.



Nyilvántartási szám: DEENK/241/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ducza László
Doktori Iskola: Ideg tudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Ducza, L., Szűcs, P., Hegedűs, K., Bakk, E., Gajtkó, A., Wéber, I., Holló, K.: NLRP2 Is Overexpressed in Spinal Astrocytes at the Peak of Mechanical Pain Sensitivity during Complete Freund Adjuvant-Induced Persistent Pain.
Int. J. Mol. Sci. 22 (21), 1-18, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222111408>
IF: 5.923 (2020)
2. Holló, K., Ducza, L., Hegyi, Z., Dócs, K., Hegedűs, K., Bakk, E., Papp, I., Kis, G., Mészár, Z. M., Bardóczy, Z., Antal, M.: Interleukin-1 receptor type 1 is over-expressed in neurons but not in glial cells within the rat superficial spinal dorsal horn in complete Freund adjuvant induced inflammatory pain.
J. Neuroinflammation. 14 (1), 1-18, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-017-0902-x>
IF: 5.193

További közlemények

3. Mészár, Z., Kókai, É., Varga, R., Ducza, L., Papp, T., Béres, M., Nagy, M., Szűcs, P., Varga, A.: CRISPR/Cas9-Based Mutagenesis of Histone H3.1 in Spinal Dynorphinergic Neurons Attenuates Thermal Sensitivity in Mice.
Int. J. Mol. Sci. 23 (6), 1-18, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23063178>
IF: 5.923 (2020)
4. Vágó, J., Kiss, K., Karanyicz, E., Takács, R. Á., Matta, C., Ducza, L., Rauch, T. A., Zákány, R.: Analysis of Gene Expression Patterns of Epigenetic Enzymes Dnmt3a, Tet1 and Ogt in Murine Chondrogenic Models.
Cells. 10 (10), 1-20, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells10102678>
IF: 6.6 (2020)





5. Gajtkó, A., Bakk, E., Hegedűs, K., Ducza, L., Holló, K.: IL-1[béta] Induced Cytokine Expression by Spinal Astrocytes Can Play a Role in the Maintenance of Chronic Inflammatory Pain.
Front. Physiol. 11, 1-17, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2020.543331>
IF: 4.566

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 28,205

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
11,116

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.05.05.



