

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A KORTIKOSZTEROID-ELÉGTELENSÉG SZINDRÓMA
ÉS A PERIFÉRIÁS FEHÉRVÉRSEJTEK GLÜKOKORTIKOIDRECEPTOR
EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA KUTYÁBAN**

dr. Csöndes Judit

Témavezetők: Dr. Vajdovich Péter és Dr. Máthé Ákos



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2022

Tartalomjegyzék

1	A kutatás jelentősége és a kitűzött célok.....	2
2	Összefoglalás.....	4
3	Új tudományos eredmények	7
	1. A kortikoszteroid elégtelenség szindróma előfordulásának vizsgálata az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatkórházában kezelt kritikus állapotú kutyák körében... 7	
	2. Korábban nem azonosított kutya glükokortikoidreceptor transzkript variáns (cGR-P) leírása és általános jelenlétének igazolása egészséges és SIRS-ben szenvedő kutyák perifériás vérmintáiban	7
	3. A glükokortikoidreceptor α és P izoformák mRNS expressziós mintázatának vizsgálata egészséges és kritikus állapotú kutyák perifériás vérmintájában, különös tekintettel a túlélés valószínűségére	7
4	A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények	9
	Lektorált, impakt faktorra bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk	9
	Konferencia prezentációk.....	9
5	Köszönetnyilvánítás	10

1 A kutatás jelentősége és a kitűzött célok

A *Kortikoszteroid-elégtelenség szindróma és a perifériás fehérvérsejtek glükokortikoid-receptor expressziójának vizsgálata kutyában* című doktori értekezésemben a kritikus állapotú kutyák túlélési valószínűsége, valamint a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely (HHM-tengely) aktiválódása, illetve a perifériás fehérvérsejtek kortizol válaszkészsége közötti lehetséges összefüggéseket vizsgáltuk. Munkahipotézisünk szerint a HHM-tengely inadekvát működése miatti hypocortisolaemia és/vagy a célsejtek csökkent glükokortikoid szenzitivitása növeli a kritikus állapotú páciensek mortalitását.

A szeptikus és nem szeptikus oktanú szisztémás gyulladással válaszreakció szindróma (SIRS) mind emberekben, mind kutyákban gyakori oka a kórházi felvételnek és a mortalitási ráta jellemzően magas (21–68%) ebben a betegpopulációban. A kritikus állapot indukálta kortikoszteroid elégtelenség (Critical Illness-related Corticosteroid Insufficiency; CIRCI) a humán gyógyászatban jól ismert entitás, de már kutyákban is dokumentálásra került. A CIRCI a kritikus állapotú betegekben kialakuló csökkent kortizoltermelést és/vagy glükokortikoid rezisztenciát foglalja magában. Valójában a csökkent kortizolszekréció nem feltétlenül okoz abszolút értelemben vett hypocortisolaemiát, hanem a fennálló szisztémás gyulladás csillapításához szükséges elégtelen mértékű kortikoszteroidhatást is jelentheti.

A glükokortikoidok fontos szerepet töltenek be a hemodinamikai stabilitás fenntartásában és a gyulladással járó folyamatok szabályozásában. A kortikoszteroidok genomikus hatása a glükokortikoid receptoron (GR) keresztül valósul meg. Habár a GR-t csupán egyetlen gén (*NR3C1*) kódolja, de az összetett és több szinten szabályozott génkifejeződés következtében számos szerkezetében és funkciójában eltérő fehérje keletkezését dokumentálták emberekben és egyes állatfajokban.

A kritikus állapotú betegekben a szisztémás gyulladás a HHM-tengely aktiválódásán keresztül hypercortisolaemia kialakulásához, valamint a célsejtek fokozott GR expressziójához, ezáltal megnövekedett glükokortikoid érzékenységhez vezethet. Ugyanakkor számos tanulmányban publikálták már, hogy a jelentősen emelkedett szérumban kortizolszint és/vagy a perifériás fehérvérsejtek csökkent GR expressziója súlyosabb betegség lefolyáshoz vezet, illetve csökkent túlélési valószínűséggel jár együtt szeptikus és nem szeptikus SIRS-ben szenvedő páciensekben. Így a kritikus állapot indukálta kortikoszteroid elégtelenség korai felismerése és megfelelő ellátása javíthatja a betegek túlélési, illetve gyógyulási esélyeit.

Tekintve, hogy a kutya számos gyulladássos kórkép modell-állata, így az eredményeink hozzájárulhatnak a humán glükokortikoidreceptor által mediált gyulladássos jelátviteli utak további megismeréséhez.

A kutatómunka első fázisában a szisztémás gyulladás klinikai gyakorlatban használt biomarkerei (testhőmérséklet, összfehérvérsejtszám, balra tolódás jelenléte, szérum albumin és C-reaktív fehérjeszintek vizsgálata) és az ACTH-stimulációs teszt során kapott eredmények (alap- és stimulált kortizol koncentrációk, Δ kortizol érték) közötti lehetséges összefüggéseket vizsgáltuk kritikus állapotú kutyákban, amelyek az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatkórházában kerültek hospitalizációra. Emellett speciális klinikai pontrendszerek segítségével próbáltuk a kritikus állapotú kutyák állapotának súlyosságát felmérni (De Laforcade-féle SIRS kritérium rendszer), illetve a betegség kimenetelét (Acute Patient Physiologic and Laboratory Evaluation (APPLE_{fast} score)) meghatározni a kórházi felvétel időpontjában.

A vizsgálataink második fázisában alapozva az emberorvosi kutatások eredményeire a szisztémás gyulladás indukálta alternatív splicing mechanizmus révén létrejött lehetséges *NR3C1* gén ortológokat vizsgáltuk SIRS-ben szenvedő kutyák perifériás vérmintáiban. Ehhez egy szeptikus peritonitisben szenvedő kutya perifériás vérmintájából kinyert RNS-t ún. új-generációs RNS-szekvenálással vizsgáltuk és a kapott szekvenciákat bioinformatikai módszerekkel azonosítottuk. A GR transzkript variánsok általános jelenlétének vizsgálatára izoforma-specifikus TaqMan primereket és próbákat terveztünk. Az mRNS expresszió vizsgálatára a komparatív C_i módszert használtuk. A kapott eredményeket a *RPS5* háztartási gén expressziós szintjéhez és a kontroll csoport átlagához normalizáltuk. Végezetül a kapott mRNS expressziós szinteket összevetettük a vizsgált klinikopatológiai paraméterekkel, valamint a betegség kimenetelével.

2 Összefoglalás

A kutatómunka során a kritikus állapotú kutyák túlélési valószínűsége, valamint a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely (HHM-tengely) aktiválódása, illetve a perifériás fehérvérsejtek kortizol érzékenysége közötti lehetséges összefüggéseket vizsgáltuk. Munkahipotézisünk szerint a HHM-tengely inadekvát működése miatti hypocortisolaemia és/vagy a célsejtek csökkent glükokortikoid szenzitivitása növeli a kritikus állapotú páciensek mortalitását.

A vizsgálataink első fázisában 50 kritikus állapotú kutya adrenalis rezerv kapacitását és egyes gyulladásos paramétereit vizsgáltuk a betegségük kimenetelének tükrében. A páciensek 2014 januárja és 2016 augusztusa között kerültek kórházi felvételre az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatkórházának Intenzív Osztályára. Azok a betegek automatikusan kizárásra kerültek a vizsgálatokból, amelyeknél mellékvese betegség került igazolásra vagy a kórházi felvételt megelőzően a HHM-tengely működését befolyásoló gyógyszeres terápiában részesültek (pl. glükokortikoidok, gesztagének, major analgetikumok, azoltípusú gomba-ellenes készítmények). Minden páciensnél részletes fizikális vizsgálatot végeztünk, illetve vénás vérmintát vettünk a rutin hematológiai és klinikai kémiai vizsgálatokra a kórházi felvételt követő 24 órán belül.

Azok a kutyák, amelyek a kórházból hazaadásra kerültek, a túlélő csoportba, azok a páciensek, amelyek a kórházi tartózkodás során elpusztultak vagy terminális állapotuk miatt végleges elaltatásra kerültek, a nem-túlélő csoportba soroltuk. Azok a kutyák, amelyek anyagi korlátok miatt kerültek végleges elaltatásra, szintén kizárásra kerültek a vizsgálatból.

A de Laforcade-féle SIRS kritériumrendszer alkalmazása a kórházi felvétel idején, az általunk vizsgált populációban nem segítette a szisztémás gyulladásos válaszreakció fennállásának megerősítését, illetve kizárását. A logisztikus regressziós modell alapján az Acute Patient Physiologic and Laboratory Evaluation rövidített pontozási rendszer alapján kalkulált APPLE_{fast} pontérték szignifikánsan korrelált a túlélés csökkenő esélyével ($p = 0,0420$). A kórházi felvétel időpontjában vett vérmintákból vizsgált hematológiai és klinikai kémiai paraméterek nem korreláltak a betegség kimenetelével.

Figyelemreméltó eredmény azonban, hogy a vizsgált populációban mind az emelkedett alap kortizolszint ($OR = 9,71$, $p = 0,0135$) mind az emelkedett stimulált kortizolszint ($OR = 3,69$, $p = 0,0311$) szignifikáns összefüggést mutatott a mortalitási rizikóval (Fisher-féle egzakt teszt).

Hasonlóan a korábban publikált eredményekhez, egyetlen kritikus állapotú kutya esetében sem detektáltunk valódi hypocortisolaemiát a rendelkezésre álló, populáció alapú referencia intervallumot figyelembe véve. A vizsgálati eredményeink alapján nem a hypocortisolaemia,

hanem a kórosan emelkedett alap és/vagy stimulált kortizolszint mutatott negatív összefüggést a túlélés valószínűségével.

Ez az ellentmondásos eredmény is ösztönzött bennünket arra, hogy a perifériás vérmintákban a glükokortikoidreceptor (cGR) mRNS expressziós szintjét vizsgálva összefüggést keressünk az expressziós szintek és a betegség kimenetele között. Ennek vizsgálatára 7 egészséges és 26 kritikus állapotú, SIRS-ben szenvedő kutya perifériás vérmintáját gyűjtöttük 2014 januárja és 2018 márciusa között.

Tekintve, hogy emberekben számos gyulladásos kórképben igazolták a glükokortikoidreceptor izoformák megváltozott expresszióját, így egy szeptikus peritonitisben szenvedő kutya vérmintáját újgenerációs mRNS-szekvenálással analizáltunk a feltételezett *NR3C1* gén transzkript variánsainak beazonosításához. Az mRNS-könyvtárt a KAPA Stranded mRNA-Seq Kit (Illumina, Roche) használatával, a gyártói alkalmazási előirat alapján hoztuk létre. A tisztított és trimmelt szekvenciák a Canis lupus Familiaris Assembly CanFam3.1 (Sep. 2011) alapján kerültek feltérképezésre a HISAT2 alignment program (v2.1.0) használatával. A CanFam3.1 referencia genom alapján ismert szekvenciák illesztésekor azonosításra került a cGR egy, a 7-es intron retencióját tartalmazó canine *NR3C1* transzkript variáns. A RNS-Seq során kapott szekvenciák megoszlásának elemzésekor, az intronok és a kódoló exonok vizsgálata alapján az *NR3C1* 7-es intronjának aránya az össz *NR3C1* exonhoz viszonyítva egy nagyságrenddel nagyobb volt, mint a globális intron: exon arány. Ez alapján a detektált 7-es intron retencióját tartalmazó *NR3C1* transzkript variáns nem artefakt vagy éretlen mRNS, hanem egy *bona fide* splice variáns. Az mRNS-Seq adatok alapján ez az eddig nem ismert izoforma expressziója a klasszikus cGR α transzkripthez viszonyítva kb. 20% volt.

Az *in silico* transláció alapján a 7-es intron retenciójával létrejött splice variáns egy, a 7-es intron elején lévő korai stop kodon okán egy 680 aminosav hosszúságú fehérjét kódol. A csonkolt fehérje a „klasszikus” glükokortikoidreceptorhoz (cGR α) képest 101 aminosavval rövidebb. A rövidülés a ligandkötő domén részleges hiányához vezet. Tekintve a szerkezetbeni homológiát a korábban már leírt humán és sertés GR-P izoformákkal a továbbiakban az újonnan talált kutya GR splice variánst cGR-P izoformaként hivatkozunk.

A cGR α és cGR-P splice variánsok általános jelenlétét TaqMan qPCR módszerrel egészséges és SIRS-ben szenvedő kutyák perifériás vérmintájában is igazoltuk. A SIRS kohort klinikopatológiai jellemzőit tovább vizsgálva, a korábbi eredményeinkkel összhangban, azt találtuk, hogy az alap kortizolszint szignifikánsan különbözött a nem-túlélők (medián: 320,0 nmol/l; 41,6 - 1366,0 nmol/l) és a túlélők között (medián: 131,0 nmol/l; (52,0 - 1131,0 nmol/l) ($p = 0,0336$).

Továbbá, a perifériás vérminták mRNS expressziós szintjét vizsgálva, a cGR α medián mRNS expressziója 5,6-szor nagyobb (0,3 - 26,3) volt a túlélő csoportban, mint az egészséges egyedekben ($p = 0,0008$), míg az expressziós szint statisztikailag nem különbözött az egészséges és a nem-túlélő csoportban ($p = 0,5360$). A cGR-P medián mRNS expressziója 9,8-szor nagyobb (0,3 - 22,8) volt a túlélő csoportban, mint az egészséges kohortban ($p = 0,0005$), és hasonlóan a cGR α expressziójához, a cGR-P expressziója a nem-túlélő, valamint az egészséges csoportban nem különbözött ($p = 0,3510$). Figyelemre méltó adat, hogy a cGR α /cGR-P arány medián mRNS expressziója nem különbözött szignifikánsan sem a túlélő sem a nem-túlélő csoportban ($p = 0,4337$), továbbá a kontroll csoportban sem ($p = 0,1738$). A cGR α és a cGR-P mRNS expresszió szoros korrelációja a vizsgált populációban a két splice variáns koregulációjára utal.

A kritikus állapotú betegekben a szisztémás gyulladás fennállása a HHM-tengely aktiválódásán keresztül hypercortisolaemia fennállásához, valamint a célsejtek fokozott glükokortikoid érzékenységéhez vezethet. Ebből adódóan a perifériás fehérvérsejtek fokozott cGR α és cGR-P mRNS expressziója egy adaptív mechanizmus része lehet SIRS betegekben, a kortizol gyulladáscsillapító hatású transzkripció-modulációjának fokozott szükségessége okán. Másfelől, a kritikus állapotú betegekben detektált jelentős hypercortisolaemia a glükokortikoidreceptor kifejeződésének mérséklődéséhez vezethet a ligand-indukálta receptor downreguláció miatt.

Számos humán tanulmányban publikálták már, hogy az emelkedett szérum kortizolszint és/vagy a perifériás fehérvérsejtek csökkent GR expressziója súlyosabb betegség lefolyáshoz vezet, illetve csökkent túlélési valószínűséggel jár együtt szeptikus- és nem szeptikus SIRS-ben szenvedő páciensekben. Tekintve, hogy a kutya számos gyulladással járó kórkép modellállata, így az eredményeink hozzájárulhatnak a humán glükokortikoidreceptor által mediált gyulladással járó jelátviteli utak további megismeréséhez.

3 Új tudományos eredmények

1. A kortikoszteroid elégtelenség szindróma előfordulásának vizsgálata az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatkórházában kezelt kritikus állapotú kutyák körében

A CIRCI tradicionális definíciója szerinti hypocortisolaemia fennállása egyetlen betegben sem volt igazolható a szérum kortizol populáció-alapú referencia tartományát figyelembe véve. Ellenben azok az egyedek, amelyeknek az alap, illetve stimulált kortizolszintje emelkedett volt, csaknem 10-szer, illetve 4-szer nagyobb eséllyel tartoztak a nem-túlélő betegcsoportba, összevetve azon kutyákkal, amelyeknek az alap, illetve stimulált kortizol koncentrációja a referenciatartományon belül volt mérhető.

2. Korábban nem azonosított kutya glükokortikoidreceptor transzkript variáns (cGR-P) leírása és általános jelenlétének igazolása egészséges és SIRS-ben szenvedő kutyák perifériás vérmintáiban

Egy szeptikus peritonitisben szenvedő kutya perifériás vérmintájából eddig ismeretlen kutya glükokortikoidreceptor izoforma (cGR-P) azonosítása RNA-Seq módszerrel és általános jelenlétének igazolása egészséges és SIRS-ben szenvedő kutyák perifériás vérmintájában TaqMan qPCR-rel.

3. A glükokortikoidreceptor α és P izoformák mRNS expressziós mintázatának vizsgálata egészséges és kritikus állapotú kutyák perifériás vérmintájában, különös tekintettel a túlélés valószínűségére

A szisztémás gyulladással járó válaszreakció szindrómában szenvedő kutyák perifériás vérmintáiban a medián cGR α és cGR-P mRNS expressziója nagyobb volt az egészséges kontroll csoport expressziós szintjeivel összevetve.

A SIRS-ben szenvedő kutyák perifériás vérmintáiban a cGR izoformáinak génexpressziós szintjét tovább vizsgálva, a cGR α medián mRNS expressziója 5,6-szor nagyobb volt a túlélő csoportban az egészséges egyedek értékeihez képest, de szignifikánsan nem különbözött a nem-túlélő és az egészséges kutyák között.

A cGR-P medián mRNS expressziója 9,8-szor nagyobb volt a túlélő csoportban, mint az egészséges kohortban, de szignifikánsan nem különbözött a nem-túlélő és az egészséges kutyák között.

Mivel a $cGR\alpha/cGR-P$ arány medián mRNS expressziója nem különbözött szignifikánsan a túlélő és nem-túlélő csoportban, így az általunk vizsgált betegcsoportban a SIRS-ben szenvedő kutyák túléléséhez a $cGR\alpha$ és a $cGR-P$ izoformák együttes, fokozott expressziója szükséges.

4 A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények

Lektorált, impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Csöndes Judit, Kiss Gergely, Máthé Ákos, Vajdovich Péter: **Hypocortisolaemia és glükokortikoid-rezisztencia kritikus állapotú kutyákban. Irodalmi összefoglaló**, Magyar Állatorvosok Lapja, 138. 681-693. 2016.

Judit Csöndes, Ibolya Fábián, Bernadett Szabó, Ákos Máthé and Péter Vajdovich: **Assessment of Adrenocortical Reserve Capacity and Inflammatory Parameters in Critically Ill Dogs**, Acta Veterinaria Hungarica, 65. 475-486, 2017.

Brigitta Margit Kállai, Judit Csöndes, Gergely Kiss, Lilla Bodrogi, Zsolt Rónai and Tamás Mészáros: **Restrained expression of canine glucocorticoid receptor splice variants α and P prognosticates fatal disease outcome in SIRS**, Scientific Reports, 11. 24505 2021.

Konferencia prezentációk

Judit Csöndes, Bernadett Szabó, Péter Vajdovich: **Clinical and laboratory evaluation of critically ill dogs suffering from inflammatory or neoplastic disorders**
Poster presentation FECAVA-SEVC Congress Barcelona; October 15-17. 2015

Judit Csöndes, Ibolya Fábián, Ákos Máthé, Bernadett Szabó, Péter Vajdovich: **Assessment of Adrenocortical Reserve Capacity and Inflammatory Parameters in Critically Ill Dogs**. Free communication ESVCP Congress London; September 7-9. 2017

5 Köszönetnyilvánítás

Közel egy évtizede, hogy a kutatási témavázlatommal megkerestem későbbi témavezetőimet, Dr. Vajdovich Pétert és Dr. Máthé Ákost. A lelkesedésem és kíváncsiságom a téma iránt a mai napig változatlan, de ez a munka nem valósulhatott volna meg ebben a formában a témavezetőim és a kutatásban résztvevő kollégák kitartó támogatása és szakmai segítségével nélkül.

Témavezetőnek, Dr. Vajdovich Péternek köszönöm, hogy biztosította a doktori tanulmányaim és a kutatómunkám megkezdését, valamint a támogatását, hogy önálló utakon járhattam.

Dr. Máthé Ákosnak, a dolgozat társtémavezetőjének köszönettel tartozom a klinikai endokrinológiai látásmód átadásáért, valamint az emberi és szakmai támogatásáért az évek során.

Számos kolléga vett részt a kutatómunkában, közülük szeretném kiemelni Dr. Kiss Gergelyt, aki motorja volt ennek a kutatási projektnek. Gergővel való közös gondolkodás nélkül ezek az eredmények nem születtek volna meg.

Külön köszönettel tartozom továbbá a Semmelweis Egyetem Molekuláris Biológia Tanszék két kutatójának, Dr. Mészáros Tamásnak és Dr. Kállai Brigittának, akik osztoztak a kíváncsiságomban. A velük való közös munka során rengeteget tanultam. Kutatói szakértelmük nélkül biztosan nem jutottam volna el ideig.

A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz a minták előkészítésében, illetve feldolgozásában nyújtott segítségért Dr. Éder Katalinnak és Simon Tündének (Chromoscince Kft.), Dr. Bodrogi Lillának (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet), valamint Dr. Rónai Zsoltnak (Semmelweis Egyetem Molekuláris Biológia Tanszék) tartozom köszönettel. Köszönetemet szeretném kifejezni továbbá Dr. Bihari Zoltánnak és Bató Emesének (Xenovea Kft.) az újgenerációs szekvenálás elvégzéséért, valamint az eredmények kiértékelésében nyújtott segítségüket.

A vizsgálatokban résztvevő kritikus állapotú és egészséges kutyák vérmintáinak rutin laboratóriumi feldolgozása a Kórélettani és Onkológiai Tanszék laboratóriumában történtek. Szabó Bernadettnek és az egyetemi labor minden munkatársának köszönettel tartozom a gondos mintakezelésért és feldolgozásért.

Köszönetemet szeretném kifejezni jelenlegi munkahelyem, a Praxislab Kft. vezetőjének Dr. Balogh Nándornak, hogy támogatta a doktori kutatómunkám befejezését.

A Praxislab-os kollégáknak, különösen Dr. Kunos Viktóriának és Dr. Tóth Bálintnak köszönöm, hogy őszinte baráti biztatásukra mindig számíthattam.

Köszönöm a barátaimtól érkező „pozitív energiákat”, amik mindig épp akkor érkeztek, amikor a legnagyobb szükségem volt rájuk.

Végezetül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom családomnak, akik kezdettől fogva támogatásukról biztosítottak és hittek bennem és abban, amit célul tűztem ki magam elé.