

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Ducza László

Témavezető: Dr. Holló Krisztina



**Debreceni Egyetem
Idegtudományi Doktori Iskola**

Debrecen, 2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi áttekintés.....	8
2.1. A gerincvelői szintű fájdalom feldolgozás alapjai.....	8
2.1.1. Primer afferensek.....	8
2.1.2. Interneuronok.....	10
2.1.3. Projekciós neuronok.....	12
2.2. Neuron-glia interakció, háromrészes szinapszis.....	12
2.3. A citokinek jelentősége és aktualitása.....	14
2.4. Az IL-1β és receptora az IL-1R1.....	17
2.5. Az IL-1β keletkezése, az inflammaszómális rendszer alapjai.....	20
2.6. Inflammaszómális rendszerek a központi idegrendszerben.....	22
2.6.1. NLRP1 inflammaszóma.....	23
2.6.2. NLRP2 inflammaszóma.....	23
2.6.3. NLRP3 inflammaszóma.....	24
3. Célkitűzések.....	25
4. Anyagok és módszerek.....	26
4.1. Kísérleti állatfelhasználás, a krónikus gyulladás állatmodellje.....	26
4.2. Mechanikai és termális viselkedési tesztek.....	26
4.3. TaqMan alacsony denzitású array módszer (TLDA).....	27
4.4. Western blot.....	30
4.5. Enzim-kapcsolt immunoszorbens assay (ELISA) módszer.....	31
4.6. Immunohisztokémia.....	32
4.6.1. Szövetelőkészítés.....	32
4.6.2. Immunoperoxidáz reakciók.....	32
4.6.3. Kettős immunofluoreszcens festések.....	33
4.6.4. Konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal végzett kvantitatív analízis.....	34
5. Eredmények.....	36
5.1. A mechanikai viselkedési teszt eredményei patkányokban.....	36
5.2. A mechanikai és termális viselkedési tesztek eredményei IL-1R1 KO és C57BL6 vad típusú egerekben.....	37
5.3. A TLDA módszerrel kapott génextpressziós változások eredményei.....	40
5.4. Az IL-1R1 fehérjeexpressziós változásának eredményei.....	41
5.4.1. Kontrollok.....	41
5.4.2. Az IL-1R1 fehérjeexpressziójának vizsgálata immunoblottal.....	42
5.4.3. Az IL-1R1 fehérje expressziójának vizsgálata immunohisztokémiai módszerekkel.....	42
5.4.3.1. Az immunoperoxidáz vizsgálat eredményei.....	42
5.4.3.2. A kettős immunofluoreszcens festés eredményei.....	43
5.4.3.2.1. Az IL-1R1 expressziója axonterminálisokon.....	43
5.4.3.2.2. Az IL-1R1 expressziója a neuronális citoplazmában és szomatodendritikus membránon.....	44
5.4.3.2.3. Az IL-1R1 expressziója serkentő- és gátló szinapszisok posztszinaptikus	

membránjában	45
5.4.3.2.4. Az IL-1R1 expressziója asztrocita és mikroglia sejteken	45
5.5. Az IL-1β és az NLRP szenzorok fehérje expressziójának eredményei	47
5.5.1. Kontrollok.....	47
5.5.2. Az IL-1 β mennyiségének vizsgálata immunoblot és ELISA módszerrel	48
5.5.3. Az IL-1 β expressziója immunohisztokémiai módszerekkel	49
5.5.4. Az IL-1 β expressziójának vizsgálata IMARIS analízissel.....	52
5.5.5. Az NLRP markerek vizsgálata immunoblot és kettős immunofluoreszcens jelöléssel	53
5.5.6. Az NLRP fehérjék távolságanalízise	57
6. Megbeszélés.....	59
6.1. CFA modell és a TLDA.....	59
6.2. Az IL-1R1 vizsgálatával kapott eredményeink következtetései	61
6.3. Az IL-1 β és az inflammaszóma szenzorok vizsgálatával kapott eredményeink következtetései	63
7. Összefoglalás	65
7. Summary	66
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	67
9. Tárgyszavak/ Keywords	88
10. Köszönetnyilvánítás.....	89
11. Függelék	90

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMPA	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav
ASC	apoptózis-asszociált foltfehérje
ATP	adenozin-trifoszfát
CARD	kaspáz aktiváció és toborzó domén
CB1	kannabinoid receptor 1
CFA	komplett Freund adjuváns
CGRP	kalcitonin gén-rokon peptid
DAMP	veszély-asszociált molekuláris mintázat
ELISA	enzim-kapcsolt immunoszorbens assay
FIIND	„funkciója megtalálni” domén
GABA	gamma-amino-vajsav
GFAP	glia fibrilláris savas protein
GSDMD	gaszdermin D
HCN	hiperpolarizáció-aktivált, ciklikus nukleotid kapuzott
Iba1	ionizált kalciumkötő adaptor molekula 1
IB4	izolektin B4
IL	interleukin
IL-1R1	interleukin-1 receptor 1
IL-1ra	interleukin-1 receptor antagonist
IRAK4	IL-1 receptor asszociált kináz 4
JNK	c-jun N-terminális kináz
KCC2	kálium-klorid kotranszporter 2

KO	génkiütött-knockout
LeTx	letális toxin
Lpb	lateralis parabrachialis terület
LRR	leucin-gazdag ismétlődés
LPS	lipopoliszacharid
MYD88	myeloid differenciáció és elsődleges válasz gén
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MMP	mátrix metalloproteináz
MTI	mechanikai talpvisszahúzási ingerküszöb
Na _v	feszültség-vezérelt nátrium csatornák
NDS	normál számárszérum
NFκB	nukleáris faktor kappa B
NGS	normál kecskeszérum
NK1	neurokinin 1
NMDA	N-metil-D-aszpartát
NLRP	NOD-szerű receptorfehérjék
NRS	normál nyúlszérum
PAG	periaqueductalis szürkeállomány
PAMP	patogén-asszociált molekuláris mintázat
PB	foszfát puffer
PBS	foszfát puffereelt sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció
P2X	purinerg 2 X-receptor
PSD95	posztzinaptikus denzitás fehérje 95

PVDF	polivinilidén-difluorid
PYD	pyrin domén
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SEM	középérték közepes hibája
TAB	TAK kötőfehérje
TAK1	TGF- β aktivált kináz 1
TGF- β	transzformáló növekedési faktor-beta
TIR	Toll/Interleukin-1R
TLDA	TaqMan alacsony denzitású array módszer
TLR4	Toll-szerű receptor 4
TNF- α	tumor nekrosis faktor- alfa
TOLLIP	Toll-interaktív protein
TPBS	Tris-PBS
TRAF6	tumor nekrosis faktor asszociált faktor 6
TRIS	Trisz(hidroximetil)-aminometán
TrkB	tropomyosin receptor kináz B
TRP	transziens receptor potenciál csatorna
TRPV	transziens receptor potenciál csatorna (alcsalád V)
TTBS	Tritont tartalmazó Tris-pufferelt fiziológiás sóoldat
TTL	termális talpvisszahúzási latencia
VGAT	vezikuláris GABA transzporter
VGLUT	vezikuláris glutamát transzporter

1. BEVEZETÉS

A Nemzetközi Fájdalom Társaság (*International Association for the Study of Pain, IASP*) aktuális definíciója (2020) szerint a fájdalom egy kellemetlen szenzoros és emocionális tapasztalás, mely valós vagy potenciális szöveti károsodáshoz társul, vagy azokhoz hasonlóságot mutat. A mostani definíció előremutató a korábbihoz képest (1979) [1] abban, hogy a fájdalom megélését egy saját, szubjektív és komplex pszichológiai „élményként” azonosítja, amely nem feltétlenül jár együtt szöveti sérüléssel, azt tekinti fájdalomnak, amelyet a beteg maga is annak érez. Az akut fájdalomtól eltérően, amely hirtelen jelentkezik és rövid ideig tart, valamint a kiváltó ok is ismeretes, a krónikus fájdalom rendszerint 3 hónapnál tovább tart vagy tér vissza, eredete nem mindig tisztázott [2-4].

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 [5-9]. A krónikus fájdalom jellege a jelenleg érvényes szempontok alapján lehet nociceptív, neuropátiás, vagy nociplastikus. 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 [10]. Ezzel szemben a neuropátiás fájdalomérzet kiváltó oka maga a jeltovábbító rendszer, tágabb értelemben a szomatoszenzoros rendszer sérülése [11]. A nociplastikus fájdalom kialakulása során a jelfeldolgozás ugyan bizonyosan megváltozik, de szöveti sérülés nélkül nem értjük annak mechanizmusát [12]. A nociceptív és a neuropátiás fájdalom létrejöttének fontos mediátorai a proinflammatorikus citokinek, amelyek hatásukat a neuraxis minden szintjén kifejezhetik [3, 13]. Egyes proinflammatorikus citokinek termelődésében fontos szerepet játszik az inflammaszómális rendszer is [14].

Periférián indukált krónikus gyullasztásos (nociceptív) modellben folytatott vizsgálataink során a proinflammatorikus interleukin 1 β (IL-1 β) és annak receptorával az interleukin 1 receptor 1 (IL-1R1)-el foglalkoztunk behatóan a gerincvelői hátsó szarvban. Bár rendelkezünk irodalmi adatokkal az IL-1R1 és az IL-1 β gerincvelői expressziójával kapcsolatban, ezen leletek ellentmondásosak [15, 16]. Kísérleteink során arra törekedtünk, hogy az ismert eredményeket kiegészítve pontosabb képet kapjunk a fentebb említett fehérjék expressziójáról és termelődéséről, így magáról a gerincvelői hátsó szarvi neuroinflammáció folyamatáról is.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

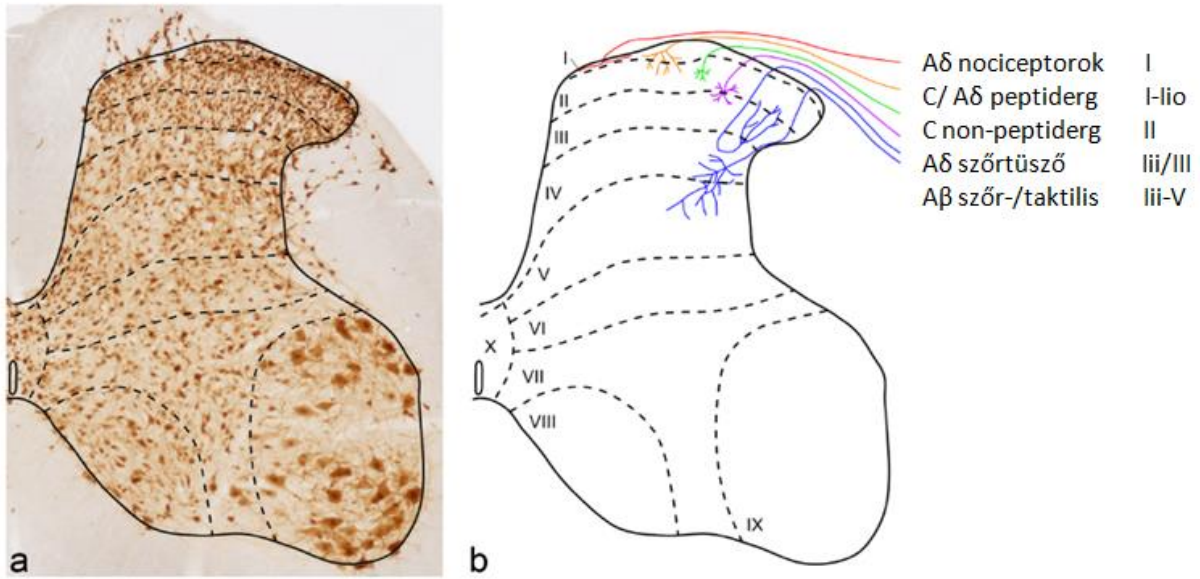
2.1. A gerincvelői szintű fájdalom feldolgozás alapjai

A gerincvelői felületes hátsó szarvi neuronhálózat fogadja a bőrből és a mélyebben fekvő szövetekből érkező szenzoros információt az ún. primer afferens axonok révén, amelyek ártalmas (nociceptív) és ártalmatlan ingerületeket egyaránt szállíthatnak. Az afferensek eloszlási mintázata egyrészt szenzoros modalitásuktól, másrészt az általuk beidegzett régiótól függ. A beérkező jelek feldolgozását egy rendkívül bonyolult működésű, sok szereplőből felépülő rendszer biztosítja, amely serkentő és gátló interneuronok bevonásával, illetve a gliasejtek közreműködésével az összegzett információt projekciós neuronok felé továbbítja magasabb agyi központokat megcélözva. Az idegi áramkörök modulációja számos ponton megvalósulhat leszálló agytörzsi pályák útján. A nociceptív ingerületek eljuthatnak a gerincvelői elülső szarvba is, hozzájárulva a fájdalmat elkerülő vagy azelől elmenekülő védekező magatartás kialakulásához (nocifenzív reflex) [17].

2.1.1. Primer afferensek

A primer afferens rostok osztályozása történhet eredetük, (például: bőr,- ízületi,- vagy zsigerek) vezetési sebességük, (méret és a mielinhüvely vastagsága), válaszadó képességük (szenzoros kvalitás, aktiváláshoz elégséges ingerintenzitás), valamint neurokémiai karakterük alapján. A vastag velőshüvellyel rendelkező primer afferens axonok (A β) alacsony ingerküszöbű mechanoreceptorok, ugyanakkor a vékony mielinizált (A δ) és a velőtlen rostok (C) leginkább magas ingerküszöbű ún. nociceptorokként jellemezhetők [17].

Az A β rostok leginkább a gerincvelői hátsó szarv szürkeállományának Rexed féle felosztás szerinti II-VI. lamináiban, az A δ és C rostok pedig a Rexed I és II-es laminákban végződnek (**1.ábra**) [17]. A C rostok két neurokémiailag különböző csoportra, a peptiderg és nonpeptiderg magas ingerküszöbű rostok halmazára oszthatók. A peptiderg rostok neuropeptideket [kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) vagy *substance P*] tartalmaznak, főként az I-es laminában és a II-es lamina külső részében (IIo) végződnek. A nonpeptiderg rostok ezzel ellentétben egy Mrgpr nevű G-protein kapcsolt receptort fejeznek ki, illetve izolektin B4 (IB4) pozitívak is, a II-es lamina belső részébe projiciálnak (IIi) [18].



1.ábra: A gerincvelői hátsó szarv lamináris felépítése a beérkező primer afferensekkel (módosítva Andrew J. Todd után, 2010, [17].) Rexed a macska gerincvelői szürkeállományát egymással párhuzamos laminákra osztotta a neuronális méret és sűrűség alapján, ez a felosztás más fajokra is alkalmazható. a: Patkány lumbális gerincvelő harántmetszeti képe NeuN (neuronok specifikus markere) elleni immunjelöléssel. A laminák határait szaggatott vonalak jelzik. Az I-es és II-es laminák (más nével marginális zóna és substantia gelatinosa) alkotják a felületes hátsó szarvat. A II-es lamina további két részre, külső (o) és belső (i) zónára osztható. b: Primer afferensek terminációs helyeinek ábrázolása korábbi intraaxonális jelölések bizonyítékai alapján. A vékony velőshüvelyes és velőtlen rostok (A δ és C) által reprezentált termális és nociceptív ingerületek a Rexed I- és II-es laminákban, a taktilis ingerléssel, vibrációval kapcsolatos non-nociceptív rostok (A β) a mélyebb laminákban végződnek.

Az utóbbi két évtizedben számottevő mértékben növekedett a tudásunk arról a bonyolult molekuláris gépezetről, amelynek elemei a primer afferens szenzoros neuronok választ koordinálja külső vagy belső stimulust követően [19, 20].

A primer afferensek modulációját számos receptor vezérli, az értekezés itt három általunk is vizsgált receptortípus szerepének rövid megvilágítására szorítkozik. A ligand-vezérelt ioncsatornák közül a tranziens receptor potenciál (TRP) csatornák V alcsaládjába tartozó TRPV1 vagy vanilloid receptor-1 nonszelektív kationcsatornáként funkcionál, amely hő, kapszaicin és alacsony pH hatására lép működésbe [21, 22]. Egyéb TRP receptorok irodalmi beágyazottsága is jelentős, pl: a meleg hőingereket detektáló TRPV3 [23], az ártalmas, extrém meleg hőmérsékletre reagáló TRPV2 [24], vagy az extrém hidegre érzékeny TRP csatornák A alcsaládjába tartozó TRPA1 receptor, amely képes vegyi anyagokat is detektálni pl: fahéj, akrolein vagy wasabi [25]. A TRP csatornák expressziójának és aktivitásának változását igazolták ízületi megbetegedésekkel kapcsolatos vizsgálatokban is, ahol a felszabaduló proinflammatorikus citokinek egyes hatásait TRP csatornákkal hozzák összefüggésbe [26].

A feszültség-vezérelt ioncsatornák közül a nátriumcsatornák (Na_v) a szenzoros rostot érő aktivációs jelet erősítik fel, hozzájárulva a küszöb feletti ingerületek tovaterjedő akciós potenciállá transzformálásában. A Na_v csatornák közül a Na_v 1.1, Na_v 1.6, Na_v 1.7, Na_v 1.8, és a Na_v 1.9 expressziója nyert bizonyítást szenzoros neuronokon [27, 28]. A perifériás gyulladás indukálására alkalmas víz, paraffinolaj és hővel előlt Mycobacterium szuszpenzió keverékét tartalmazó komplett Freund adjuváns (CFA) injekciója a Na_v 1.8 csatorna fehérje immunreaktivitását mintegy másfélszeresére növelte a kezelt állatok mielinizálatlan axonjaiban [29]. A CFA-ról kimutatták, hogy a proteinkináz B/Akt kináz szignálút révén növeli a Na_v 1.8 expressziós szintjét hátsó gyöki ganglionsejteken [30]. A Na_v 1.8 ionáram erősségének fokozódását tapasztalták szervgyulladásokban is pl: gastritis, húgyúti gyulladás, colitis [31-33].

A G-protein kapcsolt receptorok közül a kannabinoid receptorok jelentősége vitathatatlan a nociceptív szignalizációban. A kannabinoid receptor 1 expressziója (CB1), illetve a ligandjait 2-arachidonyl glicerolt (2-AG) és anandamidot (AEA) szintetizáló enzimek termelődése jelentős a gerincvelőben, főként gátló szinapszisokban [34, 35]. A receptor által mediált szignálút vonal gátolja az adenilát-cikláz működését, viszont serkenti a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) kaszkádját [36]. A CB1 receptor aktivációja során befelé egyenirányító káliumcsatornákat nyit, csökkentve a preszinaptikus tüzelést, illetve a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák gátlásával mérsékli a neurotranszmitter felszabadulást is [37]. Egyes kannabinoid vegyületeknél antinociceptív hatást írtak le számos állatmodellben, [38-40] de ezek mellékhatások nélküli humán transzlációja még várat magára [41].

2.1.2. Interneuronok

A gerincvelői hátsó szarv szürkeállományának Rexed I-III-as lamináiban lokalizálódó interneuronok axonális arborizációja nem kiterjedt. Két osztályukat különböztethetjük meg, a serkentő (glutamaterg) és a gátló, gamma-amino-vajsavat (GABA) vagy glicint tartalmazó interneuronok populációit [42].

A serkentő interneuronok egyes kalciumkötő fehérjéket, például a calbindint és a calretitint nagy mennyiségben expresszálnak [43, 44]. Szinte az összes calbindin pozitív sejt [45], és a calretinint tartalmazó sejtek 88%-a [46] bizonyult glutamatergnek. A serkentő interneuronok axonjai VGLUT2 expressziójuk alapján azonosíthatóak. Ezenkívül számos neuropeptid expresszálódik csak serkentő neuronokban, például a substance P, a gasztrin felszabadító peptid (GRP), neurotensin és a neurokinin B (NKB) [47, 48].

A gátló GABAerg és glicinerg interneuronok hagyományosan a GABA szintetizáló

enzim glutamát dekarboxiláz (GAD) és a glicin transzporter 2 (GlyT2) expressziójának kimutatásával karakterizálhatóak [49, 50]. Az irodalmi adatok tanúsága szerint a gerincvelői hátsó szarvban négy egymással nem átfedő gátló interneuron populáció definiálható a neuropeptid Y (NPY), a galanin, a neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) és a parvalbumin expressziójával [51, 52]. Axonjaik a vezikuláris GABA transzporter (VGAT) immunfestésével jeleníthetők meg [53].

A GABA neurotranszmitterrel rendelkező neuronok aránya a Rexed I-II-es laminákban (patkány gerincvelőben) a következő: lamina I: kb. 25%, a II-es lamina: kb. 30%. A glicin ugyanezen sejtekben szintén felszabadulhat (kotranszmisszió), ugyanakkor a GABA előfordulhat glicin nélkül is [17, 54].

Korábbi tanulmányokban GABA A és glicin receptor antagonisták intrathecalis adagolásával nociceptív hiperszenzitivitást figyeltek meg [26, 55, 56]. Néhány GABAerg/glicinerg szinapszis a felületes gerincvelői hátsó szarvban rendelkezik agytörzsi eredetű axonnal többségük azonban lokális axonhálózattal bír, így leginkább gerincvelői szinten vehetnek részt a nociceptív transzmisszióban [17, 57].

Az interneuronok működésének modulálásában is közrejátszik számos ioncsatorna. A feszültségfüggő hiperpolarizáció-aktivált, ciklikus nukleotid kapuzott (HCN) tetramer kationcsatornák jelentős szerepet játszanak a szinaptikus integráció, a neuronális excitabilitás, illetve a nyugalmi membránpotenciál kialakulásában [58]. A központi idegrendszerben leginkább kifejeződő HCN2 képes a nociceptív neuronok ismételt tüzelését indukálni gyulladásszerű (nociceptív) és neuropátiás fájdalom során [59-61]. A csatorna fontosságát mutatja az a tény, hogy Nav1.8-HCN2 kondicionális géntöröltött (*knockout-KO*) egerekben (a HCN2 gént Nav1.8-at expresszáló hátsó gyöki ganglionsejtekben deletálták) nem jelentkező mechanikai és termális hyperalgesia neuropátiás fájdalom modellben [62].

Azt, hogy a GABAerg és glicinerg szinapszisokban serkentés vagy gátlás alakul ki, a posztzinaptikus neuron intracelluláris kloridkoncentrációját reguláló kálium-klorid kotranszporter 2 (KCC2) transzporter határozza meg, amely érett neuronokban az intracelluláris kloridionok effluxáért felelős. A KCC2 prenatális korban alacsony szintje nagy intracelluláris klorid koncentrációt eredményez, amely a reverzál potenciál eltolásával serkentő posztzinaptikus potenciált vált ki GABA A receptorokon. Születés után a KCC2 kifejeződése jelentősebbé válva, az iongrádiens megfordításával a közismert szinaptikus gátlást váltja ki. Krónikus fájdalomban a KCC2 fehérje szintje alacsony, ezáltal a GABAerg receptorokon kialakuló serkentő neurotranszmisszió, illetve a serkentő neuronok kieső gátló kontrollja nettó hiperexcitabilitást eredményez, amely megnövekedett fájdalomérzethez vezet [63-65].

2.1.3. Projekciós neuronok

A projekciós neuronok nagy számban helyezkednek el a Rexed I-es laminában, azonban szórványosan a lumbalis gerincvelői hátsó szarv II-es laminájában is előfordulnak.

A rostok fő supraspinalis átkapcsolóhelyei a caudális ventrolateralis medulla (CVLM), a nucleus solitarii, a laterális parabrachialis area (Lpb), a periaqueductalis szürkeállomány (PAG) és a thalamus [17, 66-69].

A PAG, amely az élőlényt érő stresszorok elleni védekezésben főszerepet játszik, a fájdalomcsillapító analgetikumok egyik fő terápiás célpontja [70]. Rostjai reciprok módon összeköttetésben állnak a rostroventromediális medullával, amely főként szerotonint és noradrenalin tartalmazó leszálló gátló pályarendszer kiindulópontja. A szerotoninerg rostok forrása a nucleus raphe magnus, a noradrenergiké pedig a locus coeruleus [71].

A thalamus ventralis-posterior részéből (a fájdalom szenzoros-diszkriminatív komponenseinek kialakulásáért is felelős terület) a nociceptív ingerület a szomatoszenzoros kéregbe kerül [72].

A gerincvelői hátsó szarv Rexed I-es laminájának projekciós neuronjai nagy számban expresszálják (kb 80 %) a neurokinin 1 (NK1) receptort. A receptor serkentő interneuronokon is előfordul, azonban az expressziós szintje sokkal alacsonyabb szintet mutat [17,73].

A receptor substance P ligandjának saporinnal történő konjugációja az NK1-et expresszáló sejtek szinaptikus transzmisszióját csökkenti, amely a hyperalgesia megszűnését váltja ki számos modellben [74].

2.2. Neuron-glia interakció, háromrészes szinapszis

A nociceptív jelfeldolgozás teljes megértéséhez nem hagyhatjuk figyelmen kívül a gliasejtek szerepét. 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 [75-77]. A gliasejtek számos stimulussal aktiválhatók. A nyugalmi fázisból az aktivált állapotba kerülő sejtek jelentős számbeli, morfológiai és funkcionális változáson mennek keresztül. Az ingerületbe hozott preszinaptikus axonterminálisokból felszabaduló neurotranszmitterek / neuromodulátorok (pl adenosin-trifoszfát (ATP), glutamát, agyi eredetű neurotrófikus faktor (BDNF), neuropeptidek (substance P, CGRP), opioidok elérhetik a gliasejtek megfelelő receptorait is (purinerg receptor X2/3 (P2X2/3), P2X4, P2X7, N-metil-D-aszpartát (NMDA) 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-

oxazol-4-il) propánsav (AMPA) receptorok, tropomyosin receptor kináz B (TrkB), NK1, μ opioid receptorok, Toll-szerű receptor 4 (TLR4).

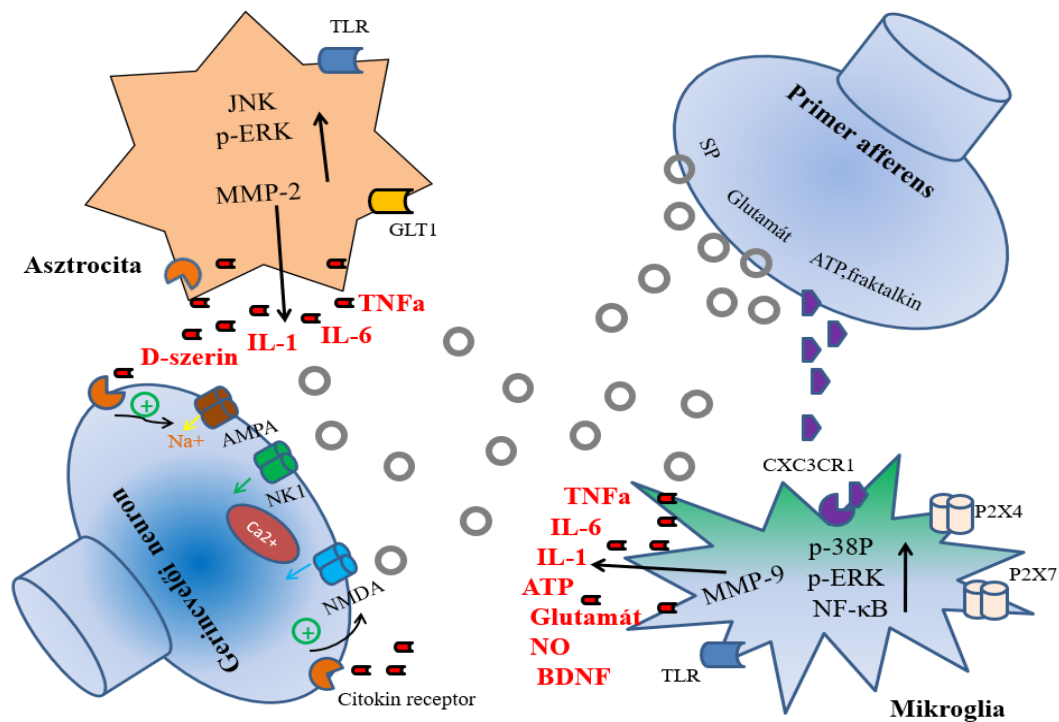
Az aktivált állapot eredményeként kialakuló szignálútvonalak szereplői a MAP kinázok, extracelluláris szignál által regulált kinázok (ERK), p38-kinázok, c-jun N-terminális kináz (JNK) sokféle mediátor termelődését szabályozhatják, beleértve a proinflammatorikus citokineket (IL-1, IL-6, tumor nekrozis faktor- alfa (TNF- α), a prosztaglandinokat, D-szerint, az ATP-t, és a glutamátot.

Antiinflammatorikus citokinek (IL-2, IL-4, IL-10, transzformáló növekedési faktor-beta (TGF- β)) vagy gliasejt inhibitorok (fluorocitrát, minocycline) alkalmazása kedvező eredményekkel járt neuropátiás állatmodellekben, ezért kiemelt terápiás célpontok lehetnek [75-78].

A centrális szenzitizáció ún. *háromrészes szinapszis* modelljének elméletét Parpura és munkatársai dolgozták ki, [75, 79] amely a hagyományos pre- és posztszinaptikus elemeken kívül fontos szerepet szán a neuron-glia kommunikációnak. A gliasejtek ugyanis képesek aktívan hozzájárulni a szinaptikus információ feldolgozásához és a neuronális plaszticitáshoz [80, 81]. Működésük következménye a serkentő neurotranszmisszó állandósulása, melynek során a primer afferensekből felszabaduló ágensek nemcsak a posztszinaptikus partnert készítetik intenzívebb tüzelésre, hanem ezzel egyidejűleg a szinapszis közelében lévő gliasejteket is aktiválják. Az aktiválás során termelődő proinflammatorikus citokinek pozitív feedback szabályozás révén növelik a serkentő tónust. A gerincvelői neuronok citokin receptorai feszültségfüggő nátriumcsatornák expresszióját növelik, serkentik az NMDA receptorok foszforilációját, ugyanakkor a GABA receptorok kifejeződését transzkripciós és translációs szinten is csökkentik. A serkentő tónus amplifikációja és a GABAerg gátlás elvesztése hosszabb távon krónikus fájdalom kialakulásához vezethet [75, 81].

Az asztrocita sejtekben ezenfelül csökkenhet a glutamát visszavétele is a glutamát transzporter 1 (GLT1) expressziójának gátlásával, így a neurotranszmitter hosszabb időn keresztül fejtheti ki hatását a szinapszisban [82]. Néhány primer afferensekből felszabaduló szignál, mint például az ATP és a fraktalkin nevű kemokin (C-X3-C motívum-CX3CL1), purinerg receptorokat és CX3C kemokin receptor 1-et (CX3CR1) expresszáló mikrogliasejteket aktiválhat [83, 84]. A patogének antigénjeinek mintázatát felismerő veleszületetten jelenlévő TLR receptorok mind asztrocitán, mind mikroglían igen fontos szerepet töltenek be a nociceptív jelátvitelben szöveti gyulladást vagy idegsérülést követően [85].

A mátrix metalloproteináz (MMP) expresszió növekedése is megfigyelhető gliasejtekben kísérletes idegkötés után. A neuropátia kezdeti szakaszában a mikroglia sejtek által expresszált MMP-9 enzim hatására fokozódik az IL-1 β hasítása, a későbbi szakaszban viszont helyét az inkább asztrocita sejtekben lokalizálódó MMP-2 enzim veszi át, amely szintén az IL-1 β hasítása révén fenntartja a neuropátiás állapotot [75, 86] (2. ábra).



2.ábra: Centrális szenzitizáció és szinaptikus plaszticitás a gerincvelői hátsó szarvban (módosítva Jun Chen után, 2013) [75]. Mind a neuronok, mind a gliasejtek aktív szerepet játszanak a nociceptív jelfeldolgozásban. Nociceptív inger hatására a primer afferensek glutamátot és substance P-t szabadítanak fel, amelyek AMPA, NMDA, illetve NK1 receptoraikon keresztül a posztszinaptikus gerincvelői idegsejteket serkentik. A preszinaptikusan felszabaduló ATP és fraktalkin a purinerg-2X 4 és 7 (P2X4 és 7) és a CXC3CR1 receptorokon hatva mikroglia sejteket aktiválnak. A mikroglia által termelt proinflammatorikus citokinek (IL-1, IL-6, TNF- α , IL-18) az asztrocitákban lévő citokin receptorokon hatva parakrin módon szintén citokin termelést váltanak ki, amelyek ugyancsak a hátsó szarvi neuronok AMPA és NMDA receptorait aktiválják. Az asztrocita eredetű D-szerin az NMDA receptorok glicinkötő helyéhez kötődve az aktivitás függő szinaptikus erősséget fokozza. A GLT-1 transzporter expressziója asztrocitákban lecsökken, hozzájárulva a glutamát meghosszabított életidejéhez a szinaptikus résben, felerősítve a nociceptív ingerületek intenzitását.

2.3. A citokinek jelentősége és aktualitása

A citokin egy összefoglaló kategóriánév, ide sorolhatóak a lymphokinek (limfociták által termelt fehérjék), a monokinek (monociták által szekretált modulátorok), és a kemokinek (olyan citokinek, amelyek kemotaktikus aktivitással rendelkeznek). A sejtekre kifejtett hatásuk

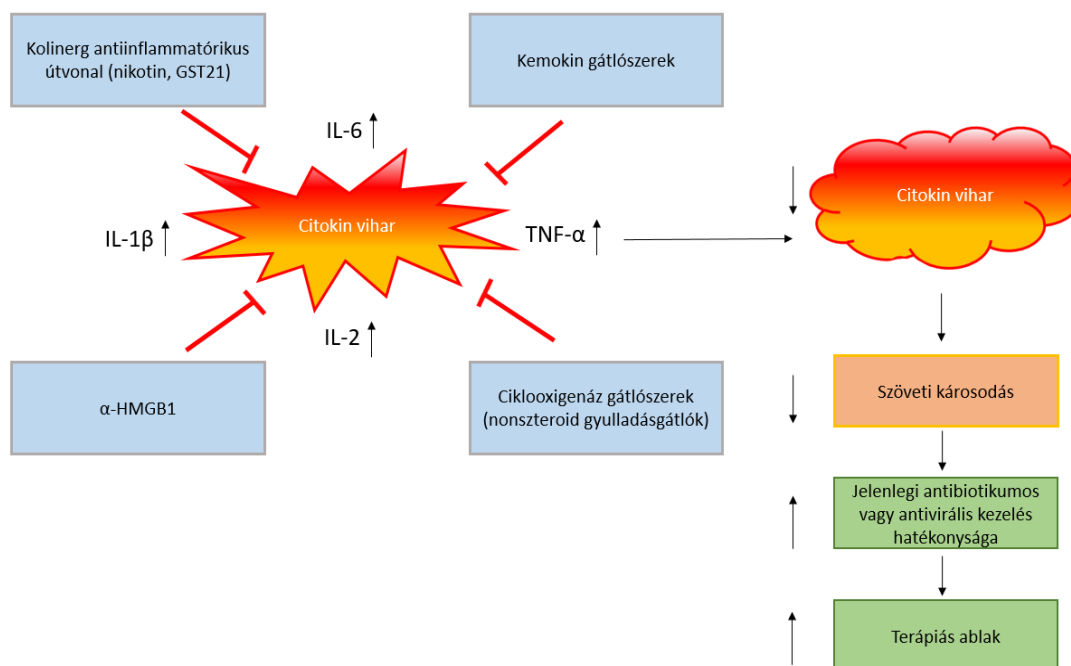
távolsága alapján megkülönböztethetünk autokrin, parakrin vagy endokrin mechanizmusokat, amelyek eredménye sokszor szerteágazó és redundáns. Termelődésük gyakran kaszkádszerűen történik, az adott citokin stimulációjával aktiválódott célsejtek újabb citokineket állítanak elő, amelyek egymás hatását vagy erősítik vagy kioltják [87].

A proinflammatorikus citokinek idegrendszeri termelődése és a neuropátia kialakulása közötti összefüggés már régóta ismert az irodalomban, többek között a gerincevelőben [88] vagy a hátsó gyöki ganglionokban [89]. A citokinek retrográd módon akár axonális vagy non-axonális útvonalon is szállíthatódnak a gerincevelői hátsó szarvba, ahol jelentősen befolyásolhatják a centrális szenzitizációt patológiás krónikus fájdalomállapotok létrehozása révén [88-90].

A citokinek olyan szignálfehérjéket jelentenek, amelyeket sokáig a sejtproliferáció- és differenciáció, illetve a mátrixfehérjék szintézisével hoztak összefüggésbe a klasszikus immunológiában. Jelenlétük elengedhetetlen a sejtnövekedéshez és a szöveti regenerációhoz, valamint a szervezet fertőzésekre és szöveti sérülésekre adott válaszainál [91, 92].

Egyik fő csoportjuk, a proinflammatorikus citokinek a korai immunválasz szervezése során immunsejteket vonzanak a sérülés vagy fertőzés helyére, amelyeket időbeli megjelenésük sorrendjében a TNF- α , az IL-1 β és az IL-6 kaszkádja aktivál. Ezen fehérjék hatáserőssége olyan nagy mértékű, hogy kevesebb, mint tíz receptor-ligand interakció elegendő lehet a fiziológiai válasz kiváltásához [93, 94]. A kialakuló reakció káros hatású is lehet, ugyanis nemcsak a behatoló patogének, de a szervezet maga is károsodhat a kialakuló ún. „citokin vihar” következtében [95, 96].

Ferrara és mtsai. 1993-ban publikálták azt a közleményt [97], amelyben a citokin vihar mint kifejezés először említésre került a *graft vs. host* betegség tárgyalása kapcsán. A citokin vihart elsősorban patogén vírusok és baktériumok indukálhatják azáltal, hogy eltolja az egyensúlyt a kívánatos gyulladási választól a gazdaszervezetre káros immunválasz felé, amely súlyos következményekkel jár [98, 99]. Ennek fő oka, hogy bizonyos proinflammatorikus citokinek a TNF- α , IL-1 β , IL-6 és az IL-2 mennyisége drasztikusan megnő, és az immunsejtek pozitív feedback szabályozás alá kerülnek. A következményként kialakuló súlyos hipotenzió, láz és ödéma végül halálhoz vezet. A kezelési stratégia során először a citokin vihart próbálják lecsendesíteni a már ismert inflammatorikus szignálpályák gátlásával, majd a második lépcsőben kezdődhet az antibakteriális vagy antivirális terápia (3. ábra) [96, 100].



3.ábra: A citokin vihar kezelési módzatai (módosítva Riccardo V. D'Elia után, 2013) [96]. A citokin vihar kezelése során a hagyományos antibiotikus vagy antivirális terápia önmagában nem elégséges, gátolni is szükséges az ismert inflammatorikus jelátviteli útvonalakat, amelyek a legnagyobb mennyiségben felszabaduló citokinek (IL-1 β , IL-6, IL-2, TNF α) termelődését teszik lehetővé. A kemokin és ciklooxygenáz gátlószereken kívül, hatásosnak bizonyul az alfa-7 nikotinos acetil-kolin receptor agonista GST-21 alkalmazása is, amely a TNF- α fehérjét gátolja. A nagy mobilitású csoport 1 (HMGB1), a szepszis késői indikátora az interferon útvonalakat gátolja, és elősegíti az IL-10 antiinflammatorikus citokin termelődését. Ezen gátlómechanizmusok összessége csökkenti a citokin vihar által kialakuló szöveti károsodást, biztosítva a megfelelő terápiás időablakot az antibiotikus vagy antivirális kezelésekhez.

A citokinek a 2019-ben bekövetkező világméretű COVID koronavírus járvány idején is főszerephez jutottak. A vírus a légutakat bélelő hámsejteket megfertőzve citokinvihar kialakulását eredményezi, amely folyamatos utánpótlást kap az immunrendszer aktiválódó sejtjeiből [101]. A központi idegrendszer a vírus első áldozatai között szerepel, ugyanis a felszabaduló citokinek reaktív oxigénradikálok képződését indukálják, amelyek átjutva a vér-agy gáton gliasejteket aktiválva a fertőzést tovább súlyosbítják. A szaglóidegrostok bántalmát és a szaglóképesség csökkenését, amely az első tünetek között szerepel, szintén citokinek váltják ki elhúzódó ideggyulladást okozva [102].

Az életveszélyes tünetek elkerülése okán a szervezet a citokinek szintézisét és felszabadítását normál körülmények között szigorú kontroll alatt regulálja, amelynek fő elemei az antiinflammatorikus citokinek (főként az IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) szekréciója, és a csali (ún. *decoy*) receptorok előállítása, amelyek révén a citokinek hatásai kötődés révén mérsékelhetők [103, 104].

2.4. Az IL-1 β és receptora az IL-1R1

A proinflammatorikus citokinek közé tartozó IL-1 β kardinális szerepet tölt be a homeosztázis szabályozásában fiziológiás körülmények között is. Részt vesz a táplálkozás, az alvás és a testhőmérséklet regulációjában [105]. Megnövekedett termelődése azonban kóros folyamatok bekövetkezését jelzi, mint például rheumatoid arthritis, neuropátiás fájdalom, bélgyulladás, osteoarthritis, vaszkuláris betegségek, szklerózis multiplex és Alzheimer kór [106-108]. Az IL-1 β felszabadításáért számos sejtípus felelős lehet: keratinociták, fibroblastok, szinoviociták, endothel sejtek, neuronok, Schwann sejtek, asztrociták, valamint immunsejtek (makrofágok, hízósejtek, mikroglia sejtek) is [109-115].

A perifériás szövetbe injektált IL-1 β markáns mechanikai és termális hyperalgesiát idéz elő, illetve hozzájárul más pronociceptív mediátorok hatásának kifejtéséhez is [116-121]. A citokin receptorán ható interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) (Anakinra) beadása szignifikánsan csökkenti a CFA intraplantaris injekcióját követő mechanikai hyperalgesiát, valamint a neurotrófikus idegnövekedési faktor (NGF) expresszióját is [122]. Az IL-1 β képes a prosztaglandinok, az IL-6, a substance P és a MMP-9 aktiválására is [123-126].

Kóroki szerepe vitathatatlan az autoimmun köszvényes arthritisben. Több évtizede ismeretes, hogy a humán fehérvérsejteket IL-1 β termelésre készíti az urátkristályok jelenléte [127, 128]. Urátkristályok indukálta gyulladós peritonitis modellben IL-1R1 KO állatokban a neutrofil granulociták infiltrációja nagymértékben lecsökken [129]. Az IL-1R1 farmakológiai blokkolása, IL-1 β elleni antitestek használata, valamint a rekombináns IL-1ra alkalmazása hasonló eredményre vezet [130].

Jelenléte nem korlátozódik a perifériára, az IL-1 β -t azonosították a gerincvelőben és az agyvelőben is [131-133]. Az IL-1 β intracerebroventrikuláris injekciója termális hyperalgesiát vált ki [134], míg intrathecalis beadása mechanikai allodynaiát és hyperalgesiát [135].

Az IL-1 β közvetlenül növeli a neuronális excitabilitás mértékét a TRPV1, a feszültségfüggő nátriumcsatornák, illetve a GABA- és NMDA receptorok modulálása révén, ugyanakkor egyes káliumcsatornákra (késleltetett egyenirányító, A-áram) gátló hatással bír. Az ionotróp NMDA receptorok kiemelt szerepet töltenek be az aktivitásfüggő szinaptikus plaszticitásban. Az NMDA receptor NMDA receptor 1 alegysége (GluN1) és az IL-1R1 kolokalizációja kimutatható neuronokban. Szöveti gyulladás vagy idegsérülés során a receptor alegységek intracelluláris C-terminális aminosavainak IL-1 β által közvetítette foszforilációja korrelációt mutat a nociceptív hiperszenzitivitás növekedésével. A sérülés indukálta centrális szenzitizáció során a gerincvelőben aktiválódott gliasejtek termelte proinflammatorikus

citokinek, köztük az IL-1 β hozzájárulnak a krónikus fájdalom kialakulásához és fenntartásához. Szerepét igazolták hő indukálta CGRP felszabadulásban is [136-140].

Az IL-1 β -t számos neuropátiás állatmodellben is vizsgálták, melynek eredményeként hátsó gyöki ganglionokban, és a gerincvelőben megemelkedett fehérjexpressziót detektáltak [141, 142].

A citokin IL-1 családja tizenegy tagot számlál, amelyek tízféle receptoron keresztül hathatnak (1. táblázat) [143].

1. táblázat: Az IL-1 család tagjai és receptorai (módosítva Dinarello után, 2018) [143].

IL-1 család	Specifikus receptor	Koreceptor	Funkció
IL-1 α , IL-1 β	IL-1R1	IL-1R3	Proinflammatórikus
IL-1 β	IL-1R2	IL-1R3	Antiinflammatórikus
IL-1ra	IL-1R1	-	Antiinflammatórikus
IL-18	IL-1R5	IL-1R7	Proinflammatórikus
IL-33	IL-1R4	IL-1R3	Proinflammatórikus
IL-36 α , β , γ	IL-1R6	IL-1R3	Proinflammatórikus
IL-36ra	IL-1R6	IL-1R3	Antiinflammatórikus
IL-37	IL-1R5	IL-1R8	Antiinflammatórikus
IL-38	IL-1R6	IL-1R9	Antiinflammatórikus

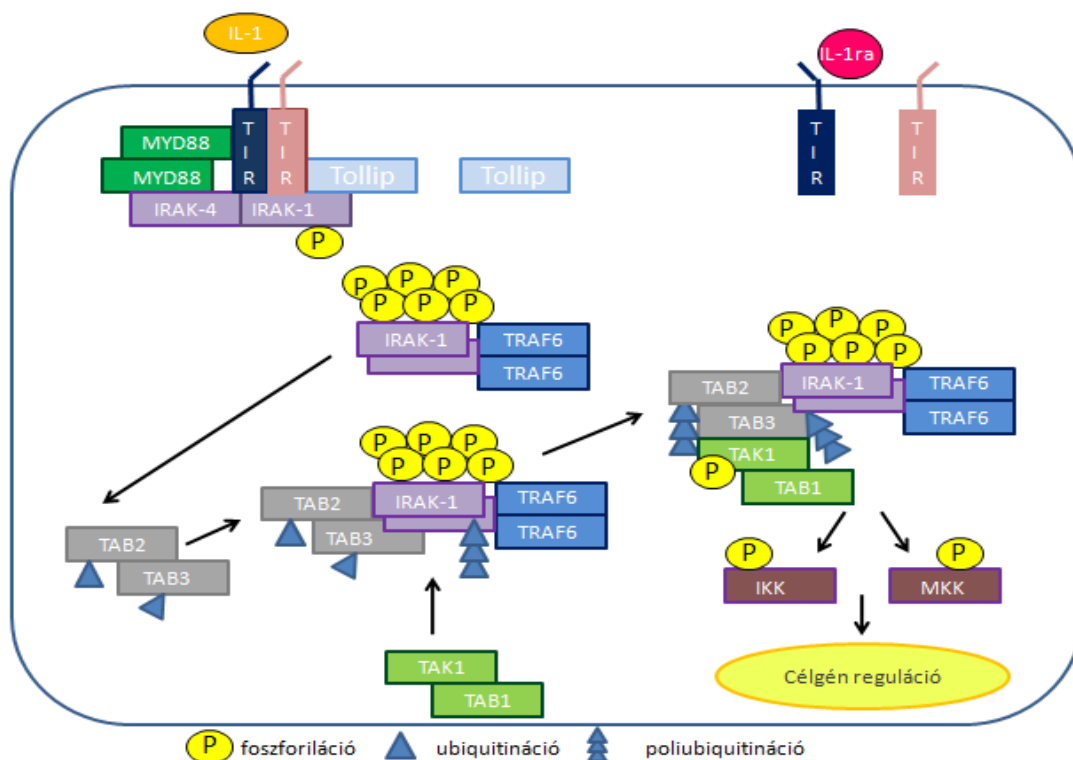
A receptorok közös ismertetőjele, hogy struktúrálisan homológ fehérjecsoportot alkotnak, extracelluláris immunoglobulin-szerű- és intracelluláris Toll/Interleukin-1R (TIR) doméneket egyaránt tartalmaznak, mindegyikük alapvető szerepet játszik a természetes és az adaptív immunitás fenntartásában. A TIR domén evolúciósan konzervált felépítésének következménye, hogy az IL-1R1 és a TLR receptorok ligandkötése ugyanazon gyulladáscsökkentő válaszokat váltja ki, mint például a ciklooxygenáz 2 (COX2) indukciója, citokinek- és kemokinek termelődése, illetve az adhéziónak megemelkedett expressziója.

Az IL-1R1 ligandjai közé az IL-1 α , az IL-1 β és az IL-1ra tartoznak. 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 szignálkomplext alkotva indítja el a jelátviteli kaskád. 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 adaptorfehérjét 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 inhibitorát (IKKb), amely foszforilálva az NF κ B inhibitorát (I κ B) kiváltja a fehérje degradációját, ezáltal a nukleáris faktor kappa B (NF κ B) képes a 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) (4. ábra) [143- 146].



4. ábra: Az IL-1R1 szignalizációja (módosítva Rebekka Bent után, 2018) [146].

2.5. 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, receptoraik által is felismert formává. Az aktív citokin előállításában az *inflammaszómának* nevezett fehérjekomplex játszik szerepet.

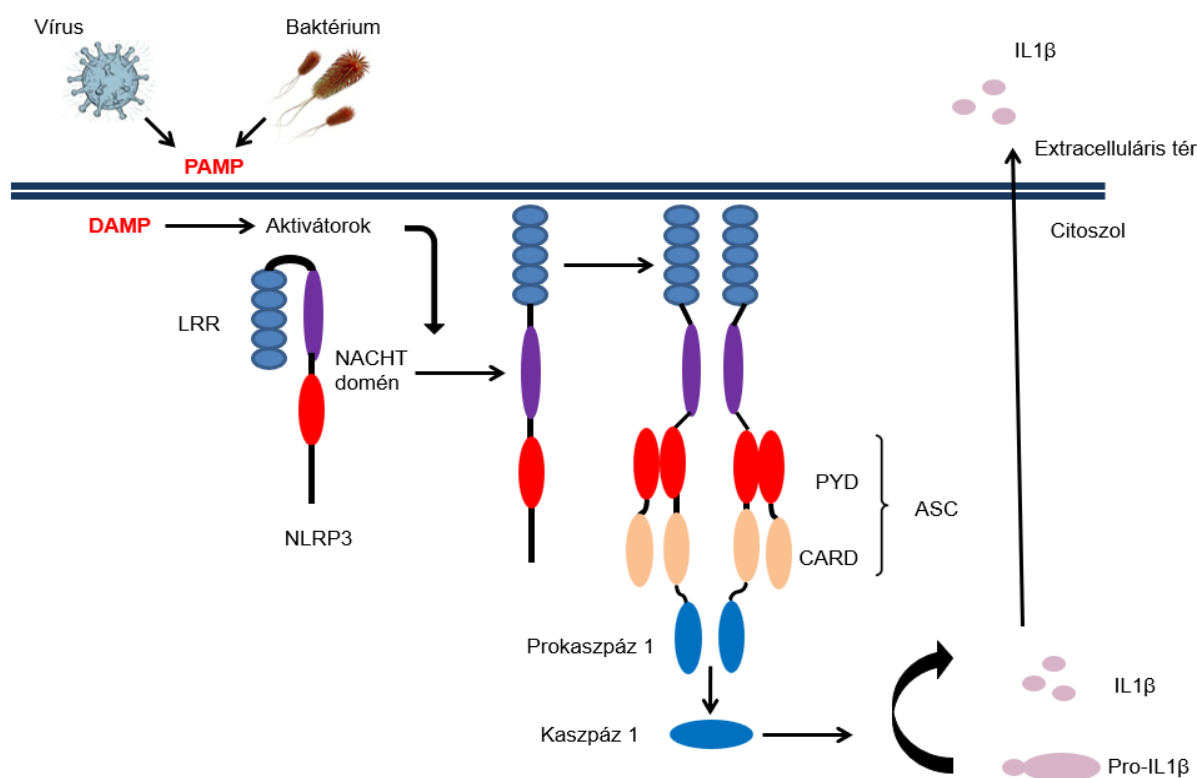
Az inflammaszóma kifejezést, és annak koncepcióját a 2000-es évek elején Tschopp és Mutsaers alkották meg, amikor közvetlen összefüggést találtak a szöveti sérülés és a veleszületett immunválasz, valamint a kaspáz-1 mediálta sejtválaszok között [147]. Az inflammaszómák intracelluláris multiprotein komplexek, amelyek elsősorban a kaspáz-1 aktivációját idézik elő, ami a gyulladást kiváltó citokinek, például IL-1 β és IL-18 fehérjék keletkezéséért tehető felelőssé. A veleszületett immunrendszer, mint elsődleges védelmi vonalunk elsősorban a patogén-asszociált (PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*) és a veszély-asszociált molekuláris mintázatok (DAMP, *damage-associated molecular pattern*) felismerését végzi mintázatfelismerő receptorok közreműködésével, amelyek extra- vagy intracelluláris lokalizációt mutathatnak. Az extracellulárisakat TLR, az intracellulárisakat NOD-szerű receptorfehérjéknek (NLRP) nevezzük, ez utóbbiak tekinthetők hagyományosan az inflammaszómális rendszer részeinek.

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. transzkripció aktivátor- *CIITA*, inkompatibilis lokusz 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 NLRP fehérjék elkülönítésének alapja.

A kanonikus útvonal szerinti aktiválódás két lépésen keresztül megy végbe:

- 1) „Priming”: a kórokozók antigénjeit felismerő PAMP, illetve a sejtkárosodás során felszabaduló anyagokat detektáló DAMP mintázatfelismerő receptorok ligandot kötnek.
- 2) „Triggering”: a ligandkötést követően az addig inaktív állapotú NLRP fehérjék homotipikus doménjei összekapcsolódnak, 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-

IL-1 β (17 kDa) extracelluláris szekrécióját készíti elő [148]. A kaszpáz-1 aktiváció olyan mértékű immunpatológiai választ válthat ki, melynek eredménye egy programozott, nagymérvű neuronális sejthalál (*pyroptosis*). A kaszpáz-1-ről kimutatták, hogy képes közvetlenül neuronális sejthalál útvonalakat indukálni [149, 150]. 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 (5. ábra) [151, 152].



5.ábra: Inflammaszóma közvetítette citokin szekréció az NLRP3 példáján (kanonikus útvonal) (módosítva Tschopp után, 2010) [152]. A vírusok és baktériumok antigénjeit detektáló PAMP, illetve a sejtkárosodás során kiszabaduló anyagokat érzékelő DAMP receptorok által közvetített jel aktiválja az intracelluláris, inflammaszómaként ismert multienzim komplexet. A rendszer alapelemei önmagukban inaktívak (önmagával érintkező autoasszociált domének), de a beérkező fenyegetést jelentő stimulusok hatására az NLRP3 proteinek megfelelő homotipikus részletei (LRR, NACHT domén) dimereket hoznak létre, majd az ASC adaptorfehérje PYD és CARD doménének csatlakozásával a zimogén prokaspáz-1 aktív kaszpáz-1 enzimmé alakul. Ezt követően a kaszpáz-1 hasítja le az IL-1 β -t, annak inaktív prekursorából (pro-IL-1 β).

Az IL-1 β keletkezésének egy másik lehetséges módja a nem kanonikus útvonal, amely a kaszpáz-11 (humán homológ megfelelője a kaszpáz 4 és 5 enzimek) enzimatis működésének

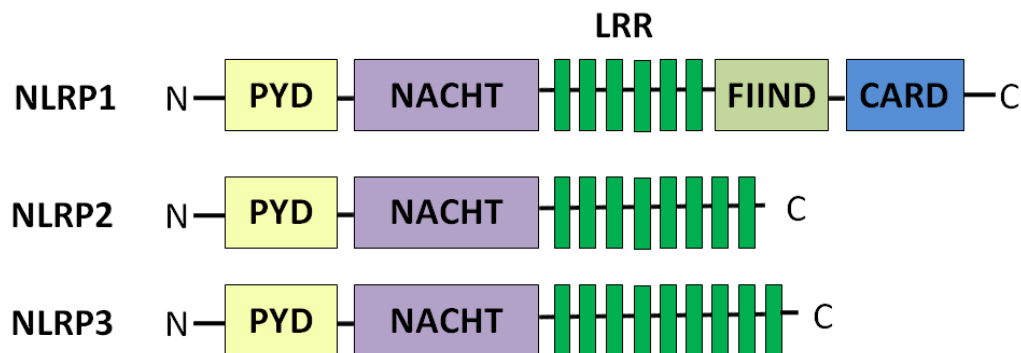
eredménye. A lipopoliszacharid (LPS) volt az első molekula, amelyet a kaszpáz-11 nonkanonikus útvonalának direkt aktivátoraként felfedeztek [153].

Internalizálódás után az LPS-t a kaszpáz-11 ismeri fel, a kialakult LPS-kaspáz-11 komplexek CARD domének részvételével oligomerizálódnak, majd autoproteolitikus aktiváción esnek át. Az enzimátikus hasítás érint egy másik fehérjét, a gasdermin D-t is (GSDMD), amely egy aminoterminális pórusformáló doménre, és egy karboxiterminális autoinhibitorikus doménre válik. A pórusformáló domén a sejtmembránhoz asszociálódva számos citoplazmatikus molekula extracelluláris felszabadítását irányíthatja, köztük az IL-1 β -t is. A kialakuló 18 nm nagyságú membránnyílások megnövelik az ozmotikus nyomást, amely extracelluláris folyadék beáramlásán keresztül sejtduzzadáshoz- és lízishez vezet, amely a kanonikus útvonal pyroptosisához hasonlítható.

A kaszpáz-11 aktiváció indukálhatja közvetlenül az inaktív prokaspáz-1 proteolízisét az NLRP3 inflammaszómán keresztül is, amely a korábbi kanonikus útvonalon elősegíti az inaktív zimogén proinflammatorikus citokinek érését és szekrécióját. Egyes közlemények szerint a kaszpáz-11 kanonikus útvonalat érintő facilitációja alapvető jelentőséggel bír, bár a két rendszer között kommunikáció mibenlétére kevés adat áll rendelkezésre [154-156].

2.6. Inflammaszómális rendszerek a központi idegrendszerben

Az inflammaszómális rendszer intracelluláris NLRP fehérjéi közül a következőknek tulajdonítanak leginkább fontos szerepet a központi idegrendszerben: az NLRP1-nek neuronokban [157], az NLRP2-nek asztrocitákban [158], illetve az NLRP3-nak mikroglia sejtekben [159]. Doménjeik szerkezeti felépítése a **6. ábrán** figyelhető meg.



6.ábra: Az inflammaszómális NLRP fehérjék szerkezeti felépítése (módosítva Komada után, 2019) [160].

2.6.1. NLRP1 inflammaszóma

A neuronális NLRP1 inflammaszóma a kaspáz-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 sajátossága, 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 egér NLRP1B paralóg fehérjéről kiderült, hogy a kaspáz-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 [159, 161].

Előzetes tanulmányok szerint az NLRP1B enzim aminoterminálisa felelős normál körülmények között az autoinhibitorikus állapot fenntartásáért, ennek eltávolítása inflammaszóma aktivációt idéz elő. Más tanulmányok szerint az NLRP1 mutánsban az aminoterminális GFP-re történő kicserélése is biztosítja a gátolt állapotot [161-163].

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 autoprocesszálása ugyanis nem engedi a proteozómális proteáz végighaladását a fehérjeláncon, a hasítással létrejövő karboxiterminális közeli bioaktív fragmentumok kapcsolódási platformot alakítanak ki a kaspáz-1 számára. Ezt a jelenséget proteozómális degradáció általi inflammaszóma aktivációnak vagy „funkcionális degradációnak” nevezik [164].

Az NLRP1 komplex érintettsége kognitív zavarokkal járó kórképekben és neurodegeneratív betegségekben már kellően bizonyított [165-167]. Állatmodellek szolgáltatva kísérleti bizonyítékok alapján az inflammaszómának a krónikus stressz kialakulásában is szerepe lehet [167, 168].

2.6.2. 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 NFκB útvonalat is. Egyik allélvariánsa nem

képes erre a gátlásra, ezért krónikus gyulladásos megbetegedések, például a *Muckle-Wells* szindróma kialakulásában kóroki szerepe bizonyított [169, 170].

Az NLRP2 funkcionális inflammaszómává történő összeszerelődése még mindig vitatott, humán asztrocita sejtekben azonban az NLRP2 szerepe tisztázódni látszik, interakciója P2X7 receptorral és pannexin 1-gyel exogén ATP alkalmazásának hatására nagy mennyiségű IL-1 β termelődést vált ki. Pannexin csatorna blokkoló probenecid és 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 [169].

2.6.3. NLRP3 inflammaszóma

Az NLRP3 inflammaszóma multiprotein komplexe a leginkább tanulmányozott NLR receptor. Az összeszerelődésben résztvevő elemek az NLRP3, ASC, és a kaspáz-1, amelyek az **5. ábrán** illusztrált doménok egymáshoz való kapcsolódásával reagálnak a PAMP és DAMP receptorok által felismert ligandokra, de az inflammaszóma a fentebb említett kaspáz-11 mediálta nonkanonikus útvonalon keresztül is képes aktiválódni.

Az NLRP3 komplex mikrogliális 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. Az 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropyridin (MPTP) nevű vegyület robusztus sejtpusztulást okozó hatása a substantia nigra dopaminerg neuronjaira jelentősen csökkenthető a neuronális kaspáz-1 gátlásával is, ugyanis az enzim α -synucleint processzáló aktivitása trunkált, aggregációra hajlamos fehérjecsomkokat hoz létre. Hasonló eredményeket igazoltak az IL-1 receptor IL-1ra alkalmazásával történő gátlásakor is [171]. A legújabb eredmények szerint az NLRP3 hozzájárulhat az amyloid- β fehérje (A β) plakkok felhalmozódásához is Alzheimer kórban és frontopoláris dementiában [172].

3. 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 gerincvelői hátsó szarvában elvégzett kísérleteink eredményeit tárgyaljuk.

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

Kísérleteink kiindulásaként 45 génre kiterjedő vizsgálatot végeztünk el, kontroll és CFA-kezelt állatok gerincvelői hátsó szarvából izolált mintákon. A génexpressziós (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 gerincvelői 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. Célul tűztük ki a receptor és ligand expressziójának felderítését a gerincvelői felületes hátsó szarvának sejtjein, valamint különböző típusú axonterminálisokon konfokális felvételek kvantitatív elemzésével.

Felmerült az a kérdés is, hogy az IL-1R1 hiánya hogyan befolyásolja a kísérleti állatok nociceptív válaszkészségét. Ezen kérdés vizsgálatára IL-1R1 génhiányos 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 inflammaszóma típus vizsgálatát, amelyről nem álltak rendelkezésre korábbi irodalmi adatok a CFA modellben.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti állatfelhasználás, a krónikus gyulladás állatmodellje

A kísérleti protokollt jóváhagyta és engedélyezte a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (engedélyszám: 2/2017/DEMÁB) nemzeti és az európai uniós jogszabályok rendelkezései alapján (az Európai Tanács 86/609/EGK irányelve). Ezenfelül a vizsgálatokat a Debreceni Egyetem kísérleti állatok felhasználására vonatkozó szabályai és ajánlásai szerint végeztük el.

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 [173] által genetikailag módosított hím IL-1R1KO egereket (n=18) használtunk (B6.129S7-Il1r1 tm1/mx,*J* stock #:003245), amelyeket a *Jackson Laboratories* cégtől (Bar Harbor, ME, USA) szereztünk be. A felhasznált állatokat normál fényviszonyok között tartottuk *ad libitum* takarmányozással.

A krónikus gyulladásos fájdalom indukálásához 100 µl (egér) vagy 150 µl (patkány) CFA (víz, paraffinolaj és hővel előlt *Mycobacterium* szuszpenziója (Sigma, St Louis, USA) [174]. és fiziológiás sóoldat 1:1 arányú keverékét injektáltuk intraplantarisan az állatok jobb hátsó talpába korábbi közlemények leírásai alapján [175, 176]. A vad típusú C57/BL6 egértörzs és az IL-1R1 KO egerek egyes csoportjai (n=6-6) CFA oltás helyett álkezelést, fiziológiás sóoldatot kaptak a jobb hátsó talpukba. A kontroll csoportba tartozó patkányok és egerek nem kaptak kezelést.

4.2. Mechanikai és termális viselkedési tesztek

A kísérletek során felhasznált állatok nociceptív válaszkészségét patkányoknál mechanikai allodynia teszttel (*Dynamic plantar aesthesiometer*, Ugo Basile, Comerio, VA, Italy), egereknél pedig mechanikai- és termális allodynia teszttel is (*Plantar Test Instrument-Hargreaves Apparatus*, Ugo Basile, Comerio, VA, Italy) vizsgáltuk. Az állatok mechanikai talpvisszahúzási ingerküszöbét- és/vagy termális nociceptív talpvisszahúzási latenciáját (továbbiakban MTI 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 válaszkészség maximuma).

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. Az állatok elhelyezése után 15 percet vártunk, hogy alkalmazkodjanak az új környezethez. A méréseket minden esetben csak ezután kezdtük el. 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.

A méréseket mindkét tesztípusnál ötször ismételtük meg mindkét talp esetében, a kapott értékeket átlagoltuk, és a középérték közepes hibáját (standard error of mean= SEM) számítottuk. Az adatok közötti statisztikus különbségeket *Kruskal-Wallis* teszttel igazoltuk.

4.3. TaqMan alacsony denzitású array módszer (TLDA)

A génexpressziós vizsgálatokat *TaqMan Low Density Array* (TLDA) módszerrel végeztük. A TLDA módszer az általunk választott konfigurációban 48 gén egyidejű vizsgálatára ad lehetőséget ugyanazon mintából egy mikrofluid kártya segítségével. A módszer érzékenysége és specificitása a kvantitatív polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálatnak megfelelő. Mintaigénye kicsi, így ez a speciális eljárás lehetővé teszi, hogy a kis szövetmintákból kinyert RNS is elegendő legyen 48 gén vizsgálatára.

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 (RNeasy Lipid tissue kit, Qiagen, Maryland, USA), amely minőségét Agilent mikroelektroforézissel és Nanodrop fotometriás rendszerrel ellenőriztük. Ezt követően cDNS könyvtárat hoztunk létre (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA, katalógusszám: 4368814), amelynek 100 ng mennyiségét töltöttük rá a gyártó által tevezett TLDA kártyák portjaira (TLDA; Applied Biosystems, Foster City, USA). A 8 porton keresztül 48 gén expressziójának vizsgálata vált elérhetővé. A PCR reakciókat az ABIPrism 7000 valós idejű PCR berendezés révén kiviteleztük, majd ABI TaqMan szoftvert használtunk a küszöbciklus értékek (Ct) meghatározásához. A kapott adatok három párhuzamos kísérletből származnak.

Az egyes gének expressziójának értékeit Livak és mtsai $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszere alapján definiáltuk [177]. Minden gén Ct értékét normalizáltuk (ΔCt) három háztartási gén átlag Ct értékeire (GAPDH, ARBP, PPIA) a következő formula szerint:

$$\Delta Ct = Ct(\text{célgén}) - Ct(\text{háztartási gének})$$

A kontroll és a CFA kezelt szövetekből származó géntranszkriptumok közötti összehasonlítást a következő képlet alapján kalkuláltuk:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{kezelt minták}) - \Delta Ct(\text{kontroll minták})$$

A relatív kvantitatív génexpresszió értékeit, amelyek megadják a kezelt és kontroll minták közötti pontos arányszámokat, a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ művelet alapján számítottuk ki. A minták közötti statisztikai különbségeket ANOVA próbával detektáltuk. A gének listáját a **2. táblázat** tartalmazza.

2. táblázat: A TLDA assay során vizsgált gének

Glutamát receptor alegység		
#	Gén	Teljes név
1	Grin1	ionotróp glutamát receptor NMDA1
2	Grin2a	ionotróp glutamát receptor NMDA2A
3	Grin2c	ionotróp glutamát receptor NMDA2C
4	Gria2	ionotróp glutamát receptor, AMPA2
5	Gria3	ionotróp glutamát receptor, AMPA3
6	Gria4	ionotróp glutamát receptor, AMPA4
7	Grm5	metabotróp glutamát receptor 5

5HT3 szerotonin receptor		
#	Gén	Teljes név
8	Htr1a	5-hidroxitriptamin (szerotonin) receptor 1A
9	Htr2a	5-hidroxitriptamin (szerotonin) receptor 2A
10	Htr3a	5-hidroxitriptamin (szerotonin) receptor 3a
11	Htr7	5-hidroxitriptamin (szerotonin) receptor 7
GABA / glicin receptor alegységek / metabolikus proteinek / transzporterek		
#	Gén	Teljes név
12	Gabra3	gamma-amino-vajsav (GABA-A) receptor, alfa 3
13	Gabrb2	gamma-amino-vajsav (GABA-A) receptor, beta 2
14	Gabrb3	gamma-amino-vajsav (GABA-A) receptor, beta 3
15	Gabbr1	gamma-amino-vajsav (GABA) B receptor 1
16	Gabbr2	gamma-amino-vajsav (GABA) B receptor 2
17	Gad2	glutamát dekarboxiláz 2
18	Gad1	glutamát dekarboxiláz 1
19	Gla1	glicin receptor, alpha 1
20	Gla2	glicin receptor, alpha 2
21	Gla3	glicin receptor, alpha 3
22	Glrb	glicin receptor, beta
23	Slc6a5	glicin transporter 2
Citokin receptorok / kemokin receptorok / ligandok		
#	Gén	Teljes név
24	Il6ra	interleukin-6 receptor, alfa
25	Il1r1	interleukin-1 receptor 1
26	Cx3cl1	kemokin (C-X3-C) ligand 1
27	Cx3cr1	kemokin (C-X3-C) receptor 1
28	Cxcl12	kemokin (C-X-C motívum) ligand 12
29	Cxcr4	kemokin (C-X-C motívum) receptor 4
30	Ccl2	kemokin (C-C motívum) ligand 2
Ioncsatornák		
#	Gén	Teljes név
31	Slc12a5	kálium-klorid kotranszporter 2
32	Slc12a2	nátrium-kálium-klorid kotranszporter 1
33	Hcn1	hiperpolarizáció-aktivált, ciklikus nukleotid kapuzott 1
34	Hcn2	hiperpolarizáció-aktivált, ciklikus nukleotid kapuzott2

35	Hcn3	hiperpolarizáció-aktivált, ciklikus nukleotid kapuzott3
36	Hcn4	hiperpolarizáció-aktivált, ciklikus nukleotid kapuzott4
37	Scn9a	feszültség-vezérelt nátrium csatorna 9
38	Scn10a	feszültség-vezérelt nátrium csatorna 10
Endokannabinoid szintézis, degradáció		
#	Gén	Teljes név
39	NAPE-PLD	N-acil-foszfátidiletanolamin-hidrolizáló foszfolipáz D
40	Faah	zsírsav-amid hidroláz
Más molekulák		
#	Gén	Teljes név
41	Ntrk2	neurotrófikus tirozin-kináz receptor 2
42	Bdnf	agyai eredetű neurotrófikus faktor
43	Pkcg	protein-kináz C gamma
44	Mapk8	mitogén-aktivált protein kináz 8 (JNK)
Háztartási gének		
#	Gén	Teljes név
45	GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
46	ARBP	savas riboszómális foszfoprotein P0
47	PPIA	peptidil-prolil-izomeráz A kötelező kontroll gén
48	18S rRNA	18S riboszómális RNS

4.4. 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 20 mM koncentrációjú Trisz (hidroximetil)-aminometán (TRIS, pH 7,4) proteáz inhibitorokat tartalmazó lízisbufferban (4 mM EDTA, 2,5 mM EGTA, 2 nM PMSF, 26 µM benzamidin, 8 µM pepstatin A, 2 µg/ml szójabab tripszin inhibitor, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin), majd a sejttörmeléseket centrifugálással eltávolítottuk (10 perc, 1500 rcf, 4 °C). A felülúszó centrifugálása után (20 perc, 12000 rcf, 4

°C), a pelletet reszuszpendáltuk 1 %-os Triton X-100-at és 0,1 % nátrium-dodecilszulfát (SDS)-t tartalmazó lízispufferbe. A kapott mintákat -70 °C-on tároltuk későbbi felhasználásig. A minták fehérjekoncentrációját detergens kompatibilis BCA assay segítségével határoztuk meg (Pierce, Rockford, USA), majd redukáló mintapufferben (50 µg protein/sáv) történő feloldásuk után 10 %-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk meg őket Laemmli leírása alapján [178]. Az elválasztott fehérjéket elektroforetikusan transzferáltuk polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra (Millipore, Bedford, USA), amelyet 10 %-os borjúsérum albumint (BSA, Sigma, St Louis, MO, USA) tartalmazó Tritont tartalmazó Tris-pufferelt fiziológiás sóoldattal (TTBS) blokkoltunk (20 mM TRIS, 500 mM NaCl, pH 7,5, 0,05 % Tween-20) 2 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd inkubáltuk az alábbi primer antitestek egyikével éjszakára 4 °C-on: kecske anti-IL-1R1 receptor antitest (1:500, RnD Systems, Minneapolis, USA, katalógusszám: AF-771), nyúl anti-IL-1 β antitest (1:500, Peprotech, Rocky Hill, New Jersey, katalógusszám: 500-P80), nyúl anti-NLRP1 antitest (1:1000, Abcam, Cambridge Science Park, Cambridge, katalógusszám: ab3683), nyúl anti-NLRP2 antitest (1:500, Abcam, katalógusszám: ab36850), nyúl anti-NLRP3 antitest (1:500, Abcam, katalógusszám: ab214185), és belső kontroll antitest (egér anti- β -tubulin, 1:2000 Sigma, katalógusszám: T8328).

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, Glostrup, Dánia, katalógusszám: P0449, P0448 és P0447). A fehérjesávokat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma) kromogén reakció révén vizualizáltuk. Az immunblotok kvantifikációját Image J szoftver használatával végeztük, az optikai denzitások értékeit β -tubulinra normalizálva határoztuk meg három párhuzamos kísérlet eredményeiből. A kapott átlagadatokat és a SEM értékeinek meghatározását követően, a kontroll és a CFA kezelt minták közötti különbségeket ANOVA statisztikai próbával vizsgáltuk.

4.5. Enzim-kapcsolt immunoszorbens assay (ELISA) módszer

A patkány IL-1 β Quantikine ELISA kit használatával (RnD Systems, Minneapolis, USA, katalógusszám: RLB00) az IL-1 β fehérje összmenyiségét kontroll (n=3) és CFA kezelt (n=3/nap) állatok gerincvelői homogenizátumaiból izoláltuk az injekciót követő 1-4. napokon. A mintagyűjtés az előző módszerekkel azonos módon történt az L4-L5-ös gerincvelői szegmentumokból.

A szövetmintákat mechanikusan homogenizáltuk proteáz inhibitorokat tartalmazó jéghideg RIPA pufferban (Pierce Protease Inhibitor Mini tablet, ThermoScientific, Rockford, USA, katalógusszám: A32953), majd 20 perces rázatást és centrifugálást követően (10 perc, 15000 rcf) eltávolítottuk az oldhatatlan szövettörmeléseket. A felülúszó 50 μ l-es térfogatát triplikátumban használva detektáltuk a homogenizátumok IL-1 β mennyiségét. A további lépések során a kítet gyártó utasításai alapján jártunk el. A kapott kísérleti adatokból meghatároztuk az átlagokat és a SEM értékeit. A statisztikai különbséget a kontroll és kezelt állatok között ANOVA teszttel validáltuk.

4.6. Immunohisztokémia

4.6.1. 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 (50 mg/kg intraperitoneálisan) mélyaltatást kiváltva, transzkardiális perfúziót végeztünk fiziológiás sóoldat és 4 % paraformaldehidet tartalmazó 0,1 M koncentrációjú foszfát puffer (PB, pH 7,4) 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 (Leica, Wetzlar, Németország). Az így készült metszeket használtuk a következőkben leírt módszerek során.

4.6.2. 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 (pH=7.4) tartalmazó 10 %-os normál kecske- (NGS) vagy nyúl szérumban (NRS) (Vector Labs, Burlingame, CA, USA, katalógusszám: S-1000 és S-5000) rázattuk 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: kecske anti-IL-1R1 receptor (1:100), nyúl anti-IL-1 β (1:500) nyúl anti-NLRP1 (1:100), nyúl anti-NLRP2 (1:500), egér anti-NLRP2 (1:500, Biotechne, UK, katalógusszám: NB100-56155SS) és nyúl anti-NLRP3 antitestek (1:500).

1 %-os NRS-ban vagy NGS-ban történő mosási lépéseket követően a metszeteket 1 % biotinilált nyúl anti-kecske (1:200, Vector Labs, katalógusszám: PK-4001) vagy biotinilált kecske anti-nyúl szekunder IgG antitestet (1:200, Vector Labs, katalógusszám: PK-4005) 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, katalógusszám: PK-4001) hozzáadásával inkubáltuk éjszakára. TPBS és 0,05 M TRIS oldattal történő mosást követően az immunreakciót DAB reagenssel tettük láthatóvá exogén 1 %-os hidrogén-peroxid oldat jelenlétében. Ezután a metszeteket TRIS és PB oldatban mostuk, majd dehidráltuk felszálló alkoholsorban. Xilolos kezelést követően a metszeteket DPX médium (Sigma) segítségével rögzítettük tárgylemezre. A metszetekről Olympus CX-31 epifluoreszcens mikroszkóp használatával készítettünk felvételeket.

4.6.3. Kettős immunofluoreszcens festések

A kettős immunofluoreszcens festés során a célfehérjék kolokalizációját tanulmányoztuk neuronális és gliális markerekkel. Az immunoperoxidáz fejezetben leírtak szerint az úszó metszeteket az antitesttel történő kezelés előtt 10 % NGS-ot vagy normál szamarászérumot (NDS) tartalmazó 0,1 M foszfát pufferelt sóoldat (PBS) oldatban inkubáltuk 50 percig.

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 (kivéve IB4) egyike: tengerimalac anti-CGRP (1:2000, Peninsula Labs, San Carlos, CA, USA, katalógusszám: T-5027), biotinilált IB4 (1:2000, Sigma, katalógusszám: 121414), tengerimalac anti-VGLUT2 (1:2000, Chemicon, Temecula, CA, USA, katalógusszám: AB2251), egér anti-VGAT (1:2000, Synaptic Systems, Goettingen, Németország, katalógusszám: 130011), egér anti-glia fibrilláris savas protein (GFAP, 1:1000, Chemicon, katalógusszám: MAB3402), egér anti-CD11b (1:500, Bachem Holding, Bubendorf, Svájc, katalógusszám: T-3102), nyúl anti-KCC2 (1:2000, Upstate Biotechnology Inc Lake Placid NY New York, katalógusszám: 07-432), egér anti-posztszinaptikus denzitás fehérje 95 (PSD95, 1:100, Frontier, Geumcheon-Gu, Dél-Korea, katalógusszám: AB2723), vagy egér anti-gephyrin (1:100, Synaptic Systems, katalógusszám: 147021) antitestek. Az egyes reakciókat 3 napig hagytuk végbemenni 4 °C-on.

Az 1 %-os NDS-t tartalmazó 0,1 M PBS oldatban történő mosások után a metszeteket Alexa Fluor 555-tel konjugált szamar anti-kecske IgG (1:1000, Molecular Probes, Eugene, OR, USA, katalógusszám: A21432) szekunder antitesttel, és az alábbi antitestek egyikével

inkubáltuk 2 órán keresztül: Alexa Fluor 488-al konjugált szamár anti-tengerimalac IgG (1:1000, Molecular Probes, katalógusszám: A11055), Alexa Fluor 488-al konjugált streptavidin (1:1000, Molecular Probes, katalógusszám: S11223), Alexa Fluor 488-al konjugált szamár anti-egér IgG (1:1000, Molecular Probes, katalógusszám: A31570) vagy Alexa Fluor 488-al konjugált szamár anti-nyúl IgG (1:1000, Molecular Probes, katalógusszám: A21206).

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, katalógusszám: 234-004). 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, Waltham, MA, USA, katalógusszám: A11034, illetve Alexa Fluor 555-tel konjugált kecske anti-egér IgG, 1:1000, Thermo Fisher Scientific, katalógusszám: A21422 vagy Alexa Fluor 555-tel konjugált kecske anti-tengerimalac IgG, 1:1000, Thermo Fisher Scientific, katalógusszám: A21435) és mosásokat (1 % NGS szérum, majd PBS) követően a metszeteket tárgylemezre szedtük fel, és Vectashield médiummal (Vector Labs, katalógusszám: H-100) fedtük le. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt primer antitestek listáját a **3. táblázat** tartalmazza.

4.6.4. 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 szkennelést x40 olajimmerziós objektívvel végeztük, (NA 1.3) a konfokális paraméterek beállítása (lézerenergia, konfokális apertúra mérete) standard módon történt. Az elkészült felvételeket Olympus Fluoview és Adobe Photoshop CS3 szoftverrel elemeztük. Intenzitásűrés révén eltávolítottuk a háttérfestődést, és beállítottuk az optimális küszöbértékeket az alkalmazott markereknél. 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 megszámlálva, 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 receptorral azonos módon határoztuk meg a kolokalizációs értékeket gliális (GFAP, Iba1) markerekkel. Az IL-1 β expressziójában bekövetkező változásokat, illetve a GFAP pozitív asztrociták térfogatváltozásait IMARIS szoftver (Bitplane) használatával is modelleztük. Az IMARIS szoftver algoritmus a konfokális mikroszkóp által készített felvételeken szereplő markereket modellezi, és háromdimenziós rekonstrukciót készít. A program kolokalizáció és távolság elemzésére egyaránt alkalmas modullal is rendelkezik.

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-vel 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. A kapott eredményeket átlagoltuk, és meghatároztuk a SEM értékeket. A kontroll és kezelt állatcsoportok közötti statisztikai különbségeket Mann-Whitney teszt alkalmazásával határoztuk meg.

3. táblázat: Alkalmazott primer antitestek listája

Faj	Név	Gyártó	Katalógusszám
kecske	anti-IL-1R1	R&D Systems	AF-771
tengerimalac	anti-CGRP	Peninsula	T-5027
Griffonia S.	IB4	Sigma	121414
tengerimalac	anti-VGLUT2	Chemicon	AB2251
egér	anti-GFAP	Chemicon	MAB3402
egér	anti-VGAT	Synaptic Systems	130011
egér	anti-CD11b	Bachem	T-3102
nyúl	anti-KCC2	Upstate	07-432
egér	anti-PSD95	Frontier	AB2723
egér	anti-gephyrin	Synaptic Systems	147021
nyúl	anti-IL-1 β	Peptotech	500-P80
nyúl	anti-NLRP1	Abcam	ab3683
nyúl	anti-NLRP2	Abcam	ab36850
nyúl	anti-NLRP3	Abcam	ab214185
tengerimalac	anti-Iba1	Synaptic Systems	234-004

5. EREDMÉNYEK

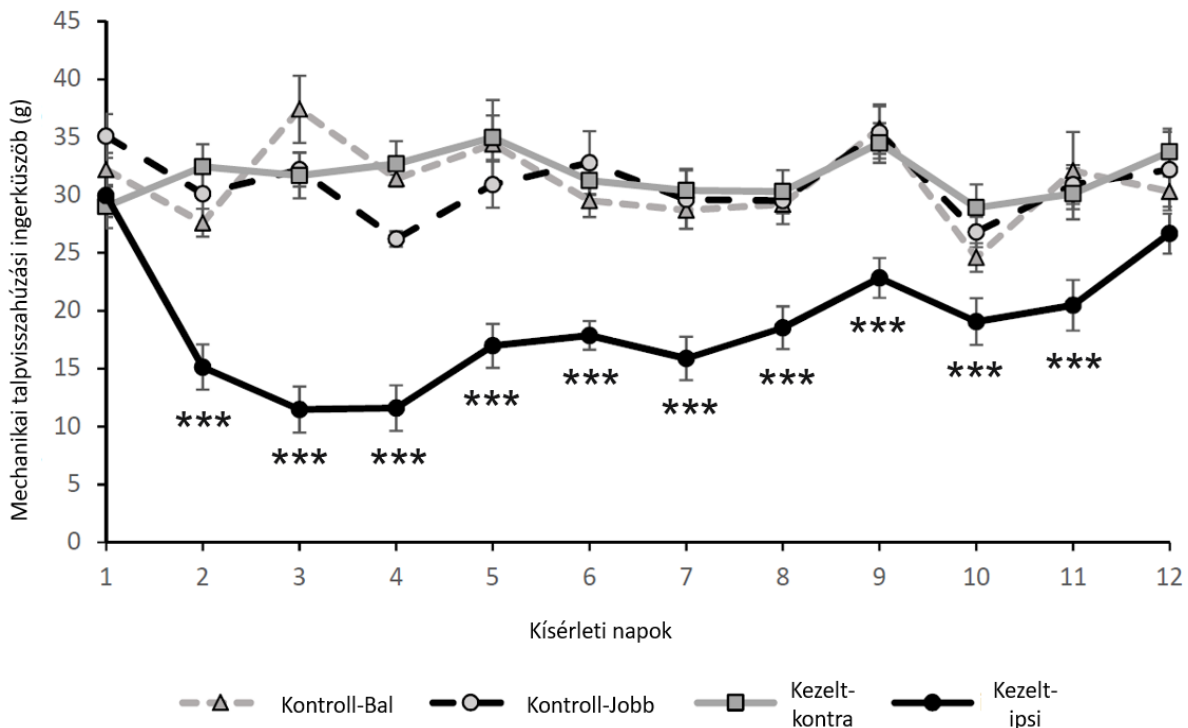
Vizsgálatainkat a krónikus gyulladáshoz való fájdalom korábban már leírt [175] állatmodelljében végeztük, amelyet laboratóriumunk egy korábbi munkájában [176] is alkalmaztak. Az irodalmi adatok, és saját korábbi eredményeink alapján a CFA szubkután intraplantaris injekciója erős és tartós gyulladást, valamint markáns mechanikai- és termális allodiniát vált ki.

5.1. A mechanikai viselkedési teszt eredményei patkányokban

A krónikus gyulladáshoz való fájdalom kialakulását mechanikai viselkedési teszttel ellenőriztük a kísérleteinkhez felhasznált hím Wistar patkányokban. Az MTI kontroll-, és a kezelt hím patkányok bal oldali hátsó talpából (kontralaterális) mért átlagértékei hasonlóan bizonyultak a mérési periódus alatt (kontroll: 26,2-35,7g; kontralaterális: 28,9-34,96 g).

CFA injekció hatására azonban szignifikáns csökkenés ($p \leq 0,001$) következett be az MTI jobb hátsó talpból (ipsilateralis) származó értékeiben a kontrollhoz képest (átlagosan 12,17 g-os MTI csökkenés).

A legalacsonyabb átlagértékeket az injekció beadását követő 3. napon detektáltuk ($11,46 \pm 1,01$ g, a kontrollhoz viszonyítva 22,34 g-os MTI csökkenés, ami megegyezik a maximális MTI csökkenéssel is). A 4. naptól kezdődően az MTI értékei folyamatos emelkedést mutattak, majd a 11. napra megközelítették a kontroll állatokban megfigyelt adatokat (**7. ábra**).



7. ábra: Patkány mechanikai allodynia teszt eredménye. A jelölők az egyes kísérleti napok átlagértékeit jelzik a SEM értékeinek feltüntetésével, *** $p \leq 0,001$ - szignifikáns differencia a kontroll és a kezelt állatok ipsilateralis oldala között

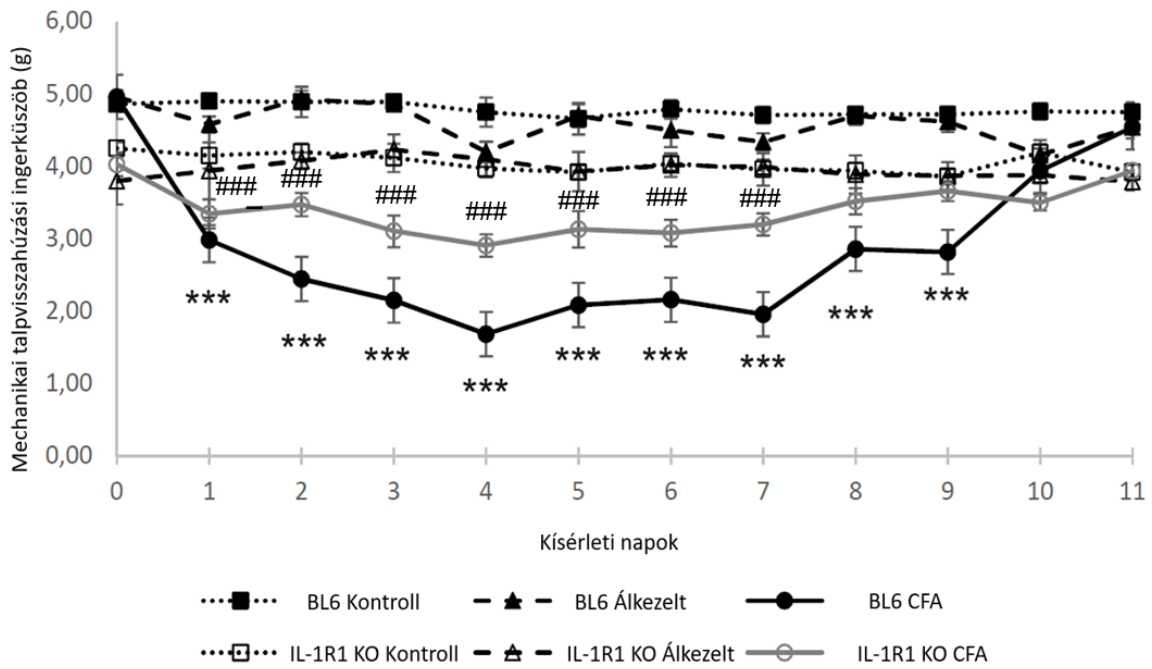
5.2. A mechanikai és termális viselkedési tesztek eredményei IL-1R1 KO és C57BL6 vad típusú egerekben

Az IL-1R1-IL-1 β szignalizáció krónikus fájdalomban betöltött szerepének vizsgálatára leginkább a IL-1R1 KO egerek alkalmasak, ezért a patkányok viselkedési tesztjei mellett kísérleteinket IL-1R1 KO és C57BL6 vad típusú egerekben is megismételtük. A mechanikai- és a termális ingerküszöb változásait a CFA injekciót (0. nap) követő 11 napig vizsgáltuk. Ezeket az állatokat a későbbiekben más vizsgálatokhoz már nem használtuk fel. CFA oltás helyett egyes állatok fiziológiás sóoldatot tartalmazó oldatot (álkezelés) kaptak. A vad típusú és az IL-1R1 KO állatok kontroll csoportjainak MTI értékei a kísérlet során végig stabilnak bizonyultak. Vad típusú egerek esetén 4,8-5,0 g közötti MTI adatokat rögzítettünk $4,81 \pm 0,29$ g átlagértékkel, míg IL-1R1 KO egereknél 3,0-5,0 g 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 ($p < 0,0001$). A fiziológiás sóoldat jobb hátsó talpra történő injekciója nem váltott ki érzékelhető különbséget, sem a vad típusú, sem a KO állatok esetén. A CFA jobb hátsó talpi injekciója azonban markáns

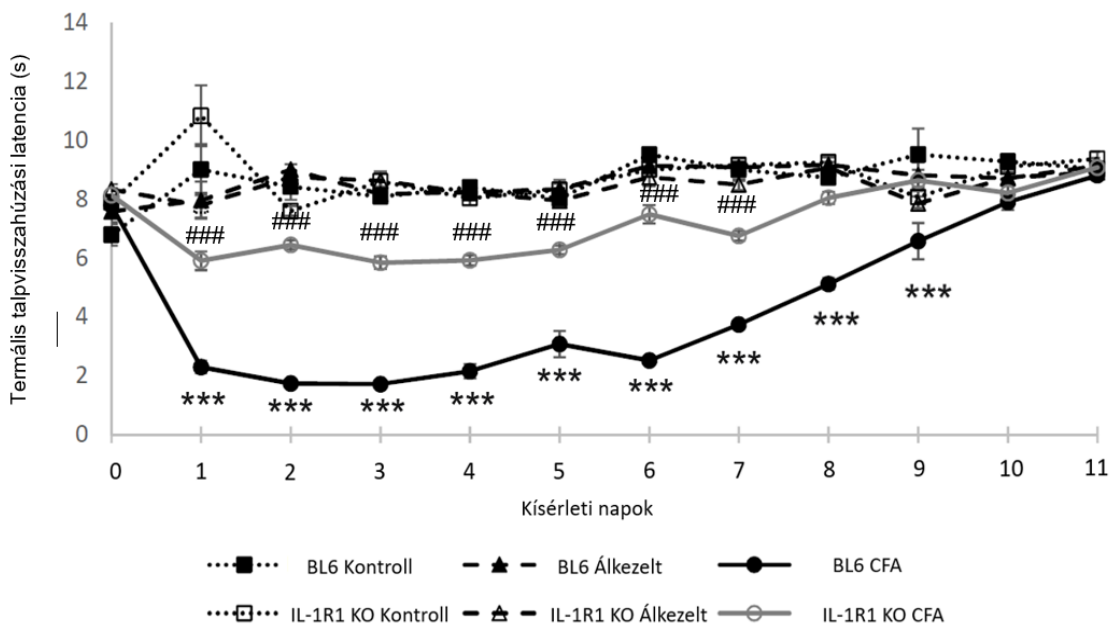
csökkenést váltott ki a vad típusú egerek MTI értékeiben a vizsgálati periódus alatt a kontrollhoz képest (átlagosan 1,91 g-os MTI csökkenés). A csökkenés az injekciót követő 4. napon érte el a maximumát (1,68±0,06 g, 3,05 g-os MTI csökkenés, ami megegyezik a maximális MTI csökkenéssel is). Ezt követően az MTI értékei emelkedő tendenciát mutatva lassan visszatértek a kontroll adatokhoz a 10-11. napra. Az IL-1R1 KO egerek CFA injekció után mért MTI értékeiben mérsékelt csökkenést tapasztaltunk, amely az injekció beadása után mindössze egy hétig tartott. Az MTI értékeinek csökkenését a kontrollhoz képest 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 MTI különbségek már az 1-9. napig voltak tetten érhetőek ($p=0,000004-0,01$) **(8. ábra a)**.

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±1,22 s átlagértékkel, míg az IL-1R1 KO állatoknál 6,3-10,0 s közötti időintervallumot regisztráltunk 8,15±0,85s 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±0,01 s, valamint 1,72±0,08). Ezt követően a TTL értékei a 10-11. napra tértek vissza a kontrollt közelítő értékekhez. Az IL-1R1 KO egerek CFA oltás után mért TTL adataiban csak kismértékű csökkenést figyeltünk meg a kontrollhoz képest, amely az injekció beadása utáni 1-7. napig tartott. A statisztikailag szignifikáns csökkenés ezen időtartam alatt végig kimutathatónak 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 ($p=0,000003-0,021$) **(8. ábra b)**.

a



b



8. ábra: a) Mechanikai és b) termális allodynia teszt eredménye egerekben. A jelölők az egyes kísérleti napok átlagértékeit jelzik a SEM értékeinek feltüntetésével a) *** $p < 0,000004-0,01$ -szignifikancia értékek vad típusú CFA-val oltott- és IL-1R1 KO egerek adatai között ### $p = 0,00004-0,006$ -szignifikancia értékek kontroll és IL-1R1 KO egerek adatai között b) *** $p = 0,000003-0,021$ szignifikancia értékek vad típusú CFA-val oltott- és IL-1R1 KO egerek adatai között ### $p = 0,0005-0,029$ - szignifikancia értékek kontroll és IL-1R1 KO egerek adatai között.

5.3. A TLDA módszerrel kapott génexpressziós változások eredményei

A TLDA módszerhez a gének kiválasztása a korábbi irodalmi adatokon alapult, azonban részben szubjektív, következően az esszében vizsgálható gének limitált számától és a gyártónál elérhető TaqMan próbáktól. Az elérhető próbák függvényében igyekeztünk teljes palettát összeállítani a glutamát, GABA és glicin receptorokból és a kapcsolódó molekulákból. Ezen kívül a munkacsoport akkori témáihoz kapcsolódó receptorcsaládokat választottunk ki, így a HCN receptorokat és az endokannabinoid rendszerhez tartozó molekulákat. Mindezek mellett helyet kaptak a vizsgálatban citokin és kemokin receptorok, valamint ligandok is, amelyek központi idegrendszeri expressziójáról és krónikus fájdalomban betöltött szerepéről a vizsgálat kezdetekor még kevés adat állt rendelkezésre, azonban a rendelkezésre álló adatok felkeltették érdeklődésünket a molekulacsalád iránt.

A krónikus gyulladással (nociceptív) fájdalom kialakulását feltehetően befolyásoló gének, köztük az IL-1R1 génexpressziós változását patkány gerincvelői felületes hátsó szarvban vizsgáltuk CFA modellben. Az IL-1R1 expressziója korábban már bizonyítást nyert a gerincvelőben, azonban nem voltak kísérletes adatok arra nézve, hogy hogyan változik a receptor mennyisége gyulladással fájdalomban. A TLDA módszerrel arra kerestük a választ, hogy detektálható-e szignifikáns génexpressziós változás a receptor mRNA 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 mRNA 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 a Livak és mtsai által publikált [177] $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszer szerint. Annak eldöntésére, hogy a CFA injekció által kiváltott hatások csak az injekció beadásával ipsilaterális gerincvelői hátsó szarvban jelentkeznek-e, vagy kontralaterálisan is tetten érhetőek, a TLDA vizsgálatot elvégeztük a mintáink kontralaterális részén is. Az IL-1R1 génexpresszió növekedése kontralaterálisan is megfigyelhető volt, viszont az állatcsoportok között jelentős variabilitások voltak.

Az általunk vizsgált többi gén (serkentő- és gátló neurotranszmitterek, citokinek, fehérjekinázok, ioncsatornák) kifejeződése közül az endogén kannabinoid szintézisben szerepet játszó NAPE-PLD génexpressziója 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) génexpressziója szintén csökkent mértékben mutatott (0,77-szeresére, $p=0,0447$).

A szignifikáns géneexpressziós változásokat a **4. táblázat** tartalmazza.

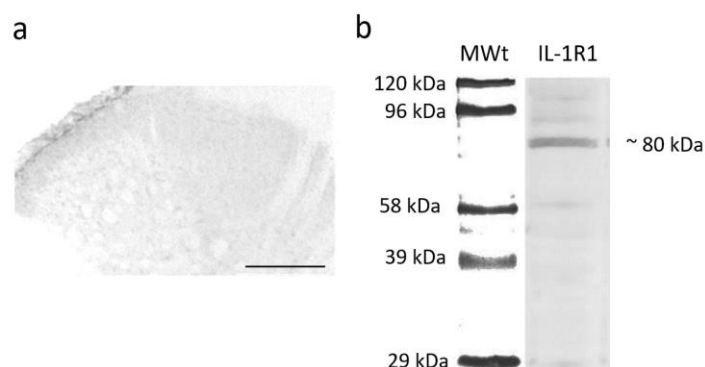
4. táblázat: TLDA módszerrel szignifikáns változásokat mutató gének listája

Gén	Teljes név	ΔCt kontroll	ΔCt kezelt	$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$	p érték
il1r1	interleukin 1 receptor 1	$14,7 \pm 0,001$	$12,1 \pm 0,002$	6,02	0,0002
NAPE-PLD	N-acil-foszfátidiletanolamin-hidrolizáló foszfolipáz D	$7,0 \pm 0,06$	$6,9 \pm 0,17$	1,11	0,0016
Faah	zsírsav-amid hidroláz	$6,4 \pm 0,01$	$6,7 \pm 0,1$	0,78	0,0368
Gria2	ionotróp glutamát receptor/ AMPA2	$3,0 \pm 0,24$	$3,3 \pm 0,06$	0,77	0,0447

5.4. Az IL-1R1 fehérjeexpressziós változásának eredményei

5.4.1. Kontrollok

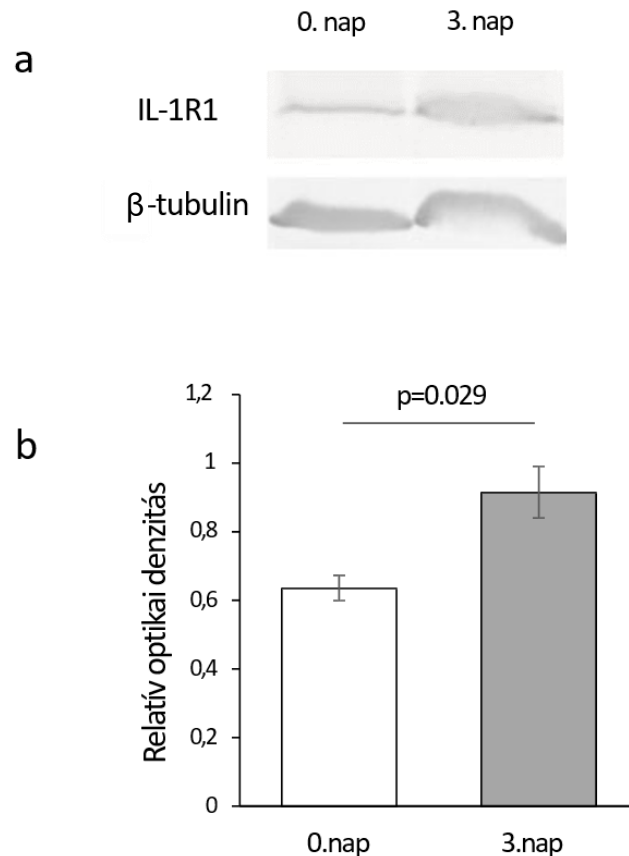
Az immunhisztokémiai protokoll részeként rekombináns patkányból származó IL-1R1- (Sino Biological Inc Peking, Kína, katalógusszám: 80028R08H50) fehérje alkalmazásával teszteltük az anti-IL-1R1 primer antitest specificitását. A metszeteken a rekombináns peptid és a megfelelő antitest (1 μg peptid/1 μg antitest) ekvivalens keverékét inkubáltuk primer szérumként, hogy antitest depléciót (kimerítést) 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 jelentkeztek (**9. ábra a**). Egyéb kontrollként az immunoblot korábban leírt protokollja szerint elvégzett antitest specificitás vizsgálatot alkalmaztuk. Az IL-1R1 esetén egy 80 kDa tömegű sávot mutattunk ki, amely megfeleltethető a receptor irodalomban leírt molekulatömegének (**9. ábra b**) [179].



9.ábra: Az anti-IL-1R1 antitest specificitásának vizsgálata a) kimerítés és b) Western blot révén.
Lépték: 100 μm

5.4.2. Az IL-1R1 fehérjeexpressziójának vizsgálata immunoblottal

A TLDA módszer során kapott IL-1R1-et érintő génexpressziós eredményeinket fehérjeszinten 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 mutakozó emelkedést mutatott ki a kezelt állatok IL-1R1 fehérje mennyiségében a kontrollhoz viszonyítva ($p=0,029$). A mintafelvitel kontrollként β -tubulin fehérjét alkalmaztunk (**10. ábra a-b**).



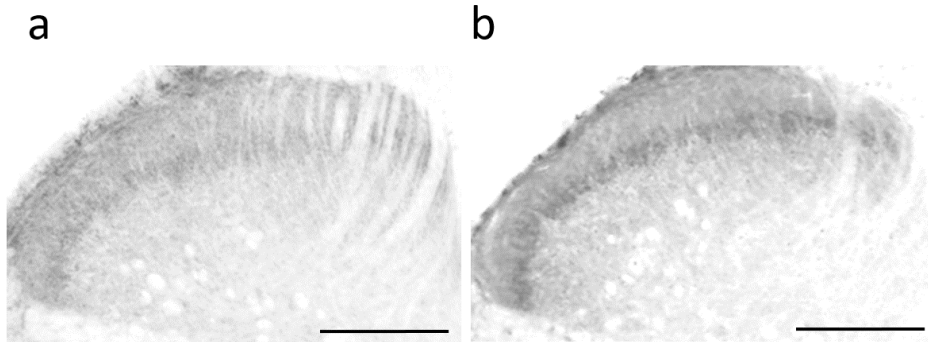
10. ábra: a) IL-1R1 immunoblot kontroll- (0. nap) és CFA kezelt állatok (3. nap) gerincvelő hátsó szarvi szövetmintáiból (CFA-ipsi) b) Az immunoblot denzitometriás analízise (az átlagérték és a SEM hibásávok feltüntetve), a $p=0,029$ érték a kontroll és a CFA kezelés közötti szignifikanciát jelzi.

5.4.3. Az IL-1R1 fehérje expressziójának vizsgálata immunhisztokémiai módszerekkel

5.4.3.1. Az immunoperoxidáz vizsgálat eredményei

Az IL-1R1 fehérje expresszióját és eloszlását peroxidáz alapú immunfestéssel is vizsgáltuk patkány gerincvelői hátsó szarvban kontroll- és gyulladós 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 (**11. ábra a**).

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. A reakció itt egy denz sávot alkotva húzódott végig a hátsó szarv teljes mediolaterális kiterjedésén (**11. ábra b**).



11.ábra: Az IL-1R1 fehérje immunoperoxidáz vizsgálata (a) kontroll és (b) CFA kezelt mintákból. Lépték: 100 μ m

5.4.3.2. A kettős immunofluoreszcens festés eredményei

A CFA oltás következményeként előálló markáns különbségek a vad típusú és IL-1R1 KO állatok mechanikai és termális szenzitivitásában arra utalnak, hogy az IL-1R1 mediálta szignalizáció kardinális szerepet játszhat a gyulladással járó fájdalom kialakulásában a gerincvelői hátsó szarvban. Ezt bizonyítják a fentebb részletezett gén- és fehérjeexpressziós eredmények is, amelyeket a TLDA és Western blot módszerekkel kaptunk.

Az IL-1R1 aktiváció hatásainak megfelelő értelmezéséhez azonban az is hozzátartozik, hogy minél pontosabban lokalizáljuk a receptor gerincvelői expresszióját a különböző neuronális és gliális markereken. Az IL-1R1 expresszióját már korábban leírták neuronokon [180-182] és gliasejteken is [16, 183, 184], de viszonylag kevés információ állt rendelkezésre a receptor pontos eloszlásáról a két sejtpopuláción. Ennek kiderítése céljából vizsgálatainkat kettős fluoreszcens immunjelölésekkel folytattuk tovább.

5.4.3.2.1. Az IL-1R1 expressziója axonterminálisokon

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

leírt tekintélyes irodalommal bíró markerek [185-192] immunoreaktivitását mi is megfigyeltük a gerincvelői felületes hátsó szarvban (CGRP, VGLUT2 és VGAT jelölés az I-es és II-es Rexed laminában, IB4 jelölés a Rexed III részében).

Ennek ellenére, a kettős immunfestések eredménye azt mutatta, hogy kontroll körülmények között szinte teljes szegregáció figyelhető meg az IL-1R1 és ezen markerek között, a kolokalizáció mértéke elhanyagolható (**12. ábra a-d**). A konfokális felvételek előzőleg leírt módszertani analízise során feltárt adatok szerint az IL-1R1 receptor immunoreaktív foltjainak axonális eloszlása a következő: $0,1 \pm 0,01\%$ CGRP markeren, $0,3 \pm 0,10\%$ IB4 markeren, $1,2 \pm 0,46\%$ VGLUT2 markeren, illetve $0,1 \pm 0,04\%$ VGAT markeren.

A CFA oltás érdemben nem változtatott ezeken a kontrollban is elhanyagolható értékeken, nem volt kimutatható hatása a gyulladásnak a receptor expressziójának mértékére (**13. ábra**).

5.4.3.2.2. Az IL-1R1 expressziója a neuronális citoplazmában és szomatodendritikus membránon

A KCC2 fehérje kizárólag neuronokon fejeződik ki. A sejtek intracelluláris klorid koncentrációját főként a korábban említett KCC2 transzporter fehérje expressziójának mértéke szabja meg [193-197], ahol a szomatodendritikus membránba ágyazva a kloridáram mediálta posztzinaptikus hiperpolarizációért felelős, axonterminálisokon nem fordul elő [198-200].

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 állatokból származó kettős immunofluoreszcens festések felvételeinek kvantifikációja során a teljes IL-1R1 készlet $19,9 \pm 2,27\%$ -át azonosítottuk a KCC2 pozitív membránon belül, ugyanakkor $49,9 \pm 2,56\%$ -a citoplazmatikus jelnek bizonyult (**12. ábra e-g**).

CFA kezelt állatokban a neuronális szomatodendritikus membrán kompartmentumban talált IL-1R1 immunoreaktív foltok számának százalékos aránya szignifikánsan nőtt, ($p = 0,002$) $19,9 \pm 2,27\%$ -ról $35,1 \pm 1,5\%$ -ra, a citoplazmatikus részarány pedig $44,39 \pm 0,56\%$ -ra csökkent (**13. ábra**).

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

Gardoni és mtsai koprecipitációs kísérleteikben korábban már azonosították az IL-1R1 jelenlétét hippocampális neuronok szomatodendritikus felszínének serkentő posztszinaptikus denzitásaiban [201], ezért mi is megvizsgáltuk a receptor lehetséges átfedését a serkentő-, illetve gátló szinapszisok posztszinaptikus membránmarkereivel is. Korábbi irodalmi adatok alapján a PSD95 a serkentő glutamaterg- [202, 203], a gephyrin pedig a gátló GABAerg és glicinerg posztszinaptikus denzitás specifikus markere [204, 205].

Gardonival egyetértésben mi is azt találtuk, hogy az IL-1R1 immunoreaktivitás főként a serkentő posztszinaptikus denzitásban megfigyelhető. A PSD95 markerrel jelölt területen a receptorkészlet $9,04 \pm 0,43$ %-a volt megtalálható, ami a KCC2-vel jelölt szomatodendritikus membránfelszínen detektált immunreaktív foltok közel felét teszi ki (12. ábra h-j, 13. ábra). 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.

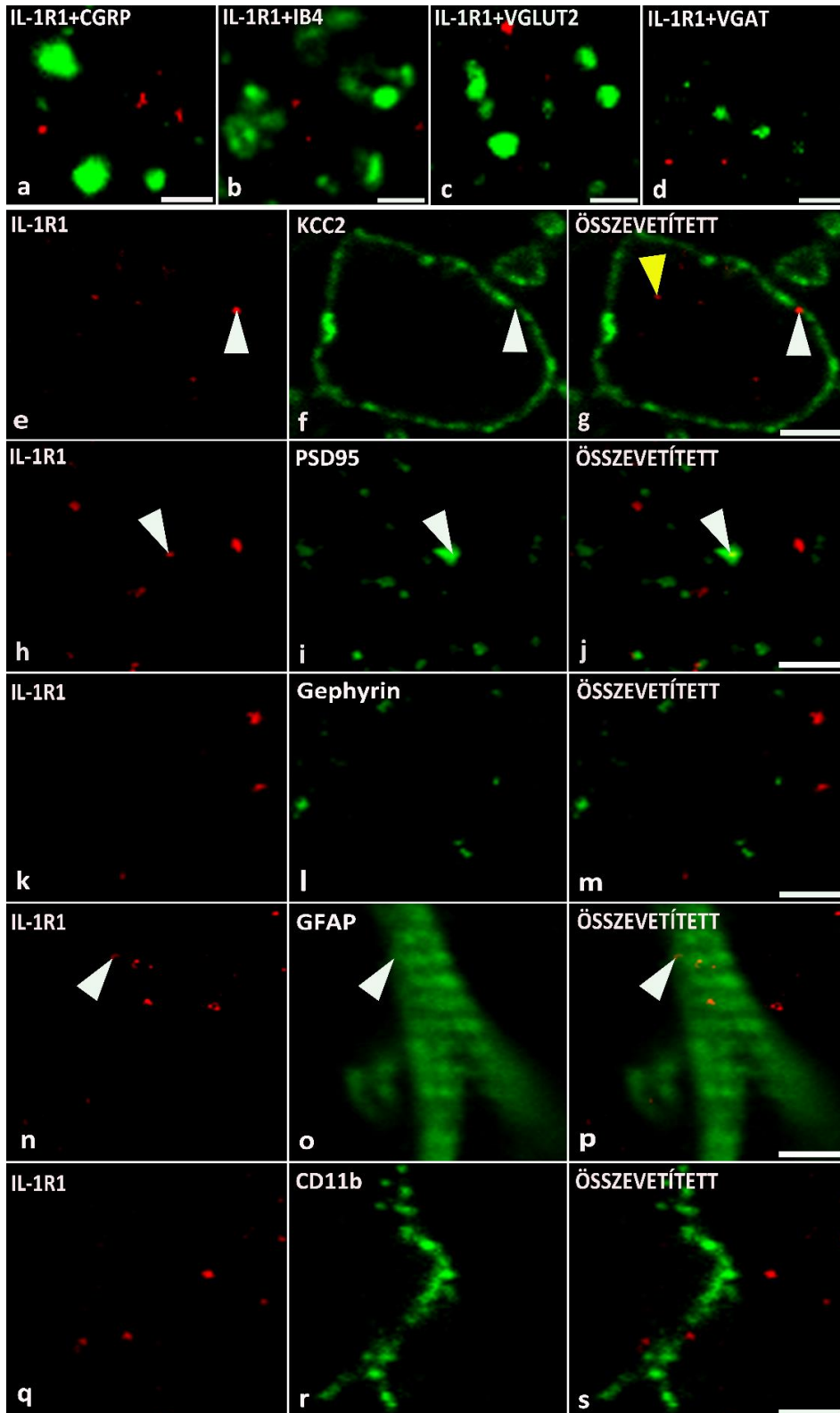
A CFA kezelt állatokban a receptor eloszlásában nem tapasztaltunk számottevő eltérést a kontrollhoz képest. PSD95 markerrel az IL-1R1 $9,93 \pm 0,4$ %-a, míg gephyrinnel mindössze $1,43 \pm 1,14$ %-a kolokalizált (12. ábra k-m, 13. ábra).

5.4.3.2.4. 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 [206], illetve a mikroglia marker CD11b között (12. ábra n-s) [207].

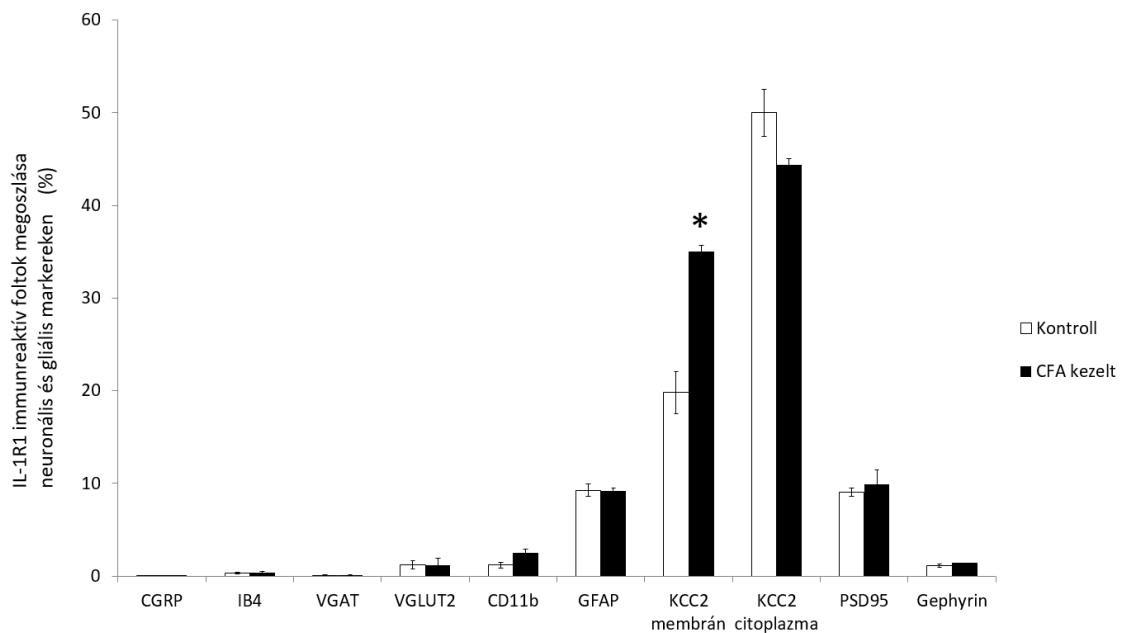
A kontrollból származó kettős festések kiértékelése során a receptor mennyiségének mintegy $9,3 \pm 0,65$ %-a expresszáldott asztrocitákon, míg elenyésző $1,2 \pm 0,30$ %-át mikroglia sejteken detektáltuk.

A CFA oltás hatására a gliasejteken kimutatható receptorszám szignifikáns változást nem mutatott (13. ábra).



12.ábra: Az IL-1R1 fehérje eloszlása neuronokon és gliasejteken a gerincvelői felületes hátsó szarvban. 1 μm vastag konfokális optikai szeletfelvételek illusztrálják az IL-1R1 (piros, a-d, e, h, k, n, q) és az alábbi markerek immunoreaktivitása közötti kolokalizációt: peptiderg (CGRP, zöld, a), valamint nonpeptiderg (IB4, zöld, b) primer afferens axonok, neuronális szomatodendritikus felszín (KCC2, zöld, f) serkentő- (VGLUT2, zöld, c) és gátló (VGAT, zöld, d) interneuronok axonterminálisai, serkentő posztszinaptikus denzitás (PSD95, zöld, i), gátló posztszinaptikus denzitás (gephyrin, zöld, l), asztrocita (GFAP, zöld, o), illetve mikroglia (CD11b, zöld, r). A markerek közötti átfedést (összevetített) fehér

nyílhegyek jelzik (j, m, p, s). Az IL-1R1 immunoreaktív foltok vagy a KCC2 marker által meghatározott profilra (membránlokalizáció, f-g), vagy a KCC2 jelölésen belüli területen (citoplazmatikus lokalizáció, sárga nyíl, g) is megfigyelhetők. Lépték: 2 μ m (a–d), 10 μ m (e–m), 5 μ m (n–s). Az adatok az egyes markerek átlagértékeit és a SEM hibásávokat tartalmazzák.



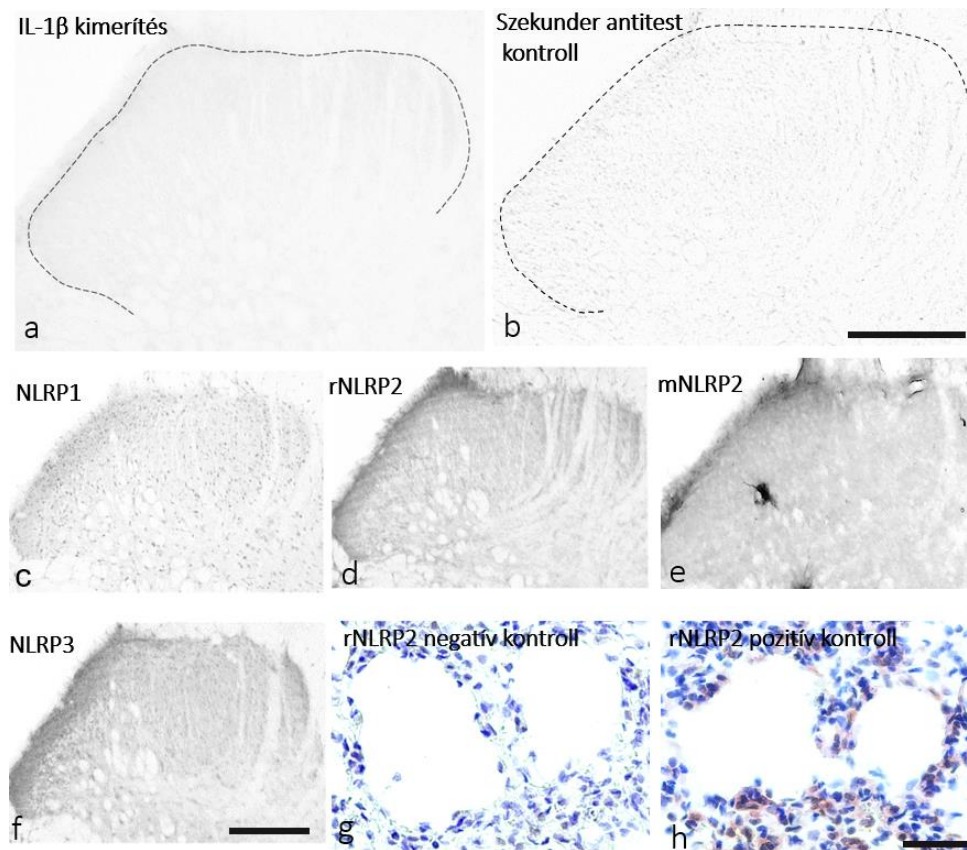
13.ábra: Az IL-1R1 immunoreaktív foltok neuronális és gliális markerekkel való kolokalizációjának százalékos értékeit tartalmazó oszlopdiagram. A fehér oszlopok a kontroll, a feketék pedig a CFA injektált állatokból származó adatsorokat reprezentálják, az átlagadatokat és a SEM feltüntetésével. A * jel, az IL-1R1 a KCC2 marker szomatodendritikus membrán jelölésében megfigyelhető szignifikáns immunoreaktív foltok számának százalékos növekményére utal ($p=0,002$).

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

5.5.1. 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 (**14. ábra a**). Az inflammaszómális fehérjék elleni antitestek teszteléséhez nem rendelkezünk megfelelő antigén peptiddel a kimerítés végrehajtásához, ezért itt a primer antitestet mellőző, csak szekunder antitestet tartalmazó eleggyel történő inkubálást valósítottuk meg. Ennek eredményeként specifikus immunjelölést az előzőekhez hasonlóan ismét nem tapasztaltunk (**14. ábra b**). Ha a megfelelő primer antitesteket alkalmaztuk, akkor az NLRP1, NLRP2 és NLRP3 fehérjék elleni immunoreaktivitás detektálhatóvá válik, ugyanakkor a mélyebb laminák továbbra sem festődtek (**14. ábra c-f**). Az NLRP2 markerrel kapcsolatos

eredményeink további alátámasztására hematoxylinnel festett tüdőmetszeten pozitív (primer antitestet tartalmazó) és negatív immunoperoxidáz (primer antitest kihagyásával) reakciót is végrehajtottunk (14. ábra g-h).



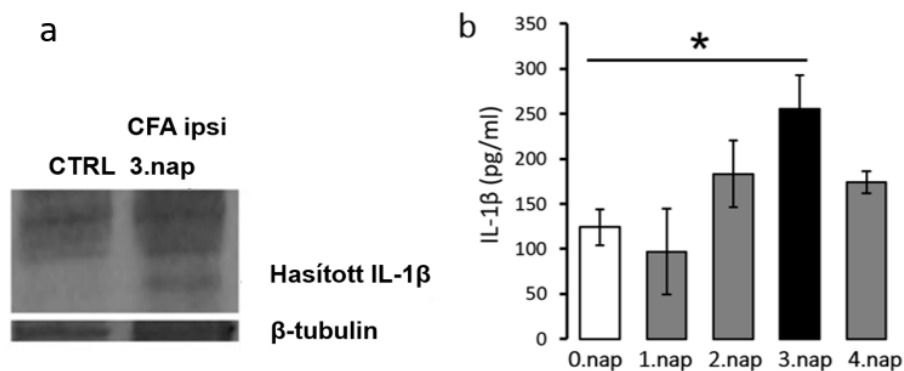
14. ábra: IL-1 β és NLRP markerek kontroll immunreakciói a) Anti-IL-1 β antitest specificitás vizsgálata antitest kimerítés révén b) Szekunder antitest kontroll reakció NLRP szenzorok elleni primer antitestek mellőzésével. c-f) Immunoperoxidáz reakciók, amelyek az NLRP1, NLRP2 (nyúl-anti NLRP2, rNLRP2, egér-anti NLRP2 (mNLRP2)) és az NLRP3 markerek lokalizációját mutatják g) rNLRP2 negatív kontroll reakció (primer antitest elhagyásával) tüdőszövetben hematoxylin háttérfestéssel. h) rNLRP2 pozitív kontroll reakció tüdőszövetben hematoxylin háttérfestéssel. Lépték: a-b- 200 μ m, c-f- 200 μ m, g-h- 50 μ m. A szaggatott vonalak a gerincvelői hátsó szarv kontúrját mutatják.

5.5.2. Az IL-1 β mennyiségének vizsgálata immunoblot és ELISA módszerrel

Az IL-1 β fehérje IL-1R1 receptorhoz kötődése csak abban az esetben valósulhat meg, ha az előzetesen enzimatikusan aktiválódik 31 kDa molekulatömegű prekursorából (pro-IL-1 β), amely normál körülmények között (0. nap) csak kis mennyiségben van jelen. 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) [151]. Azonban a CFA oltás utáni 3.

napon, a mechanikai allodynia maximumán, mind a pro-IL-1 β , mind annak aktív, érett 17 kDa molekulatömegű kaspáz 1 által hasított formája is nagy mennyiségben megtalálható a gerincvelői hátsó szarvában (**15. ábra a**).

Habár az IL-1 β expresszióját a központi idegrendszerben többen is leírták korábban [**131-133**], nem találtunk adatokat arra vonatkozóan, hogy a citokin szintjét időfüggő módon is vizsgálták volna gyulladásoos 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 (**15. ábra b**).

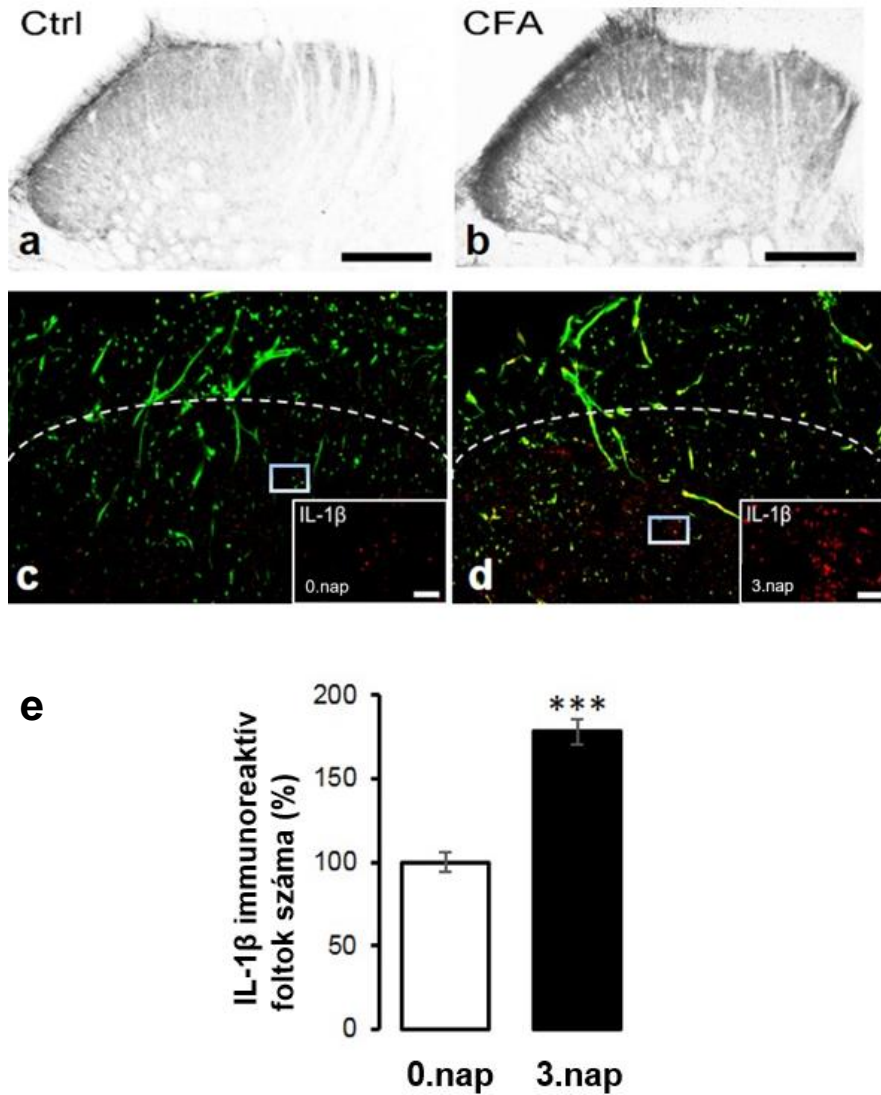


15.ábra: a) Reprezentatív IL-1 β immunoblot kontroll (0. nap) és CFA kezelt állatok (3. nap) gerincvelő hátsó szarvi szövetmintáiból b) Az IL-1 β fehérje koncentrációjának (pg/ml) vizsgálata ELISA módszerrel CFA oltást követően (0. nap). Az adatok az átlagértékeket és a SEM-et tartalmazzák. A * jel a 0. napi kontroll és a CFA oltást követő 3. nap közötti szignifikancia értéket jelzi ($p=0,040$).

5.5.3. 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 (**16. ábra a-b**). Ezt megerősítendő, számszerűsítettük az IL-1 β immunoreaktivitását a gerincvelő L4-L5-ös szegmentumaiból származó hátsó szarvi szövetszeleteken a Rexed I és II-es laminákban a konfokális analízisnél ismertetett laprács segítségével. A kvantifikálás során a CFA kezelt mintákból (3. nap) származó metszetek IL-1 β

immunoreaktív foltjainak számát összehasonlítva a kontroll állatokéval (0. nap) szignifikáns ($p < 0,0001$) növekedést tapasztaltunk, a termelődött IL-1 β mennyisége mintegy $78 \pm 7,48$ %-al nőtt (16. ábra c- e).

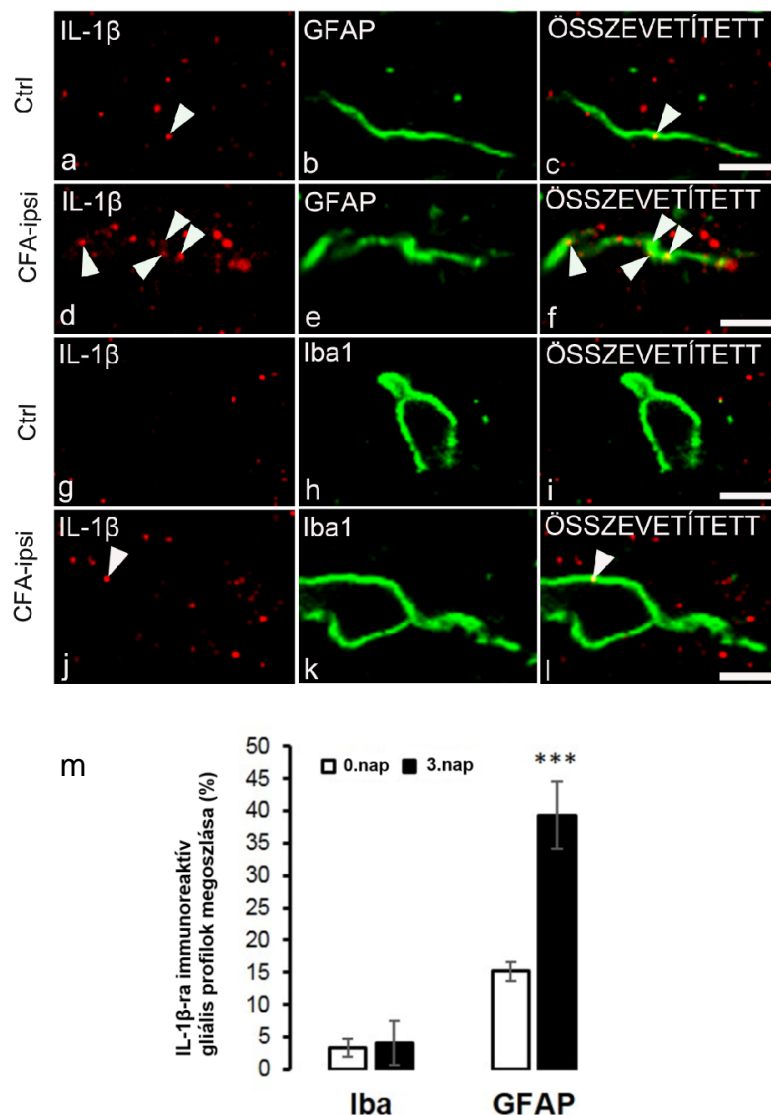


16. ábra: a-b): Az IL-1 β immunoperoxidáz vizsgálata a gerincvelői hátsó szarvban kontroll (Ctrl) és CFA indukálta gyulladásban (CFA). c-e): Az IL-1 β pozitív immunoreaktív foltok kvantifikációja kontroll (0. nap) és CFA kezelt állatokban felszínes gerincvelői hátsó szarvban (3. nap). A szaggatott vonalak a szürke- és fehérállomány közti határt jelzik. Az adatok az átlagértékeket és a SEM-et tartalmazzák. A *** a szignifikanciát ($p < 0,0001$) jelzi a kontroll és a kezelt állatok között. Lépték: 5 μ m

A gliasejtek a központi idegrendszerben kialakuló gyulladós folyamatok karmesterei lehetnek, számos irodalmi adat alátámasztja a neuron-glia interakciót, melynek során az NF- κ B and MAPK szignálpályák révén proinflammatorikus mediátorok szabadulhatnak fel [75-77]. A nociceptív szignalizációban betöltött fontos szerepe miatt az IL-1 β fehérje gliális expresszióját

és eloszlását a CFA modellben is vizsgálni kívántuk mikroglia és asztrocita sejteken, a rendelkezésre álló markerek (Iba1-mikroglia, GFAP-asztrocita) segítségével.

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 (17. ábra a-l, m).



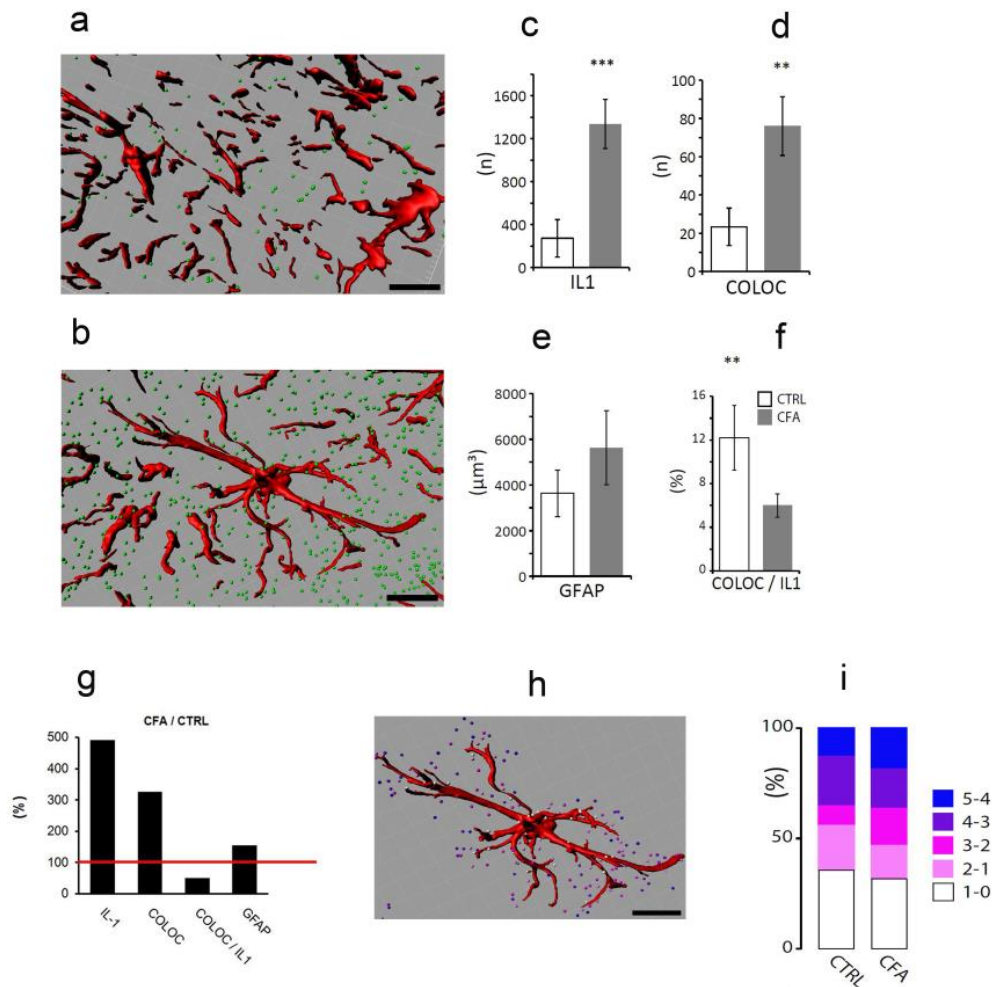
17. ábra: Az IL-1 β gerincvelő hátsó szarvi expressziója és kvantifikálása gliasejteken. a-l): 1 μ m vastag konfokális optikai szeletfelvételek illusztrálják a GFAP pozitív asztrocita (zöld, b, e) az Iba1 pozitív mikroglia (zöld, h, k) markerek és az IL-1 β immunoreaktivitása (piros, a, d, g, j) közötti kolokalizációt. A markerek közötti átfedést (összevetített) fehér nyílhegyek (c, f, i, l) jelzik. A kontrollból származó immunjelöléseket az első és a harmadik (Ctrl), a CFA kezeltet pedig a második

és negyedik panelek jelentik (CFA-ipsi). Lépték: 2 μm , 2 μm , 2 μm és 1 μm . m) Az IL-1 β fehérjét expresszáló gerincvelő hátsó szarvi mikroglia (Iba1) és asztrocita (GFAP) sejtek százalékos arányát mutató oszlopdiagram kontroll (0. nap, fehér oszlopok) és CFA kezelt (3. nap, fekete oszlopok) állatokból. Az adatok az átlagértékeket és a SEM értékeit tüntetik fel. A *** a szignifikanciát ($p=0,002$) jelzi a kontroll (0. nap) és a kezelt állatok (3. nap) között.

5.5.4. Az IL-1 β expressziójának vizsgálata IMARIS analízissel

A kontroll (**18. ábra a**) és a CFA kezelt állatok (**18. ábra b**) asztrocita sejtjeinek morfofunkcionális vizsgálatára, és azok IL-1 β termelése közötti finomabb különbségeinek kimutatására IMARIS szoftveres modellezést és analízist is végeztünk. Az analízis feltárta, hogy a CFA-val kezelt állatokból származó metszeteken, mind az IL-1 β immunoreaktív 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, $n=23,33\pm 9,76$) (**18. ábra c-d**). Ezenkívül a kezelt állatokból származó GFAP pozitív asztrocita profilok térfogata (GFAP) szintén jelentősen ($p=0,194406$), de nem szignifikánsan nőtt ($5620 \mu\text{m}^3 \pm 1623$) a kontrollal összehasonlítva ($3630 \mu\text{m}^3 \pm 1020$) (**18. ábra e**). 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 ($5,99\% \pm 1,05$) (**18. ábra f**).

Összességében elmondható, hogy a krónikus gyulladásoz 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 emelkedett a CFA kezelt állatokban, de ez nem bizonyult szignifikánsnak (**18. ábra g**). Az IL-1 β immunreaktív foltok asztrocita profiloktól való távolságát szintén megmértük IMARIS használatával kontroll és gyulladásoz körülmények között. A távolságmátrix elemzése nem mutatott ki szignifikáns különbséget a két csoport között, az IL-1 β foltok többségét a szoftver 1 μm -es távolságon belül detektálta mindkét csoport esetében (**18. ábra h-i**).



18. ábra: Az IL-1 β és az asztriciták között kolokalizáció IMARIS szoftveres analízise. a) kontroll állatokból származó gliális profilok IMARIS renderelése b) CFA kezelt állatokból származó gliális profilok IMARIS renderelése c) IL-1 β immunoreaktív foltok abszolút száma (n) (IL-1) kontroll (fehér oszlopok) és CFA kezelt állatokban (szürke oszlopok) A *** a szignifikanciát (p=0,009032) jelzi. d) asztricitával kolokalizáló IL-1 β foltok száma (n) (COLOC) kontroll (fehér oszlopok) és CFA kezelt állatokban (szürke oszlopok). A *** a szignifikanciát (p=0,022896) jelzi. e) az asztrocita profilok (GFAP) szoftveres térfogatmérése (μm^3) kontroll (fehér oszlopok) és CFA kezelt állatokban (szürke oszlopok). f) a teljes IL-1 β foltszámra normalizált kolokalizáció (COLOC/IL-1) százalékos értéke kontroll (fehér oszlopok) és CFA kezelt állatokban (szürke oszlopok). A ** a szignifikanciát (p=0,0366) jelzi g) Összefoglaló hisztogram a CFA/CTRL arányról az IL-1 β szám (IL-1), az abszolút és relatív kolokalizációs érték (COLOC, COLOC/IL-1), valamint az asztrocita profilok térfogatáról (GFAP) h-i) az IL-1 β foltok asztricitáktól való távolságmátrixa. Az adatok az átlagértékeket és a SEM-et tartalmazzák. Lépték: 5 μm .

5.5.5. Az NLRP markerek vizsgálata immunoblot és kettős immunofluoreszcens jelöléssel

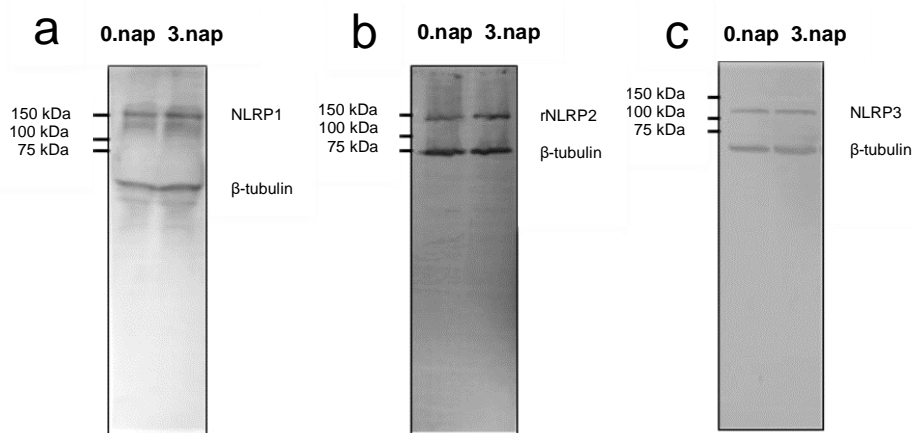
Az IL-1 β citokin termelődése az előzőekben említett inflammaszómális rendszerek közreműködésével valósul meg [146, 147], amelyek gerincvelői hátsó szarvi expressziójáról és eloszlásáról viszonylag kevés információ áll rendelkezésre. Korábbi tanulmányokban ugyan

azonosították az NLRP1-et és az NLRP3 fehérjét neuropátiás fájdalomban [208, 209], de nem volt adat az NLRP2 expressziójára vonatkozóan.

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) (19. ábra a-c).

A három inflammaszómális marker vizsgálata közül egyedül az NLRP2 fehérjénél tapasztaltunk nagymértékű expresszió növekedést immunoblotol CFA oltott állatokban (3. nap) a kontrollhoz viszonyítva (0. nap) (19. ábra b).

A kapott blot eredményt kiegészíti, hogy az NLRP2 immunoreaktív foltok abszolút száma száma is szignifikánsan ($p < 0,0001$) nőtt a kontrollhoz képest ($81,5 \pm 7,65\%$, kontroll $n = 20,66 \pm 1,32$, CFA kezelt állatok: $n = 37,5 \pm 1,53$) (a 21. ábra c részére itt hivatkozunk).



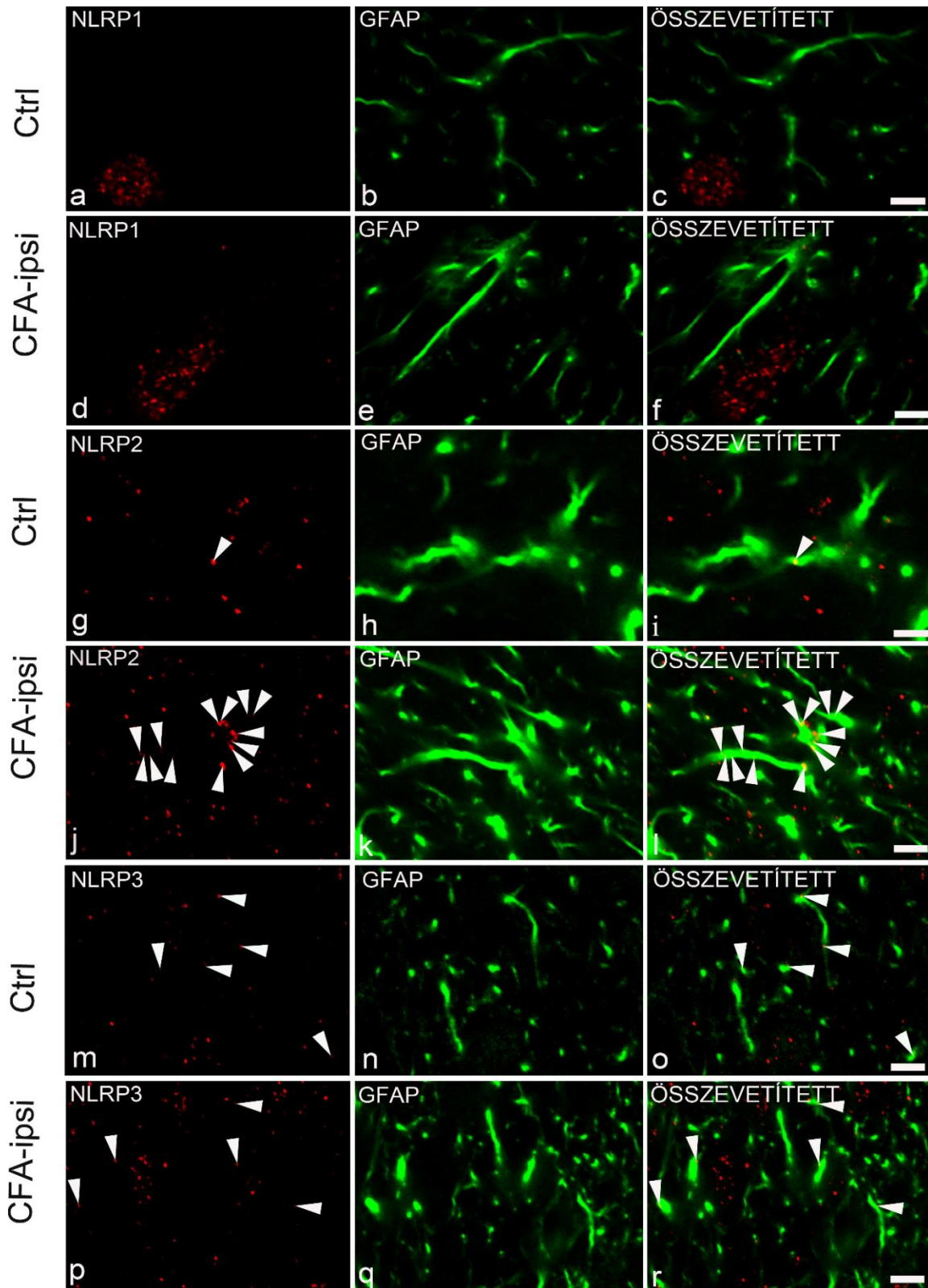
19. ábra: az NLRP1, (a) NLRP2, (b) NLRP3 (c) fehérjék immunoblotjai kontroll (0. nap) és CFA kezelt állatok (3. nap) gerincvelői hátsó szarvi szövetmintáiból molekulatömeggel feltüntetve

Mivel az előző kísérletekben kimutattuk, hogy az IL-1 β termeléséért elsősorban a gerincvelői asztrociták felelősek a CFA modellben, ezért a következő kísérlet során arra voltunk kíváncsiak, hogy ezekben a sejtekben melyik inflammaszómális marker expresszálódása következik be.

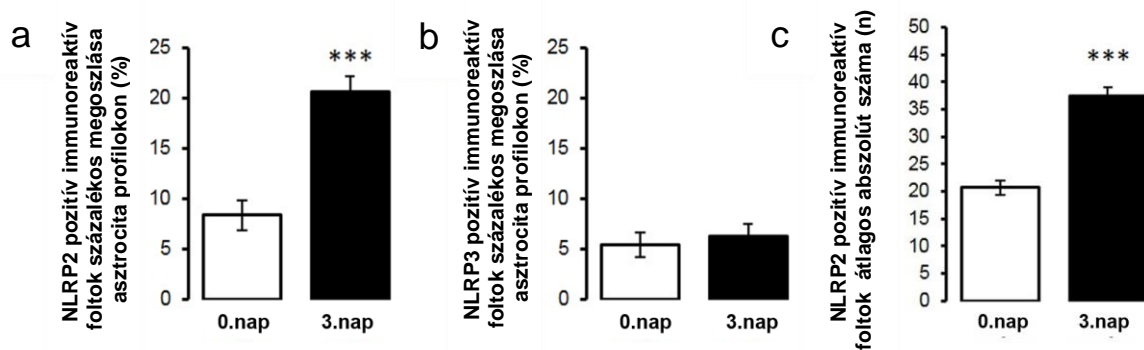
A kvantitatív analízis szerint az NLRP1 fehérje immunoreaktív foltjai teljes elkülönülést mutattak a GFAP pozitív profiloktól a gerincvelői hátsó szarvban kontroll és gyulladós körülmények között is (20. ábra c és f). A kolokalizáció vizsgálata során mind kontroll, mind CFA kezelt állatokban megfigyeltük az asztrociták nagymértékű NLRP2 expresszióját (20. ábra i és l). Az NLRP2 pozitív immunoreaktív foltok mintegy $8,34 \pm 1,5\%$ -a kolokalizált

asztrocitával kontroll állatokból származó metszeteken, azonban CFA oltás után szignifikáns ($p < 0,0001$) több mint kétszeres emelkedést tapasztaltunk ($20,59 \pm 1,6$ %) **(21. ábra a)**.

Az NLRP3 fehérje asztrocitával történő kolokalizációjának mértéke kontroll állatok esetén $5,36 \pm 1,21$ %-nak bizonyult, amely csak elenyésző mértékben $6,21 \pm 1,29$ %-ra nőtt gyulladásoos fájdalomban **(20. ábra o és r, 21. ábra b)**.



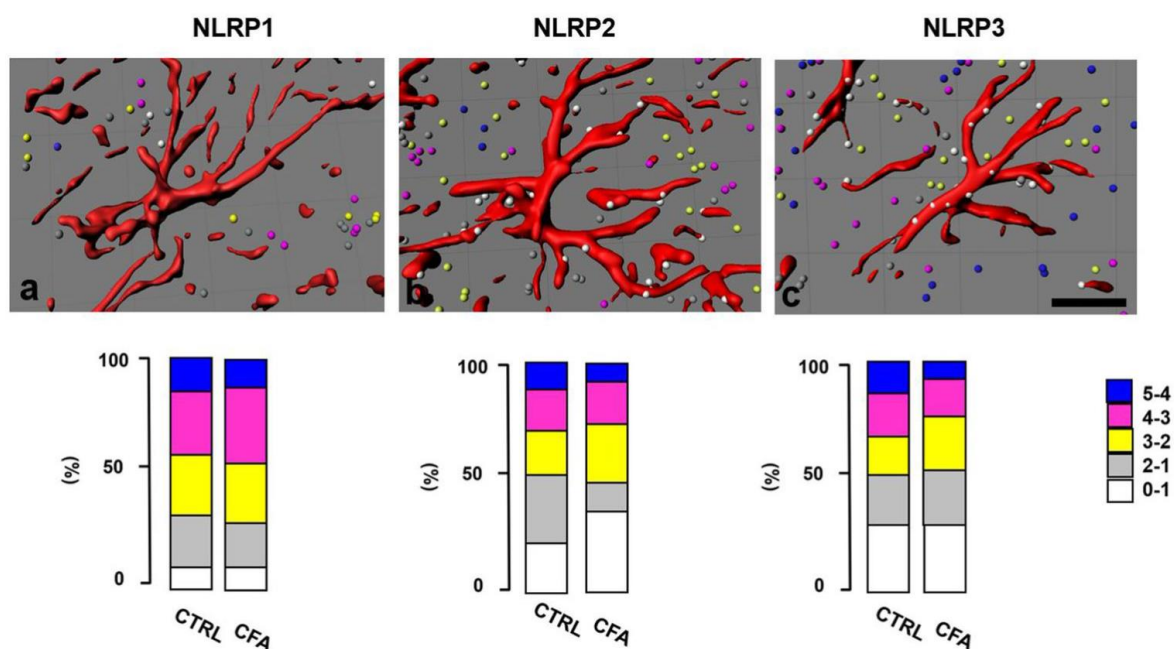
20. ábra: Az inflammaszóma szenzorfehérjék eloszlásának vizsgálata asztrocitákon kettős immunofluoreszcens jelöléssel a gerincvelői hátsó szarvban. 1 μm vastag konfokális optikai szeletfelvételek, amelyek az asztrocita sejtek (GFAP, zöld, b, e, h, k, n, q) és a következő inflammaszómális markerek közötti kolokalizációt reprezentálják: NLRP1 (piros, a, d), NLRP2 (piros, g, j), NLRP3 (piros, m, p). Az összevetített képek a markerek közötti átfedést jelzik fehér nyilakkal (i, l, o, r). Minden egyes inflammaszómális marker esetén az első panel a kontroll-(Ctrl), a második pedig a CFA kezelt mintát jelenti (CFA-ipsi). Lépték: 5 μm .



21. ábra: a) Az asztrocita marker GFAP és az NLRP2 fehérje közötti kolokalizáció százalékos mértékét mutató oszlopdiagram kontroll (0. nap, fehér oszlopok) és CFA kezelt állatokban (3. nap, fekete oszlopok). A *** a szignifikanciát ($p=0,022896$) jelzi. b) Az asztrocita marker GFAP és az NLRP3 fehérje közötti kolokalizáció százalékos mértékét mutató oszlopdiagram kontroll és CFA kezelt állatokban c) Az NLRP2 immunoreaktív foltok kvantifikációja kontroll és CFA kezelt állatokban. A *** a szignifikanciát ($p<0,0001$) jelzi.

5.5.6. 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 konfokális z-stack optikai szeletekből renderelve (**22. ábra a-c**). Az NLRP1 és az NLRP3 esetében nem, az NLRP2 szenzornál azonban szignifikánsan nőtt ($p=0,0004$) az immunoreaktív foltok száma gyulladási fájdalom esetén 0-1 μm távolságon belül a kontrollhoz viszonyítva a program kalkulációja alapján.



22. ábra: Az NLRP szenzorok és az asztrociták közötti távolság IMARIS szoftveres analízise. Az illusztrációk konfokális z-stack kettős immunjelölést tartalmazó felvételek IMARIS által renderelt

megfelelői, amelyeknél az NLRP1 (a), az NLRP2 (b) és az NLRP3 (c) inflammaszóma szenzorfehérjék távolságát (színes gömbök, 0-5 μm -ig terjedő színskálával jelezve mindegyik marker esetén) vizsgáltuk GFAP pozitív asztrocita profiloktól (piros szín) kontroll (CTRL) és krónikus gyulladáshoz vezető fájdalom során (CFA).

6. MEGBESZÉLÉS

Vizsgálataink génexpressziós (TLDA) kísérlet eredményeire épültek, amelynek alapján munkánk első részében az IL-1R1 receptor gerincvelő hátsó szarvi megoszlását vizsgáltuk. A krónikus fájdalom modellezésére a CFA-indukált gyulladásos (nociceptív) modellt alkalmaztuk. Munkánk második részében arra kerestük a választ, hogy a gerincvelő hátsó szarvában melyek azok a sejtek, amelyek az IL-1R1 ligandjának szekrécijában részt vesznek.

Kísérleteink eredményei alapján megállapítottuk, hogy a gerincvelő hátsó szarvának felületes lamináiban az IL-1R1 a legnagyobb mennyiségben idegsejteken fejeződik ki, amely intraplantáris CFA beadás hatására tovább fokozódik. További eredményeink szerint az IL-1R1 egyik ligandja, az IL-1 β lokálisan a gerincvelői hátsó szarv felszínes lamináiban asztocitákban termelődik, valamint megállapítottuk, hogy az IL-1 β bioaktív formájának kialakításában az NLRP2 inflammaszóma játszik szerepet.

6.1. CFA modell és a TLDA

Az állatmodellek fontos eszközei az orvosbiológiai kutatásoknak, így a krónikus fájdalom tanulmányozására is számos modellt fejlesztettek ki. Kísérleteink során a krónikus (perzisztens) fájdalom vizsgálatára Complete Freund Adjuváns (CFA) intraplantáris beadásával kiváltott gyulladásos (nociceptív) modellt alkalmaztunk. A CFA modell a korábbi leírások alapján a krónikus gyulladásos fájdalom modellje (a disszertáció alapját képező első, 2017-ben megjelent, közlemény idejében ez volt az érvényes definíció), az újabb, 2020-ban kiadott IASP fogalomtár szerint pedig a nociceptív fájdalom kategóriába sorolható. Sajnálatos módon az irodalomban továbbra is keverednek a fájdalom különböző formáival kapcsolatos definíciók [210]. A modell első leírásától, [211, 212] 1988-tól a PubMed adatbázis szerint több mint 750 közlemény jelent meg ezen modell alkalmazásával. Ennek megfelelően a modell jól karakterizált, számos szempontból megfelelő leképezése a perifériás gyulladás következtében kialakuló, a szövetsérülés regenerációját követően is fennálló nociceptív hiperszenzitivitásnak [174-176]. A kezeléssel kiváltott nociceptív válaszkészség változásának vizsgálatára viselkedési tesztek állnak rendelkezésre. A tesztek közül az elektronikus von Frey (mechanikai) és Hargreaves (termális) tesztek alkalmaztuk, melyek segítségével megállapítottuk, hogy a maximális nociceptív válaszkészség-fokozódás a CFA beadást követő 3. (patkányok esetén) illetve 4. (egerek esetén) kísérleti napra tehető. A viselkedési válaszokban a 2 hét közepéig

tapasztaltunk eltérést a kezeletlen állatokhoz képest, ezek az eredmények megegyeznek más kutatócsoportok eredményeivel. Irodalmi adatok alapján, más modellekkel (pl. karragén, kapszaicin vagy formalin-indukált modellek) összevetve a CFA modell előnye a viselkedési válaszok többi modellhez képest lassabb visszatérése a kontroll szintre, és ennek megfelelően a folyamat „krónikusabbnak” tekinthető. Ugyancsak irodalmi adatok alapján a CFA modellben hyperalgesia és az allodynia jelensége is tapasztalható, ugyanakkor szisztémás immunválasz (pl. arthritis kialakulása) nem mutatható ki [213].

Szintén előnye a modellnek, hogy az irodalomban már leírt, hogy a hátsó végtagba intraplantárisan injektált CFA hatása a lumbális 4-5 gerincvelői szegmentumokra tehető, ennek megfelelően vizsgálatainkat ezen gerincvelői szegmentumokban végeztük el.

A génexpressziós vizsgálatokhoz (TLDA) a gének kiválasztása a korábbi irodalmi adatokon alapult. Az elérhető próbák közül kiválasztottuk a glutamát, GABA és glicin receptorokat valamint a glutamát-, GABA-és glicinerg neurotranszmisszióhoz kapcsolódó molekulákat. Ezen kívül további olyan receptor-családokat választottunk ki, amelyek vizsgálata ígéretesnek mutatkozott az irodalmi adatok alapján, így kerültek a kiválasztott próbák közé a HCN és szerotonin receptorok valamint az endokannabinoid rendszerhez tartozó molekulák. A citokin, kemokin receptorok és ligandok központi idegrendszeri termelődéséről és szerepéről a kísérleteink kezdetekor még kevés adat állt rendelkezésre, éppen ezért kerültek a kiválasztott próbák közé ezek a gének is.

A TLDA kísérletek során [214] a legjelentősebb változást az IL-1R1 génexpresszióban találtuk, amely szignifikáns, több mint hatszoros emelkedését (6,02) mutatott a gerincvelői hátsó szarv ipsilaterális oldalán CFA oltás után. A kontralaterális oldalon is megvizsgáltuk a mRNS mennyiségét, amely itt is növekedett ugyan, de az eredmények nagy variabilitást mutattak. Következtetésként megállapíthatjuk, hogy az mRNS mennyiségének növekedése nem korlátozódik arra a gerincvelői szürkeállomány területre, amely közvetlenül fogadja a nociceptív szenzoros bemenetet a gyulladt talpi bőrfelszínről, tehát a lokális gyulladás kétoldali hatást is kiválthat gerincvelői szinten [215].

A vizsgálat további szignifikáns változásai között meg kell említenünk az endokannabinoidok jelátviteléhez kapcsolódó NAPE-PLD és Faah, valamint a serkentő ionotróp AMPA receptor 2-es alegység gén a Gria2 (GluR-B) expresszióját is. A NAPE-PLD mRNS mennyiségének növekedése (1,11), valamint a Faah csökkenése (0,78), az endokannabinoidok szintézisének irányába tolja el az egyensúlyt, amely a neuroinflammáció mérséklésével a CFA által indukált hatásokat kompenzálja [216]. A Gria2 (GluR-B) expressziójának csökkenése (0,77) kapcsolatban lehet a GluR-B KO állatokban már mások által

leírt hosszútávú viselkedési plaszticitással. A GluR-B deléciója ugyanis a megnövekedett AMPA szinaptikus áramok és az általuk mediált kalcium influx következtében nociceptív hiperszenzitivitást vált ki gyulladás során [217].

6.2. Az IL-1R1 vizsgálatával kapott eredményeink következtetései

A TLDA vizsgálat eredménye alapján a további munkában részletesen tanulmányoztuk között az IL-1R1 fehérje-expresszióját, valamint a receptor eloszlását rágcsálók gerincvelői hátsó szarvában kontroll körülmények és CFA kezelés hatására is.

A kettős immunofluoreszcens festéseink eredményei alátámasztják, hogy az IL-1R1 fehérje több mint kétharmada a neuronális szomatodendritikus kompartmentben, kisebb mértékben pedig gliális, főként asztrocita sejteken lokalizálódik. A neuronális dominanciát megerősítik korábbi közlemények is [15, 218].

Közismert, hogy az IL-1 β proinflammatorikus citokin által kiváltotta nociceptív válaszok az IL-1R1 közreműködésével alakulnak ki, melynek expresszióját korábban számos szövetben leírták [109-115]. Irodalmi adatok alapján az IL-1ra a nocicepciót teljes mértékben gátolni képes [133], és antiallodyniás hatást fejt ki nociceptív és neuropátiás fájdalomban is [219-221].

Munkánk során immunoblot és immunoperoxidáz vizsgálattal igazoltuk, hogy nem csak az IL-1 β mennyiségének változása, de receptora az IL-1R1 szignifikáns fehérje expresszió növekedése is hozzájárul ahhoz, hogy a gerincvelői hátsó szarvban a CFA indukálta krónikus gyulladás és centrális szenzitizáció kialakuljon. Az IL-1R1 fehérje gerincvelői expresszióját előttünk mások is tanulmányozták [184], azonban a receptor pontos celluláris eloszlásáról eddig nem álltak rendelkezésre adatok [214].

Az IL-1R1 hozzájárulását a mechanikai és termális allodynia kialakulásához, illetve a gerincvelői centrális szenzitizációhoz génmódosított IL-1R1 KO egerekkel [173] végzett kísérleteink is megerősítik. Mind a mechanikai, mind a termális viselkedési tesztek (allodynia) eredményei azt támasztják alá, hogy a szubkután intraplantaris CFA injekció gyulladást kiváltó hatása KO állatokban is érvényesül. Ezen állatok méréseink szerint csökkent mértékben és időtartamban mutattak nociceptív válaszkészséget a vad típusú állatokhoz képest. A KO állatok CFA kezelés előtti alapértékei szintén alacsonyabbak voltak mindkét tesztípusnál, melynek okai feltehetően az egerek vad típustól eltérő magatartásában keresendők. Fertőzést követően az IL-1 β -IL-1R1 szignalizáció mind állatokban, mind emberekben egy adaptív viselkedési mintázatot, ún. „*sickness behaviour*”-t válthatnak ki, amelynek gyakori tünetei közé tartozik a

megváltozott fájdalomérzékelés mellett a letargia, depresszió, étvágytalanság, aluszékonyság, valamint csökkent fizikai aktivitás is. A KO állatok esetén a CFA kezelés előtt tapasztalható általános nyugtalanság, éberség és hiperaktivitás feltételezhetően az IL-1R1 jelátvitel kiesésére vezethető vissza [222, 223].

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 [224-229].

Saját eredményeink szintén arra mutatnak, hogy az IL-1R1 serkentő neurotranszmisszióval áll kapcsolatban, mind a poszt-szinaptikus, mind pedig az extraszinaptikus membránban. Gardoni és mtsai eredményeihez hasonlóan [201] ugyanis azt találtuk, hogy a KCC2 pozitív szomatodendritikus membránban lévő IL-1R1 részben kolokalizált a serkentő poszt-szinaptikus PSD95 markerrel is [202, 203]. A CFA-val kiváltott krónikus gyulladás során a meglévő szomatodendritikus populáció aránya közel 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 poszt-szinaptikus membránjában is kimutattuk, amelyet az irodalomban is leírt gephyrin markerrel jelöltünk [204, 205]. Bár elenyésző itt a receptorszám, és CFA oltás hatására sem nőtt érdemben, egyes kutatók, mint Chirila és mtsai feltételezik [230], hogy glicinerg szinapszisok GABAerg sejteken végződve diszinhibíciót váltanak ki IL-1 β hatására, amely tartós serkentő állapotot idéz elő.

Bár az IL-1R1-t mi és mások is főként neuronokon találtuk meg, gliasejtek is expresszálhatják a gerincvelőben. Gruber-Schoffnegger és mtsai kimutatták [231], hogy az IL-1 β és a TNF hatása gliasejteken lévő citokin receptorokon is érvényesülhet. Mindkét citokin fokozza az AMPA és NMDA receptorok mediálta szinaptikus áramokat a Rexed lamina I-ben LTP-t indukálva.

Kvantitatív elemzéseink alapján a receptor közel 10 %-ának expresszióját asztrocita sejteken találtuk, viszont a mikroglia sejtekkel történő kolokalizáció elenyészőnek bizonyult. CFA oltás hatására nem figyeltünk meg érdemi változásokat a receptorszámban egyik gliatípusban sem.

Ezen eredmények konklúziójaként, valamint irodalmi források alapján feltételezhetjük, hogy a CFA indukálta perifériás gyulladás során a nociceptív primer afferens rostok közvetítésével, például ATP felszabadítással [232] IL-1 β szekretálódhat, amely leginkább neuronális, de akár gliális IL-1R1-hoz is kötődve potenciórozhatja az NMDA receptor mediálta szinaptikus áramokat, illetve glicinerg interneuronokon hatva GABAerg neuronok gátlását (diszinhibíció) idézi elő. A serkentő neurotranszmisszió fokozása, és a gátló szinapszisok kiesése végül mind a centrális szenzitizáció irányába hatnak.

6.3. Az IL-1 β és az inflammaszóma szenzorok vizsgálatával kapott eredményeink következtetései

Jelen munka második részében az IL-1R1 ligandját az IL-1 β citokint, illetve a keletkezéséért felelős inflammaszóma komplex fehérjék expresszióját tanulmányoztuk rágcsálók felületes gerincvelői hátsó szarvában kontroll- és CFA indukálta gyulladásos fájdalom modellben is.

Az IL-1 β fokozott expressziójáról beszámoltak korábban mások is [233], de az elsők között vagyunk, akik a citokin mennyiségének időfüggését is vizsgálták és validálták a CFA modellben.

Általánosan elfogadott, hogy a gerincvelői mikroglia sejtek aktiválódnak elsőként krónikus fájdalomban [234], de ellentmondásos adatok vannak arról, hogy a fájdalom kései szakaszában mely gliasejt aktivációja dominál. Néhány modellben a mikroglia sejtek, míg más esetben az asztrocita sejtek aktivációja jellemző, amelyek proinflammatorikus citokineket termelnek [235]. A mi adataink szerint a CFA indukálta gyulladásos fájdalomban az IL-1 β expressziója szignifikánsan megnő, amelyet az általunk alkalmazott vizsgálati módszerek is alátámasztanak. A citokin fő forrásának az aktivált asztrocita sejteket találtuk, amely egybevág más szerzők munkájával is [234].

Korábban feltételeztük, hogy az IL-1 β nemcsak gerincvelői neuronokon, hanem akár gliasejteken expresszált IL-1R1-okon is kifejtheti hatásait [214, 231]. Ezt alátámasztják korábbi adatok is, melyek szerint az IL-1R1 nemcsak a neuronális excitabilitást befolyásolhatja, de az asztrocita sejtek révén gyulladásos citokinek és kemokinek termelődését is elősegítheti [234, 235]. Az IMARIS vizsgálat rámutatott arra, hogy az aktivált asztrociták morfológiájukat és méretüket tekintve 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 [236, 237]. A hasítást végző kaszpáz-1 szintén inaktív, míg az inflammaszómális rendszer nem aktiválja.

A gerincevelői inflammaszóma expresszióról alkotott kép jelenleg hiányos, a legtöbb adat neuropátiás fájdalommodellből származik. Az asztrocitában expresszálódó NLRP1 és a mikroglia sejtben lokalizált NLRP3 fehérjéket korábban már kapcsolatba hozták neuropátiával, [208, 209, 238] azonban a CFA modellben, bár ezen fehérjéket azonosítottuk a gerincevelői hátsó szarvban, nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a mennyiségükben a kontrollhoz viszonyítva. A funkcionális NLRP2 fehérjét Minkiewicz és mtsai [158] kimutatták humán kortikális asztrocita tenyészetekben, de eddig csak egy közlemény kapcsolta a szenzort a krónikus fájdalomhoz. Matsuoka és mtsai [239] az NLRP2 aktivációját detektálták hátsó gyöki ganglionban szöveti gyulladás során. Az inflammaszóma markert vizsgálták bőrléziókban, kromoszóma károsodásnál, légúti megbetegedésekben [240], illetve egerek embrionális fejlődése során is [241], de a központi idegrendszeri eloszlása, illetve forrása további adatokat igényel.

Saját eredményeink szerint a gerincevelői hátsó szarvban 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 [242], trophoblasztban [243], és glioblasztóma sejtvonalakban, [244] hogy képes az NFκB 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 NFκB útvonalat. Erre az esetleges kétarcú mechanizmusra kísérletes bizonyíték jelenleg nincsen.

Végső konklúzióként elmondhatjuk, hogy a gerincevelő hátsó szarvi IL-1β termelődés a CFA indukált fájdalommodellben, a mechanikai ingerküszöb maximális csökkenésével egyidőben az NLRP2 típusú inflammaszóma asztrocitában végbemenő aktivációjával hozható összefüggésbe. Az aktív citokin forma felszabadulását követően 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 termelődését váltja ki.

7. 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, a sokféle, főként a központi idegrendszeri neuronok és gliasejtek interakciójának elégtelen ismerete még mindig kihívást jelent a kutatói és a gyógyászati alkalmazásoknak.

Munkánk során a fentieket szem előtt tartva CFA indukálta gyulladással (nociceptív) 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 gyulladást 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.

7. SUMMARY

Nowadays there is a growing body of literature associated with chronic pain. The main reason behind this fact is the progressive health deterioration and substantial decline of life quality of patients, which may lead to severe depression. The potential loss of capability of work have a tremendous impact on society, hence the problems of this medical condition are to be resolved in the collective interest. Although our currently knowledge increasingly grows about the pathological mechanisms related to this sensory overload, the lack of deeper insights into the molecular pain processes and the scanty information being available about the interactions of neurons with glial cells still poses a challenge to research- and medical applications.

Regarding the statements above, our work here focused on the establishment of the CFA induced chronic inflammatory pain model to investigate the changes of gene- and protein expression within the spinal dorsal horn, especially the elements of the IL-1R1 signalisation. On one hand our findings can support the earlier results regarding the putative role of IL-1R1, on the other hand we provide here new data about its relatively less studied quantitative receptorial distribution. We were one of first laboratories, who reported a time-dependent correlation between the changes of the receptorial gene- and protein expression within the superficial Rexed laminae by means of TLDA array and other morphological methods following CFA injection.

Our results showed that, not only the IL-1 β ligand, but its receptor is also significantly upregulated chiefly at extrasynaptic part of neurons to potentiate the inflammatory condition.

In accordance with the previous postulations, we can accept that, the cytokine release takes place from astrocytes at later phase of inflammation, whose morphology is markedly different in comparison with control cells.

We were the first to emphasize the importance of inflammasomal protein NLRP2 in spinal central sensitisation. Significant astrocytic upregulation of this protein can also contribute to the inflammatory amplification and the production of IL-1 β and other proinflammatory agents.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain*. 1979;6(3):249.
- [2] Raja SN, Carr DB, Cohen M, et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*. 2020;161(9):1976-1982. doi:10.1097/j.pain.0000000000001939
- [3] Bonezzi C, Fornasari D, Cricelli C, Magni A, Ventriglia G. Not All Pain is Created Equal: Basic Definitions and Diagnostic Work-Up. *Pain Ther*. 2020;9(Suppl 1):1-15. doi:10.1007/s40122-020-00217-w
- [4] Treede RD, Rief W, Barke A, et al. A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain*. 2015;156(6):1003-1007. doi:10.1097/j.pain.000000000000160
- [5] Alonso J, Ferrer M, Gandek B, et al. Health-related quality of life associated with chronic conditions in eight countries: results from the International Quality of Life Assessment (IQOLA) Project. *Qual Life Res*. 2004;13(2):283-298. doi:10.1023/b:qure.0000018472.46236.05
- [6] Kawai K, Kawai AT, Wollan P, Yawn BP. Adverse impacts of chronic pain on health-related quality of life, work productivity, depression and anxiety in a community-based study. *Fam Pract*. 2017;34(6):656-661. doi:10.1093/fampra/cmz034
- [7] Blyth FM, March LM, Brnabic AJ, Cousins MJ. Chronic pain and frequent use of health care. *Pain*. 2004;111(1-2):51-58. doi:10.1016/j.pain.2004.05.020
- [8] Eriksen J, Sjøgren P, Ekholm O, Rasmussen NK. Health care utilisation among individuals reporting long-term pain: an epidemiological study based on Danish National Health Surveys. *Eur J Pain*. 2004;8(6):517-523. doi:10.1016/j.ejpain.2003.12.001
- [9] Henschke N, Kamper SJ, Maher CG. The epidemiology and economic consequences of pain. *Mayo Clin Proc*. 2015;90(1):139-147. doi:10.1016/j.mayocp.2014.09.010
- [10] Mickle AD, Shepherd AJ, Mohapatra DP. Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;131:73-118. doi:10.1016/bs.pmbts.2015.01.002
- [11] Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*. 2008;70(18):1630–5.
- [12] International Association for the study of Pain. IASP Terminology—IASP [Internet]. <https://www.iasp-pain.org/terminology?>. Accessed 4 Oct 2020.
- [13] Gonçalves Dos Santos G, Delay L, Yaksh TL, Corr M. Neuraxial Cytokines in Pain States. *Front Immunol*. 2020;10:3061. Published 2020 Jan 28. doi:10.3389/fimmu.2019.03061

- [14] Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov.* 2020;6:36. Published 2020 Jun 9. doi:10.1038/s41421-020-0167-x
- [15] Cook AD, Christensen AD, Tewari D, McMahon SB, Hamilton JA. Immune Cytokines and Their Receptors in Inflammatory Pain. *Trends Immunol.* 2018;39(3):240-255. doi:10.1016/j.it.2017.12.003
- [16] Mailhot B, Christin M, Tessandier N, et al. Neuronal interleukin-1 receptors mediate pain in chronic inflammatory diseases. *J Exp Med.* 2020;217(9):e20191430. doi:10.1084/jem.20191430
- [17] Todd AJ. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11(12):823-836. doi:10.1038/nrn2947
- [18] Hanns Ulrich Zeilhofer and Robert Ganley. Dorsal horn pain mechanisms, *The Oxford Handbook of the Neurobiology of Pain*, 2020, Edited by John N. Wood
- [19] Bennett DL, Clark AJ, Huang J, Waxman SG, Dib-Hajj SD. The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiol Rev.* 2019;99(2):1079-1151. doi:10.1152/physrev.00052.20177
- [20] Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest.* 2010;120(11):3760-3772. doi:10.1172/JCI42843
- [21] Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997;389(6653):816-824. doi:10.1038/39807
- [22] Caterina MJ, Pang Z. TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. *Pharmaceuticals (Basel).* 2016;9(4):77. Published 2016 Dec 14. doi:10.3390/ph9040077
- [23] Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, et al. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science.* 2005;307(5714):1468-1472. doi:10.1126/science.1108609
- [24] Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature.* 1999;398(6726):436-441. doi:10.1038/18906
- [25] Story GM, Peier AM, Reeve AJ, et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell.* 2003;112(6):819-829. doi:10.1016/s0092-8674(03)00158-2
- [26] Krupkova O, Zvick J, Wuertz-Kozak K. The role of transient receptor potential channels in joint diseases. *Eur Cell Mater.* 2017;34:180-201. Published 2017 Oct 10. doi:10.22203/eCM.v034a12
- [27] Black JA, Dib-Hajj S, McNabola K, et al. Spinal sensory neurons express multiple sodium channel alpha-subunit mRNAs. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996;43(1-2):117-131. doi:10.1016/s0169-328x(96)00163-5

- [28] Fukuoka T, Kobayashi K, Yamanaka H, Obata K, Dai Y, Noguchi K. Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons. *J Comp Neurol*. 2008;510(2):188-206. doi:10.1002/cne.21786
- [29] Coggeshall RE, Tate S, Carlton SM. Differential expression of tetrodotoxin-resistant sodium channels Na_v 1.8 and Na_v 1.9 in normal and inflamed rats. *Neurosci Lett*. 2004;355(1-2):45-48. doi:10.1016/j.neulet.2003.10.023
- [30] Liang L, Fan L, Tao B, Yaster M, Tao YX. Protein kinase B/Akt is required for complete Freund's adjuvant-induced upregulation of Na_v 1.7 and Na_v 1.8 in primary sensory neurons. *J Pain*. 2013;14(6):638-647. doi:10.1016/j.jpain.2013.01.778
- [31] Bielefeldt K, Ozaki N, Gebhart GF. Experimental ulcers alter voltage-sensitive sodium currents in rat gastric sensory neurons. *Gastroenterology*. 2002;122(2):394-405. doi:10.1053/gast.2002.31026
- [32] Yoshimura N, Seki S, Novakovic SD, et al. The involvement of the tetrodotoxin-resistant sodium channel $Na(v)$ 1.8 (PN3/SNS) in a rat model of visceral pain. *J Neurosci*. 2001;21(21):8690-8696. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-21-08690.2001
- [33] Beyak MJ, Ramji N, Krol KM, Kawaja MD, Vanner SJ. Two TTX-resistant Na^+ currents in mouse colonic dorsal root ganglia neurons and their role in colitis-induced hyperexcitability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287(4):G845-G855. doi:10.1152/ajpgi.00154.2004
- [34] Hegyi Z, Kis G, Holló K, Ledent C, Antal M. Neuronal and glial localization of the cannabinoid-1 receptor in the superficial spinal dorsal horn of the rodent spinal cord. *Eur J Neurosci*. 2009;30(2):251-262. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06816.x
- [35] Hill KP, Palastro MD, Johnson B, Ditre JW. Cannabis and Pain: A Clinical Review. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2017;2(1):96-104. Published 2017 May 1. doi:10.1089/can.2017.0017
- [36] Ibsen MS, Connor M, Glass M. Cannabinoid CB1 and CB2 Receptor Signaling and Bias. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2017;2(1):48-60. Published 2017 Mar 1. doi:10.1089/can.2016.0037
- [37] Morales P, Hurst DP, Reggio PH. Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. *Prog Chem Org Nat Prod*. 2017;103:103-131. doi:10.1007/978-3-319-45541-9_4
- [38] Clayton N, Marshall FH, Bountra C, O'Shaughnessy CT. CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. *Pain*. 2002;96(3):253-260. doi:10.1016/s0304-3959(01)00454-7
- [39] Burgos E, Pascual D, Martín MI, Goicoechea C. Antinociceptive effect of the cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, in the orofacial and temporomandibular formalin tests. *Eur J Pain*. 2010;14(1):40-48. doi:10.1016/j.ejpain.2009.02.003
- [40] Starowicz K, Finn DP. Cannabinoids and Pain: Sites and Mechanisms of Action. *Adv Pharmacol*. 2017;80:437-475. doi:10.1016/bs.apha.2017.05.003

- [41] Vučković S, Srebro D, Vujović KS, Vučetić Č, Prostran M. Cannabinoids and Pain: New Insights From Old Molecules. *Front Pharmacol.* 2018;9:1259. Published 2018 Nov 13. doi:10.3389/fphar.2018.01259
- [42] Todd AJ. Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn. *Mol Pain.* 2017;13:1744806917693003. doi:10.1177/1744806917693003
- [43] Antal M, Freund TF, Polgár E. Calcium-binding proteins, parvalbumin- and calbindin-D 28k-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and dorsal root ganglia: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol.* 1990;295(3):467-484. doi:10.1002/cne.902950310
- [44] Ren K, Ruda MA. A comparative study of the calcium-binding proteins calbindin-D28K, calretinin, calmodulin and parvalbumin in the rat spinal cord. *Brain Res Brain Res Rev.* 1994;19(2):163-179. doi:10.1016/0165-0173(94)90010-8
- [45] Antal M, Polgár E, Chalmers J, et al. Different populations of parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons contain GABA and accumulate 3H-D-aspartate in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol.* 1991;314(1):114-124. doi:10.1002/cne.903140111
- [46] Smith KM, Boyle KA, Madden JF, et al. Functional heterogeneity of calretinin-expressing neurons in the mouse superficial dorsal horn: implications for spinal pain processing. *J Physiol.* 2015;593(19):4319-4339. doi:10.1113/JP270855
- [47] Todd AJ, Spike RC. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol.* 1993;41(5):609-645. doi:10.1016/0301-0082(93)90045-t
- [48] Todd AJ, Hughes DI, Polgár E, et al. The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur J Neurosci.* 2003;17(1):13-27. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02406.x
- [49] Zeilhofer HU, Wildner H, Yévenes GE. Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev.* 2012;92(1):193-235. doi:10.1152/physrev.00043.2010
- [50] Foster E, Wildner H, Tudeau L, et al. Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch. *Neuron.* 2015;85(6):1289-1304. doi:10.1016/j.neuron.2015.02.028
- [51] Polgár E, Sardella TC, Tiong SY, Locke S, Watanabe M, Todd AJ. Functional differences between neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the rat spinal dorsal horn. *Pain.* 2013;154(12):2606-2615. doi:10.1016/j.pain.2013.05.001
- [52] Tiong SY, Polgár E, van Kralingen JC, Watanabe M, Todd AJ. Galanin-immunoreactivity identifies a distinct population of inhibitory interneurons in laminae I-III of the rat spinal cord. *Mol Pain.* 2011;7:36. Published 2011 May 15. doi:10.1186/1744-8069-7-36
- [53] McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM. Identification and

- characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature*. 1997;389(6653):870-876. doi:10.1038/39908
- [54] Todd AJ, Sullivan AC. Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol*. 1990;296(3):496-505. doi:10.1002/cne.902960312
- [55] Yaksh TL. Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain*. 1989;37(1):111-123. doi:10.1016/0304-3959(89)90160-7
- [56] Sivilotti L, Woolf CJ. The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol*. 1994;72(1):169-179. doi:10.1152/jn.1994.72.1.169
- [57] Antal M, Petkó M, Polgár E, Heizmann CW, Storm-Mathisen J. Direct evidence of an extensive GABAergic innervation of the spinal dorsal horn by fibres descending from the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience*. 1996;73(2):509-518. doi:10.1016/0306-4522(96)00063-2
- [58] Ramírez D, Zúñiga R, Concha G, Zúñiga L. HCN Channels: New Therapeutic Targets for Pain Treatment. *Molecules*. 2018;23(9):2094. Published 2018 Aug 21. doi:10.3390/molecules23092094
- [59] Papp I, Szucs P, Holló K, Erdélyi F, Szabó G, Antal M. Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation channel subunit 2 ion channels modulate synaptic transmission from nociceptive primary afferents containing substance P to secondary sensory neurons in laminae I-IIo of the rodent spinal dorsal horn. *Eur J Neurosci*. 2006;24(5):1341-1352. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05013.x
- [60] Emery EC, Young GT, Berrocoso EM, Chen L, McNaughton PA. HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain. *Science*. 2011;333(6048):1462-1466. doi:10.1126/science.1206243
- [61] Emery EC, Young GT, McNaughton PA. HCN2 ion channels: an emerging role as the pacemakers of pain. *Trends Pharmacol Sci*. 2012;33(8):456-463. doi:10.1016/j.tips.2012.04.004
- [62] Young GT, Emery EC, Mooney ER, Tsantoulas C, McNaughton PA. Inflammatory and neuropathic pain are rapidly suppressed by peripheral block of hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated ion channels. *Pain*. 2014;155(9):1708-1719. doi:10.1016/j.pain.2014.05.021
- [63] Ford A, Castonguay A, Cottet M, et al. Engagement of the GABA to KCC2 signaling pathway contributes to the analgesic effects of A3AR agonists in neuropathic pain [published correction appears in *J Neurosci*. 2015 Jun 10;35(23):8971]. *J Neurosci*. 2015;35(15):6057-6067. doi:10.1523/JNEUROSCI.4495-14.2015
- [64] Coull JA, Boudreau D, Bachand K, et al. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*. 2003;424(6951):938-942. doi:10.1038/nature01868

- [65] Price TJ, Cervero F, de Koninck Y. Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr Top Med Chem.* 2005;5(6):547-555. doi:10.2174/1568026054367629
- [66] Gauriau C, Bernard JF. A comparative reappraisal of projections from the superficial laminae of the dorsal horn in the rat: the forebrain. *J Comp Neurol.* 2004;468(1):24-56. doi:10.1002/cne.10873
- [67] Lima D, Albino-Teixeira A, Tavares I. The caudal medullary ventrolateral reticular formation in nociceptive-cardiovascular integration. An experimental study in the rat. *Exp Physiol.* 2002;87(2):267-274. doi:10.1113/eph8702354
- [68] Boscan P, Pickering AE, Paton JF. The nucleus of the solitary tract: an integrating station for nociceptive and cardiorespiratory afferents. *Exp Physiol.* 2002;87(2):259-266. doi:10.1113/eph8702353
- [69] Gauriau C, Bernard JF. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol.* 2002;87(2):251-258. doi:10.1113/eph8702357
- [70] Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev.* 2009;60(1):214-225. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.12.009
- [71] Lv Q, Wu F, Gan X, et al. The Involvement of Descending Pain Inhibitory System in Electroacupuncture-Induced Analgesia. *Front Integr Neurosci.* 2019;13:38. Published 2019 Aug 21. doi:10.3389/fnint.2019.00038
- [72] Huynh V, Lütolf R, Rosner J, et al. Supraspinal nociceptive networks in neuropathic pain after spinal cord injury. *Hum Brain Mapp.* 2021;42(12):3733-3749. doi:10.1002/hbm.25401
- [73] Salter MW, Henry JL. Responses of functionally identified neurones in the dorsal horn of the cat spinal cord to substance P, neurokinin A and physalaemin. *Neuroscience.* 1991;43(2-3):601-610. doi:10.1016/0306-4522(91)90319-j
- [74] Mantyh PW, Rogers SD, Honore P, et al. Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science.* 1997;278(5336):275-279. doi:10.1126/science.278.5336.275
- [75] Jun Chen, Ji-Sheng Han, Zhi-Qi Zhao, Feng Wei, Jen-Chuen Hsieh, Lan Bao, Andrew CN Chen, Yi Dai, Bi-Fa Fan, Jian-Guo Gu, Shuang-Lin Hao, San-Jue Hu, Yong-Hua Ji, Yong-Jie Li, Yun-Qing Li, Qing Lin, Xian-Guo Liu, Yan-Qing Liu, Yan Lu, Fei Luo, Chao Ma, Yun-Hai Qiu, Zhi-Ren Rao, Lin Shi, Bai-Chuang Shyu, Xue-Jun Song, Jing-Shi Tang, Yuan-Xiang Tao, You Wan, Jia-Shuang Wang, Ke-Wei Wang, Yun Wang, Guang-Yin Xu, Tian-Le Xu, Hao-Jun You, Long-Chuan Yu, Sheng-Yuan Yu, Da-Ying Zhang, De-Ren Zhang, Jun-Ming Zhang, Xu Zhang, Yu-Qiu Zhang, Min Zhuo. *Pain, Neuroscience in the 21st Century, 2013, Edited by Donald W. Pfaff*
- [76] De Leo JA, Sorkin LS, Watkins LR. Immune and glial regulation of pain. *Journal of Musculoskeletal Pain.* 2008; 16:4, 358-359, doi: 10.1080/10582450802479750

- [77] Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med.* 2010;16(11):1267-1276. doi:10.1038/nm.2234
- [78] Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature.* 1994;369(6483):744-747. doi:10.1038/369744a0
- [79] Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 1999;22(5):208-215. doi:10.1016/s0166-2236(98)01349-6
- [80] Halassa MM, Haydon PG. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:335-355. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135843
- [81] Watkins LR, Hutchinson MR, Ledebor A, Wieseler-Frank J, Milligan ED, Maier SF. Norman Cousins Lecture. Glia as the "bad guys": implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain Behav Immun.* 2007;21(2):131-146. doi:10.1016/j.bbi.2006.10.011
- [82] Roberts-Wolfe DJ, Kalivas PW. Glutamate Transporter GLT-1 as a Therapeutic Target for Substance Use Disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2015;14(6):745-756. doi:10.2174/1871527314666150529144655
- [83] Toulme E, Tsuda M, Khakh BS, Inoue K. On the Role of ATP-Gated P2X Receptors in Acute, Inflammatory and Neuropathic Pain. In: Kruger L, Light AR, eds. *Translational Pain Research: From Mouse to Man.* Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2010.
- [84] Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(1):23-36. doi:10.1038/nrn2533
- [85] Downer EJ, Johnston DG, Lynch MA. Differential role of Dok1 and Dok2 in TLR2-induced inflammatory signaling in glia. *Mol Cell Neurosci.* 2013;56:148-158. doi:10.1016/j.mcn.2013.04.00
- [86] Kawasaki Y, Xu ZZ, Wang X, et al. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat Med.* 2008;14(3):331-336. doi:10.1038/nm1723
- [87] Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e
- [88] DeLeo JA, Colburn RW, Nichols M, Malhotra A. Interleukin-6-mediated hyperalgesia/allodynia and increased spinal IL-6 expression in a rat mononeuropathy model. *J Interferon Cytokine Res.* 1996;16(9):695-700. doi:10.1089/jir.1996.16.695
- [89] Schäfers M, Svensson CI, Sommer C, Sorkin LS. Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J Neurosci.* 2003;23(7):2517-2521. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-07-02517.2003
- [90] Ozaktay AC, Kallakuri S, Takebayashi T, et al. Effects of interleukin-1 beta, interleukin-

- 6, and tumor necrosis factor on sensitivity of dorsal root ganglion and peripheral receptive fields in rats. *Eur Spine J.* 2006;15(10):1529-1537. doi:10.1007/s00586-005-0058-8
- [91] Charles A Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik. *Immunobiology, The Immune System in Health and Disease*, edition 5, Garland Publishing, New York, 2001.
- [92] Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem.* 1993;53(4):288-295. doi:10.1002/jcb.240530404
- [93] Winkelstein BA, DeLeo JA. Nerve root injury severity differentially modulates spinal glial activation in a rat lumbar radiculopathy model: considerations for persistent pain. *Brain Res.* 2002;956(2):294-301. doi:10.1016/s0006-8993(02)03560-6
- [94] DeLeo JA, Colburn RW, Nichols M, Malhotra A. Interleukin-6-mediated hyperalgesia/allodynia and increased spinal IL-6 expression in a rat mononeuropathy model. *J Interferon Cytokine Res.* 1996;16(9):695-700. doi:10.1089/jir.1996.16.695
- [95] Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000;118(2):503-508. doi:10.1378/chest.118.2.503
- [96] D'Elia RV, Harrison K, Oyston PC, Lukaszewski RA, Clark GC. Targeting the "cytokine storm" for therapeutic benefit. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(3):319-327. doi:10.1128/CVI.00636-12
- [97] Ferrara JL, Abhyankar S, Gilliland DG. Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1. *Transplant Proc.* 1993;25(1 Pt 2):1216-1217.
- [98] Us D. Kuş gribinde sitokin fırtınası [Cytokine storm in avian influenza]. *Mikrobiyol Bul.* 2008;42(2):365-380.
- [99] Mares CA, Ojeda SS, Morris EG, Li Q, Teale JM. Initial delay in the immune response to *Francisella tularensis* is followed by hypercytokinemia characteristic of severe sepsis and correlating with upregulation and release of damage-associated molecular patterns. *Infect Immun.* 2008;76(7):3001-3010. doi:10.1128/IAI.00215-08
- [100] Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012;76(1):16-32. doi:10.1128/MMBR.05015-11
- [101] Liu B, Li M, Zhou Z, Guan X, Xiang Y. Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)? *J Autoimmun.* 2020;111:102452. doi:10.1016/j.jaut.2020.102452
- [102] Torabi A, Mohammadbagheri E, Akbari Dilmaghani N, et al. Proinflammatory Cytokines in the Olfactory Mucosa Result in COVID-19 Induced Anosmia. *ACS Chem Neurosci.* 2020;11(13):1909-1913. doi:10.1021/acchemneuro.0c00249
- [103] Bonecchi R, Garlanda C, Mantovani A, Riva F. Cytokine decoy and scavenger receptors as key regulators of immunity and inflammation. *Cytokine.* 2016;87:37-45. doi:10.1016/j.cyto.2016.06.023

- [104] Garlanda C, Riva F, Bonavita E, Gentile S, Mantovani A. Decoys and Regulatory "Receptors" of the IL-1/Toll-Like Receptor Superfamily. *Front Immunol.* 2013;4:180. Published 2013 Jul 9. doi:10.3389/fimmu.2013.00180
- [105] Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996;87(6):2095-2147.
- [106] Braddock M, Quinn A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(4):330-339. doi:10.1038/nrd1342
- [107] Pétrilli V, Martinon F. The inflammasome, autoinflammatory diseases, and gout. *Joint Bone Spine.* 2007;74(6):571-576. doi:10.1016/j.jbspin.2007.04.004
- [108] Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain.* 1995;63(3):289-302. doi:10.1016/0304-3959(95)00186-7
- [109] Copray JC, Mantingh I, Brouwer N, et al. Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *J Neuroimmunol.* 2001;118(2):203-211. doi:10.1016/s0165-5728(01)00324-1
- [110] Shamash S, Reichert F, Rotshenker S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci.* 2002;22(8):3052-3060. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-08-03052.2002
- [111] Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett.* 2004;361(1-3):184-187. doi:10.1016/j.neulet.2003.12.007
- [112] Perrin FE, Lacroix S, Avilés-Trigueros M, David S. Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1alpha and interleukin-1beta in Wallerian degeneration. *Brain.* 2005;128(Pt 4):854-866. doi:10.1093/brain/awh407
- [113] Clark AK, D'Aquisto F, Gentry C, Marchand F, McMahon SB, Malcangio M. Rapid co-release of interleukin 1beta and caspase 1 in spinal cord inflammation. *J Neurochem.* 2006;99(3):868-880. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04126.x
- [114] Moynagh PN. The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. *J Anat.* 2005;207(3):265-269. doi:10.1111/j.1469-7580.2005.00445.x
- [115] Thacker MA, Clark AK, Marchand F, McMahon SB. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth Analg.* 2007;105(3):838-847. doi:10.1213/01.ane.0000275190.42912.37
- [116] Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature.* 1988;334(6184):698-700. doi:10.1038/334698a0
- [117] Fukuoka H, Kawatani M, Hisamitsu T, Takeshige C. Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 beta in the rat. *Brain Res.* 1994;657(1-2):133-140. doi:10.1016/0006-8993(94)90960-1

- [118] Watkins LR, Wiertelak EP, Goehler LE, Smith KP, Martin D, Maier SF. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res.* 1994;654(1):15-26. doi:10.1016/0006-8993(94)91566-0
- [119] Safieh-Garabedian B, Poole S, Allchorne A, Winter J, Woolf CJ. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 1995;115(7):1265-1275. doi:10.1111/j.1476-5381.1995.tb15035.x
- [120] Cunha JM, Cunha FQ, Poole S, Ferreira SH. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 2000;130(6):1418-1424. doi:10.1038/sj.bjp.0703434
- [121] Zelenka M, Schäfers M, Sommer C. Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. *Pain.* 2005;116(3):257-263. doi:10.1016/j.pain.2005.04.018
- [122] Safieh-Garabedian B, Poole S, Haddad JJ, Massaad CA, Jabbur SJ, Saadé NE. The role of the sympathetic efferents in endotoxin-induced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine upregulation. *Neuropharmacology.* 2002;42(6):864-872. doi:10.1016/s0028-3908(02)00028-x
- [123] Inoue A, Ikoma K, Morioka N, et al. Interleukin-1beta induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system. *J Neurochem.* 1999;73(5):2206-2213.
- [124] Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, et al. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature.* 2001;410(6827):471-475. doi:10.1038/35068566
- [125] Economides AN, Carpenter LR, Rudge JS, et al. Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nat Med.* 2003;9(1):47-52. doi:10.1038/nm811
- [126] Ji RR, Xu ZZ, Wang X, Lo EH. Matrix metalloprotease regulation of neuropathic pain. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(7):336-340. doi:10.1016/j.tips.2009.04.002
- [127] Malawista SE, Duff GW, Atkins E, Cheung HS, McCarty DJ. Crystal-induced endogenous pyrogen production. A further look at gouty inflammation. *Arthritis Rheum.* 1985;28(9):1039-1046. doi:10.1002/art.1780280911
- [128] Di Giovine FS, Malawista SE, Nuki G, Duff GW. Interleukin 1 (IL 1) as a mediator of crystal arthritis. Stimulation of T cell and synovial fibroblast mitogenesis by urate crystal-induced IL 1. *J Immunol.* 1987;138(10):3213-3218.
- [129] Chen CJ, Shi Y, Hearn A, et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J Clin Invest.* 2006;116(8):2262-2271. doi:10.1172/JCI28075
- [130] Ren K, Torres R. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain Res Rev.* 2009;60(1):57-64. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.12.020
- [131] Farrar WL, Kilian PL, Ruff MR, Hill JM, Pert CB. Visualization and characterization of

- interleukin 1 receptors in brain. *J Immunol.* 1987;139(2):459-463.
- [132] French RA, VanHoy RW, Chizzonite R, et al. Expression and localization of p80 and p68 interleukin-1 receptor proteins in the brain of adult mice. *J Neuroimmunol.* 1999;93(1-2):194-202. doi:10.1016/s0165-5728(98)00224-0
- [133] Zhang RX, Li A, Liu B, et al. IL-1ra alleviates inflammatory hyperalgesia through preventing phosphorylation of NMDA receptor NR-1 subunit in rats. *Pain.* 2008;135(3):232-239. doi:10.1016/j.pain.2007.05.023
- [134] Oka T, Aou S, Hori T. Intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta induces hyperalgesia in rats. *Brain Res.* 1993;624(1-2):61-68. doi:10.1016/0006-8993(93)90060-z
- [135] Reeve AJ, Patel S, Fox A, Walker K, Urban L. Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. *Eur J Pain.* 2000;4(3):247-257. doi:10.1053/eujp.2000.0177
- [136] Schäfers M, Sorkin L. Effect of cytokines on neuronal excitability [published correction appears in *Neurosci Lett.* 2010 Sep 13;481(3):191]. *Neurosci Lett.* 2008;437(3):188-193. doi:10.1016/j.neulet.2008.03.052
- [137] Liu T, Jiang CY, Fujita T, Luo SW, Kumamoto E. Enhancement by interleukin-1 β of AMPA and NMDA receptor-mediated currents in adult rat spinal superficial dorsal horn neurons. *Mol Pain.* 2013;9:16. Published 2013 Mar 28. doi:10.1186/1744-8069-9-1
- [138] Oprée A, Kress M. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *J Neurosci.* 2000;20(16):6289-6293. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-16-06289.2000
- [139] Tabarean IV, Korn H, Bartfai T. Interleukin-1beta induces hyperpolarization and modulates synaptic inhibition in preoptic and anterior hypothalamic neurons. *Neuroscience.* 2006;141(4):1685-1695. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.05.007
- [140] Hashizume H, DeLeo JA, Colburn RW, Weinstein JN. Spinal glial activation and cytokine expression after lumbar root injury in the rat. *Spine (Phila Pa 1976).* 2000;25(10):1206-1217. doi:10.1097/00007632-200005150-00003
- [141] Lee HL, Lee KM, Son SJ, Hwang SH, Cho HJ. Temporal expression of cytokines and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model. *Neuroreport.* 2004;15(18):2807-2811.
- [142] Gui WS, Wei X, Mai CL, et al. Interleukin-1 β overproduction is a common cause for neuropathic pain, memory deficit, and depression following peripheral nerve injury in rodents. *Mol Pain.* 2016;12:1744806916646784. Published 2016 May 12. doi:10.1177/1744806916646784
- [143] Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018;281(1):8-27. doi:10.1111/imr.12621

- [144] Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol.* 2000;67(4):508-514. doi:10.1002/jlb.67.4.508
- [145] Acuner Ozbabacan SE, Gursoy A, Nussinov R, Keskin O. The structural pathway of interleukin 1 (IL-1) initiated signaling reveals mechanisms of oncogenic mutations and SNPs in inflammation and cancer. *PLoS Comput Biol.* 2014;10(2):e1003470. Published 2014 Feb 13. doi:10.1371/journal.pcbi.1003470
- [146] Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies?. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2155. Published 2018 Jul 24. doi:10.3390/ijms19082155
- [147] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 2002;10(2):417-426. doi:10.1016/s1097-2765(02)00599-3
- [148] Walsh JG, Muruve DA, Power C. Inflammasomes in the CNS. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(2):84-97. doi:10.1038/nrn3638
- [149] Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(2):99-109. doi:10.1038/nrmicro2070
- [150] Zhang WH, Wang X, Narayanan M, et al. Fundamental role of the Rip2/caspase-1 pathway in hypoxia and ischemia-induced neuronal cell death [published correction appears in *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Feb 3;101(5):1426]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(26):16012-16017. doi:10.1073/pnas.2534856100
- [151] Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:17023-. doi:10.1038/sigtrans.2017.23
- [152] Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production?. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):210-215. doi:10.1038/nri2725
- [153] Yi YS. Caspase-11 Non-Canonical Inflammasome: Emerging Activator and Regulator of Infection-Mediated Inflammatory Responses. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2736. Published 2020 Apr 15. doi:10.3390/ijms21082736
- [154] Yi YS. Caspase-11 non-canonical inflammasome: a critical sensor of intracellular lipopolysaccharide in macrophage-mediated inflammatory responses. *Immunology.* 2017;152(2):207-217. doi:10.1111/imm.12787
- [155] Yi YS. Regulatory Roles of the Caspase-11 Non-Canonical Inflammasome in Inflammatory Diseases. *Immune Netw.* 2018;18(6):e41. Published 2018 Nov 17. doi:10.4110/in.2018.18.e41
- [156] Ding J, Shao F. SnapShot: The Noncanonical Inflammasome. *Cell.* 2017;168(3):544-544.e1. doi:10.1016/j.cell.2017.01.008
- [157] Abulafia DP, de Rivero Vaccari JP, Lozano JD, Lotocki G, Keane RW, Dietrich WD. Inhibition of the inflammasome complex reduces the inflammatory response after

- thromboembolic stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(3):534-544. doi:10.1038/jcbfm.2008.143
- [158] Minkiewicz J, de Rivero Vaccari JP, Keane RW. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia.* 2013;61(7):1113-1121. doi:10.1002/glia.22499
- [159] Hanamsagar R, Torres V, Kielian T. Inflammasome activation and IL-1 β /IL-18 processing are influenced by distinct pathways in microglia. *J Neurochem.* 2011;119(4):736-748. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07481.x
- [160] Komada T, Muruve DA. The role of inflammasomes in kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(8):501-520. doi:10.1038/s41581-019-0158-z
- [161] Mitchell PS, Sandstrom A, Vance RE. The NLRP1 inflammasome: new mechanistic insights and unresolved mysteries. *Curr Opin Immunol.* 2019;60:37-45. doi:10.1016/j.coi.2019.04.015
- [162] Boyden ED, Dietrich WF. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet.* 2006;38(2):240-244. doi:10.1038/ng1724
- [163] Chavarría-Smith J, Mitchell PS, Ho AM, Daugherty MD, Vance RE. Functional and Evolutionary Analyses Identify Proteolysis as a General Mechanism for NLRP1 Inflammasome Activation. *PLoS Pathog.* 2016;12(12):e1006052. Published 2016 Dec 7. doi:10.1371/journal.ppat.1006052
- [164] Sandstrom A, Mitchell PS, Goers L, Mu EW, Lesser CF, Vance RE. Functional degradation: A mechanism of NLRP1 inflammasome activation by diverse pathogen enzymes. *Science.* 2019;364(6435):eaau1330. doi:10.1126/science.aau1330
- [165] Freeman LC, Ting JP. The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases. *J Neurochem.* 2016;136 Suppl 1:29-38. doi:10.1111/jnc.13217
- [166] Mawhinney LJ, de Rivero Vaccari JP, Dale GA, Keane RW, Bramlett HM. Heightened inflammasome activation is linked to age-related cognitive impairment in Fischer 344 rats. *BMC Neurosci.* 2011;12:123. Published 2011 Dec 1. doi:10.1186/1471-2202-12-123
- [167] Aricioglu F, Ozkartal CS, Bastaskin T, et al. Antidepressant-like Effects Induced by Chronic Blockade of the Purinergic 2X7 Receptor through Inhibition of Non-like Receptor Protein 1 Inflammasome in Chronic Unpredictable Mild Stress Model of Depression in Rats. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2019;17(2):261-272. doi:10.9758/cpn.2019.17.2.261
- [168] Sahin Ozkartal C, Tuzun E, Kucukali CI, Ulusoy C, Giris M, Aricioglu F. Antidepressant-like effects of agmatine and NOS inhibitors in chronic unpredictable mild stress model of depression in rats: The involvement of NLRP inflammasomes. *Brain Res.* 2019;1725:146438. doi:10.1016/j.brainres.2019.146438
- [169] Fontalba A, Gutierrez O, Fernandez-Luna JL. NLRP2, an inhibitor of the NF-kappaB pathway, is transcriptionally activated by NF-kappaB and exhibits a nonfunctional allelic variant. *J Immunol.* 2007;179(12):8519-8524. doi:10.4049/jimmunol.179.12.8519

- [170] Minkiewicz J, de Rivero Vaccari JP, Keane RW. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia*. 2013;61(7):1113-1121. doi:10.1002/glia.22499
- [171] Lee E, Hwang I, Park S, et al. MPTP-driven NLRP3 inflammasome activation in microglia plays a central role in dopaminergic neurodegeneration. *Cell Death Differ*. 2019;26(2):213-228. doi:10.1038/s41418-018-0124-5
- [172] Lemprière S. NLRP3 inflammasome activation implicated in tau pathology. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(1):4. doi:10.1038/s41582-019-0299-5
- [173] Labow M, Shuster D, Zetterstrom M, et al. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *J Immunol*. 1997;159(5):2452-2461.
- [174] Freund J, Opie EL. Sensitization and antibody formation with increased resistance to tuberculous infection induced by heat killed tubercle bacilli. *J Exp Med*. 1938;68(2):273-298. doi:10.1084/jem.68.2.273
- [175] Hylden JL, Nahin RL, Traub RJ, Dubner R. Expansion of receptive fields of spinal lamina I projection neurons in rats with unilateral adjuvant-induced inflammation: the contribution of dorsal horn mechanisms. *Pain*. 1989;37(2):229-243. doi:10.1016/0304-3959(89)90135-8
- [176] Papp I, Holló K, Antal M. Plasticity of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation channel subunit 2 expression in the spinal dorsal horn in inflammatory pain. *Eur J Neurosci*. 2010;32(7):1193-1201. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07370.x
- [177] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- [178] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0
- [179] Kuno K, Matsushima K. The IL-1 receptor signaling pathway. *J Leukoc Biol*. 1994;56(5):542-547. doi:10.1002/jlb.56.5.542
- [180] Niederberger E, Schmidtko A, Gao W, Kühlein H, Ehnert C, Geisslinger G. Impaired acute and inflammatory nociception in mice lacking the p50 subunit of NF-kappaB. *Eur J Pharmacol*. 2007;559(1):55-60. doi:10.1016/j.ejphar.2006.11.074
- [181] Zhu J, Wei X, Feng X, Song J, Hu Y, Xu J. Repeated administration of mirtazapine inhibits development of hyperalgesia/allodynia and activation of NF-kappaB in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 2008; 433(1):33-37. doi:10.1016/j.neulet.2007.12.037
- [182] Holmes GM, Hebert SL, Rogers RC, Hermann GE. Immunocytochemical localization of TNF type 1 and type 2 receptors in the rat spinal cord. *Brain Res*. 2004;1025(1-2):210-219. doi:10.1016/j.brainres.2004.08.020
- [183] Li M, Shi J, Tang JR, et al. Effects of complete Freund's adjuvant on immunohistochemical distribution of IL-1beta and IL-1R I in neurons and glia cells of

- dorsal root ganglion. *Acta Pharmacol Sin.* 2005;26(2):192-198. doi:10.1111/j.1745-7254.2005.00522.x
- [184] Wang XF, Yin L, Hu JG, et al. Expression and localization of p80 interleukin-1 receptor protein in the rat spinal cord. *J Mol Neurosci.* 2006;29(1):45-53. doi:10.1385/JMN:29:1:45
- [185] Alvarez FJ, Villalba RM, Zerda R, Schneider SP. Vesicular glutamate transporters in the spinal cord, with special reference to sensory primary afferent synapses. *J Comp Neurol.* 2004;472(3):257-280. doi:10.1002/cne.20012
- [186] Brumovsky P, Watanabe M, Hökfelt T. Expression of the vesicular glutamate transporters-1 and -2 in adult mouse dorsal root ganglia and spinal cord and their regulation by nerve injury. *Neuroscience.* 2007;147(2):469-490. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.02.068
- [187] Traub RJ, Solodkin A, Ruda MA. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the cat lumbosacral spinal cord and the effects of multiple dorsal rhizotomies. *J Comp Neurol.* 1989;287(2):225-237. doi:10.1002/cne.902870206
- [188] Nasu F. Analysis of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing nerve fibres in the rat spinal cord using light and electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo).* 1999;48(3):267-275. doi:10.1093/oxfordjournals.jmicro.a023678
- [189] Li JL, Fujiyama F, Kaneko T, Mizuno N. Expression of vesicular glutamate transporters, VGluT1 and VGluT2, in axon terminals of nociceptive primary afferent fibers in the superficial layers of the medullary and spinal dorsal horns of the rat. *J Comp Neurol.* 2003;457(3):236-249. doi:10.1002/cne.10556
- [190] Oliveira AL, Hydling F, Olsson E, et al. Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Synapse.* 2003;50(2):117-129. doi:10.1002/syn.10249
- [191] Todd AJ, Hughes DI, Polgár E, et al. The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur J Neurosci.* 2003;17(1):13-27. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02406.x
- [192] Polgár E, Al-Khater KM, Shehab S, Watanabe M, Todd AJ. Large projection neurons in lamina I of the rat spinal cord that lack the neurokinin 1 receptor are densely innervated by VGLUT2-containing axons and possess GluR4-containing AMPA receptors. *J Neurosci.* 2008;28 (49):13150-13160. doi:10.1523/JNEUROSCI.4053-08.2008
- [193] Lee HH, Walker JA, Williams JR, Goodier RJ, Payne JA, Moss SJ. Direct protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell surface stability and activity of the potassium chloride cotransporter KCC2. *J Biol Chem.* 2007;282(41):29777-29784. doi:10.1074/jbc.M705053200
- [194] Kakazu Y, Akaike N, Komiyama S, Nabekura J. Regulation of intracellular chloride by cotransporters in developing lateral superior olive neurons. *J Neurosci.* 1999;19(8):2843-2851. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-08-02843.1999

- [195] Rivera C, Voipio J, Payne JA, et al. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*. 1999;397(6716):251-255. doi:10.1038/16697
- [196] DeFazio RA, Keros S, Quick MW, Hablitz JJ. Potassium-coupled chloride cotransport controls intracellular chloride in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci*. 2000;20(21):8069-8076. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-21-08069.2000
- [197] Payne JA, Stevenson TJ, Donaldson LF. Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem*. 1996;271(27):16245-16252. doi:10.1074/jbc.271.27.16245
- [198] Williams JR, Sharp JW, Kumari VG, Wilson M, Payne JA. The neuron-specific K-Cl cotransporter, KCC2. Antibody development and initial characterization of the protein. *J Biol Chem*. 1999;274(18):12656-12664. doi:10.1074/jbc.274.18.12656
- [199] Kanaka C, Ohno K, Okabe A, et al. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience*. 2001;104(4):933-946. doi:10.1016/s0306-4522(01)00149-x
- [200] Javdani F, Holló K, Hegedűs K, et al. Differential expression patterns of K(+) /Cl(-) cotransporter 2 in neurons within the superficial spinal dorsal horn of rats. *J Comp Neurol*. 2015;523(13):1967-1983. doi:10.1002/cne.23774
- [201] Gardoni F, Boraso M, Zianni E, et al. Distribution of interleukin-1 receptor complex at the synaptic membrane driven by interleukin-1 β and NMDA stimulation. *J Neuroinflammation*. 2011;8(1):14. Published 2011 Feb 11. doi:10.1186/1742-2094-8-14
- [202] Kim E, Sheng M. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(10):771-781. doi:10.1038/nrn1517
- [203] Kurakin A, Swistowski A, Wu SC, Bredesen DE. The PDZ domain as a complex adaptive system. *PLoS One*. 2007;2(9):e953. Published 2007 Sep 26. doi:10.1371/journal.pone.0000953
- [204] Kneussel M, Betz H. Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J Physiol*. 2000;525 Pt 1(Pt 1):1-9. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.t01-4-00001.x
- [205] Fritschy JM, Harvey RJ, Schwarz G. Gephyrin: where do we stand, where do we go?. *Trends Neurosci*. 2008;31(5):257-264. doi:10.1016/j.tins.2008.02.006
- [206] Diniz DG, de Oliveira MA, de Lima CM, et al. Age, environment, object recognition and morphological diversity of GFAP-immunolabeled astrocytes. *Behav Brain Funct*. 2016;12(1):28. Published 2016 Oct 10. doi:10.1186/s12993-016-0111-2
- [207] González-Scarano F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:219-240. doi:10.1146/annurev.neuro.22.1.219
- [208] Liu S, Li Q, Zhang MT, et al. Curcumin ameliorates neuropathic pain by down-regulating

- spinal IL-1 β via suppressing astroglial NALP1 inflammasome and JAK2-STAT3 signalling. *Sci Rep.* 2016;6:28956. Published 2016 Jul 6. doi:10.1038/srep28956
- [209] Grace PM, Strand KA, Galer EL, et al. Morphine paradoxically prolongs neuropathic pain in rats by amplifying spinal NLRP3 inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(24):E3441-E3450. doi:10.1073/pnas.1602070113
- [210] Abboud C, Duveau A, Bouali-Benazzouz R, et al. Animal models of pain: Diversity and benefits. *J Neurosci Methods.* 2021;348:108997. doi:10.1016/j.jneumeth.2020.108997
- [211] Stein C, Millan MJ, Herz A. Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacol Biochem Behav.* 1988;31(2):445-451. doi:10.1016/0091-3057(88)90372-3
- [212] Millan MJ, Członkowski A, Morris B, et al. Inflammation of the hind limb as a model of unilateral, localized pain: influence on multiple opioid systems in the spinal cord of the rat. *Pain.* 1988;35(3):299-312. doi:10.1016/0304-3959(88)90140-6
- [213] Ren K, Dubner R. Inflammatory Models of Pain and Hyperalgesia. *ILAR J.* 1999;40(3):111-118. doi:10.1093/ilar.40.3.111
- [214] Holló K, Ducza L, Hegyi Z, et al. Interleukin-1 receptor type 1 is overexpressed in neurons but not in glial cells within the rat superficial spinal dorsal horn in complete Freund adjuvant-induced inflammatory pain. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):125. Published 2017 Jun 23. doi:10.1186/s12974-017-0902-x
- [215] Shenker N, Haigh R, Roberts E, Mapp P, Harris N, Blake D. A review of contralateral responses to a unilateral inflammatory lesion. *Rheumatology (Oxford).* 2003;42(11):1279-1286. doi:10.1093/rheumatology/keg397
- [216] Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):389-462. doi:10.1124/pr.58.3.2
- [217] Hartmann B, Ahmadi S, Heppenstall PA, et al. The AMPA receptor subunits GluR-A and GluR-B reciprocally modulate spinal synaptic plasticity and inflammatory pain. *Neuron.* 2004;44(4):637-650. doi:10.1016/j.neuron.2004.10.029
- [218] Gao YJ, Ji RR. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics.* 2010;7(4):482-493. doi:10.1016/j.nurt.2010.05.016
- [219] Sweitzer S, Martin D, DeLeo JA. Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience.* 2001;103(2):529-539. doi:10.1016/s0306-4522(00)00574-1
- [220] Cao H, Zhang YQ. Spinal glial activation contributes to pathological pain states. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32(5):972-983. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.03.009
- [221] Wolf G, Gabay E, Tal M, Yirmiya R, Shavit Y. Genetic impairment of interleukin-1 signaling attenuates neuropathic pain, autotomy, and spontaneous ectopic neuronal activity, following nerve injury in mice. *Pain.* 2006;120(3):315-324.

doi:10.1016/j.pain.2005.11.011

- [222] Bluthé RM, Layé S, Michaud B, Combe C, Dantzer R, Parnet P. Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice. *Eur J Neurosci.* 2000;12(12):4447-4456.
- [223] Roerink ME, van der Schaaf ME, Dinarello CA, Knoop H, van der Meer JW. Interleukin-1 as a mediator of fatigue in disease: a narrative review. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):16. Published 2017 Jan 21. doi:10.1186/s12974-017-0796-7.
- [224] Brenner GJ, Ji RR, Shaffer S, Woolf CJ. Peripheral noxious stimulation induces phosphorylation of the NMDA receptor NR1 subunit at the PKC-dependent site, serine-896, in spinal cord dorsal horn neurons. *Eur J Neurosci.* 2004;20(2):375-384. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03506.x
- [225] Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, et al. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci.* 2003;23(25):8692-8700. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-25-08692.2003
- [226] Lu KT, Wang YW, Yang JT, Yang YL, Chen HI. Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons [published correction appears in *J Neurotrauma.* 2009 Mar;26(3):469]. *J Neurotrauma.* 2005;22(8):885-895. doi:10.1089/neu.2005.22.885
- [227] Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, Ji RR. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci.* 2008;28(20):5189-5194. doi:10.1523/JNEUROSCI.3338-07.2008
- [228] Suzuki R, Stanfa LC, Kowaluk EA, Williams M, Jarvis MF, Dickenson AH. The effect of ABT-702, a novel adenosine kinase inhibitor, on the responses of spinal neurones following carrageenan inflammation and peripheral nerve injury. *Br J Pharmacol.* 2001;132(7):1615-1623. doi:10.1038/sj.bjp.0703972
- [229] Liu YL, Zhou LJ, Hu NW, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces long-term potentiation of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn in rats with nerve injury: the role of NF-kappa B, JNK and p38 MAPK. *Neuropharmacology.* 2007;52(3):708-715. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.09.011
- [230] Chirila AM, Brown TE, Bishop RA, Bellono NW, Pucci FG, Kauer JA. Long-term potentiation of glycinergic synapses triggered by interleukin 1 β . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(22):8263-8268. doi:10.1073/pnas.1401013111
- [231] Gruber-Schoffnegger D, Drdla-Schutting R, Hönigsperger C, Wunderbaldinger G, Gassner M, Sandkühler J. Induction of thermal hyperalgesia and synaptic long-term potentiation in the spinal cord lamina I by TNF- α and IL-1 β is mediated by glial cells. *J Neurosci.* 2013;33(15):6540-6551. doi:10.1523/JNEUROSCI.5087-12.2013
- [232] Cook SP, McCleskey EW. Desensitization, recovery and Ca(2+)-dependent modulation of ATP-gated P2X receptors in nociceptors. *Neuropharmacology.* 1997;36(9):1303-1308. doi:10.1016/s0028-3908(97)00132-9

- [233] Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Adv Exp Med Biol.* 2003;521:1-21.
- [234] Ji RR, Chamesian A, Zhang YQ. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science.* 2016;354(6312):572-577. doi:10.1126/science.aaf8924
- [235] Ren K, Dubner R. Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2008;21(5):570-579. doi:10.1097/ACO.0b013e32830eddbdf
- [236] Huang Y, Smith DE, Ibáñez-Sandoval O, Sims JE, Friedman WJ. Neuron-specific effects of interleukin-1 β are mediated by a novel isoform of the IL-1 receptor accessory protein. *J Neurosci.* 2011;31(49):18048-18059. doi:10.1523/JNEUROSCI.4067-11.2011
- [237] Yazdi AS, Drexler SK, Tschopp J. The role of the inflammasome in nonmyeloid cells. *J Clin Immunol.* 2010;30(5):623-627. doi:10.1007/s10875-010-9437-y
- [238] He W, Long T, Pan Q, et al. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 β release and contributes to central sensitization in a recurrent nitroglycerin-induced migraine model. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):78. Published 2019 Apr 10. doi:10.1186/s12974-019-1459-7
- [239] Matsuoka Y, Yamashita A, Matsuda M, Kawai K, Sawa T, Amaya F. NLRP2 inflammasome in dorsal root ganglion as a novel molecular platform that produces inflammatory pain hypersensitivity. *Pain.* 2019;160(9):2149-2160. doi:10.1097/j.pain.0000000000001611
- [240] Bhattacharjee P, Das N, Chatterjee D, et al. Association of NALP2 polymorphism with arsenic induced skin lesions and other health effects. *Mutat Res.* 2013;755(1):1-5. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.04.010
- [241] Peng H, Chang B, Lu C, et al. Nlrp2, a maternal effect gene required for early embryonic development in the mouse. *PLoS One.* 2012;7(1):e30344. doi:10.1371/journal.pone.0030344
- [242] Bruey JM, Bruey-Sedano N, Newman R, Chandler S, Stehlik C, Reed JC. PAN1/NALP2/PYPAF2, an inducible inflammatory mediator that regulates NF-kappaB and caspase-1 activation in macrophages. *J Biol Chem.* 2004;279(50):51897-51907. doi:10.1074/jbc.M406741200
- [243] Tilburgs T, Meissner TB, Ferreira LMR, et al. NLRP2 is a suppressor of NF- κ B signaling and HLA-C expression in human trophoblasts \dagger , \ddagger . *Biol Reprod.* 2017;96(4):831-842. doi:10.1093/biolre/iox009
- [244] Wu GQ, Liao YJ, Qin ZQ, et al. PYRIN domain of NALP2 inhibits cell proliferation and tumor growth of human glioblastoma. *Plasmid.* 2010;64(1):41-50. doi:10.1016/j.plasmid.2010.01.003



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

Jelölt: Ducza László

Doktori Iskola: Idegtudományi 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., Bardóczi, 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: <http://dx.doi.org/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)



**DEBRECENI
EGYETEM**

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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.

9. TÁRGYSZAVAK/ KEYWORDS

gerincvelői hátsó szarv

spinal dorsal horn

krónikus gyulladássos fájdalom

chronic inflammatory pain

CFA injekció

CFA injection

citokinek

cytokines

immunohisztokémia

immunohistochemistry

IMARIS analízis

IMARIS analysis

TLDA módszer

TLDA method

viselkedési tesztek

behavioural tests

asztrociták

astrocytes

10. 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** intézetvezető egyetemi docens Urat, hogy Ph.D. tanulmányaimat az Anatómiai Intézetben támogatta!

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

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

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** 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 Agykutatói 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.

11. FÜGGELÉK

Elsőszerzős válogatott konferencia poszterek

1. Investigation of 90 genes in mice for identification of molecules contributing to the development of chronic inflammatory pain ***IBRO Workshop, Pécs, 2010***
2. Pain-related changes in the expressional level of 31 genes in a mouse model of chronic inflammatory pain ***FENS konferencia, Amszterdam, 2010***
3. Measurement of cytokine and chemokine protein expression in the Freund adjuvant-induced inflammatory pain model by the antibody array technique ***MITT konferencia, Budapest, 2011***
4. Spinal expression of interleukin-1 receptor type 1 (IL-1R1) in the Freund adjuvant-induced inflammatory pain model ***FENS konferencia, Barcelona, 2012***
5. Spinal expression of IL-1beta in Freund adjuvant induced inflammatory pain model. ***FENS konferencia, Milánó, 2014***
6. Expression and cellular localization of P2X4 and P2X7 purinergic receptors in the superficial dorsal horn of rats suffering from chronic inflammatory pain. ***ICBMB konferencia, Párizs, 2015***
7. NLRP 2 inflammasome is upregulated in the superficial dorsal horn of rats suffering from chronic inflammatory pain. ***FENS Regional Meeting konferencia, Pécs, 2017***
8. Role of the spinal purinergic expression in CFA induced chronic pain model, ***ICIS konferencia, Bécs, 2019***
9. Inflammasome regulation of rat spinal dorsal horn in persistent inflammatory pain, ***MAT konferencia, Budapest, 2021***

Elsőszerzős tudományos előadások

1. Expression and cellular localisation of interleukin-1 receptor type 1 in the superficial spinal dorsal horn in rats suffering from Freund adjuvant-evoked inflammatory pain.

Magyarország-Románia Határon Átnyúló Együtműködési Program, HURO, Debrecen, 2013

2. A citokinek szerepe a gerincvelői felületen hátsó szarvban krónikus gyulladáshoz vezető fájdalom modellben. ***MAT konferencia, Budapest, 2017***

3. Lightning talk: Chronic pain induced upregulation of NLRP2 inflammasome in the rat spinal dorsal horn, ***ICIS online konferencia, Seattle, 2020***

4. IL-1 β and NLRP2 expression are upregulated within the spinal dorsal horn of rats suffering from CFA-induced chronic inflammatory pain, ***Neurotech Open Section online konferencia Debrecen, 2021***

A disszertációban feltüntetett eredményekhez való hozzájárulások:

Közlemények összeállítása, koncepció:

1. „Interleukin-1 receptor type 1 is overexpressed in neurons but not in glial cells within the rat superficial spinal dorsal horn in complete Freund adjuvant-induced inflammatory pain” :

Prof. Dr. Antal Miklós, Dr. Holló Krisztina

2. NLRP2 is overexpressed in spinal astrocytes at the peak of mechanical pain sensitivity during complete Freund adjuvant-induced persistent pain

Ducza László, Dr. Holló Krisztina,

Kísérleti módszerek:

Genotipizálás: Dr. Mészár Zoltán

Mechanikai- és termális viselkedési tesztek: Bakk Erzsébet, Ducza László, Hegedüs Krisztina, Dr. Holló Krisztina, Katóné Dr. Papp Ildikó

TLDA: Bakk Erzsébet, Dr. Bardóczi Zsuzsanna, Ducza László, Dr. Holló Krisztina

Western blot: Bakk Erzsébet, Dr. Holló Krisztina

ELISA: Bakk Erzsébet, Dr. Holló Krisztina,

Immunohisztokémia: Ducza László, Hegedüs Krisztina, Kis Gréta

Olympus CX31-es felvételek elkészítése: Ducza László, Dr. Wéber Ildikó

Konfokális mikroszkóp felvételek elkészítése: Dr. Dócs Klaudia, Gajtkó Andrea, Dr. Hegyi Zoltán,

Konfokális felvételek kvantitatív analízise Olympus Fluoview szoftverrel: Ducza László

Konfokális felvételek kvantitatív analízise IMARIS szoftverrel: Ducza László, Dr. Szücs Péter