

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola

**A kortikoszteroid-elégtelenség szindróma és a
perifériás fehérvérsejtek glükokortikoidreceptor
expressziójának vizsgálata kutyában**

PhD értekezés

dr. Csöndes Judit

2022

„Nem az a lényeges, hogy valamit elsőnek lássunk meg, hanem az, hogy szilárd kapcsolatot teremtsünk az előzőleg már megismert és az eddig ismeretlen között. Ez a tudományos felfedezés ábécéje..”

Selye János

Tartalomjegyzék

I. Rövidítések jegyzéke	4
II. Összefoglalás	7
III. Bevezetés	11
IV. Irodalmi áttekintés.....	13
1. Kritikus állapotú kutyák klinikopatológiai jellemzői.....	13
2. Szisztémás gyulladással járó válaszreakció, szepszis	13
2.1 Szepszis, súlyos szepszis, szepszisz sokk	14
3. A szisztémás gyulladás laboratóriumi vizsgálata a gyakorlatban.....	15
3.1 A gyulladással járó leukogram kutyában.....	15
3.2 A szérumban C-reaktív fehérje.....	16
4. Több szervi-diszfunkció szindróma	19
5. A kritikus állapotú kutyák felismerését segítő klinikai pontrendszerek	21
6. Hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely működése élettani és kóros körülmények között.....	24
5.1 A hipotalamusz-hipofízis- mellékvese tengely működése élettani körülmények között.....	24
5.2 Hormonális változások a kritikus állapotú betegekben	25
5.3 Critical Illness-Related Adrenocortical Insufficiency (CIRCI) - A kritikus állapotú betegek kortikoszteroid-elégtelenség szindrómája	27
7. A glukokortikoidreceptor és a glukokortikoidrezisztencia.....	36
6.1 A glukokortikoidok gyulladáscsökkentő és immunmoduláló hatása	36
6.2 A glukokortikoidreceptor és izoformái.....	38
6.3 A glukokortikoidrezisztencia	45
V. Anyag és módszer	48
1. A vizsgált populáció: kritikus állapotú kutyák és a kontroll csoport	48
2. Mintavétel és vizsgálati módszerek	49
2.1 Rutin hematológiai és biokémiai vizsgálatok	49
2.2 Az alacsony dózisu ACTH-stimulációs teszt és szérumban kortizolszint meghatározása.....	50
2.3 A perifériás vérminta RNS tartalmának kivonása, tisztítása, minőség ellenőrzés és cDNA formában történő átírása	50
2.4 A cGR izoformák új generációs RNS szekvenálással (RNA-Seq) történő bioinformatikai azonosítása.....	50
2.5 Glukokortikoidreceptor mRNS expresszió vizsgálata egészséges és klinikailag beteg kutyák perifériás vérmintájából (két-lépcsős RT-qPCR)	51
2.6 In silico vizsgálatok	52
3. Statisztika	53
4. Célkitűzés	54

VI. Eredmények.....	56
1. A kritikus állapotú kutyák kortizolválasz készségének vizsgálata és összevetése a szisztémás gyulladás mértékét mutató paraméterekkel és betegség kimenetelével	56
2. A Glükokortikoidreceptor P izoforma detektálása kritikus állapotú kutya perifériás vérmintájából mRNA-Seq módszerrel	61
3. Glükokortikoidreceptor izoformák mRNS expressziójának vizsgálata egészséges és kritikus állapotú kutyák perifériás vérmintájából	63
4. A perifériás fehérvérsejtek glükokortikoidreceptor izoformáinak expressziós mintázata egészséges és kritikus állapotú kutyákban, különös tekintettel a lehetséges összefüggésre az expressziós mintázat és túlélés valószínűsége között.....	65
VII. Megbeszélés.....	70
1. A kritikus állapotú kutyák kortizol válaszkészségének vizsgálata és összevetése a szisztémás gyulladás mértékét mutató paraméterekkel, valamint a betegség kimenetelével	70
2. A Glükokortikoidreceptor P izoforma detektálása kritikus állapotú kutya perifériás vérmintájából mRNA-Seq módszerrel	75
3. Glükokortikoidreceptor izoformák mRNS expressziójának vizsgálata egészséges és kritikus állapotú kutyák perifériás vérmintájából	78
4. A perifériás fehérvérsejtek glükokortikoidreceptor izoformáinak expressziós mintázata egészséges és kritikus állapotú kutyákban, különös tekintettel a lehetséges összefüggésre az expressziós mintázat és a túlélés valószínűsége között.....	79
VIII. Új tudományos eredmények	81
1. A kortikoszteroid elégtelenség szindróma előfordulásának vizsgálata az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatkórházában kezelt kritikus állapotú kutyák körében	81
2. Korábban nem azonosított kutya glükokortikoidreceptor transzkript variáns (cGR-P) leírása és általános jelenlétének igazolása egészséges és SIRS-ben szenvedő kutyák perifériás vérmintáiból.....	81
3. A glükokortikoidreceptor α és P izoformák mRNS expressziós mintázatának vizsgálata egészséges és kritikus állapotú kutyák perifériás vérmintájában, különös tekintettel a túlélés valószínűségére	81
IX. Irodalomjegyzék.....	83
X. A doktori kutatás eredményeinek közlései.....	102
XI. Köszönetnyilvánítás.....	104
XII. Mellékletek.....	106

I. Rövidítések jegyzéke

ABCB1: ATP-binding cassette sub-family B member 1

ACTH: Adrenokortikotrop hormon

ALT: Alanin-aminotranszferáz

ALKP: Alkalikus foszfatáz

AKI: Acute Kidney Injury

APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation

APPLE_{full} score és APPLE_{fast} score: Acute Patient Physiologic and Laboratory Evaluation
(teljes és rövidített pontozási rendszer)

AP-1: Activator protein-1

ARDS: Akut Respirációs Distressz Szindróma

AVP: Arginin-vazopresszin

CBG: Corticosteroid-binding globulin

cDNS: komplementer DNS (RNS mintáról szintetizálódott DNS szál)

cGR α : Kutya glükokortikoidreceptor α -izoforma

cGR-P: Kutya glükokortikoidreceptor P-izoforma

CIRCI: Critical Illness-Related Corticosteroid Insufficiency

CRH: Corticotrop-releasing hormon

CRP: C-reaktív fehérje

C_T: Cycle threshold (qPCR reakcióban)

CTD: C-terminális domén

DBD: DNS-kötő domén

DHEAS: Dehidroepiandroszteron és dehidroepiandroszteron-szulfát

DIC: Disszeminált Intravascularis Coagulatio

FAM: Fluoreszcein-amidit

GLK: Glükokortikoid

GR: Glükokortikoidreceptor

GREs: Glucocorticoid Responsive Elements

HEX: Hexakloro-fluoreszcein

hGR α : Humán glükokortikoidreceptor α -izoforma

hGR β : Humán glükokortikoidreceptor β -izoforma

hGR-P: Humán glükokortikoidreceptor P-izoforma

HDL: High-density lipoprotein

HHM: Hipotalamusz-hipofízis-mellékvese

IL-1 β : Interleukin-1 β

IL-6: Interleukin-6

LBD: Ligandkötő domén

MIF: Macrophage migration inhibitory factor

MODS: Multiple Organ Dysfunction Syndrome

MDR: Multi Drug Resistance

mRNS: messenger RNS

NF- κ B: Nuclear factor- κ B

nGRE: negative Glucocorticoid Responsive Elements

NR3C1: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1

NTD: N-terminális domén

ORF: Open Reading Frame ("nyitott leolvasási keret", amely a DNS-szekvenciában lévő fehérjekódoló régió-jelölt területek előzetes azonosítását segíti)

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

PCR: Polimeráz láncreakció

POMC: Proopiomelanocortin

qPCR (real-time PCR): kvantitatív polimeráz láncreakció

RAI: Relative Adrenal Insufficiency

RIN: RNA Integrity Number

RNA-Seq: RNA sequencing (ún. újgenerációs szekvenálási technika, amivel az adott időpontban jelen lévő és mennyiségű RNS-t lehet kimutatni a vizsgált mintában)

RPS5: Ribosomal protein S5

SIADS: Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone Secretion

SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment

TBG: Thyroxine-binding globulin

TGF β : Transforming Growth Factor- β

TNF α : Tumor Necrosis Factor- α

11 β -HSD: 11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz

II. Összefoglalás

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

A Critical Illness-Related Corticosteroid Insufficiency (CIRCI) a humán gyógyászatban jól ismert entitás (Beishuizen and Thijs, 2001; Venkatesh and Cohen, 2011), de kutyákban is dokumentálásra került már (Goy-Thollot et al., 2006; Burkitt et al., 2007; Martin et al., 2008; Creedon, 2015). A CIRCI definíciója szerint csökkent kortizol termelést és/vagy glükokortikoid rezisztenciát jelent kritikus állapotú betegekben (Marik et al, 2008, Burkitt Creedon, 2015). Valójában a csökkent kortizolszekréció nem feltétlenül okoz abszolút értelemben vett hypocortisolaemiát, hanem a fennálló szisztémás gyulladás csillapításához szükséges elégtelen mértékű kortikoszteroidhatást is jelenthet (Galac et al, 2010; Venkatesh - Cohen, 2011; Bhatia et al, 2014).

A glükokortikoidok fontos szerepet töltenek be a hemodinamikai stabilitás fenntartásában és a gyulladásos folyamatok szabályozásában (van den Berghe, 2003; Gibson et al, 2005; Annane, 2011). A gyulladáskeltő- és csillapító citokinek egyensúlyának felborulása szisztémás gyulladásos válaszreakció (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS), továbbá többszervi diszfunkció szindróma (Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS) kialakulásához is vezethet (Johnson et al, 2004; Singer et al, 2004), amelyek a kórházi tartózkodás meghosszabbodását, illetve magasabb mortalitási rátát okozhatnak (Sweeney et al, 2010).

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. Azon betegek automatikusan kizárására kerültek a vizsgálatból, 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 betegek, amelyek anyagi korlátok miatt kerültek végleges elaltatásra, szintén kizárásra kerültek a vizsgálatból.

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 vizsgált hematológiai és klinikai kémiai paraméterek nem korreláltak a betegség kimenetelével. Azonban figyelemreméltó eredmény, 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 (Prittie et al., 2002; Goy-Thollot et al., 2006; Martin et al., 2008; Marchetti et al., 2021). 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 kimenetel 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 gyulladáscsökkentő kórképben igazolták a glükokortikoidreceptor izoformák megváltozott expresszióját, így egy szepszisben 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 transzkripcióhoz 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 izoformával a továbbiakban az újonnan talált kutya GR splice variánst cGR-P izoformaként hivatkozunk.

A cGR α és cGR-P splice variánsok jelenlétét Taq-Man 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 a egészséges kohortban ($p = 0,0005$), és hasonlóan a cGR α expresszióhoz, 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 ($p = 0,1738$).

Az egészséges egyedek expressziós szintjéhez viszonyítva, sem a cGR α , sem a cGR-P génexpressziója nem emelkedett meg szignifikánsan a nem-túlélő csoportban, ellentétben a szignifikáns mRNS expresszió növekedéssel a túlélő egyedekben. 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 (Peeters et al, 2009). 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 (Hagendorf et al, 2005, Nicolaidis et al., 2014).

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

III. Bevezetés

A kutatás célja a HHM-tengely működésének vizsgálata volt kritikus állapotú kutyákban, különös tekintettel az ún. kritikus állapotú kutyák kortikoszteroid-elégtelenség szindrómájának, valamint a perifériás fehérvérsejtek glükokortikoidreceptor expressziós mintázatának vizsgálatára.

A munkahipotézis szerint a relatív hypocortisolaemia, amit a HHM-tengely elégtelen aktiválódása eredményezhet, valamint a glükokortikoidrezisztencia, amit a célsejtek nem megfelelő válaszkészsége válthat ki, a túlélés esélyét csökkenthetik kritikus állapotú kutyákban.

A Critical Illness-Related Corticosteroid Insufficiency (CIRCI) szindróma az emberorvoslásban már 1982 óta ismert és kezdetben „relatív adrenalis elégtelenség” (RAI, Relative Adrenal Insufficiency) néven írták le a szakirodalomban. Azóta, bár a kórkép elnevezését több alkalommal módosították, a humán medicinában kiemelt figyelmet szentelnek a kritikus állapotú betegek adrenalis válaszkészségének és glükokortikoid rezisztenciájának vizsgálatára (Prigent et al, 2004; Gibson et al, 2005, Venkatesh - Cohen, 2011; Boonen - Van den Berghe, 2016, Dendoncker - Libert, 2017). A HHM-tengely működését kritikus állapotú kutyákban a 2000-es évek óta kutatják (Martin et al, 2008; Galac et al, 2010; Prittie, 2009; Sweeney et al, 2010; Burkitt Creedon, 2015).

A glükokortikoidrezisztencia molekuláris mechanizmusa összetett, számos folyamat állhat önállóan vagy többedmagával a háttérben (Yudt - Cidlowski, 2002; Barnes - Adcock, 2009, Venkatesh - Cohen, 2011; Souza et al, 2014; Vandevyver et al, 2014). A humán glükokortikoidreceptor splice variánsainak fokozott kifejeződése és a sejtek glükokortikoid érzékenységének megváltozása közötti kapcsolatot számos *in vitro* és *in vivo* kísérlet vizsgálta (Moalli et al, 1993; Gaiten et al, 1995; Krett et al, 1995; Leung et al, 1997; Parks et al, 1998; DeLange et al, 2001; Webster et al, 2001; Chikanza - Kozaci, 2004; Lewis -Tuffin - Cidlowski, 2006; Ito et al, 2006; Marik et al, 2008; Tait et al, 2008; Ledderose et al, 2012; Guerrero et al, 2013; Oakley - Cidlowski, 2013).

A kisállat-gyógyászatban a sürgősségi beavatkozást és intenzív ellátást igénylő páciensek száma folyamatosan emelkedik, így e betegpopulációnak a kórélettani jellemzőinek vizsgálata és az egyes terápiás beavatkozások hatásának nyomon követése egyre fontosabbá válik a gyakorló állatorvosok számára is. A súlyos, életet veszélyeztető megbetegedésekben a fájdalom, a gyulladáskeltő citokinek, a szisztémás vagy lokális keringési zavar, valamint a hypoxia/hypoxaemia befolyásolják a neuroendokrin- és az immunrendszer működését (Van den Berghe, 2003; Martin et al, 2008).

A CIRCI a neuroendokrin és az immunrendszer közötti komplex és dinamikus interakció megváltozásának következménye. A kórélettani háttere összetett, mivel a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese-tengely bármely, vagy akár minden szintje egyidejűleg érintett lehet. Amennyiben a gyulladást kiváltó folyamatok a szabályozás hiányában „elszabadulnak”, ún. szisztémás gyulladással válaszreakció (Systemic Inflammatory Response Syndrome; SIRS), illetve akár többszervi-diszfunkció szindróma (Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS) is kialakulhat (Johnson et al, 2004; Singer et al, 2004). A megfelelően megválasztott és alkalmazott terápia ellenére is a betegek túlélés esélyei jelentősen csökkenhetnek, illetve a gyógyulás folyamata hosszabb ideig tarthat. A SIRS-ben szenvedő egyed korai felismerése és megfelelő ellátása növeli a páciens túlélési, illetve gyógyulási esélyeit (Sweeney et al, 2010).

IV. Irodalmi áttekintés

1. Kritikus állapotú kutyák klinikopatológiai jellemzői

A kisállat-gyógyászatban a kritikus állapotú beteg fogalma alatt azokat a pácienseket értjük, ahol az alapbetegségtől függetlenül (pl. gyulladásoos kórképek, daganatos megbetegedések, trauma stb.), de annak következtében kialakuló másodlagos szervfunkció zavarok miatt vagy azok helyettesítésének, illetve helyreállításának hiányában a páciens rövid időn belül, nagy eséllyel elpusztul. A kritikus állapot gyors és hatékony felismeréséhez egyes klinikai és laboratóriumi paraméterek, illetve ezek kombinációjából megalkotott pontrendszerek jelentősen hozzájárulhatnak.

A kritikus állapotú beteg vérében a gyulladáskeltő citokinek koncentrációja megemelkedik, ami szisztémás gyulladás kialakulásához vezethet. A szisztémás gyulladás lehet az alapbetegség része vagy következményesen kialakuló állapot is. A citokinek kis molekula-tömegű fehérjék, amelyek részt vesznek az egyes immunfolyamatok aktiválásában és lejátszódásában. A gyulladáskeltő citokinek közé tartoznak a tumor nekrozis faktor alfa (TNF- α), egyes interleukinek (pl. IL-1, IL-6, IL-12), és az interferon gamma (IFN- γ) is. A legfontosabb gyulladáscsökkentő citokinek pedig az IL-10, a transzformáló növekedési faktor β (TGF- β), valamint az IL-4 (DeClue et al, 2012; Schulte et al, 2013).

2. Szisztémás gyulladásoos válaszreakció, szepszis

A szisztémás gyulladásoos válaszreakció (SIRS) a szervezetet érő súlyos fertőző (pl. pyometra, bronchopneumonia, pyothorax, széptikus peritonitis, szepszis, babesiosis) vagy nem-fertőző eredetű kórok (pl. pancreatitis, hőtörlődás szindróma, égési sérülés, polytrauma, daganatos és immun-mediált kórképek) által kiváltott kaszkád-folyamat, amelyet a pro- és antiinflammatorikus citokinválasz egyensúlyának felborulása jellemez (DeClue, 2009; de Laforcade, 2009). A gyulladásoos reakció szabályozásának hiányában (fokozott TNF α -, IL-1-, IL-6-, prekallikrein-, bradykinin-, thrombocytá-aktiváló faktor citokinválasz) a gyulladásoos folyamatok „elszabadulnak”, melynek következményei a szervezet egészére kihatnak, és kezelés hiányában fatális kimenetellel járnak (DeClue, 2009; de Laforcade, 2009).

A SIRS nem-specifikus tünetekkel kísért klinikai szindróma, amelyet többszervi diszfunkció, perifériás vagy centrális keringési elégtelenség, valamint véralvadási zavarok is kísérhetnek (Annane, 2011, Osterbur et al, 2014). A SIRS és szövődményeinek kórélettani háttere összetett. A citokinek által kiváltott, fokozott endothel átérésztőképesség, a fokozott nitrogén-monoxid-szintáz termelődés, a vazopresszin- és/vagy kortizolhiány, illetve -rezisztencia okozta csökkent vascularis tónus hipotenzióhoz vezethet. Az ún. szöveti faktor fokozott

kifejeződése a fehérvérsejtek felületén, valamint az endogén antikoaguláns rendszer kimerülése véralvadási zavarok kialakulásához vezethet (de Laforcade, 2009; Boller - Otto, 2009). A veleszületett és szerzett immunitás nem megfelelő működése, a neuroendokrin rendszer aktiválódása, valamint az intermedier anyagcsere megváltozott működése is hozzájárulnak a kritikus állapot kialakulásához és progrediálásához (de Laforcade, 2009; Schulte et al, 2013).

A SIRS kezelése az alapbetegség gyógykezelésén kívül speciális terápiás megfontolásokat igényel (Declue, 2009). A szepszisben, illetve a SIRS-ben szenvedő betegek állapota kritikus, a mortalitási ráta még intenzív terápiás ellátás ellenére is jellemzően magas (van den Akker et al, 2009; Schulte et al, 2013).

2.1 Szepszis, súlyos szepszis, septicus sokk

Hasonlóan a humán konszenzusos irányelvben foglaltakhoz (Bone et al, 1992; Schulte et al, 2013) az állatorvosi gyakorlatban szepszis alatt a fertőző ágensek által kiváltott szisztémás gyulladós válaszreakció szindrómát értünk. Szűkebb értelemben véve a szepszis az egész szervezetre kiterjedő, elsősorban Gram-negatív baktériumok által kiváltott kontrollálatlan gyulladós válaszreakciót jelenti (Prechl - Gergely, 2012). Súlyos szepsziszről beszélünk, ha a SIRS fennállása mellett szisztémás hipotenzió, és/vagy bármely belső szerv funkciózavara, és/vagy hipoperfúzió okozta eltérések (lactacidaemia és/vagy oliguria) alakul(nak) ki. Szeptikus sokk esetén a megfelelő intravénás folyadékterápia ellenére akut keringési elégtelenség vagy perzisztáló artériás hipotenzió detektálható a septicus betegben (Dendoncker - Libert, 2017).

A SIRS-ben szenvedő kutyák hatékony felismerésére speciális kritériumrendszert állítottak fel, amely klinikai és laboratóriumi eltéréseket (hypothermia/hyperthermia, leukocytosis/leukopenia, a leukogram balra tolódása, tachycardia/bradycardia, tachypnoe) vizsgál, és a négy kritérium közül egyidejűleg legalább kettőnek kell teljesülnie a SIRS fennállásának igazolásához (**1. sz. táblázat**) (de Laforcade, 2009; DeClue, 2009).

1. sz. táblázat. SIRS-kritériumok kutyában (de Laforcade, 2009)

Paraméter	Érték
testhőmérséklet	<38,0°C vagy > 39,0°C
érverésszám	> 120/perc
légzésszám	> 20/perc
összfehérvérsejt szám, neutrophil grc. band arány	<6 G/l vagy >16 G/l >3%

Ez a kritériumrendszer ugyan nagyon érzékeny (szenzitivitás: 97%), de nem kellően specifikus (specifitás: 64%). Mivel a SIRS kritériumrendszerben vizsgált paraméterek nem-specifikusak, és az alapbetegség okozta eltérésekkel átfedést mutatnak, ezért célszerű más laboratóriumi módszerekkel is igazolni a szisztémás gyulladással járó válaszreakció fennállását (pl. toxikus neutrophil granulocyták jelenlétének kvalitatív és kvantitatív vizsgálata, gyulladással járó citokinek vérszintjének detektálása, akut fázis fehérjék vérszintjének változásának nyomon követése, szervfunkciók monitorozása) (Boller - Otto, 2009).

3. A szisztémás gyulladás laboratóriumi vizsgálata a gyakorlatban

A szisztémás gyulladás fennállásának számos klinikai (pl. testhőmérséklet emelkedése, bágyadság) és laboratóriumi (pl. leukocytosis/leukopenia, a leukogram balra tolódása, fokozott vörösvérsejt-süllyedés, szérum fehérjeelektroforézis eltérései, gyulladással járó citokinek és akut fázis fehérjék koncentrációjának változása) paramétere ismert (Stockham - Scott, 2008; Latimer, 2011).

3.1 A gyulladással járó leukogram kutyában

A gyulladással járó leukogramot el kell különíteni az ún. fiziológiás leukocytosistól, ami az „alarm” reakciót kíséri, illetve a szteroid-indukálta fehérvérsejtszám emelkedéstől (Schultze, 2010).

Az „alarm” reakció során a leukocytosis azonnali, de általában enyhe mértékű és az érett, szegmentált neutrophil granulocyták, valamint a lymphocyták kismértékű, átmeneti emelkedését okozza kutyában (Schultze, 2010). Ezzel ellentétben, az endogén vagy exogén kortikoszteroidok hatására az összfehérvérsejtszám néhány órán belül átmenetileg, vagy tartósan megemelkedik, de a leukocytosis mértéke itt elérheti, sőt olykor meghaladja a mérsékelt (15,0 - 25,0 G/L) szintet. Az érett neutrophil granulocyták számának megemelkedése mellett a monocytosis, valamint a lympho- és eosinopenia megjelenése is jellemezheti a „stressz leukogramot” (Tvedten et al, 2019).

A gyulladással járó leukogram a szervezet általános válasza fertőző vagy nem fertőző háttérű gyulladással járó kórképekre. Perakut folyamat fennállása esetén az összfehérvérsejtszám lecsökkenhet (leukopenia), elsősorban a neutrophil granulocyták megfogyatkozása (neutropenia) miatt. Néhány óra elteltével a csontvelőből a vérkeringésbe kerülő neutrophil granulocyták miatt a leukocytosis/neutrophilia lesz jellemző (akut gyulladás). A gyulladás akut szakaszában az érett, szegmentált magvú neutrophil granulocyták mellett a fiatalabb neutrophil granulocyták (ún. band, metamyelocyta, myelocyta alakok) száma is megemelkedhet (a leukogram balra tolódása). A neutrophil granulocyták a vérkenet fénymikroszkópos vizsgálata során ún. toxikus változás jeleit (Döhle testek, basophil, vakuolizált cytoplazma, illetve toxikus granuláció megjelenése) is mutathatják.

Ezzel egyidejűleg lymphopenia, eosinopenia is tapasztalható, a monocyták száma pedig normál vagy emelkedett lehet. Ez utóbbi eltérések az akut gyulladás során már a gyulladásos folyamat által indukált endogén glükokortikoidválasz következményei. Ha az akut gyulladás fennállása nem szűnik meg, akkor a folyamat akár néhány nap elteltével krónikussá válhat. A krónikus gyulladás leukogramjára a neutrophilia (balra tolódással vagy a nélkül) jellemző, a többi fehérvérsejttípus számának alakulása változatos lehet. A gyulladásos leukogram egy speciális formája az ún. extrém neutrophiliás leukocytosis (korábbi nevén leukaemoid reakció), amikor a neutrophil granulocytá sejttség jellemzően meghaladja a 80.0 G/l-t és ezt általában jelentős balra tolódás és toxikus eltérések megjelenése kíséri. Lymphocytosis és eosinophilia szintén kialakulhat. Extrém neutrophiliás leukocytosis jellemzően krónikus, lokalizált fertőzés/gyulladás (pl. peritonitis, pyometra, immun-mediált haemolyticus anaemia) fennállására utal (Schultze, 2010).

2.2 A szérumban C-reaktív fehérje

Az akut fázis fehérjék (AFF) az ún. akut fázis reakcióban részvevő proteinek. Az akut fázis reakció a természetes immunválasz része. A folyamat nem specifikus, bármilyen szöveti károsodás kiválthatja, ugyanakkor a károsodást követően röviddel már megkezdődik, akár a klinikai tünetek megjelenése előtt vagy azzal egy időben, de mindenképpen korábban, mint a specifikus immunválasz megjelenése (Cerón et al, 2005; Eckersall - Bell, 2010). Az akut fázis reakció nemcsak az immunrendszer aktiválódását jelenti, hanem számos más szervrendszer megváltozott működését vonja maga után: pl. fokozott glükoneogenezis, valamint lipolízis és fehérje katabolizmus, csökkent szérumban vas- és cinkkoncentráció, emelkedett kortizol- és csökkent tiroxinszint, valamint az egyes plazmafehérjék koncentrációjának megváltozása (Cerón et al, 2005). Az akut fázis reakció lezajlása és az egyes akut fázis fehérjék termelődése jelentősen különbözik az egyes fajokban (pl. a kutya egyik fő AFF-je a C-reaktív fehérje, míg macskában gyulladásos citokinek hatására nincs CRP-válasz). Az akut fázis fehérjék gyulladásos citokinek (pl. IL-1, IL-6, TNF α) hatására döntően a májban termelődnek, és a természetes immunválasznak nemcsak markerei, hanem aktív résztvevői is. Szerepük van például az opszonizáció és fagocitózis fokozásában, az extracelluláris mátrix stabilizálásában, valamint a komplement kaskád aktiválásában is (Cerón et al, 2005; Murata et al, 2004). Az akut fázis fehérjék többféle szempont szerint csoportosíthatók, de leggyakrabban az akut fázis reakció során végbemenő koncentráció-változásuk dinamikáját figyelembe véve megkülönböztetünk negatív (csökkenő koncentrációjú) és pozitív (emelkedő koncentrációjú) akut fázis proteinek (Eckersall - Bell, 2010, Latimer, 2011). A negatív AFF-k közül a legismertebb az albumin és transferrin, de negatív akut fázis protein pl. a tiroxin- és kortizolkötő fehérje (TBG, CBG) is. A pozitív AFF-k a vérplazma-koncentrációjuk megemelkedésének mértéke és időbeni lezajlása alapján fő („major”), mérsékelt („moderate”)

és mellék („minor”) alcsoportokba sorolhatóak (**2. sz. táblázat**). A fő pozitív AFF-k (pl. C-reaktív fehérje, szérum amyloid A) vérplazmaszintjére jellemző, hogy egészséges egyedben nagyon alacsony koncentrációban vannak jelen, gyulladásos citokinek hatására a vérplazmaszintjük akár 100-1000x emelkedést is mutathat. Koncentrációjuk a károsító stimulust követően néhány órán belül már megemelkedik, 24-48 órán belül eléri a maximumszintjüket, és a kiváltó inzultus elmúltával a koncentrációjuk nagyon rövid időn belül jelentősen lecsökken. Ha a kiváltó gyulladáskeltő tényező nem szűnik meg, úgy vérplazma-koncentrációjuk tartósan emelkedett marad. A mérsékelt pozitív akut fázis fehérjék (pl. haptoglobin, α -savas glikoprotein, cöruoplazmin) egészséges egyed vérplazmájában is detektálhatóak, azonban proinflammatorikus citokinek hatására vérplazma-koncentrációjuk 2-10x-re emelkedik. Az emelkedésük jellemzően nemcsak mérsékeltebb a fő AFF-hez képest, hanem időben elhúzódóbb is (csúcskoncentráció 2-3 nappal a kiváltó ingert követően alakul ki), akárcsak a koncentráció-csökkenésük a kiváltó hatás megszűnését követően. A mellék vagy minor pozitív akut fázis fehérjék (pl. hepcidin) egészséges egyedben is jelen vannak, vérplazmaszintjük gyulladásos válaszreakció során jellemzően 50-100%-kal emelkedik meg. A rutin klinikai gyakorlatban általában nem kerülnek meghatározásra (Eckersall - Bell, 2010).

2. sz. táblázat. A legfontosabb akut fázis fehérjék kutyában. (Cerón et al: Acute phase proteins: current knowledge and future perspectives, Vet Clin Path., 34. 85-99, 2005.)

Pozitív		Negatív
Fő	Mérsékelt	
C-reaktív fehérje, szérum amyloid A	cöruoplazmin, haptoglobin, α -savas glikoprotein	albumin, transzferrin

Az akut fázis fehérjék tehát kvantitatív jelzői a szisztémás gyulladásnak, és a vérplazma-koncentrációjuk sorozatmérésével a gyulladásos folyamat időbeni lezajlása is jól nyomon követhető. Az AFF-k nagyon érzékeny, de a válaszreakció kiváltó okát tekintve nem-specifikus markerei a gyulladásnak. Minden olyan folyamat, ami a gyulladáskeltő citokinek koncentrációjának megemelkedésével jár (pl. fertőző betegség, immun-mediált folyamat, szöveti nekrozis, fizikai trauma, daganat) az az akut fázis proteinek vérplazma koncentrációjának megváltozását idézi elő (Cerón et al, 2005; Stockham - Scott, 2008).

A klinikai gyakorlatban, kutyákban az alábbi kórképekben javasolt az akut fázis fehérjék meghatározása és nyomon követése:

Fertőző és nem-fertőző oktanú gyulladással megbetegedések: pl. parvovirus (Kocaturk et al, 2010; McClure et al, 2013), széptikus oktanú pleuritis/peritonitis és szepszis (Gebhardt et al, 2009), pyometra (Dabrowsky et al, 2009), szövődményes babesiosis (Matijatko et al, 2007), perioperatív széptikus szövődmény (Christensen et al, 2015), hasnyálmirigy gyulladás (Keany et al, 2021), pneumonia (Yamamoto et al, 2011), illetve SIRS fennállásának megerősítésére (Torrente et al, 2015). Továbbá, immun-mediált kórképek esetén: pl. szteroidreszponzív meningitis-arteritis (Bathen-Noethen et al, 2008), immun-mediált haemolyticus anaemia (Griebsch et al, 2009; Mitchell et al, 2009), immun-mediált polyarthritis (Kjelgaard-Hansen et al, 2006), gyulladással bélbetegség (Jergens et al, 2003), valamint immunszuppresszált beteg állapotának nyomon követésére (Merlo et al, 2007; Mischke et al, 2007).

Az akut fázis fehérjék termelődésére az életkor általában nincs szignifikáns hatással, kivéve a 6 hónap alatti pediátriai betegeket, ahol enyhe fokú AFF-szint emelkedés is komoly beszámítás alá tartozik. Az egyes fajok és fajták között az AFF-k tekintetében azonban érdemi különbségek vannak. Az ivar néhány kivételtől eltekintve nincs hatással az akut fázis fehérjék termelődésére. Egészséges egyedben az akut fázis fehérjék produkciójában nem figyelhető meg cirkadián ritmus vagy „napok közötti” variáció, de az interindividuális eltérések jelentősek lehetnek, és erre hatással vannak pl. a tartási körülmények is (nagyon tiszta kenneben tartott vs. tanyán élő kutya). Egészséges kutyák sorozatmintáit vizsgálva azt tapasztalták, hogy az intra- és interindividuális eltérések okán a populáció alapú referencia tartomány nem feltétlen használható önmagában az adott egyedben mért szérum C-reaktív fehérje szint elbírálásakor (Carney et al, 2011).

Az akut fázis válaszreakcióra (és így az AFF-k termelődésére) nincs hatással pl. *lege artis* kivitelezett vénaszúrás, subcutan beadott injekció vagy fiziológiás sóoldat intravénás beadása, ugyanakkor egyes gyógyszerek (pl. glükokortikoidok, citosztatikumok) jelentős hatással bírnak az akut fázis fehérjék szintézisére (Cerón et al, 2005).

A C-reaktív fehérje a legrégebb óta ismert fő AFF emberben. A fehérje elnevezése onnan származik, hogy 1930-ban Tillett és Francis *Pneumococcus C* fertőzésben szenvedő páciensek vérében detektálta először a *Pneumococcus* baktérium „C” poliszacharidjával reagáló molekulát. A CRP, hasonlóan más AFF-hez, nemcsak markere, hanem résztvevője is az akut fázis válaszreakciónak. Szerepe elsősorban a komplement molekulák kötődésének elősegítése, a citokinek termelésének indukciója, valamint a kemotaxis gátlása (Cerón et al, 2005). A kutya C-reaktív fehérjéje egy 100kD-os pentamer molekula, szerkezetét tekintve csak részben egyezik meg a humán CRP-vel, így méréséhez fajspecifikus módszer beállítása

szükséges (Eckersall - Bell, 2010). A szérumban CRP meghatározására a klinikai laboratóriumi gyakorlatban ELISA vagy immunturbidimetriás mérési módszerek használhatóak (Murata et al, 2004; Stockham - Scott, 2008; Hillström et al, 2014). A szérumban a C-reaktív fehérje 4°C-on tárolva néhány napig, -20°C-on fagyaszta pedig hónapokig stabil (Cerón et al, 2005).

A szisztémás gyulladással fennállásának igazolására, illetve kizárására az akut fázis fehérjék mérésének előnye más laboratóriumi diagnosztikai markerekhez (pl. gyulladással leukogram megjelenése, fokozott vörösvérsejt-süllyedés) képest az automatizált és gyors meghatározáson túl, hogy ezeknek a paramétereknek magas a szenzitivitása, továbbá a gyulladással állapot korai felismerését teszik lehetővé (pl. szubklinikai állapotok). Myelosuppressio fennállása esetén pedig csaknem az egyetlen diagnosztikai módszer a szisztémás gyulladással kimutatására a rutin állatorvosi klinikai gyakorlatban. Az AFF-k vérplazma-koncentrációjának változása jól korrelál a gyulladással folyamat kiterjedésével és mértékével, valamint sorozatmérés során alkalmas a betegség, illetve az alkalmazott terápia hatékonyságának nyomon követésére, továbbá pl. a posztoperatív komplikációk korai kimutatására. Az akut fázis fehérjék diagnosztikai értékét befolyásolja, ha szisztémás gyulladással folyamat fennállásával egyidőben fehérjevesztő kórképek vagy súlyos fokú májfunkciózavar áll fenn (Cerón et al, 2005).

4. Többszervi-diszfunkció szindróma

A SIRS miatt kialakuló többszervi funkciózavar szindróma jellemzően 2 vagy több szervet érintő másodlagos kórkép, melynek kialakulása még célirányos beavatkozás esetén is jelentősen csökkentheti az egyed túlélésének esélyét (Declue, 2009; Kenney et al, 2010, Osterbur et al, 2014). A klinikai gyakorlatban a tüdő-, a vesefunkció, a gyomor-bél csatorna- és a májműködés, a szív és keringési rendszer, a központi idegrendszer, az endokrin szabályozás, valamint a hemosztázis megváltozott működését detektálhatjuk a fizikális és kiegészítő laboratóriumi vizsgáló módszerekkel (Johnson et al, 2004; Kenney et al, 2010).

A többszervi funkciózavar szindróma kóroktanában szerepet játszhatnak a gyulladással keltő citokinek (pl. $TNF\alpha$, IL-6, IL-1 β) fokozott aktivitása miatt bekövetkező közvetlen sejtfunkciókárosodás, valamint a sejtek megváltozott metabolikus aktivitása, továbbá a keringő vérvolumen csökkenése (hypovolaemia, hypotonia) illetve a mikrocirkulációs zavarok következtében kialakuló szöveti hypoxia is (Singer et al, 2004; Osterbur et al, 2014). A bekövetkezett károsodás mértékétől és a fennállásának időtartamától függően a működészavar lehet átmeneti, de bekövetkezhethet akár végleges strukturális károsodás is. Kutyaiban MODS fennállása esetén az egyes szervek diszfunkciója klinikopatológiailag jól nyomon követhető.

A májműködés beszűkülése esetén hypoalbuminaemiát, hypoglykaemiát, csökkent karbamid-, és koleszterinszintet, illetve emelkedett laktátszintet és csökkent laktátklírenszt, továbbá emelkedett alanin-aminotranszferáz (ALT) - és alkalikus foszfatáz (ALKP) - aktivitást, hyperbilirubinaemiát, valamint a véralvadási idők meghosszabbodását detektálhatjuk (Johnson et al, 2004; Osterbur, et al, 2014). A szeptikus betegekben tapasztalt cholestasisban szerepe lehet a hepatocyták megváltozott epesavmetabolizmusának is (Dendoncker - Libert, 2017).

A hemosztázis zavara a véralvadási-készség fokozódásában, az endogén antikoaguláns rendszer kimerülésében, illetve fokozott fibrinolízisben nyilvánulhat meg. A DIC lehet okkult vagy vezethet életet veszélyeztető szervfunkciós zavarokhoz. Laboratóriumi vizsgálatokkal a thrombocytaszám csökkenését vagy emelkedését, megnyúlt aktivált parciális tromboplastin időt, prothrombin időt és thrombin időt, továbbá a fibrin(ogén)-degradációs proteinek koncentrációjának emelkedését, illetve az antithrombin III-aktivitás csökkenését igazolhatjuk (Osterbur et al, 2014).

A szív- és érrendszer érintettsége szisztémás gyulladással válaszreakcióban nem ritka és szisztémás hipotenzióban, illetve csökkent myocardialis kontraktilitásban nyilvánulhat meg. A betegvizsgálat során tachycardiát, súlyos esetben bradycardiát, illetve arrhythmiát tapasztalhatunk. A páciensekben az adekvát folyadékterápia és vazopresszor-kiegészítés ellenére szisztémás hipotenzió alakulhat ki, ami a vérerek és a szívizom adrenerg receptorainak katekolaminokra adott csökkent válaszkészségének a következménye (Osterbur et al, 2014). Langhorn és mtsai (2014) szisztémás gyulladással válaszreakcióban szenvedő kutyák szérummintájában vizsgálta a szívizom-eredetű troponin I- (cTnI) koncentrációt és annak változását a betegség kimenetelének függvényében. A kórházi felvételkor mért cTnI-koncentráció, valamint a hospitalizáció során detektált legmagasabb troponin I-szint szignifikánsan befolyásolta az egyéves túlélés valószínűségét.

A szisztémás gyulladással válaszreakció során a gyulladáskeltő citokinek a vese hámsajtjeinek apoptózist indukálhatják. Súlyos esetben akár akut tubularis nekrosis is kialakulhat, ami csökkent glomerulus filtrációs rátához, ezáltal beszűkült veseműködéshez vezet (acute kidney injury, AKI). A vizelettermelődés mértékének monitorozása, valamint a vér kreatinin-koncentrációjának sorozatmérése segít megítélni az akut vesefunkciókárosodás mértékét (Johnson et al, 2004).

Kritikus állapotú betegben az artériás vérgázanalízis során a PaO_2 : FiO_2 arány és az ún. alveoláris-artériás oxigén gradiens (A-a gradiens) vizsgálatával az akut respirációs distressz szindróma (ARDS), illetve az artériás hypoxaemia kialakulása igazolható (Johnson et al, 2004).

A gyomor-bélrendszer motilitásának csökkenése, a bélnyálkahártya permeabilitásának fokozódása elősegíti a bakteriális transzlokáció kialakulásának esélyét, amely tovább csökkenti a SIRS-ben szenvedő beteg túlélési esélyeit. Klinikailag étvágytalanság, hányás, véres, híg bélsár ürítése hívja fel a figyelmet a gyomor-bélcsatorna érintettségére (Declue, 2009; Osterbur et al, 2014).

A neuroendokrin rendszer megváltozott működése miatt a kritikus állapotú betegben inzulinrezisztencia, sick euthyreoid szindróma, relatív adrenalis elégtelenség, valamint a vazopresszin megváltozott termelődése és elválasztása okozta folyadék- és elektrolitháztartási zavar (Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone Secretion) is kialakulhat. A kritikus állapotú beteg endokrinológiai vizsgálata és az eltérések kezelése akár életmentő beavatkozás is lehet (Singer et al, 2004; Osterbur et al, 2014).

A központi idegrendszer érintettsége MODS-ban nem ritka, ugyanakkor ennek laboratóriumi módszerekkel történő vizsgálata az állatorvosi klinikai gyakorlatban ritkán valósítható meg. A metabolikus encephalopathiákon túl a központi idegrendszer primer károsodása (vérkeringési- és véralvadási zavarok, nekrozis, apoptózis) is bekövetkezhet SIRS során, ennek leggyakoribb klinikai megjelenési formája a csökkent tudatállapot és/vagy görcsroham. A központi idegrendszer klinikai vizsgálatát nehezíti, hogy a kritikus állapotú betegekben gyakran alkalmazott major analgetikumok szintén hatással vannak a mentális státuszra (Osterbur et al, 2014).

5. A kritikus állapotú kutyák felismerését segítő klinikai pontrendszerek

A kritikus állapotú kutyák felismerését számos pontrendszer segíti (**3. sz. táblázat**). A korábban már említett és a vizsgálatainkban is használt SIRS-kritériumokon kívül ilyen például a humán APACHE (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation) pontozási séma állatorvosi változata az APPLE-pontrendszer (Acute Patient Physiologic and Laboratory Evaluation) „teljes” és „gyors” változata. (Hayes et al, 2010), valamint az ún. SOFA-pontrendszer (Sequential Organ Failure Assessment) (Ripanti et al, 2012) és a Survival Predictor Index Scores (SPI2-) indexszám (Whittemore et al., 2011).

3. sz. táblázat. A kritikus állapotú kutyák felismerését segítő klinikai pontrendszerek kritériumainak összefoglalása. (A táblázat a következő oldalon folytatódik.)

Pontrendszer	Paraméter	Érték
APPLE_{fast} pontrendszer 1- 50 pont, a pontszám fordítottan arányos a túlélés esélyével (Hayes et al., 2010)		
	vércukor koncentráció	<4.6 mmol/l → 7 pont 4.6 - 5.6 mmol/l → 8 pont 5.7 - 9.0 mmol/l → 9 pont 9.1 - 15.0 mmol/l → 10 pont >15.0 mmol/l → 0 pont
	albumin koncentráció	<26 g/l → 8 pont 26 - 30 g/l → 7 pont 31 - 32 g/l → 6 pont 33 - 35 g/l → 0 pont >35 g/l → 2 pont
	laktátszint	<2.0 mmol/l → 0 pont 2.0 - 8.0 mmol/l → 4 pont 8.0 - 10.0 mmol/l → 8 pont >10 mmol/l → 12 pont
	vérlemezkeszám	<151 G/l → 5 pont 151 - 200 G/l → 6 pont 201 - 260 G/l → 3 pont 261 - 420 G/l → 0 pont >420 G/l → 1 pont
	tudatállapot	fiziológiás → 0 pont lábbon van, bágyadt/tompult → 4 pont csak segítséggel állítható lábra, bágyadt/tompult → 6 pont nem állítható lábra, de külső ingerekre reagál → 7 pont nem állítható lábra, külső ingerekre sem reagál → 14 pont
SPI2- indexszám 0.00 – 1.00 (1.00 = 100% túlélési valószínűség) (Whittemore et al., 2011)		
	SPI2-indexszám $= e^{\text{logitP}} / (1 + e^{\text{logitP}})$	logitP = 0.3273 + (0.0108 x artériás középnyomás) - (0.0102 x légzésszám) - (0.2183 x kreatinin) + (0.0164 x Ht) + (0.3553 x albumin) - (0.1184 x életév) - [0.8069 x belgyógyászati (1) vagy sebészeti (0) kórkép]

SOFA-érték 0 - 24 pont (Ripanti et al, 2012)		
	PaO₂/FIO₂ * 1 órával a vazopresszortherápia megkezdését követően	>400 Hgmm → 0 pont 400 - 300 Hgmm → 1 pont 300 - 200 Hgmm → 2 pont 200 - 100 Hgmm → 3 pont* <100 Hgmm → 4 pont*
	vérlemezkeszám	>150 G/l → 0 pont <150 G/l → 1 pont <100 G/l → 2 pont <50 G/l → 3 pont <20 G/l → 4 pont
	szérum bilirubinszint	<10 μmol/l → 0 pont 10 - 24 μmol/l → 1 pont 24 - 86 μmol/l → 2 pont 86 - 188 μmol/l → 3 pont >188 μmol/l → 4 pont
	vérnyomás	nincs hypotenzio → 0 pont artériás középnyomás <60 Hgmm → 1 pont dopamin <5μg/kg/min → 2 pont >5μg/kg/min dopamin; <1μg/kg/min (nor)adrenalin → 3 pont >15μg/kg/min dopamin; <1μg/kg/min (nor)adrenalin → 4 pont
	Glasgow Coma Scale	15 pont → 0 pont 13 - 14 pont → 1 pont 10 - 12 pont → 2 pont 6 - 9 pont → 3 pont < 6 pont → 4 pont
	szérum kreatinin koncentráció	<124.0 μmol/l → 0 pont 124 - 168 μmol/l → 1 pont 169 - 301 μmol/l → 2 pont 302 - 433 μmol/l → 3 pont >433.0 μmol/l → 4 pont

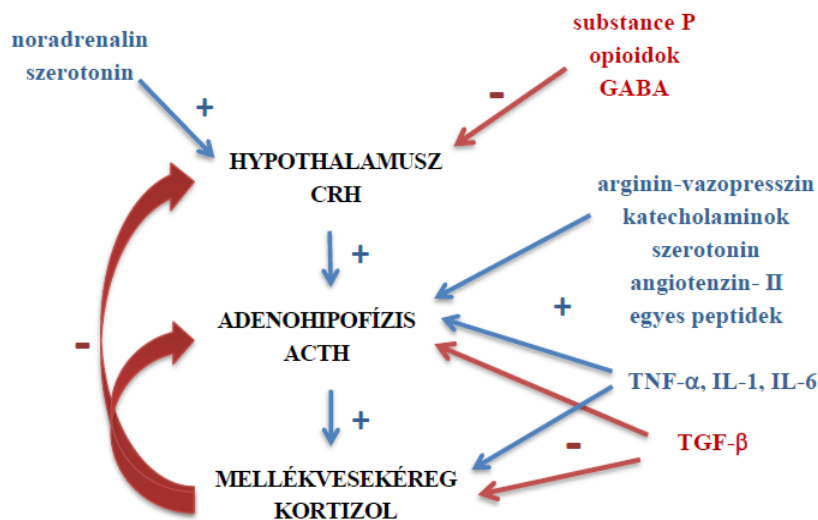
Az APPLE_{full} és a SOFA pontozási rendszer alkalmazásához artériás vérgázanalízis vizsgálatot is végezni kell, az SPI2 indexszám kalkulálásához pedig artériás középnyomást kell mérni.

6. Hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely működése élettani és kóros körülmények között

5.1 A hipotalamusz-hipofízis- mellékvese tengely működése fiziológias körülmények között

A mellékvesekéreg zona fasciculata és kismértékben a zona reticularis rétegében termelődő glükokortikoidhormonok a szintézisüket követően azonnal a szisztémás keringésbe kerülnek. A keringésben a szállításuk különböző karriermolekulákhoz kötődve történik. Kutyaiban a kortizol nagyjából 75%-a a specifikus kortizolkötő fehérjéhez (CBG, cortisol binding globulin), kb. 12%-a albuminhoz és vörösvérsejtekhez kapcsolódva kering, míg a fennmaradó rész az ún. szabad frakció (szabad kortizol), ami a sejtek számára elérhető, biológiai aktív forma (Meyer - Rothuizen, 1993). A kötött és szabad frakció arányát az elérhető szállítórendszerek típusa és mennyisége befolyásolja. A kortizol elérhetőségét a sejtek számára döntően a 11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (11 β -HSD) enzimrendszer működése szabályozza. Ezen enzim 2 formája (1-es és 2-es típusú 11 β -HSD) felel az aktív kortizol és az inaktív kortikoszteron dinamikus átalakulásáért szöveti szinten. Kutyaiban a glükokortikoid hormonok kisebb részben a májban metabolizálódnak, döntően azonban a vesén keresztül metabolizálódnak és választódnak ki. Az összkortizol mindössze néhány százaléka változatlan formában ürül a vizelettel (Galac et al, 2010; Boag et al, 2020).

A mellékvesekéreg által termelt glükokortikoidok bioszintézisét és elválasztását döntően a hipofízis elülső lebenyében termelődő adrenokortikotrop hormon (ACTH) szabályozza. Az ACTH epizódikus elválasztását a hipotalamusz és központi idegrendszer felől érkező ingerek befolyásolják és a szekréciós mintázatára hat a keringő kortizolszint negatív visszacsatolási mechanizmusa, a stressz, valamint immunológiai tényezők is (**1. sz. ábra**). Ellentétben, az emberben leírt reggeli órákban tapasztalt ACTH-szint emelkedéssel, kutyaiban végzett ilyen irányú vizsgálatok eddig nem támasztották alá az ACTH-termelés és elválasztás cirkadián ritmusát. Újabb kutatások eredménye alapján nem-ACTH-függő szabályozás is részt vesz a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely működésének „finom hangolásában” (Bornstein - Chrousos, 1999; Marik, 2009; Galac et al, 2010).



1. sz. ábra. A hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely sematikus működése és a visszacsatolási mechanizmusok fiziológiai körülmények között. (Galac S. - Reusch C. E. - Kooistra, H. S. - Rijnberk A.: Adrenals. In: Rijnberk A. - Kooistra H. S.: Clinical Endocrinology of Dogs and Cats. 2nd edition 2010 alapján)

5.2 Hormonális változások a kritikus állapotú betegekben

A kritikus állapotú betegekben kialakuló hormonális változások összetettek, és csaknem minden endokrin szerv működését érinthetik (van den Berghe, 2003; Gibson et al, 2005; Santos, 2013). Általánosan ismert endokrin működészavarok az ún. sick euthyreoid szindróma, amely akut vagy krónikus szisztémás betegségben szenvedő euthyreoid páciens pajzsmirigy-hormonszintjeiben, illetve a pajzsmirigy működését vizsgáló funkcionális tesztekre adott válaszában okoz eltéréseket (van den Berghe, 2003; Singer et al, 2004; Gibson et al, 2005; Schoeman et al, 2007). Az alacsony ossztiroxinkoncentráció prognosztikai markerként is használható a kritikus állapotú kutyák túlélési esélyének meghatározására (Schoeman - Herrtage, 2008b).

A glükokortikoidok az akut fázis reakció alapvető hormonális szabályozói (Prittie et al, 2002, Necela - Cidlowski, 2004). A fokozott ACTH-termelés és elválasztás következtében megemelkedik a vérplazma összkortizolszintje, valamint csökken a kortizolszállító fehérjék mennyisége és affinitása, így a keringésben a kortizol biológiailag aktív, szabad frakciójának aránya megemelkedik (Galac et al, 2010; Martin, 2011). A kortizol hatással van a katekolamin-elválasztásra és az adrenerg receptorok működésére, illetve a vesetubulusok nátriumion- és vízvisszatartására, így a megemelkedett szabad kortizol koncentrációnak és a célsejtek fokozott kortizol érzékenységének célja, nemcsak a gyulladás mérséklése, hanem a

hemodinamikai stabilitás megőrzése is (van den Berghe, 2003; Gibson et al, 2005; Annane, 2011). A megfelelő stressz-válaszreakció a kritikus állapotú betegek túlélésében kiemelkedő szerepet játszik (Galac et al, 2010; Bhatia et al, 2014).

A hipotalamusz-hipofízis-mellékvese-tengely aktiválódása komplex hatások végeredménye (**1. sz. ábra**). A kortikotrop-fel szabadító hormon (CRH) elválasztását a noradrenalin és a szerotonin serkenti, míg a substance P, az opioidok és a GABA blokkolják (O'Connor et al, 2000). Egyes proinflammatorikus citokinek (TNF- α , IL-1, IL-6) is modulálják a CRH elválasztását a hipotalamuszban. Az ACTH-elválasztását a CRH és a vazopresszin (AVP) fokozza, továbbá a katekolaminok, az angiotenzin-II, a szerotonin és egyéb peptidek (pl. vasoactive intestinal polipeptid) is serkentik. Fiziológias körülmények között a TNF- α , IL-1, IL-6 stimulálja, a TGF- β pedig gátolja az ACTH termelődését és elválasztódását. A glükokortikoidok visszacsatolási mechanizmusok által maguk is negatív hatással bírnak mind az ACTH, mind a CRH termelésére és elválasztására (Prigent et al, 2004; Galac et al, 2010; Martin, 2011; Oakley - Cidlowski, 2013).

Kritikus állapotú betegben az akut fázis reakció részeként a fentiekén kívül számos neuroendokrin változás detektálható. A növekedési hormon indukálta inzulinrezisztencia és hyperglykaemia kialakulásához hozzájárul a kortizol, az adrenalin, valamint a glukagon által kiváltott fokozott glükoneogenezis és a csökkent perifériás glükózfelhasználás is (Van den Berghe, 2003; Gibson et al, 2005).

A vazopresszin megváltozott termelődése és elválasztása súlyos zavart okozhat a folyadék- és elektrolitháztartásban, amennyiben az alacsony plazma ozmolalitás ellenére az AVP-szekréció normál marad vagy fokozódik. Ilyenkor ún. inadekvát ADH-szekréciós szindróma (Syndrome of Inappropriate ADH Secretion) alakulhat ki. Ezen betegekre jellemző a hyponatraemia, a csökkent plazma ozmolalitás ($P_{osm} < 280$ mOsm/kg) továbbá a relatív hypersthenuria (Meij et al, 2010; Ueda et al, 2015).

Kritikus állapotú páciensekben gyakori az ionizált hypocalcaemia is. Hátterében összetett hormonális (D-hipovitaminózis, citokin-indukálta megváltozott parathyroid hormon elválasztás) és egyéb hatások (hypomagnesaemia, alkalózis, vérplazma ionizált kalcium frakciójának fokozott kelációja, szekvesztrációja) állnak (Holowaychuk et al, 2009; Holowaychuk, 2013).

5.3 Critical Illness-Related Adrenocortical Insufficiency (CIRCI) - A kritikus állapotú betegek kortikoszteroid-elégtelenség szindrómája

A CIRCI kórképnek jelenleg nincs általánosan elfogadott magyar nyelvű elnevezése. A humán terminológia korábban az ún. *relatív adrenalis elégtelenség* kifejezést használta a vazopresszor-rezisztens hipotenzív septicus betegek jellemzésére (Marik et al, 2008; Galac et al, 2010), újabban a *sick euadrenal state* elnevezést részesítik előnyben (Venkatesh - Cohen, 2011). A CIRCI azonban nemcsak a mellékvesék elégtelen kortizol termelését jelentheti, hanem a kortizol csökkent hatását is a célsejteken (Marik et al, 2008, Burkitt Creedon, 2015). Az elégtelen kortizolhatás következtében az inflammatorikus transzkripciós faktorok downregulációja nem megfelelő mértékű, így a betegben zajló gyulladásos folyamatok nem mérséklődnek (Peyton - Burkitt, 2009; Galac et al, 2010; Sweeney et al, 2010; Venkatesh - Cohen, 2011; Bhatia et al, 2014; Osterbur et al, 2014).

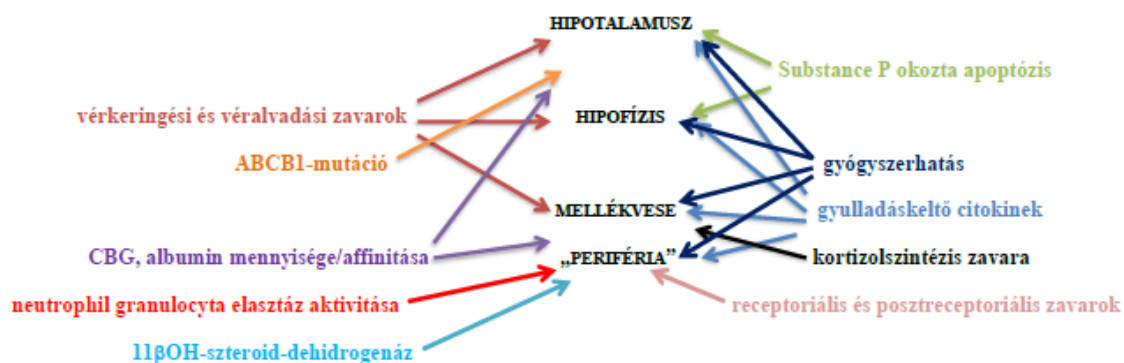
A CIRCI több szempontból különbözik a hypoadrenocorticismustól (Addison-betegség). A mellékvese hipofunkciójával járó kórképek főbb jellemzőit a **4. sz. táblázat** foglalja össze. A kutyák Addison-betegsége ritka, életveszélyes kórkép, amely leggyakrabban a mellékvesekéreg immun-mediált gyulladásának következtében alakul ki és irreverzibilis mineralokortikoid és/vagy glükokortikoid hiányhoz vezet, amelynek terápiás célú pótlása a páciens élete végéig szükséges (Galac et al, 2010). Ezzel ellentétben a kritikus állapotú betegek kortikoszteroid-elégtelenség szindrómája során elsősorban funkcionális zavar alakul ki (ehhez társulhat akár strukturális károsodás is), ami „relatív” hypocortisolaemiához és/vagy kortizolrezisztencia kialakulásához vezet. A CIRCI lefolyása és súlyossága a kiváltó tényezőktől függően időben dinamikusan változhat és az alapbetegség megszűnésével a normál kortizoltermelés, illetve kortizolhatás helyreállhat (Prittie, 2009; Martin et al, 2008). További különbség, hogy CIRCI során a mineralokortikoid-termelődés és elválasztás általában nem érintett (Martin et al, 2008; Galac et al, 2010).

Klinikai körülmények között kutyában a mellékvesék kortizoltermelő kapacitását az ACTH-stimulációs teszt során lehet vizsgálni (Martin et al, 2007; Pessina et al, 2009). Az Addison-kór igazolására a korábbi 250 μ g/állat dózis helyett, jelenleg az 5 μ g/ttkg szintetikus ACTH-készítmény intravénás adása javasolt, amellyel a mellékvesék maximális kortizol termelését lehet előidézni (Kemppainen et al, 2005; Martin et al, 2007). Újabb kutatások szerint 5 μ g/kg-nál alacsonyabb ACTH-dózis is alkalmas a mellékvesekéreg maximális kortizol válaszának vizsgálatára emberben (Kozyra et al, 2005), valamint kutyában is (Martin et al, 2007; Sweeney et al, 2010; Cortés-Puch et al, 2014; Botsford et al, 2018).

4. sz. táblázat. A mellékvese hipofunkció formái kutyában Rijnberk-Kooistra: Clinical Endocrinology of Dogs and Cats (2009) alapján.

Kórkép	Kórélettani háttere	Hormonális eltérések
“tipikus” Addison betegség	immun-mediált gyulladás és következményes funkcióvesztés	hypocortisolaemia és hypoaldosteroemia
eunatraemiás, eukalaemiás hypoadrenocorticismus (“atipikus” Addison betegség)	immun-mediált gyulladás és következményes funkcióvesztés	hypocortisolaemia idővel kísérheti hypoaldosteroemia
iatrogén Addison-kór	hypophysectomia, kétoldali adrenalectomia, glükokortikoid terápia átmenet nélküli megvonása, trilosztán/mitotán/ketokonazol /gesztagén terápia mellékhatása lehet	hypocortisolaemia +/- hypoaldosteroemia
“relatív” adrenalis elégtelenség (kortikoszteroid-elégtelenség szindróma)	összetett oktanú kórkép, a HHM-tengely minden szintje érintett lehet, valamint receptorialis, illetve posztreceptorialis zavarok is állhatnak a háttérben	nem megfelelő kortizolválasz és/vagy kortizolhatás kritikus állapot betegben

A CIRCI oktana még nem minden részletében ismert, de a HHM-tengely nem megfelelő aktiválódása, a mellékvesék csökkent kortizol termelése vagy a sejtszintű glükokortikoidrezisztencia önállóan, vagy együttesen is vezethetnek a kórkép kialakulásához (Beishuizen - Thijs, 2004; Martin, 2011, Peyton - Burkitt, 2009, Prigent et al, 2004; Bhatia et al, 2014; Boonen - Van den Berghe, 2016) (**2. sz. ábra**).



2. sz. ábra. Sematikus ábra a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengelyt és a célsejteket érő komplex hatásokról kritikus állapot fennállása során. (*ABCB1*: ATP-binding cassette sub-family B member 1; CBG: kortizolkötő globulin)

Kwon és mtsai (2010) kritikus állapotú emberek klinikai vizsgálata során igazolták, hogy a proinflammatorikus citokinek mérsékelik a mellékvese kortizoltermelő rezerv kapacitását. Egyes citokinek fokozott kifejeződését pedig összefüggésbe hozták szteroid-rezisztens asztmában szenvedő betegek T-lymphocytáinak csökkent GLK-érzékenységével (Ito et al, 2006). A gyulladásos folyamatok során a mellékvese kortizol termelését a neutrophil granulocyták által termelt α -defenzinek is blokkolják, azáltal, hogy az ACTH-val versenyeznek az adrenalis melanocortin receptor kötőhelyekért (Prigent et al, 2004). Ugyancsak az aktivált neutrophil granulocyták által termelt elasztáz képes befolyásolni a kortizol és a kortizolkötő szállítómolekula közötti kapcsolatot, ezáltal a sejtek számára nagyobb mennyiségű szabad kortizol válik elérhetővé (Vanhorebeek et al, 2006).

A Th2-sejtek által termelt gyulladáskeltő citokinek (IL-2, IL-4) képesek befolyásolni a periférián a 11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzimek kifejeződésének mértékét, így a biológiailag aktív kortizol koncentrációja függ a 2-es típusú 11 β -HSD aktivitásától is (Prigent et al, 2004; Marik, 2009; Martin, 2011; Annane, 2016).

Az *ABCB-1* (korábbi nevén *MDR1*) gén mutációjával rendelkező egyedekben a P-glikoprotein nem megfelelő működése miatt a GLK-ok szabadon lépnek át az vér-agy gáton, így a visszacsatolási mechanizmusok során erőteljesebb gátló hatást fejtenek ki a központokra. Egészséges *ABCB1* gén mutációját hordozó egyedben az endogén ACTH-szint, illetve az alap és a stimulált kortizolszint is szignifikánsan alacsonyabb, mint *ABCB1* gén vad típusát hordozó egyedben az erőteljesebb negatív feed back hatás miatt (Mealey et al, 2007; Dendoncker - Libert, 2017). A HHM-tengely szuppressziója *ABCB1* génmutációt hordozó

egyedben relatív hypocortisolaemia kialakulásához vezethet kritikus állapot során (Mealey et al, 2007).

Az alacsony kortizolszinthez, illetve a csökkent kortizol rezerv kapacitáshoz a hypocholesterinaemia is hozzájárulhat, tekintve, hogy a kritikus állapotú betegekben gyakori a HDL-szint markáns csökkenése (Marik, 2009; Annane, 2016).

Kritikus állapotú betegekben csökkent szérum kortizol-klírenszenz fennállását is igazolták, ami nem a megnövekedett kortizol szekréció, hanem a csökkent, illetve elhúzódó metabolizmus és kiválasztás következménye volt (Kanczkowski et al, 2015; Boonen - Van den Berghe, 2016). Boag és mtsai. (2020) szepszisben és szeptikus sokkban szenvedő kutyák vér- és vizeletmintáinak vizsgálatával mutatták ki a kortizol metabolizmus megváltozását.

A HHM-tengely működése dinamikusan változik a gyulladásos folyamat intenzitásával és fennállásának időtartamával. A szisztémás gyulladás „krónikussá” válásával az endogén ACTH-szint lecsökken, ezáltal a fokozott kortizoltermelés már nem ACTH-függő folyamatok következménye (ACTH - kortizol disszociáció) (Beishuizen - Thijs, 2004). A mellékvese kortizolszekrécióját ilyenkor a mellékvesékben termelődő „szöveti kortikotropin felszabadító hormon” és a „szöveti” kortikotropin serkenti. Ez az alternatív hormonális szabályozás stimulálja a mellékvesék glükokortikoid termelését a hipotalamusz-eredetű CRH hiányában is. Ehhez járul hozzá az adrenalis sejtek és a mellékvesében jelen lévő immunsejtek citokin termelése, valamint az adrenalis immunsejtek MHC/HLA class II molekulák expresszióján keresztül közvetlen leukocytá-mellékvese szabályozás és fokozott kortizolszekréció (Bornstein - Chrousos, 1999; Beishuizen - Thijs, 2004; Boonen et al, 2014; Kanczkowski et al, 2015; Annane, 2016).

A jelentős szisztémás gyulladás fennállása során emberben a mellékvese kortikoszteroid-metabolizmus megváltozásának markere a csökkenő DHEAS (dehidroepiandrosteron és dehidroepiandrosteron szulfát) koncentrációk. Az adrenalis androgének számos élettani funkciót látnak el, többek között a glükokortikoidok immunszuppresszív hatását ellensúlyozzák (Beishuizen - Thijs, 2004).

A szisztémás gyulladás során a vérkeringésben megnő a biológiailag aktív, szabad kortizolfrakció mennyisége. Ez a kortizolkötő fehérje (negatív akut fázis protein) koncentrációnak csökkenése miatt következik be (Kanczkowski et al, 2015). Elhúzódó gyulladás fennállása során a CBG-szint ismét megemelkedik, ez a szabad kortizolszint csökkenését okozza (Beishuizen - Thijs, 2004).

Egészséges beagle kutyákban a kortizolszint emelkedését mutatták ki hipertóniás sóoldat (10% NaCl 5ml/kg) bolusban történő intravénás beadását követően, ugyanakkor 0.9% NaCl

infúziós oldat és HAES kolloid oldat adagolása után ezt nem tapasztalták (Goy-Thollot et al, 2007). A gyógyszerek közül az etomidát és a dexmedetomidin a 11 β -hidroxiláz (*CYP11B1*) gátlásán keresztül csökkenti a kortizolszintézist, de más anesztetikumokról is igazolták már, hogy emberekben a HHM-tengely működését blokkolják, így például a fentanil és egyéb opioidok csökkenti az ACTH-szintet (Prigent et al, 2004; Gibson et al, 2005; Thomas et al, 2010; Santos, 2013). Emberben egyes gyógyszerek (pl. antiepileptikumok, rifampin, ciklosporin, klaritromicin) a CYP-450 enzimrendszer indukciójával fokozzák a kortizol-metabolizmust (Prigent et al, 2004; Thomas et al, 2010). Az azoltípusú gombaellenes szerek (pl. ketokonazol) pedig reverzibilisen gátolják az adrenalis szteroidszintézis CYP-450 függő enzimeit (Thomas et al, 2010). A kritikus állapotú beteg megváltozott adrenalis válaszreakciója tehát nemcsak az alapbetegség következménye lehet, hanem a terápiás beavatkozások is hozzájárulhatnak kialakulásához (Thomas et al, 2010; Martin, 2011; Burkitt Creedon, 2015; Boonen - Van den Berghe, 2016).

A CIRCI következményei a hemodinamikai instabilitás és a gyulladós folyamatok csillapodásának elmaradása (Prittie, 2009; Bhatia et al, 2014). A CIRCI során detektálható klinikopatológiai eltérések nem specifikusak, továbbá az alapbetegség klinikai tünetei és a laboratóriumi eltérések sokszor elfedik a jelenlétüket. Ilyenek például a láz, hányinger/hányás, hasi fájdalom, szisztémás hipotenzió, csökkent tudatállapot, alacsony vérglükózszint, hyponatraemia, valamint az eosinophilia (Gibson et al, 2005; Prittie, 2009).

A humán felmérések szerint a CIRCI a daganatos és nem-daganatos kritikus állapotú betegek 30-58%-át érinti (Prittie, 2009; Bruno et al, 2012; Bhatia et al, 2014; Osterbur et al, 2014). A CIRCI prevalenciájáról az állatorvosi szakirodalomban jelenleg nem találhatóak konkrét adatok, ugyanakkor számos tanulmány vizsgálta már a kórkép jellemzőit kritikus állapotú kutyák körében (Goy-Thollot et al., 2006; Schoeman et al, 2007; Prittie, 2009; Martin, 2011, Cortés-Puch, 2014; Summers et al, 2021; Marchetti et al, 2021).

A CIRCI diagnosztikai protokollja sem a humán-, sem az állatgyógyászatban nem egységes. Az alap szérum kortizolszintet, az ACTH-stimulációs teszt során mért alap és stimulált kortizolszintet, illetve ezek különbségét (ún. Δ kortizol érték), valamint a kortizol/ ACTH arányt is alkalmazzák kritikus állapotú betegek túlélési valószínűségének meghatározására (Cortés-Puch et al, 2014; Bhatia et al, 2014; Burkitt Creedon, 2015; Marik et al, 2008; Kwon et al, 2010; Martin, 2011, Peyton - Burkitt, 2009; Prittie et al, 2002; Venkatesh - Cohen, 2011; Schoeman - Herrtage, 2008a).

A kritikus állapotban detektálható hypercortisolaemia „referencia tartományát” még nem határozták meg (Prittie et al, 2002; Prittie, 2009; Martin, 2011). Humán vizsgálatok alapján

random módon vett vérmintában amennyiben a kortizolszint nagyobb, mint 34 $\mu\text{g/dl}$ (>935 nmol/l), az súlyos állapotban lévő betegben megfelelő mellékvese-működésre utal, míg <15 $\mu\text{g/dl}$ (<412 nmol/l) kortizol érték esetén a relatív adrenalis elégtelenség fennállása nagyon valószínű. A szürke zónában mért alap kortizol koncentráció (15-34 $\mu\text{g/dl}$) esetén az adrenalis válaszkészség megítélésére további tesztek elvégzése javasolt (Gibson et al, 2005).

Kaplan és mtsai. (1995) nem-mellékvese eredetű, krónikus betegségben szenvedő kutyák ACTH-stimulációs teszt során kapott eredményei alapján azt tapasztalták, hogy a betegek 34%-ának az alap kortizolszintje, a páciensek 14%-ának a poszt-ACTH kortizolszintje a referencia tartomány felső határát meghaladta. Szeptikus, *Staphylococcus aureus* okozta tüdőgyulladásban szenvedő kutyák alap kortizolszintje a sepszis korai szakaszában magasabb volt, mint az ACTH-stimulációt követően mért értékek (Cortés-Puch et al, 2014).

Sweeney és mtsai. (2010) az intenzív terápiás beavatkozások (fentanil-midazolám-medetomidin kombinációval fenntartott szedáció, endotrachealis intubáció és mechanikus lélegeztetés) hatását vizsgálták egészséges kutyák mellékveseműködésére. Az első 24 órában mind az alap, mind a stimulált kortizol-koncentrációk emelkedettek voltak a kontroll csoport értékeihez képest, de 24 óra után már nem volt szignifikáns különbség a két csoport kortizolértékei között. Az ACTH-stimulációs tesztet 5 $\mu\text{g/kg}$, valamint 1 $\mu\text{g/állat}$ ACTH készítmény intravénás beadásával is elvégezték, és nem tapasztaltak szignifikáns különbséget a kétféle dózis hatása között. A 24 órán túli különbség eltűnése a kezelt és a kezeletlen egészséges kutyák kortizolszintjei között magyarázható egyrészt azzal, hogy a kezdeti stresszhatás elmúltával és a megfelelő analgézia-szedáció fenntartása mellett gyulladásos folyamat hiányában nem volt újabb HHM-tengelyt érő stimulus. Másfelől lehetséges, hogy az alkalmazott narkotikumok befolyásolták negatívan a HHM-tengely működését.

A humán szakirodalmi adatok ellentmondásosak a szérumban mért kortizolkoncentráció és a betegség várható kimenetele közötti összefüggés tekintetében. Egyes tanulmányok pozitív összefüggést találtak a hypercortisolaemia mértéke és a túlélés valószínűsége között, míg más vizsgálatok ellentétes kapcsolatot mutattak ki az emelkedett kortizolszint és a betegség kimenetele között (Goetze - Guerrero, 2006; Bendel et al, 2008; Venkatesh - Cohen, 2011).

A szérumban mért kortizolszint és a betegség kimenetele közötti lehetséges összefüggést már kutyákban is vizsgálták klinikai körülmények között. *Babesia canis rossi*-val fertőzött kutyák közül a nem-túlélők medián alap kortizol- és ACTH-szintje szignifikánsan magasabb volt, mint a túlélőké (Schoeman et al, 2007). Cortés-Puch és mtsai. (2014) a HHM-tengely működését vizsgálták szeptikus, *Staphylococcus aureus* okozta tüdőgyulladásban szenvedő kutyákban.

A kortizol- és ACTH-szint emelkedésének mértéke a szepszis korai szakaszában nem különböztette meg a túlélő és nem-túlélő egyedeket, ugyanakkor a túlélők HHM-tengelyének a visszacsatolási mechanizmusokra való érzékenysége a szepszis kialakulását követően már 24 órán belül helyreállt. A nem-túlélőkben magas kortizol- és ACTH-szint volt jellemző, és exogén ACTH- illetve, dexametazon adását követően a dinamikus tesztek elvégzése során csökkent válaszkésztséget mutattak.

Fontos megjegyezni, hogy a fenti vizsgálatokban az ACTH-stimulációs teszt elvégzése során eltérő dózisban alkalmazták a szintetikus ACTH-készítményeket, így a vizsgálatok eredményei nem vethetők össze (Prittie et al, 2002; Sweeney et al, 2010; Cortés-Puch, 2014). Egyes szakirodalmi adatok alapján a 250 µg/egyed ACTH-dózis alkalmazása nem javasolt a stimulációs teszt során, mivel ez extrém nagy (szuprafiziológiás) mennyiség, ami nem kellőképp érzékeny a CIRCI igazolására, helyette az ún. alacsony dózisú (0,5 µg/kg iv.) ACTH-stimulációs teszt elvégzését javasolják a mellékvese kortizoltermelő rezerv kapacitásának vizsgálatára (Martin et al, 2007; Prittie, 2009; Martin, 2011; Venkatesh - Cohen, 2011).

Továbbá figyelembe kell venni azt is, hogy az összkortizol koncentráció meghatározása nem feltétlenül korrelál a biológiai funkciót valójában betöltő, a hordozómolekulákhoz nem kötött, ún. szabad kortizol szintjével (Marik, 2009; Bhatia et al, 2014; Venkatesh - Cohen, 2011, Boag et al, 2020). Ugyanakkor Bendel és mtsai (2008) emberekben, illetve Boag és mtsai. (2020) kutyák esetében sem találtak szignifikáns különbséget a túlélő és nem-túlélő szeptikus betegek kalkulált, illetve mért szabad kortizolszintje, valamint az összkortizol koncentrációja között. A szabad- és az összkortizol koncentráció értékei jól korreláltak egymással, továbbá a nem-túlélő, szepszisben vagy szeptikus sokkban szenvedő betegek szabad és összkortizol szintje egyaránt szignifikánsan magasabbak voltak a túlélő betegcsoport értékeihez képest.

Az állatorvosi klinikai laboratóriumi diagnosztikában rutinszerűen nem alkalmazott, ún. szabad kortizolfrakció meghatározása hasznos lehet olyan egyedekben, amelyekben jelentős hypoalbuminaemia/hypoproteinaemia áll fenn, mivel ezekben a páciensekben az összkortizol meghatározása nem feltétlenül lesz reprezentatív a szabad kortizolfrakció tekintetében (Beishuizen - Thijs, 2004; Sweeney et al, 2010; Martin, 2011). Azt sem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a szérum össz- vagy szabad kortizol koncentrációja nem feltétlenül reprezentálja a sejtszintű glükokortikoid miliót (Venkatesh - Cohen, 2011).

Egyes szerzők pedig az egyszeri hormonszint-meghatározás vagy stimulációs teszt elvégzése helyett, sorozat kortizolszint mérést és/vagy ismételt ACTH-stimulációs tesztet, illetve szérum kortizol-klirensz vizsgálatot javasolnak, hangsúlyozva a CIRCI időben változó,

dinamikus jellegét (Prittie et al, 2002; Martin, 2011; Cortés-Puch et al, 2014; Boonen - Van den Berghe, 2016).

Az endogén ACTH-szint meghatározása önmagában nem alkalmas a CIRCI-ben szenvedő és nem-szenvedő kritikus betegek megkülönböztetésére. A jelenség hátterében állhat, hogy a kritikus állapot hosszabb idejű fennállása esetén a kortizoltermelés döntően már nem ACTH-függő irányítás alá kerül az „ACTH - kortizol szekréció disszociáció” jelensége okán (Beishuizen - Thijs, 2004; Venkatesh - Cohen, 2011, Boonen - Van den Berghe, 2016).

Az American College of Critical Care Medicine irányelve alapján, ha az alap kortizolszint kisebb, mint 10 µg/dl (<275 nmol/l) vagy a stimulált kortizol érték kevesebb, mint 9 µg/dl-rel (247,5 nmol/l) nő a 250 µg/beteg dózisú szintetikus ACTH-injekcióval végzett stimulációs tesztje során, akkor az adott páciensnél javasolt a glükokortikoidpótlás a megfelelő folyadék- és vérnyomásemelő-terápia mellett (Burkitt Creedon et al, 2007; Kwon et al, 2010; Bhatia et al, 2014). Egy másik átfogó humán vizsgálat alapján az a beteg, akinek a stimulált kortizol értéke <250 nmol/l (250 µg ACTH inj. adminisztrációját követően) az glükokortikoidpótlást igényel (Annane, 2011).

A szérum kortizolszint meghatározására használt detektálási módszerek analitikai pontosságát és megbízhatóságát, illetve a különböző mérési metódusok közötti jelentős analitikai variabilitást is célszerű figyelembe venni, amikor az egyes tanulmányokban meghatározott, klinikai döntéshozatali küszönértékeket (ún. cut off value) vetjük össze (Boonen - Van den Berghe, 2016). A mérési eredmények kiértékelésekor tehát figyelembe kell venni az alkalmazott mérési módszer analitikai varianciáját, a vizsgált paraméter biológiai variabilitását, valamint az esetleges analitikai interferenciát (pl. lipaemia, hemolízis, heterológ ellenanyagok jelenléte) vagy keresztreaktivitást okozó anyagok hatását is (Bendel et al, 2008, Venkatesh - Cohen, 2011; Gal et al, 2017).

Gal és mtsai. (2017) egészséges kutyákban vizsgálta a populáció alapú referenciatartomány alkalmazhatóságát ACTH-stimulációs teszt eredményének kiértékelésekor. A kapott eredmények alapján az ACTH-stimulációs teszt kortizol értékei ún. köztes individualitási indexet mutattak, ami a populáció alapú referencia intervallum alkalmazásán kívül az ún. „reference change value” (kritikus különbség érték) együttes figyelembevételét indokolja az ACTH-stimulációs teszt eredményeinek kiértékelése során.

Prittie és mtsai. (2002) 20 kritikus állapotú kutya ACTH-stimulációs teszt (250 µg/állat) elvégzése során mért kortizol értékeit és az endogén ACTH-koncentrációját vizsgálták a betegségük kimenetelének függvényében. A vizsgálatban egyik egyednél sem igazoltak abszolút értelemben vett hypocortisolaemiát az elérhető referenciatartományhoz képest,

továbbá sem az alap, sem a stimulált kortizolkoncentráció, sem pedig az endogén ACTH-szint nem mutatott szignifikáns különbséget a túlélő és nem-túlélő csoportokban.

Goy-Thollot és mtsai. (2006) 34 kritikus állapotú kutya alap és stimulált kortizol koncentrációját, valamint az ún. Δ kortizol értékét hasonlították össze egészséges kutyák eredményeivel. Az ACTH-stimulációs tesztet $250\mu\text{g}/\text{állat}$ dózisban alkalmazták intravénásan adva. Az adatok elemzését követően azt találták, hogy a nem-túlélő, kritikus állapotú kutyák alap kortizol- és a Δ kortizol értéke ugyan magasabb volt, mint a túlélőké, de a különbség nem volt szignifikáns. A stimulált kortizol érték viszont a nem-túlélőkben szignifikánsan magasabb volt, mint túlélőkben.

Egy másik vizsgálatban 33 szeptikus állapot okozta SIRS-ben szenvedő kutyát vizsgáltak. Azon SIRS-ben szenvedő egyedek, amelyek Δ kortizol-értéke az ACTH-stimulációs teszt során $<3\mu\text{g}/\text{dl}$ ($<82,5\text{ nmol/l}$) volt, jellemzően szisztémás hipotóniában szenvedtek, és a túlélési esélyük kisebb volt, mint a jobban stimulálható egyedeké. Fontos azonban megemlíteni, hogy a vizsgálat során a mellékvese rezerv kapacitását intramuszkulárisan adott, $250\mu\text{g}/\text{állat}$ dózisú szintetikus ACTH-készítmény adásával végezték, így felmerül, hogy az izomba adott készítmény felszívódása a hipotóniában szenvedő egyedekben eleve elégtelen lehetett, így a csökkent mértékű stimuláció esetleg nem oka, hanem következménye volt a szisztémás hipotóniának (Burkitt Creedon et al, 2007).

Martin és mtsai (2008) szintén a Δ kortizol-érték kiszámítása alapján azonosították be a feltehetően CIRCI-ben szenvedő, kritikus állapotú kutyákat (Martin et al, 2008). Az ACTH-stimulációs tesztet $5\mu\text{g}/\text{kg}$ iv. dózissal végezték. Az alapbetegségüktől függetlenül azok a páciensek, amelyek Δ kortizol értéke $<83\text{ nmol/l}$ volt, közel 6-szor nagyobb eséllyel részesültek vazopresszor-terápiában, mint azok a kutyák, melyek Δ kortizol értéke nagyobb volt, mint 83 nmol/l (Martin et al, 2008).

A fenti ellentmondásos eredményeket és a nem egységes protokoll alapján végzett vizsgálatokból származó adatokat nehéz összevetni, ugyanakkor néhány állatorvosi szakirodalmi forrás álláspontja alapján amennyiben a kritikus állapotú kutya alap kortizol értéke a referenciatartományon belül vagy a felett van, de az ACTH-stimulációt követően a kortizolválasz elégtelen, úgy CIRCI gyanúja áll fenn, és ezekben a páciensekben a glükokortikoidterápia kedvezően hathat az alapbetegség kimenetelére (Burkitt Creedon et al, 2007; Prittie, 2009; Martin, 2011).

A CIRCI-ben szenvedő beteg kortikoszteroid szubsztitúciós terápiáját illetően jelenleg nincs egységesen elfogadott irányelv, sem a humán-, sem az állatorvoslásban (Cortés-Puch et al,

2014; Burkitt Creedon, 2015; Vandewalle - Libert, 2020; Summers et al, 2021). Korábbi vizsgálatok embereken igazolták, hogy a nagy dózisú GLK-terápia növelte a mortalitást, sőt a másodlagos fertőzések és egyéb mellékhatások okozta halálozás ebben a betegcsoportban magasabb volt (Goecke - Guerrero, 2006; Marik et al, 2008). A humán szakirodalom az alacsony dózisú 0,5 - 1,5 mg/kg hidrokortizon 6 óránként iv./im. vagy 2 mg dexametazon iv./im. alkalmazását javasolja a folyadék- és vérnyomásemelő terápiára nem reagáló septicus betegek kezelésére (Gibson et al, 2005; Marik et al, 2008; Peyton - Burkitt, 2009, Prittie, 2009). A kritikus állapotú kutyák kezelésére jelenleg az alábbi glükokortikoid készítmények javasoltak: hidrokortizon 1,0 - 4,3 mg/kg/24h iv. (a napi dózis elosztható 4 részre és 6 óránként is adható bolusokban) vagy prednizon 0,25 - 1,0 mg/kg/24h iv. (elosztható 2 részre és 12 órással különbséggel adható), illetve dexametazon 0,04 - 0,4 mg/kg/24h iv. (Martin, 2011).

7. A glükokortikoidreceptor és a glükokortikoidrezisztencia

6.1 A glükokortikoidok gyulladáscsillapító és immunmoduláns hatása

A szarvasmarhák mellékvesekérgéből kivont szteroidok gyulladáscsillapító hatását az 1940-es évek második felében ismerték fel és kezdték el orvosi céllal használni. A szintetikusan előállított kortikoszteroidok számos farmakológiai tulajdonságukban térnek el a szervezet által termelt glükokortikoidoktól. Egyfelől a mesterségesen előállított hatóanyagok a keringésben nem a kortizolkötő fehérjéhez kapcsolódva szállítódnak, így a sejtek/szövetek által elérhető „szabad” frakció nem áll szabályozás alatt. Másfelől a szintetikus glükokortikoidok egymástól és az endogén kortizoltól jelentősen különböznek a hatékonyságukat, valamint metabolikus klírenszüket tekintve. Például a dexametazon, ellentétben a kortizollal nem inaktiválható a 2-es típusú 11 β -hidroxi-szteroid-dehidrogenáz által, így a sejtek szintjén fokozott a biológiai elérhetősége (Veterinary Medicine Expert Committee on Drug Information, USP, 2004; Whitley - Day, 2011; Kadmiel - Cidlowski, 2013; Oakley - Cidlowski, 2013).

A glükokortikoidok napjainkban is a leggyakrabban alkalmazott gyulladáscsillapító és immunmoduláns gyógyszerek közé tartoznak mind az embergyógyászatban, mind az állatorvoslásban (Bell et al, 1984; Schmidt et al, 2004; Goecke - Guerrero, 2006; Matsuda et al, 2010; Thacker, 2010; Whitley - Day, 2011; Viviano, 2013; Dendoncker - Libert, 2017).

A glükokortikoidok és receptoraik a szervezet szinte minden sejtjében jelen vannak és csaknem 2000 gén szabályozásában vesznek részt. Ezek a gének szabályozzák az alapélettani működéseket (pl. embrionális fejlődés, postnatalis növekedés, idegrendszer

adaptációja), illetve számos enzim kódolásán keresztül részt vesznek a szénhidrát-, a lipid- és aminosav-anyagcsere, az akut fázis reakció, valamint a xenobiotikumok metabolizációjának szabályozásában is (Newton, 2000; Necela - Cidlowski, 2004; Schmidt et al, 2004; Kadmiel - Cidlowski, 2013; Dendoncker - Libert, 2017).

A glükokortikoidok az immunrendszer sejt és humorális elemeit egyarányt modulálják. Számos a gyulladásban részt vevő citokin (pl. IL-1, IL-6, TNF α , GM-CSF, CXCL8, IL-10), kemokin, adhézións molekula, gyulladásos enzim (pl. lipocortin-1, nitrogén-monoxid-szintáz, ciklooxygenáz) átíródását „kapcsolják ki” (transzrepresszió) (Leung - Bloom, 2003; Barnes - Adcock, 2009; Thacker, 2010; Whitley - Day, 2011; Viviano, 2013). Az antiinflammatorikus hatásukat részben a gyulladásban részt vevő sejtek (pl. lymphocyták, monocyták, eosinophil granulocyták) programozott sejthalálának indukálásával érik el, míg egyes sejteket (pl. neutrophil granulocyták) megvédene az apoptózistól (Necela - Cidlowski, 2004; Schmidt et al, 2004). A humán neutrophil granulocyták más perifériás fehérvérsejttípusokkal összehasonlítva nagyobb mértékben fejezik ki a glükokortikoidreceptor β -izomformáját (hGR β). Ez szerepet játszhat abban, hogy a neutrophil granulocyták glükokortikoid hatására, egy ideig, elkerülik a programozott sejthalált (Leung - Bloom, 2003). A glükokortikoidok sejt-specifikus hatása más módon is megmutatkozik. Az adhézións segítő molekulák csökkent expressziójával a GLK-ok gátolják a neutrophil granulocyták extravázációját, de a kemotaxist, valamint a fagocitózist is akadályozzák (Beishuizen - Thijs, 2004; O'Connor et al, 2000; Thacker, 2010; Kadmiel - Cidlowski, 2013). A B-lymphocyták és plazmasejtek ellenanyag termelése csökken glükokortikoidok hatására, míg a T-lymphocyták egy részében programozott sejthalált okoznak, ugyanakkor az ún. T_{reg}-lymphocyták túlélését segítik a glükokortikoidok (Kadmiel - Cidlowski, 2013). A macrophagok citokin termelését, antigén prezentációját és fagocitózist blokkolják, az eosinophil- és basophil granulocyták számát a keringésben csökkentik, biológiai funkciójukat gátolják a glükokortikoidok (O'Connor et al, 2000; Beishuizen - Thijs, 2004; Thacker, 2010).

Figyelemre méltó különbség van a glükokortikoidok gyulladáscsillapító hatását tekintve a nemek között. Rágcsálókban és főemlősökben végzett kutatások szerint az ösztrogén szerepet játszik a gyulladásos citokinek szabályozásában, a hipotalamusz CRH és AVP szekréciójában, valamint befolyásolhatja az egyéb gyulladásos mediátorok (pl. ciklooxygenáz, nitrogén-monoxid szintáz) képződését is (Puder et al, 2001; Oakley - Cidlowski, 2013; Tait et al, 2008; Venkatesh - Cohen, 2011).

A glükokortikoidok szerteágazó hatásukat nem-genomi és genomi szabályozáson keresztül valósítják meg. Hatásuk dóziszfüggő, szerv, illetve sejt specifikus és a celluláris mikrokörnyezet is befolyásolja (Vandevyver et al, 2014).

A klasszikus, genomi szabályozás általában 24 - 48 órát vesz igénybe, ugyanakkor a GLK-ok már néhány órán belül képesek változást okozni a szervezet működésében. A nem-genomi hatás a sejtmembránhoz kötött, aktivált glükokortikoid receptorok közvetlen, ún. kináz-alapú jelátviteli utakkal és más membránhoz kötött fehérjékkel való kölcsönhatáson alapul (Newton, 2000; Dallman, 2005; Nicolaidis et al, 2014). A genomi szabályozás a GR által az egyes gének transzkripciójának fokozásával (transzaktiváció) vagy gátlásával (transzrepresszió) történik (Gross et al, 2009; Oakley - Cidlowski, 2013). A transzrepresszió már sokkal alacsonyabb GLK-dózis mellett megtörténik, mint a transzaktiváció (Nixon et al, 2013; Nicolaidis et al, 2014). A transzrepresszió elsősorban a gyulladáscsillapító hatásért felelős (pl. AP-1, NF- κ B), míg a glükokortikoidok által kiváltott transzaktiváció döntően a metabolikus „mellékhatásokért” felel (pl. glikoneogenezis fokozása a foszfoenol-piruvát-karboxi-kináz gén fokozott transzkripciója által), ugyanakkor újabb kutatások ennél árnyaltabb képet mutatnak a GR monomerek és dimerek transzkripció aktivitásáról, illetve a glükokortikoidreceptorok egyéb transzkripció faktorokkal történő interakciójának gyulladáscsillapító hatásáról (**4. sz. ábra**) (Newton, 2000; Nixon et al, 2013; Nicolaidis et al, 2014).

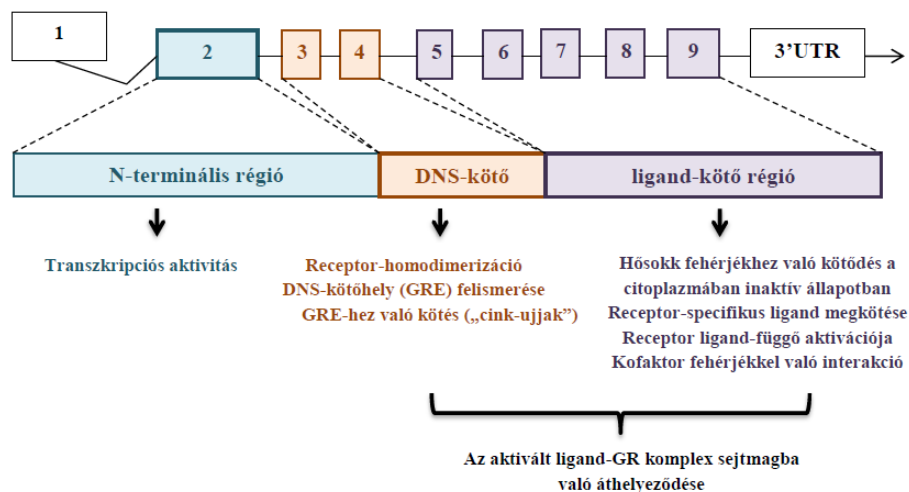
6.2 A glükokortikoidreceptor és izoformái

A glükokortikoidreceptor (GR) egy ligandfüggő transzkripció faktor, amely a nukleáris receptor szupercsalád tagja (Goecke - Guerrero, 2006). Kutyaiban a 2-es kromoszómán elhelyezkedő *NR3C1* (Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1) gén kódolja.

A GR csaknem minden sejtben megtalálható, de megjelenésük (számuk, típusuk, subcellularis megoszlásuk) szövet-specifikus mintázatot mutat (Zhou - Cidlowski, 2005; Nicolaidis et al, 2014). A GR génje emberben és kutyaiban is intronikus szakaszokkal elválasztott 9 exonból áll, amelyekből az első nem tartalmaz kódoló régiót (Lewis-Tuffin - Cidlowski, 2006). A kutya jelenleg ismert és azonosított, funkcionális glükokortikoid receptora (cGR α) egy 781 aminosavból álló fehérje, aminek a szerkezete az általános GR felépítését követi. A receptorfehérje szerkezetileg három fő részből épül fel: az N-terminális régió, a DNS-kötő régió, valamint a C-terminális, ún. ligandkötő domén (**3. sz. ábra**) (http://www.ensembl.org/Canis_lupus_familiarisboxer/Transcript/ProteinSummary?db=core:g=ENSCAFG00000006293;r=2:35169173-35286712;t=ENSCAFT00000010207).

Az N-terminális rész a konstitutív, ligandfüggetlen transzkripció aktivitásért felelős régiót tartalmazza, amely a GLK hormonok célgénjeinek átíródását szabályozza. A centrális, erősen konzervált szakasz a DNS-kötő régió (DBD), amely két „cink-ujj” motívummal rendelkezik, ezekkel képes a sejtmagban lévő kötőhelyekhez (GRE: glükokortikoid reszponzív részek) kapcsolódni, majd egyéb transzkripció faktorokkal komplexet alkotni. Továbbá ennek a régióknak kulcsszerepe van a receptor dimerizációjában is. Az inaktív GR a citoplazmában

monomer formában, fehérjékhez kapcsolódva található, míg a sejtmagban aktív formában dimer-szerkezetű. A „hinge” régió a DBD és a ligandkötő domén között helyeződik és a receptor strukturális flexibilitását biztosítja. A C-terminális régió (ligandkötő domén) pedig a receptor-specifikus ligand megkötésén kívül a ligandfüggő transzkripció aktivációjáért is felel. Az aktivált ligand-GR-komplex sejtmagba való áthelyeződését a centrális és a C-terminális régió szabályozza (Zhou - Cidlowski, 2005; Oakley - Cidlowski, 2013; Dendoncker - Libert, 2017).

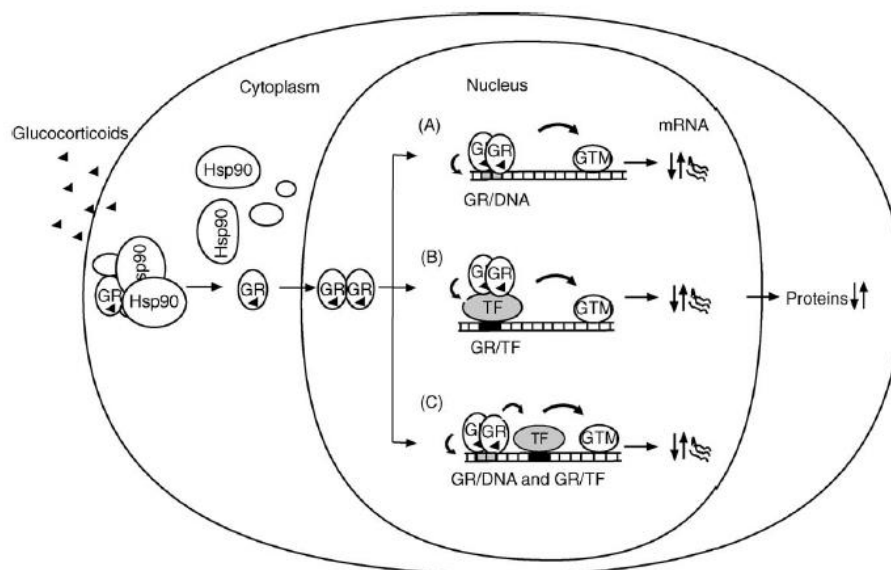


3. sz. ábra. A kutya glükokortikoidreceptor (*NR3C1*) génjének sematikus szerkezeti felépítése (felső sor) és az egyes genomi régiók által kódolt fehérjedomének, valamint azok funkciója (alsó sor). Costa és mtsai, Polymorphisms in the canine glucocorticoid receptor alpha gene (*NR3C1 α*). J. Vet. Pharmacol. Therap., 2015 alapján.

A glükokortikoidok szabadon jutnak át a sejtmembránon és kapcsolódnak a citoplazmában inaktív, ún. multiprotein komplex (pl. HSP90 hősokek-fehérjéhez kötött) formában lévő monomer GR-hoz (Oakley - Cidlowski, 2013; Nicolaidis et al, 2014). A hormon receptor komplex ezt követően aktiválódik (megváltozik a C-terminális domén térszerkezete), és a sejtmagba helyeződik át. Ott a DNS GRE-szakaszaihoz kapcsolódva, homodimert alkotva, számos kofaktor fehérjével funkcionális, transzkripciót szabályozó komplexet képez és felerősíti, vagy éppen gátolja az egyes GLK-reszponzív gének átíródását (Goecke - Guerrero, 2006; Zhou - Cidlowski, 2005; Nicolaidis et al, 2010).

A folyamatot bizonyos transzkripció faktorok is befolyásolják. A gyulladáso folyamatok szabályozásában fontos szerepet játszik a nuclear faktor- κ B (NF- κ B) és az activator protein-1 (AP-1) (Nicolaidis et al, 2010; Oakley - Cidlowski, 2013). Az AP-1 közvetítő szerepet játszik a citokinek jelátvitelében, továbbá számos proinflammatorikus gén aktiválásában vesz részt

(Necela - Cidlowski, 2004). Az NF- κ B a gyulladáskeltő citokinek és gének aktiválásával felerősíti a gyulladást (Necela - Cidlowski, 2004). Az NF- κ B és az AP-1 egyes gyulladáskeltő citokinek, illetve fertőző ágensek, valamint más károsító stimulusok (pl. lipopoliszacharidok, UV-sugárzás, oxidatív hatások) hatására aktiválódnak, és az immunszabályozó gének expressziójának fokozásával sejt- és szövetkárosodáshoz vezetnek (Leung - Bloom, 2003; Zhou - Cidlowski, 2005; Ito et al, 2006). A glükokortikoidreceptor képes közvetlenül hozzákapcsolódni ezekhez a gyulladást transzkribáló faktorokhoz, ezáltal inaktíválva azokat. Emellett a GR-ek bizonyos antiinflammatorikus citokinek és fehérjék kifejeződését is serkentik, így járulva hozzá a gyulladás mérsékléséhez (Zhou - Cidlowski, 2005; Goecke - Guerrero, 2006; Matsuda et al, 2010; Nixon et al, 2013; Nicolaidis et al, 2014).



4. sz. ábra. Sematikus ábra a GR-mediált transzkripció reguláció jelátviteli útvonalairól (Zhou - Cidlowski, 2005). Az inaktív glükokortikoidreceptor (GR) ligandkötést követően a leválik a hőszokk-fehérjéről és a sejtmagba helyeződik át, ahol **(A)** GR-dimer formában közvetlenül kapcsolódik a célgénnek GRE-, illetve nGRE-hez, **(B)** egyes transzkripció faktorokkal (pl. NF- κ B, AP-1) történő közvetlen interakció által történik a génszabályozás, illetve **(C)** egyidejű, komplex interakció során a GRE-vel és a más transzkripció faktorokkal együtt modulálja a célgén átíródását. (GTM: general transcription machinery; TF: other transcription factors)

A glükokortikoidreceptor genomi hatása tehát 3 fő mechanizmuson keresztül valósul meg **(4. sz. ábra)**: (1) transzaktiváció fokozása vagy a transzkripció gátlása (transzrepresszió) a célgénekben; (2) génszabályozás más transzkripció faktorokkal (pl. AP-1, NF- κ B) történő közvetlen interakció által, illetve (3) egyidejű, komplex interakció a GRE-vel és más transzkripció faktorokkal (Leung - Bloom, 2003; Necela - Cidlowski, 2004).

Az *NR3C1* gén átíródása során történő alternatív splicing mechanizmus emberben, majmokban, rágcsálókban, valamint zebrahalban is több variánst eredményezhet. Emberben számos (pl. hGR α , hGR β , hGR γ , hGR-A, hGR-P), míg kutyában mindezig csupán a cGR α ismert (Oakley - Cidlowski, 2011; Costa et al, 2015). Az alternatív splicing a centrális vagy a C-terminális régiót érinti, ezáltal az izoformák a subcellularis lokalizációjukban, a ligandkötésükben, illetve a magkötődésükben különböznek (Bamberger et al, 1995; Oakley - Cidlowski, 2013; Nicolaidis et al, 2014, Costa et al, 2015). Az mRNS translációja során alternatív iniciációnak köszönhetően minden egyes izoformából további variánsok keletkezhetnek, eltérő génregulációs profillal (Oakley - Cidlowski, 2011). Ezek jellemzően az N-terminális régió variációi, tehát ligandkötő képességükben nem, de a sejten belüli megoszlásukban, transzkripció képességükben eltérhetnek (Nicolaidis et al, 2014; Vandevyver et al, 2014; Dendoncker - Libert, 2017). Mindezen túl az egyes variánsok specifikus poszttranszlációs módosulásokon (pl. foszforiláció, acetiláció, metiláció, ubiquitináció, illetve sumoiláció) mennek keresztül, amelyek további funkcionális különbségeket okozhatnak: így például, eltérő receptorstabilitás, subcellularis lokalizáció, és más transzkripció faktorokkal/fehérjékkel történő interakció. A fenti mechanizmusok következménye, hogy bár egy gén kódolja a glükokortikoidreceptort, de az összetett és több szinten szabályozott génkifejeződés miatt számos szerkezetében és funkciójában eltérő fehérje keletkezhet (Nixon et al, 2013; Souza et al, 2014; Nicolaidis et al, 2014; Vandevyver et al, 2014; Tan - Wahli, 2016). Egy friss humán vizsgálat eredménye szerint, amelyben egészséges véradók perifériás vérmintáját vizsgálták, több mint 1500 *NR3C1* variánst detektáltak RNS szinten, ugyanakkor a különböző GR szubtypusok lehetséges funkciójáról fiziológias és patológias körülmények között csak korlátozott ismereteink vannak (Petta et al, 2016, Leventhal et al, 2019).

A transzkript variánsok közül emberben a hGR α , a hGR β valamint, a hGR-P izoformák a legismertebbek. A hGR α és a hGR β izoforma mRNS és fehérjeszinten számos sejtben és szövetben került már kimutatásra és ezek szerepet játszhatnak a sejtek GLK-érzékenységének szabályozásában fiziológias és patológias körülmények között (Zhou - Cidlowski, 2005; Lewis-Tuffin - Cidlowski, 2006; Goecke - Guerrero, 2006; Ito et al, 2006 Nagy et al, 2016). A hGR α az ún. „klasszikus”, funkcionálisan aktív receptor. A hGR α emberben 777 aminosav hosszúságú fehérje (Nicolaidis et al, 2014). A β -izoforma (hGR β) emberben egy rövidebb, 742 aminosav hosszúságú fehérje, amely megtalálható a legtöbb sejtben és szövetben, de fiziológias körülmények között az α -izoformához képest általában nagyságrendekkel kisebb mértékben fejeződik ki és bár döntően a sejtmagban található, de a citoplazma és sejtmag között „ingázni” is képes (Bamberger et al, 1995; Pujols et al, 2002; Yudit - Cidlowski, 2002; Hagendorf et al, 2005; Gross et al, 2009; Ledderose et al, 2012).

A két hGR izotípus mRNS szinten a 9. exonban különbözik egymástól (Bamberger et al, 1995; Lewis-Tuffin - Cidlowski, 2006; Nicolaidis et al, 2010). A 9. exon a ligandkötő rész kódolásában vesz részt (**3. sz. ábra**) (Goecke - Guerrero, 2006). A β -izoforma transzkript variánsa egy rövidebb kódoló régiót tartalmaz, amely csonka fehérjét eredményez és természetes ligandot nem, de pl. a mifepriszton (RU486) nevű glükokortikoidantagonistát megköti, illetve hGR α jelenlétében transzkripció aktivitással bír (Lewis-Tuffin - Cidlowski, 2006; Gross et al, 2009; Kadmiel - Cidlowski, 2013).

A β -izoformát már nem csak emberben, hanem pl. rágcsálókban (Hinds et al, 2010; DuBois et al, 2013), sertésben (Reyer et al, 2013), valamint zebrahalban (Schaaf et al, 2008) is azonosították, ugyanakkor egészséges kutyák májszöveti mintáiból RNA-Seq módszerrel nem sikerült azonosítani (Costa et al, 2015). Az alternatív splicing mechanizmusa az egyes fajokban eltérő. A zebrahalban a 8-as exont érintő „kivágódás” vezet a ligandkötő doménjában eltérő splice variáns létrejöttéhez (Schaaf et al, 2008). Egérben, az emberhez hasonlóan a β -izoformának 15-aminosav-hosszúságú C-terminális régiója van és a 8-as intronban jelen lévő, alternatív splicing donorhely használatával jön létre (Hinds et al, 2010). DuBois és mtsai. (2013) Wistar patkányban olyan izoforma jelenlétét mutatták ki, amely a 7-es intron egyes szekvenciáit tartalmazza. Habár a β -izoformák a különböző fajokban szerkezetileg eltérőek, funkciójukat tekintve azonosak (Schaaf et al, 2008; DuBois et al, 2013; Hinds et al, 2010).

A GR β -izoformájának fokozott megjelenése (pl. proinflammatoricus citokinek vagy mikrobiális szuperantigének által) ún. domináns negatív gátló hatást fejt ki az α -izoforma működésére. Ez azáltal valósul meg, hogy a transzkripció szempontjából inaktív heterodimert hoz létre a GR α -val, illetve az α - és β -izoforma között versengés alakul ki a GRE-hez való kötődésért, valamint a nukleáris receptor transzkripció koaktivátor komplexekért. A GR β negatív/gátló hatása a saját GRE-ken keresztül megvalósuló, közvetlen downregulációval is összefüggésben áll (Yudt - Cidlowski, 2002; Leung - Bloom, 2003; Goecke - Guerrero, 2006; Bernes, 2010; Nicolaidis et al, 2010; Kadmiel - Cidlowski, 2013; Oakley - Cidlowski, 2013; Ma et al, 2013; Nagy et al, 2016; Tan - Wahli, 2016). Az újabb kutatások alapján hGR β a hiszton deacetilációján keresztül is hozzájárul a transzkripció gátlásához (Hinds et al, 2010).

A két izotípus aránya egyéb tényezők mellett szerepet játszik egészséges egyedben a különböző sejtek/szövetek eltérő GLK-érzékenységének kialakításában (Zhou - Cidlowski, 2005; Nicolaidis et al, 2010). A hGR β fokozott expresszióját és ez által az α - és β -izotípus arányának megváltozását ki lehet váltani a gyulladáskeltő citokinekkel, mikrobiális szuperantigénekkel, valamint kortizollal is (Leung et al, 1997; Hauk et al, 2000; Webster et al, 2001; Leung - Bloom, 2003; Zhou - Cidlowski, 2005; Silverman - Sternberg, 2012; Bhatia et al,

2014). Mivel a kortizol-indukálta receptor downreguláció β -izoforma esetén nem valósul meg, ez további arányeltolódást okoz a két izoforma expressziójában (Yudt - Cidlowski, 2002). A két izoforma kifejeződését egyfelől meghatározza a képződésük üteme, másfelől az RNS- és fehérjeszinten eltérő stabilitásuk is hatással van expressziós arányukra (Leung et al, 1997). Mivel a hGR β fehérje félideje kétszer hosszabb, mint a hGR α proteiné, ez is hozzájárul az arányuk megváltozásához (Leung - Bloom, 2003).

A humán GR splice variánsok közül a hGR-P (de hGR- δ -ként is hivatkozott) izoforma az utolsó előtti intron (intron G) retenciója által jön létre. A korai stop kodont tartalmazó izoforma emberben egy 676 aminosav hosszúságú fehérjét kódol, amelynek bár intakt a DNS-kötő doménje, de a β -izofomához képest egy hosszabb rész hiányzik a ligandkötő régióból (Moalli et al, 1993; Krett et al, 1995, Gaitan et al, 1995; Parks, et al, 1998; De Lange et al, 2001). A hGR-P-t először a 90-es években azonosították myeloma multiplexben szenvedő páciensek daganatos sejtjeiben, ahol a fokozott expressziója glükokortikoid rezisztenciát eredményezett (Moalli et al, 1993; Krett et al, 1995, Sanchez-Vega et al, 2006). Ugyanakkor De Lange és mtsai. (2001) transzfekciós vizsgálatában a hGR-P, a hGR α transzkripciós aktivitását és ezáltal a GLK-érzékenységet sejtvonaltól függően befolyásolta. A hGR-P-t azóta nemcsak myeloma sejtekből, hanem más lymphoproliferatív daganatsejtekből is izolálták, valamint egészséges emberek, illetve Addison-kórban és Cushing-betegségben szenvedő páciensek fehérvérsejtjeiben is azonosították (Hagendorf, 2005). A hGR-P expressziója az egyes daganatos mintákban akár az 50%-t is elérte a teljes GR transzkriptomhoz viszonyítva (De Lange et al, 2001), míg egészséges emberek fehérvérsejtjeiben a hGR-P expressziója kb. negyede volt a hGR α -nak, de több nagyságrenddel nagyobb volt a hGR β -hoz képest (Hagendorf, 2005). Habár a hGR-P expressziója jelentősen nagyobb, mint a hGR β -é funkciójáról jelenleg keveset tudunk. A hGR-P hatása ellentmondásos a glükokortikoid érzékenységre, különösen egy újabb kutatás fényében, amely azt találta, hogy a H intron retenciója által létrejött 745 aminosav hosszúságú izoforma (hGR-S1) *in vitro* körülmények között, exogén glükokortikoidhatás jelenlétében és hiányában is csökkent transzaktivációs potenciállal bír (Baker et al, 2012). Mindez tovább árnyalja a strukturálisan hasonló, de funkciójukban különböző izoformák lehetséges biológiai szerepét, valamint a celluláris miliő hatását az egyes izoformák transzkripciós aktivitására vonatkozóan.

A humán GR-P-hez hasonló, az utolsó előtti intron retenciója által létrejött ortológot sertésből származó szövetekben (Reyer et al, 2013), valamint egér blastocystában is detektálták (Čikoš et al, 2019). A sertésből származó különböző szövetekben a GR β , illetve a GR-P aránya az össz *NR3C1* transzkriptomhoz képest 1.2%, illetve 6-25% között változott.

Yamanaka és mtsai (2019) iatrogén Cushing-szindrómában szenvedő kutya perifériás vérmintáját vizsgálva a cGR α -tól különböző izoformát (cGR Δ LBD) írtak le. Vizsgálatukban a C-terminális rész megrövidülésével járó splice variánst inzerciós mutációként azonosították és *in vitro* körülmények között a „csonkolt” izoformával „fertőzött” sejtekben jelentősen csökkent glükokortikoid érzékenységet találtak.

A GR izoformáinak eltérő transzkripciók aktivitásán kívül számos egyéb tényező befolyásolja az endogén vagy exogén glükokortikoidra adott válaszreakciót. A glükokortikoidreceptor nukleáris kötőhelyeit, a genomban nagy gyakorisággal előforduló GRE-eket és az újonnan felfedezett direkt-represszor nGRE szekvenciákat, génpolimorfizmus jellemzi. A GRE és nGRE szakaszok a genomban jellegzetes és változó térszerkezeti mintázatban helyezkednek el a kromatin állapotától függően könnyen, vagy kevésbé hozzáférhető konformációban. A térszerkezeti mintázatra hatással vannak epigenetikus faktorok, a sejtciklus-fázis, valamint a hisztonszerkezet is. A GRE-k dinamikus kölcsönhatásban vannak az aktivált GR-ral és annak kofaktoraival. A kölcsönhatás erőssége függ a GRE szakaszok szekvenciájától, a GR centrális doménjének struktúrájától és a kromatinban szabadon lévő GRE mintázattól is. Glükokortikoidreszponzív elemek magában az *NR3C1* génben is megtalálhatóak, így közvetlen önszabályozás is érvényesül (Pujols et al, 2002; Oakley - Cidlowski, 2013; Dejager et al, 2014; Vandevyver et al, 2014; Dendoncker - Libert, 2017). Ennek a glükokortikoidok által indukált receptor önszabályozásnak is szerepe van az egészséges sejtek GLK-homeosztázisának fenntartásában (Gross et al, 2009; Nicolaidis et al, 2014). Fontos hangsúlyozni azonban, hogy a glükokortikoid jelátviteli útvonalaik és hálózataik szabályozásával kapcsolatos ismeretek még koránt sem teljesek, és jelenleg is aktív kutatás tárgyát képezik (Kadmiel - Cidlowski, 2013, Tan - Wahli, 2016).

A glükokortikoid érzékenység, illetve rezisztencia mértéke tehát genomi szinten az *NR3C1* gén mutációitól, polimorfizmusaitól, a GRE-k és GLK-reszponzív gének elérhetőségétől, a jelátviteli útvonalak egyéb molekuláitól, transzkripciók szinten az alternatív splicing-tól, az alternatív translációk iniciációtól, a microRNS-k expressziót befolyásoló hatásától, fehérjeszinten pedig a poszttranszlációs módosulásoktól, valamint epigenetikai szinten is számos további tényezőtől függ. Például a különböző sejtek/szövetek glükokortikoid érzékenységének cirkadián ritmusa emberben ismert jelenség, amely részben a GR fehérje poszttranszlációs módosulása (pl. acetiláció) révén valósul meg. Mindez együttesen okozza a glükokortikoidok széleskörű, sokrétű, dóziszfüggő és gyakran egyedi hatását (Leung - Bloom, 2003; Stevens et al, 2004; Chrigger et al, 2005; Zhou - Cidlowski, 2005; Gross et al, 2009; Ledderose et al, 2012; Nicolaidis et al, 2014; Souza et al, 2014; Vandevyver et al, 2014; Dendoncker - Libert, 2017).

6.3 A glükokortikoidrezisztencia

A szerzett glükokortikoidrezisztenciát el kell különíteni a veleszületett, ún. primer (familiáris) glükokortikoidrezisztencia szindrómától. Ez a ritka kórkép emberben a GR génmutációja következtében tartósan magas kortizolszintet okoz, de a hypercortisolismus klasszikus klinikai tünetei nem alakulnak ki (Barnes, 2010). Emberben leírták már az *NR3C1* gén ritka, de jellegzetes polimorfizmusait is (pl. ER22/23EK, N363S, BclI) amelyek jelentős fenotípusos különbségeket okozhatnak az egyedi glükokortikoid érzékenységben (Russcher et al, 2005; Silverman - Sternberg, 2012; Kadmiel - Cidlowski, 2013; Souza et al, 2014; Bazsó et al, 2020). Kutyaiban a GR-t kódoló *NR3C1* génben mindeztáig 6 SNP-t mutattak ki, amelyből kettő nem szinonim polimorfizmus (Costa et al, 2015).

A szerzett GLK-rezisztencia esetén a GR génjében nem mutatható ki strukturális eltérés (Leung - Bloom, 2003; Dendoncker - Libert, 2017). A szerzett glükokortikoidrezisztencia molekuláris háttere összetett. Prereceptoriális, receptoriális, valamint poszt-receptoriális mechanizmusok alakíthatják ki (Yudt - Cidlowski, 2002). A csökkent glükokortikoidválasz kialakításában szerepet játszhat a CBG-koncentráció gyulladásos citokinek hatására bekövetkező csökkenése, a 11β -HSD enzimrendszer aktivitásának módosulása, valamint az *ABCB1* gén által kódolt pumpafehérje (P-glikoprotein) fokozott kifejeződése, illetve a ligand-indukálta GR down-reguláció is (Farrell - Kelleher, 2003; Barnes, 2010; Silverman - Sternberg, 2012; Dejager et al, 2014; Nicolaidis et al, 2014). A macrophag migrációs gátló faktor (MIF, Macrophage migration inhibitory factor) egy olyan gyulladáskeltő citokin, amely jelentős glükokortikoid gátlóhatással rendelkezik a macrophagok citokin termelését és T-lymphocyták aktivációját tekintve, és aminek a képződését maguk a GLK-ok is indukálják (Beishuizen - Thijs, 2004, Barnes, 2010; Dejager et al, 2014). Egyes gyulladáskeltő citokinek (pl. IL-2, IL-4) hatására a GR ligand-által történő aktiválódása, sejtmagba történő áthelyeződése és GRE-hez történő kapcsolódása, valamint az egyes transzkripciós faktorokkal történő interakciója is akadályozott lehet (Barnes - Adcock, 2009; Dejager et al, 2014). A ligandkötést követően a GR foszforilálódásának mintázata is befolyásolja a transzkripciós aktivitást (Dejager et al, 2014). A GR transzkripciós eredményességét befolyásolja a kromatin szerkezete, valamint a kromatinállomány hozzáférhetőségét szabályozó faktorok is (Dejager et al, 2014; Dendoncker - Libert, 2017). Egyes transzkripciós faktorok (pl. AP-1) fokozott expressziója, illetve a hiszton acetiláció zavara miatt a célgének transzkripciója zavart szenved. Ezen kívül a T_{reg} -lymphocyták csökkent száma és az általuk termelt IL-10 alacsony koncentrációja is megfigyelhető GLK-rezisztenciában (Leung - Bloom, 2003; Barnes - Adcock, 2009). Emberben ismert az egyes szövetek glükokortikoid érzékenységének cirkadián ritmusa is (Nicolaidis et al, 2014).

Az egyes izoformák mennyisége nemcsak a képződésük rátája, hanem az RNS- és fehérje-szintű degradációjuk mértékének is a függvénye (Leung et al, 1997; Dejager et al, 2014). A glükokortikoidreceptor expressziójának finomhangolásában szerepet játszanak az ún. microRNS-k is. Egyes microRNS-k (pl. miR124) többek között ACTH- és gyulladáscsökkentő citokinek hatására a GR expresszióját mérséklik (Dejager et al, 2014). A GR funkcióját, a korábban már említett posztranszlációs módosulások is jelentősen befolyásolhatják (Dejager et al, 2014)

Számos gyulladáscsökkentő körképben igazolták már a perifériás mononukleáris sejtek GR β upregulációja és a GLK-rezisztencia közötti kapcsolatot: pl. szepszisben (Ledderose et al, 2012; Guerrero et al, 2013), asztmában (Leung et al, 1997; Hamid et al, 1999; Ito et al, 2006; Dejager et al, 2014), gyulladáscsökkentő bélbetegségben (Orie et al, 2002; Farrell - Kelleher, 2003), reumatoid arthritisben (Chikanza - Kozaci, 2004), szisztémás lupus erythematosusban (Piotrowski et al, 2007), valamint egyes lymphoproliferatív körképekben (Oakley - Cidlowski, 2013). Más vizsgálatok ugyanakkor ezt nem igazolták (Goecke - Guerrero, 2006; Ma et al, 2013). Van den Akker és mtsai. (2009) szepszisben és sepsztikus sokkban lévő csecsemők és kisgyermekek vérében a neutrophil granulocyták GR izotípusainak mRNS expresszióját vizsgálták a betegség súlyosságával összevetve. A GR mRNS expresszió átmeneti csökkenését tapasztalták a neutrophil granulocytákban. A csökkenés a hGR α és hGR-P izotípusokat érintette, a hGR β -t nem. A csökkenés mértéke fordítottan arányos volt a betegség súlyosságával.

A humán vizsgálatok során kapott eltérő és ellentmondásos eredmények háttere máig nem tisztázott kérdés. Figyelembe kell venni ugyanakkor a rendkívül összetett és sokszintű, „hálózszerű” szabályozó mechanizmusokat, illetve az alkalmazott metodikák korlátait. A GR-izotípusok kifejeződésének csak mRNS-szintű vizsgálata nem feltétlenül reprezentatív a különböző GR-izoformák fehérje-szinten történő megnyilvánulását tekintve (Goecke - Guerrero, 2006; van den Akker, et al, 2009; Ma et al, 2013). A különböző izoformák expressziójának mértékét befolyásolja a vizsgált szervek (pl. perifériás vérminta, májsejtek, izomszövet, központi idegrendszer stb), illetve sejtek típusa (pl. neutrophil granulocyták, lymphocyták, perifériás mononukleáris sejtek) is (Ledderose et al, 2012). Például az apoptózisra „programozott” lymphocyták és a túlélésre „programozott” neutrophil granulocyták ellentétes GR izotípus mintázattal rendelkeznek (Strickland et al, 2001; van den Akker et al, 2009).

Az intraindividuális variabilitás figyelembevételével (Hagendorf et al, 2005), a jelentős fenotípusbeli különbségeket okozó polimorfizmusok kis allél-gyakorisága a populációs szintű statisztikai vizsgálatokban komoly problémát jelentenek.

A kutya glükokortikoid rezisztenciájával kapcsolatos ismeretek jelenleg korlátozottak (Burkitt Creedon, 2015). A kutyában a glükokortikoidreceptort a 2-es kromoszómán található *NR3C1* gén kódolja. A funkcionálisan aktív, „klasszikus” $cGR\alpha$ izoforma 6 polimorfizmusát írták le eddig (Costa et al, 2015) és Yamanaka és mtsai. (2019) pedig egy iatrogén Cushing szindrómában szenvedő kutya perifériás vérmintájából, egy általuk inzerciós mutációként ($cGR\Delta LBD$) azonosított GR típust izoláltak. Ezt a mutációt 2 másik, egészséges kutyában nem találták meg.

Egy 1984-ben publikált tanulmányban lymphoproliferatív kórképben szenvedő kutyákat és macskákat vizsgáltak, amelyek 2mg/kg/nap dózisú prednisont kaptak 14 napon át. Azon egyedek, amelyek *in vitro* mintáiban a blast sejtek csak kis mértékben kötötték meg a jelölt-triamcinolont, azon egyedek a terápiára sem reagáltak (Bell et al, 1984). Matsuda és mtsai. (2010) kutyából származó daganatos lymphoid sejtvonalakban igazolták az alacsony GR expresszió okozta GLK-rezisztenciát. Ugyanennek a munkacsoportnak egy másik vizsgálatában mastocytómában szenvedő kutyák mintáit vizsgálva azt találták, hogy GLK-rezisztens betegek mintáiban alacsonyabb mértékű volt a daganatos sejtek GR expressziója (Matsuda et al, 2011). Szintén kutya hízósejtes daganatból származó mintákat vizsgált egy másik munkacsoport. A vizsgálataik alapján a rosszul-differenciált daganatos sejtek kisebb mértékben fejeztek ki GR-okat, így azok GLK-kezelésre kevésbé voltak érzékenyek (Takahashi, et al, 1997).

V. Anyag és módszer

1. A vizsgált populáció: kritikus állapotú kutyák és a kontroll csoport

A vizsgálatok első szakaszában 2014. január 1-je és 2016. augusztus 31-e között, az állat tulajdonosának írásos bejegyzésével kórházi felvételre került, gyulladással vagy daganatos alapteregségben szenvedő kutyák közül ötven, kritikus állapotú egyed került kiválasztásra (Melléklet, Adattábla 1). A beválasztási kritériumok közé tartozott, hogy a páciens ismert vagy újonnan megállapított mellékvese betegségben nem szenved, nem részesült a vizsgálatot megelőző egy hónapban glükokortikoid vagy más a HPM-tengely működését befolyásoló gyógyszeres (pl. gesztagének, major analgetikumok, azoltípusú gombaellenes szerek) kezelésben. Ugyanakkor előzetes nem-szteroid típusú gyulladáscsökkentő, antibiotikum, illetve folyadékterápia alkalmazása nem volt kizáró feltétel.

A kritikus állapotú kutyák a fizikális vizsgálaton túl az alapteregségüknek és aktuális állapotuknak megfelelően kiegészítő laboratóriumi (pl. vérgázanalízis, hematológiai és klinikai kémiai vizsgálatok, vizeletvizsgálat, testúri folyadékok vizsgálata stb.), illetve képalkotó vizsgálatokban (pl. hasi ultrahangvizsgálat, mellkas RTG, koponya CT stb.), valamint konzervatív és szükség szerinti sebészeti ellátásban (pl. laparotomia) részesültek. Azon kutyák, amelyek a de Laforcade, 2009 szerinti SIRS kritériumok (**1. sz. táblázat**) közül négyből kettőnek megfeleltek, automatikusan SIRS-páciensként lettek regisztrálva. Ha a kórházi felvétel idején kettőnél kevesebb kritérium állt fenn, úgy a besorolás egyéb klinikopatológiai paraméterek kiértékelése, illetve a kórelőzményi adatok áttekintése alapján történt. Minden páciens esetében a vérvétellel egy időben a tudatállapot is rögzítésre került az APPLE_{fast} pontérték (Hayes et al, 2010) (**3. sz. táblázat**) kiszámításához.

A végső diagnózist a kórelőzményi adatok, a klinikai tünetek, a rutin laboratóriumi és képalkotó vizsgálatok, citológiai/kórszöveti és/vagy kórbonctani vizsgálatok eredményei alapján állapítottuk meg. Azon kritikus állapotú kutyákat, amelyek javuló általános állapotban vagy gyógyultan kerültek hazaadásra a kórházból, a „túlélő” csoportba soroltuk. A „nem-túlélő” csoportba azon egyedek kerültek, amelyek a kórházi kezelés során elpusztultak vagy a rossz kórjóslatra való tekintettel végleges elaltatásra kerültek. Azon pácienseket, amelyek anyagi okokból kerültek elaltatásra, utólag kizártuk a vizsgálatból. A beválasztási kritériumoknak végül 50 egyed felelt meg.

A kutatás második fázisában az előző csoport 23 egyedén kívül, további három, SIRS-ben szenvedő, kritikus állapotú kutyát vontunk be a vizsgálatokba (Melléklet, Adattábla 2). A beválasztási kritériumok a fentiekben ismertettek voltak, ezen kívül további kizáró ok volt, ha páciensnél lymphoproliferatív kórkép került megállapításra.

Ehhez a vizsgálathoz kontroll csoportként klinikailag egészséges, állatorvos kollégák, illetve hallgatók tulajdonában lévő egyedek kerültek kiválasztásra (n=7), amelyek ismert vagy újonnan megállapított mellékvese- vagy egyéb betegségben nem szenvedtek, illetve nem részesültek a vizsgálatot megelőző egy hónapban glükokortikoid vagy más a HHM-tengely működését befolyásoló gyógyszeres (pl. gesztagének, major analgetikumok, azoltípusú gombaellenes szerek) kezelésben. Az egészségvizsgálat magában foglalta a fizikális vizsgálatot, a vérvételt rutin vérvizsgálatokra (hematológia, biokémiai panel, CRP- és alap kortizolszint) (Melléklet, Adattábla 2).

Az elvégzett klinikai vizsgálatokhoz az Állatorvostudományi Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága hozzájárult, továbbá a vizsgálatban résztvevő kutyák mindegyike magas minőségű állatorvosi ellátásban részesült a Kisállatkórház Intenzív Osztályán.

2. Mintavétel és vizsgálati módszerek

A kritikus állapotú betegekben a vérminták vétele a kórházi felvételtől, illetve a kritikus állapot kialakulásától számított 24 órán belül *lege artis* történtek. A laboratóriumi vizsgálatokat az Állatorvostudományi Egyetem Kóréletani és Onkológiai Tanszék laboratóriumában végezték.

2.1 Rutin hematológiai és biokémiai vizsgálatok

A vénás vérminták azonnal vagy legfeljebb 24 órán belül 4°C-on történő tárolást követően kerültek rutin hematológiai és klinikai kémiai vizsgálatra. A C-reaktív fehérje és kortizolszint meghatározáshoz a szérumminták -20°C-on tároltuk a mérésig. A teljes vérkép vizsgálat Abacus Junior Vet 5 Analyzer (Diatron) hematológiai automatával történő mérést és a vérkenet mikroszkópos, kvalitatív morfológiai vizsgálatát foglalta magában. A vizsgált paraméterek az összfehérvérsejtszám, az ún. band neutrophilek száma, lymphocyták száma, a vörösvérsejt szám, hemoglobin koncentráció és vérlemezke szám volt. A klinikai kémiai paraméterek (albumin, összbilirubin, összkoleszterin, ALT, lipáz, kreatinin, CRP) Olympus AU400 biokémiai automatával kerültek lemérésre. A szérum C-reaktív fehérje szintet csak 33 páciens mintájából tudtuk meghatározni, korábban már erre a fajra validált, immunturbidimetriás módszerrel a gyártó leírása alapján (Canine CRP assay, Diasystem Scandinavica). A detekciós tartomány feletti (>220 mg/l) C-reaktív fehérje szinteket a statisztikai vizsgálatokhoz 220 mg/l értéként rögzítettük. A vérglükóz-, a laktát-, a bikarbonát- és az elektrolitszinteket savbázis automatákon (ABL 55 Bloodgas Analyser, Denmark, illetve EPOC vérgáz analizáló rendszer[®], Epocal. Inc. Ontario) a mintavételt követő 5 percen belül meghatároztuk. A savbázis vizsgálatokhoz a mintát speciális mintavételi fecskendőbe gyűjtöttük (PICO, Radiometer[®]).

2.2 Az alacsony dózisú ACTH-stimulációs teszt és szérumszint meghatározás

Az ACTH-stimulációs tesztet a vérvétellel egy időben végeztük alacsony 0,5 µg/kg dózisban beadott tetrakozaktid injekció felhasználásával (Synacten 250µg/ml inj., Novartis). Szérumszinteket a szintetikus ACTH-injekció intravénás beadása előtti (kortizol t_0) és 60 perccel később (kortizol t_{1h}) vett vérmintákból is meghatároztuk. Két kutya posztstimulációs kortizolszint meghatározása elégtelen mintamennyiség következtében nem volt lehetséges. A Δ kortizol értékét a kapott eredmények alapján az alábbi formula alapján számítottuk ki:
$$\Delta\text{kortizol} = [\text{kortizol } t_{1h}] - [\text{kortizol } t_0].$$

A szérumszint mérés kutyára korábban már validált, kemilumineszcens immunoassay (Immulite1000, Siemens) módszerrel történt (Russell et al, 2007). A detekciós tartomány feletti (>1380 nmol/l) kortizolszinteket a statisztikai vizsgálatokhoz 1380 nmol/l értéként rögzítettük.

2.3 A perifériás vérminta RNS tartalmának kivonása, tisztítása, minőség ellenőrzés és cDNS formában történő átírása

A glükokortikoidreceptor mRNS expressziójának vizsgálatához az egészséges és a kritikus állapotú kutyák (egyedenként 2*500 µl) perifériás vérmintáját speciális csőbe (RNA Protect[®] Animal Blood Tubes, Qiagen[®]) gyűjtöttük, és a gyártó ajánlása szerint kezeltük. A csöveket az mRNS-tartalom kivonásáig -80°C-on tároltuk. Az mRNS-tisztítást (RNeasy Protect Animal Blood Kit for purification of total RNA from blood, Qiagen[®]) és a minták minősítését (Agilent 2100 Bioanalyzer mikrokapillaris chip-gélelektroforézis rendszer), valamint cDNS-re történő átírását a Chromoscience Kft. végezte.

2.4 A cGR izoformák új generációs RNS szekvenálással (RNA-Seq) történő bioinformatikai azonosítása

A glükokortikoidreceptor izoformákat (*NR3C1* gén splice variánsok) a Xenovea Kft. közreműködésével, ún. új-generációs RNS szekvenálással (mRNA-Seq) azonosítottuk. Egy kritikus állapotú, szepikus peritonitisben szenvedő kutyából (Melléklet Adattábla 2, „Patient 25”) származó, Qiagen RNALater (500µl) csőbe gyűjtött és tárolt perifériás vérmintájából az RNS kivonása a gyártó javaslata alapján történt (RNeasy[®] Protect Animal Blood Kit; Qiagen). A minta minősítését (ún. RNA Integrity Number meghatározása) és a tisztított RNS koncentrációjának mérését automatizált, elektroforézis elvén működő rendszerrel végeztük (4200 TapeStation System Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; RNA HS Assay Kit with Qubit 3.0 Fluorometer Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Az mRNS-könyvtárt a KAPA Stranded mRNA-Seq Kit (Illumina, Roche) használatával, a gyártói alkalmazási előirat alapján hoztuk létre. Az mRNS-könyvtár kvantitatív és kvalitatív minősítése High Sensitivity DNA 1000 ScreenTape system with 2200 TapeStation (Agilent) és dsDNA HS Assay Kit with Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher) rendszerrel végeztük. A poolozott könyvtárak hígításra kerültek (to 1.8 pM for 2x81 bp paired-end sequencing with 150-cycle High Output v2.5 Kit on the NextSeq 550 Sequencing System; Illumina) a gyártó protokollját követve.

A termékek az Illumina software (fastx-toolkit) adapter- és minőségkontrollja (Q30) alapján kerültek trimmelésre és kiértékelésre (hosszúság, minőség, adapter tartalom, GC-tartalom FASTQC szerint). 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 transzkript variánsokat *StringTie* (v2.1.1) programmal azonosítottuk be. A termékek megoszlása a különböző genomi régiók között (CDS exons, UTR exons, introns, upstream and downstream régiók) RSeQC (v3.0.1)-vel lett meghatározva. A kapott *NR3C1* transzkriptek végül az Integrative Genomics viewer használatával kerültek vizuális elbírálásra. Az exonok és feltételezett exonok konszenzusos szekvenciáinak összekapcsolása és translációja EMBOSS transeq (v5.0.0) segítségével történt. Az mRNS-Seq adatok a National Center for Biotechnology Information számára elküldtük (projekt azonosító száma: PRJNA736937 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA736937>).

2.5 Glükokortikoidreceptor mRNS expresszió vizsgálata egészséges és klinikailag beteg kutyák perifériás vérmintájából (két-lépéses RT-qPCR)

A qPCR-hez a perifériás vérminták a 2.3. pontban leírt módon kerültek tisztításra és minősítésre. A kivont RNS cDNS-e történő átírását RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-tel (Thermo Scientific) végeztük a gyártó előírása alapján. A cGR α és cGR-P mRNS expresszió TaqMan-alapú real-time PCR assay-vel, singleplex reakcióként került detektálásra (**10. sz. ábra**). A cGR α és cGR-P specifikus primereket a PrimerQuest™ Tool from IDT (<https://eu.idtdna.com/>) programmal terveztük. A primerek specificitásának ellenőrzéséhez pedig a NCBI adatbázis szerinti Primer-BLAST tool-t használtuk (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A közös forward primer (5' GAT TAT TAA TGA GCA GAG AAT GAC CCT 3'), ami a 6-7-es exonok találkozási pontjára lett tervezve, ezáltal mindkettő izoforma kvantitatív vizsgálatát lehetővé tette, egyidejűleg került alkalmazásra a reverz primerekkel, amelyek egyfelől a 8-as exonnal (5' GTT CCC TTC CCT CTT GAC AAT G 3'), másfelől a 7-es intronnal (5' GTT TCT GCA CAT TTA CAT TTC ATG C 3') komplementerek, ezáltal a cGR α , illetve cGR-P izoformákkal specifikusak. A cGR α -specifikus próba (5' CAG TTC CTA AGG AAG GTT TGA AGA GCC A 3') HEX-szel (hexakloro-

fluoreszcein) lett jelölve és a 7-8-as exon találkozási pontjához kötődik be, míg a cGR-P-specifikus próba (5' TGC TCT ACC AAC CTG AAG AGA GAA GC 3') FAM-mal (fluoreszcein amidit) jelölt és a 7 exon és 7 intron határán kapcsolódik be (**10. sz. ábra**). A cGR α - és cGR-P-specifikus próbák tervezése az antisense és sense szálak alapján történt.

A PCR reakcióelegy végtérfogata (10 μ l) 1 μ l cDNS-t, 1 \times TaqMan™ Gene Expression Master Mix-et (Applied Biosystems), 900 nM mennyiségű primert (Eurofins Genomics AT) és 250 nM TaqMan próbát (Eurofins Genomics AT) tartalmazott. Belső kontrollként a qPCR vizsgálat során a *RPS5*-t kódoló gént használtuk (Brinkhof et al, 2016). A referencia gén expresszióját egy paralel SYBR Green-alapú real-time PCR reakcióban mértük. A reakcióelegy végtérfogata (10 μ l) 1 \times qPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX reagenst (PCR Biosystems), 1 μ l mennyiségű templátot a reverz transzkripcióhoz, 500 nM mennyiségű forward (5' GGA GCG CCT GAC CAA CT 3') és 500 nM mennyiségű reverse (5' CCC GGG GAC CAC TGT TA 3') primereket tartalmazott. A felhasznált primerek IDT alapján kerültek megtervezésre. A PCR reakciók mindegyike MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems) in QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) rendszerben történt, a következőkben felsorolt PCR futási ciklus paraméterekkel: 50°C – 2 min, 95°C – 10 min, majd 40 cikluson keresztül 95°C – 15 s, 60°C – 1 min. A reakciókat triplikátummal végeztük. A kapott mérési eredmények a Thermo Fisher Cloud (Thermo Fisher Scientific) relatív kvantifikáció analízis moduljába kerültek feltöltésre, hogy a technikai replikátumok átlag \pm SD értékeiket megkapjuk. Minden technikai replikátum C_t standard deviációja kisebb volt, mint 0,3.

A kontrol és SIRS egyedek cGR α és cGR-P mRNS expressziós szintjeinek relatív kalkulálásához a komparatív threshold cycle (C_t) módszert használtuk (Schmittgen - Livak, 2008). A kapott eredményeket a *RPS5* háztartási gén expressziós szintjéhez és a kontroll csoport átlagához normalizáltuk (Melléklet, Adattábla 4). Az alábbi formulát használtuk a génexpressziós szintek számításához: $2^{-\Delta\Delta C_T}$, ahol $\Delta\Delta C_T = (C_{T,target\ gene} - C_{T,reference\ gene})$ minta - átlag $(C_{T,target\ gene} - C_{T,reference\ gene})$ kontroll csoport. A SIRS-ben szenvedő páciensek túlélő és nem túlélő alcsoportjainak esetében $2^{-\Delta\Delta C_T}$ vizsgálata az egészséges kutyák mRNS expressziós értékeihez képest mért relatív változást jelenti.

2.6 In silico vizsgálatok

Az alábbi fajok *NR3C1*-201 (GR α) transzkript szekvenciái kerültek elemzésre (forrás: <http://www.ensembl.org/>): ember (ENST00000231509.7), sertés (ENSSSCT00000044530.2), egér (ENSMUST00000025300.13) és kutya (ENSCAFT00000010207.4). Az emberi, a sertés, az egér, valamint a kutya exonok kerültek összehasonlításra, a GRCh38.p13, Sscrofa11.1,

GRCm39 és CanFam3.1 alapján. A humán szekvenciát tekintettük referenciának az exonok egyezőségének vizsgálatához és az összevetéséhez.

A humán GR α (P04150-1) és GR-P (P04150-4) aminosav sorrendjét az UniProt Knowledgebase-ból vettük (<https://www.uniprot.org/>). A sertés, az egér és a kutya GR-P izoforma szekvenciái Clone Manager 9 Professional Edition (v9.1) programmal lettek analizálva. A sertés GR-P (Reyer et al, 2013) (accession number: KC329459) és a részleges egér GR-P (Čikoš et al, 2019) (MG946717.1) transzkript szekvenciák a NCBI adatbázisából származnak. A teljes egér GR-P kódoló szekvencia megalkotásához, az Ensembl alapján ismert sorrendet, a GenBank-ból ismert részleges GR-P szekvenciához illesztettük, így a 7-es intron sorrendje az egér GR 7-es exonja után került beillesztésre. A kutya GR-P transzkript szekvencia a saját mRNS-Seq vizsgálatunkból volt ismert (GenBank, accession number: MZ382869). A meghatározott ORF-k szerinti fehérjeszekvenciákra történő transláció Clone Manager 9 Professional Edition (v9.1) programmal végeztük. A hGR α ligandkötő doménjának a 531-777 közötti aminosav sorrend feltérképezéséhez az NCBI Conserved Domain Search (Lu et al, 2020) programot használtuk. A GR-P izoforma aminosav sorrendjének illesztését a hGR α splice variánshoz Clustal Omega (v1.2.4) programmal végeztük (Madeira et al, 2019) az eltérés a hGR α -tól a 674 aminosav után volt detektálható.

3. Statisztika

A kutatás első fázisában kapott eredmények statisztikai vizsgálatához az „R 3.2.3 statisztikai program-ot” (R Core Team, 2015) használtuk. A vizsgálni kívánt paraméterek a következők voltak: alap kortizolszint (kortizol₀), stimulált kortizolszint (kortizol_{t1h}), Δ kortizol érték, testhőmérséklet, a SIRS kritériumoknak való megfelelés, az APPLE_{fast} pontérték, összfehérvérsejtszám, band neutrophil granulocyták abszolút száma, abszolút lymphocyták szám, szérum albumin és C-reaktív fehérje koncentráció.

A folytonos változók (Δ kortizol érték, testhőmérséklet, az APPLE_{fast} pont, összfehérvérsejt szám, band neutrophil granulocyták abszolút száma, abszolút lymphocyták szám, szérum albumin és C-reaktív fehérje koncentráció) átlaga és \pm SD tartományuk került rögzítésre. A csoportok értékeinek összehasonlításához Student's t-tesztet, valamint Spearman-féle rang korrelációt alkalmaztunk. A kategóriás változók (a SIRS kritériumoknak való megfelelés, a betegség kimenetel, az alap és a stimulált kortizolszint) összehasonlításához Fisher-féle egzakt próbát használtunk. Logisztikus regressziós modell alkalmazásával vizsgáltuk az APPLE_{fast} pontérték és a betegség kimenetel közötti kapcsolat erősségét. Az ACTH-stimulációs teszt során vett vérmintákban mért alap és/vagy stimulált kortizolszint 4 páciens esetében a detekciós tartomány feletti érték (>1380 nmol/l) volt, emiatt a statisztikai

elemzésből ezen eredményeket kizártuk. A Δ kortizol határértékének megállapítása 44 kutya adataiból történt a túlélés esélyének megbecslésére. A statisztikai vizsgálatokhoz az alábbi csoportokat hoztuk létre: referenciatartományon belüli alap kortizolszint (40 - 110 nmol/l), alap kortizolszint emelkedett (≥ 110 nmol/l), stimulált kortizolszint a referenciatartományon belüli (150 - 470 nmol/l), a stimulált kortizolszint emelkedett (≥ 470 nmol/l) vagy a stimulált kortizolszint csökkent (< 150 nmol/l) a referenciatartományhoz képest. A $p < 0,05$ érték esetén a kapott eredményt statisztikailag szignifikáns különbségnek tekintettük.

A vizsgálatok második fázisában kapott eredmények (klinikopatológiai változók és génexpressziós szintek) kiértékeléshez GraphPad Prism 8.0.1 statisztikai programot használtunk. A kategóriás változók (ivar) gyakoriságként kerültek kifejezésre. A folytonos változók (életkor, összfehérvérsejtszám, szérum C-reaktív fehérje koncentráció, valamint szérum alap kortizolszint) tekintetében pedig a medián értékek és a hozzájuk tartozó tartományok kerültek rögzítésre.

A két csoport kategóriás változóinak elemzésére Fisher-féle egzakt tesztet alkalmaztunk, a folytonos változók összevetéséhez pedig, nem-parametrikus Mann-Whitney U tesztet használtunk. A csoportok értékeinek összehasonlításához Spearman-féle rang korrelációt alkalmaztunk. A p -értékek kétoldali próbával kerültek meghatározásra és $p < 0,05$ érték esetén tekintettük a kapott eredményt statisztikailag szignifikánsnak.

4. Célkitűzés

A kutatómunka során egyfelől célunk volt az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatkórházának Intenzív Osztályán kezelt kritikus állapotú kutyák kortizol rezerv kapacitásának vizsgálatával a CIRCI-szindróma előfordulási gyakoriságának felmérése, illetve az adrenalis válaszkészség összevetése egyes, a szisztémás gyulladás mértékét mutató klinikopatológiai paraméterekkel, illetve a betegség kimenetelével.

Ehhez klinikopatológiai vizsgálatokkal igazolt, szisztémás gyulladással válaszreakció szindrómában (SIRS) szenvedő kutyák kortizolválaszkészségét vizsgálatuk $0.5 \mu\text{g}/\text{ttkg}$ dózisban beadott szintetikus ACTH-injekcióval végzett stimulációs teszt során. Továbbá az alap és a stimulált kortizolszintet, valamint a Δ kortizol értékét vetettük össze a gyulladás mértékét mutató hematológiai és klinikai kémiai paraméterekkel, valamint a betegség kimenetelével.

A kutatás során további célkitűzés volt a kritikus állapotú kutyák perifériás vérmintáiban a glükokortikoidreceptor izoformák mRNS expressziójának vizsgálata. A humán szakirodalmi ismeretekre alapozva feltételeztük, hogy a gyulladással járó kórképekben, hasonlóan az emberhez, kutyában is megváltozik a GR expressziója. Ennek vizsgálatára

SIRS-ben szenvedő, valamint klinikailag egészséges kutyák perifériás vérmintáit speciális csőbe gyűjtöttük (Qiagen RNALater). Az alternatív splicing során létrejövő transzkript vairánsokat ún. új-generációs RNS szekvenálással vizsgáltuk SIRS-ben szenvedő kutya perifériás vérmintájából. Az RNA-Seq során kapott és bioinformatikai módszerekkel azonosított transzkriptek alapján izoforma-specifikus primereket és próbákat tervezve az *NR3C1* ortológok jelenlétét vizsgáltuk TaqMan qPCR-rel az egészséges és a SIRS-ben szenvedő kutyák vérmintáiban. Az egészséges kontroll csoport és a SIRS kohort GR izoformáinak expressziós szintjét összevetettük, továbbá, a SIRS csoport értékeit tovább vizsgálva a túlélő- és a nem-túlélő kutyák expresziós mintázatát elemeztük ki a vizsgált klinikopatológiai paraméterek, illetve a betegség kimenetelének tükrében.

VI. Eredmények

1. A kritikus állapotú kutyák kortizolválasz készségének vizsgálata és összevetése a szisztémás gyulladás mértékét mutató paraméterekkel és betegség kimenetelével

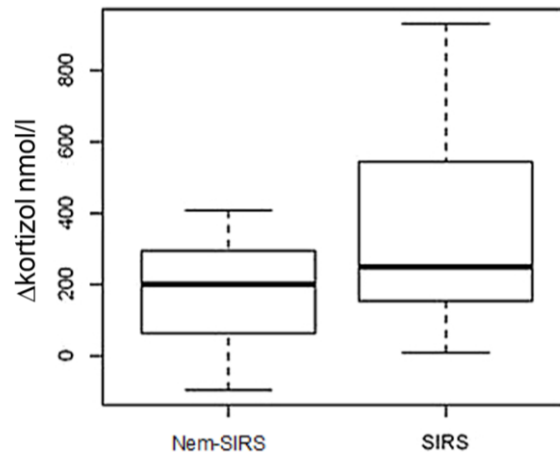
A vizsgált időszakban a beválasztási kritériumoknak ötven kritikus állapotú kutya felelt meg, ebből 26 hímivarú (12/26 kasztrált) és 24 nőivarú (13/24 ivartalanított) egyed volt (Melléklet adattábla 1). A páciensek az alábbi fajtákhoz tartoztak: 7 egyed keverék, 4 egyed német juhászkutya, 3 - 3 egyed Yorkshire terrier és Golden retriever, 2 egyed Bichon bolognese, Bichon havanese, illetve angol cocker spániel, Tacsókó, Dobermann, Mopsz, valamint West highland white terrier fajtájú volt, további 19 fajtából pedig 1-1 egyed került a vizsgálati csoportba. A beteg egyedek medián testtömege 22,5 kg (2 - 65 kg) volt. A páciensek életkora az alábbiak szerint alakult: 5 hónapos volt a legfiatalabb és 15,5 éves a legidősebb beteg, a medián életkor 7 év volt. A nem-túlélők átlagéletkora $8,7 \pm 3,8$ év (0,9 - 15,5 év) szignifikánsan magasabb volt, mint a túlélők átlag életkora $6,4 \pm 3,7$ év (0,5 - 13,5 év) ($p= 0,0461$).

A betegek 82%-ában (41/50) valamilyen gyulladósos kórkép került megállapításra: peritonitis ($n=8$), gyulladósos bélbetegség (IBD) ($n=5$), akut vérzéses hasmenés szindróma (korábbi nevén haemorrhagiás gastroenteritis) ($n=3$), septicaemia ($n=3$), ún. ismeretlen oktanú láz szindróma (fever of unknown origin) ($n=2$), pancreatitis-szel szövődött diabetes mellitus ($n=2$), pleuropneumonia ($n=2$), bronchopneumonia ($n=2$), félrenyeléses tüdőgyulladás ($n=2$), szeptikus pleuritis ($n=2$), harapott sérülés ($n=2$), immun-mediált haemolyticus anaemia ($n=2$), nem-specifikus gastroenteritis ($n=1$), endocarditis ($n=1$), mastitis ($n=1$), tályog ($n=1$), babesiosis ($n=1$), immun-mediált polyarthritis ($n=1$). Az 50 egyedből 9 kutya (18%) pedig valamilyen daganatos megbetegedéssel került diagnosztizálásra: emlő carcinoma ($n=2$), kissejtes tüdő carcinoma ($n=1$), high grade multicentrikus lymphoma ($n=1$), alimentaris B-sejtes lymphoma ($n=1$), high grade laphámsejtes carcinoma ($n=1$), haemangiosarcoma ($n=1$), tüdő metastasis ($n=1$), hasüregi nem differenciált sarcoma ($n=1$). A páciensek 64%-a (32/50) gyógyultan/javuló általános állapotban a kórházból hazaadásra került, de 18 kutya (36%) a kórházi kezelés időtartama alatt elpusztult vagy a rossz kórjóslat miatt végleges elaltatásra került.

A betegek 64%-a (32/50) teljesített kettő feltételt a négy SIRS kritériumrendszerből. Közülük 5 kutya (5/9; 56%) a daganatos és 27 egyed (27/41; 66%) a gyulladósos betegcsoportba tartozott.

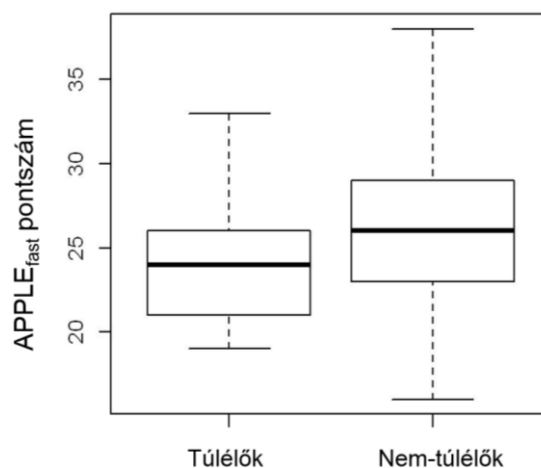
A SIRS- és a nem-SIRS csoport között nem volt szignifikáns különbség a betegség kimenetelét tekintve. A SIRS és nem-SIRS csoportba tartozó egyedek alap kortizol (medián $SIRSkortizol_{t0}$: 176 nmol/l; 52,4 - 1366 nmol/l; medián $nemSIRSkortizol_{t0}$: 147 nmol/l; 69,3 - 1131

nmol/l; $p=0,3476$), illetve stimulált kortizolszintje nem különbözött szignifikánsan (medián $SIRS_{kortizol_{t60}}$: 329,5 nmol/l; 123 - 1035 nmol/l; medián $nemSIRS_{kortizol_{t60}}$: 449,5 nmol/l; 93,8 - 1219 nmol/l; $p=0,158$). Ugyanakkor a medián Δ kortizol érték szignifikánsan különbözött a SIRS- és nem-SIRS csoportok között (medián Δ kortizol_{non-SIRS}: 201,5 nmol/l (tartomány: -96 - 408 nmol/l), és medián Δ kortizol_{SIRS}: 249,15 nmol/l (tartomány: 8 - 931 nmol/l), $p= 0,0148$ (**5. sz. ábra**).



5. sz. ábra. A Δ kortizol érték alakulása a SIRS- és nem-SIRS betegcsoportban (medián Δ kortizol_{non-SIRS}: 201,5 nmol/l (tartomány: -96 - 408 nmol/l), és medián Δ kortizol_{SIRS}: 249,15nmol/l (tartomány: 8 - 931 nmol/l); $p= 0,0148$. A horizontális vastag vonal a medián értékeket jelöli.

Az $APPLE_{fast}$ pontérték és az alap-, a stimulált kortizolszint, valamint a Δ kortizol érték között nem volt szignifikáns összefüggés. Ugyanakkor logisztikus regresszió alkalmazásával statisztikailag szignifikáns kapcsolatot lehetett kimutatni a növekvő $APPLE_{fast}$ pontérték és a túlélés csökkenő esélye között [átlag $APPLE_{fast}$ pontérték a túlélő betegcsoportban: $24,09 \pm 3,62$, átlag $APPLE_{fast}$ pontérték a nem-túlélő betegcsoportban: $26,89 \pm 5,29$, OR = 0,86, CI 95%: (0,79; 0,92), $p = 0,0420$] (**6. sz. ábra**).



6. sz. ábra. Logisztikus regresszió alkalmazásával szignifikáns kapcsolatot lehetett kimutatni a növekvő APPLE_{fast} pontérték és a túlélés csökkenő esélye között. Az APPLE_{fast} pontszám a túlélő- és a nem-túlélő betegcsoportban: átlag_{túlélő} 24,09 ± 3,62, átlag_{nem-túlélő} 26,89 ± 5,29 (OR= 0,86, CI 95%: [0,79; 0,92], p= 0,0420).

A testhőmérséklet a vérvétellel egyidőben került megmérésre és rögzítésre. Harmincegy beteg (31/50; 62%) testhőmérséklete fiziológias tartományban volt (38,0 - 39,2°C), 8 kutya (8/50; 16%) testhőmérséklete emelkedett, 11 egyed (11/50, 22%) pedig hypothermiás volt. A testhőmérséklet emelkedése korrelált az emelkedett CRP-szinttel (Spearman-féle rang korreláció, $p = 0,0255$, $\rho = 0,39$). A vizsgált populációban az ivar nem befolyásolta a betegség kimenetelét (Fisher-féle egzakt teszt, $p = 0,8473$).

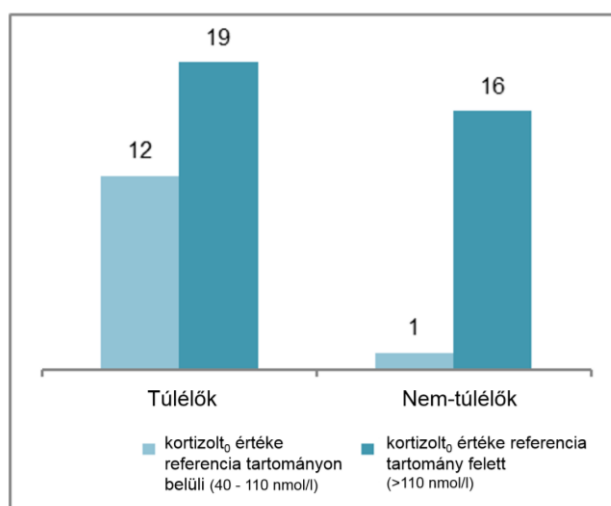
A szérumszintű C-reaktív fehérje szint 33 egyed mintájából került meghatározásra: medián_{crp}: 101,6 mg/l, átlag_{crp}: 130,6 ± 87,20 mg/l, tartomány: 18,9 - 406,1 mg/l). Habár a nem-túlélő egyedek átlag CRP-szintje magasabb volt, mint a túlélőké, a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns (**7. sz. táblázat**). Az átlag CRP-koncentráció nem különbözött a SIRS- (146,4 ± 94,5 mg/l) és nem-SIRS (109,1 ± 74,0 mg/l) csoportok között sem, továbbá a szérumszintű C-reaktív fehérje koncentráció nem korrelált sem az alap, sem a stimulált kortizolszinttel. Az összfehérvérsejtszám, a band neutrophil granulocyták, illetve a lymphocyták abszolút száma, továbbá az albumin koncentráció nem korrelált a betegség kimenetelével. A szérumszintű albumin koncentráció nem különbözött a túlélő- és nem túlélő betegcsoportban (**7. sz. táblázat**).

7. sz. táblázat A túlélő- és nem túlélő páciensek klinikai és laboratóriumi jellemzői

* Wilcoxon- féle rangösszeg próba folytonossági korrekcióval

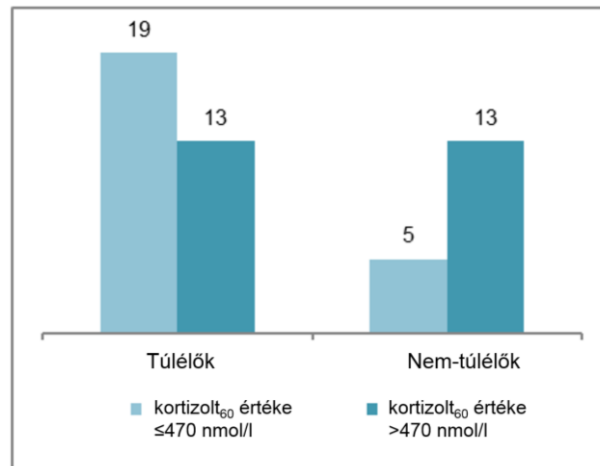
Paraméter		átlag	SD	medián	n	p-érték
APPLE _{fast} pontérték	Túlélők	24,09	3,62	24	32	0,0283
	Nem-túlélők	26,89	5,29	26	18	
Testhőmérséklet (°C)	Túlélők	38,59	0,67	38,65	32	0,6314
	Nem-túlélők	38,69	0,76	38,80	18	
Összfehérvérsejt szám (G/l)	Túlélők	28,71	17,89	26,35	32	0,5309
	Nem-túlélők	31,31	31,87	22,45	18	
Band Neutrophil sejt szám (G/l)	Túlélők	2,66	4,77	1,11	31	0,4445
	Nem-túlélők	1,60	2,85	0,76	16	
Lymphocyta sejt szám (G/l)	Túlélők	2,64	1,44	2,02	31	0,4061
	Nem-túlélők	2,36	1,92	1,83	16	
Albumin koncentráció (g/l)	Túlélők	23,70	7,33	22,7	32	0,8805
	Nem-túlélők	23,97	5,18	23,6	18	
C-reaktív fehérje szint (mg/l)	Túlélők	118,97	90,85	87,65	20	0,2852*
	Nem-túlélők	148,38	81,50	146,2	13	
Δkortizol érték	Túlélők	274,5	227,6	218	29	0,8807
	Nem-túlélők	288,5	294,5	155	13	

Azon egyedek, amelyek alap kortizolszintje [kortizol_{t0}] a referencia tartományhoz (>110 nmol/l) képest emelkedett volt, csaknem 10-szer nagyobb eséllyel tartoztak a nem-túlélő betegcsoportba, összevetve azon kutyákkal, amelyeknek az alap kortizol koncentrációja a referenciatartományon belül (40 - 110 nmol/l) volt mérhető (OR = 9,71, p = 0,0135) (**7. sz. ábra**).



7. sz. ábra. A túlélő és nem-túlélő kutyák alap kortizol (kortizol_{t0}) szintje és a túlélés valószínűsége közötti összefüggés. Az oszlopok feletti számok az egyedszámokat jelölik (OR = 9,71, p = 0,0135).

Azon páciensek, amelyek stimulált kortizol szintje [kortizol $t_{60\text{min}}$] a referencia tartományhoz képest (>470 nmol/l) emelkedett volt csaknem 4-szer nagyobb eséllyel tartoztak a nem-túlélő betegcsoportba, összevetve azon kutyákkal, amelyeknek a stimulált kortizol koncentrációja a referenciatartományon belül (150 - 470 nmol/l) vagy az alatt volt mérhető (OR = 3,69, $p = 0,0311$) (8. sz. ábra).



8. sz. ábra. A túlélő és nem-túlélő kutyák stimulált kortizolszintje és a túlélés valószínűsége közötti összefüggés. Az oszlopok feletti számok az egyedszámokat jelölik (OR= 3,69, $p= 0,0311$).

A négy kutya, amelyeknek az alap és/vagy stimulált kortizol szintje a mérési módszer detekciós tartománya feletti érték (>1380 nmol/l) volt a statisztikai vizsgálatokban nem szerepelt. Ezek közül három egyed a kórházi kezelés időtartama alatt elpusztult vagy a rossz kórjóslatra való tekintettel elaltatásra került (peritonitis-szel szövődött hasnyálmirigy gyulladás, emlőtumor, idegentest okozta ileus és hashártyagyulladás) és csak egy kutya került hazaadásra a kórházból (babesiosis és tibia-implantátum okozta fertőzés).

A klinikai döntéshozatalt segítő, megfelelő szenzitivitással és specificitással rendelkező Δ kortizol határértéket statisztikai módszerekkel ebben a betegpopulációban nem találtunk.

2. A Glükokortikoidreceptor P izoforma detektálása kritikus állapotú kutya perifériás vérmintájából mRNA-Seq módszerrel

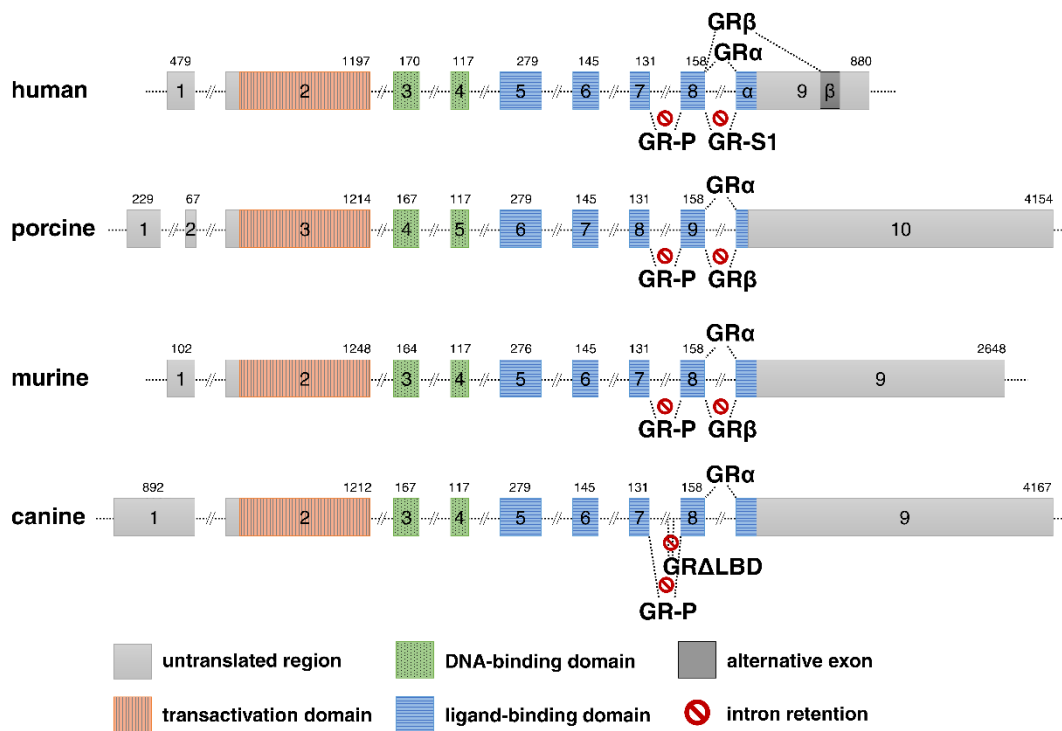
A humán szakirodalmi ismeretekre alapozva feltételeztük, hogy a gyulladásoos kórképekben, hasonlóan az emberhez, kutyában is megváltozik a glükokortikoidreceptor expressziója. Ennek a hipotézisnek az igazolására, egy szeptikus peritonitisben szenvedő kutya (Melléklet 2. adattábla, „Patient 25”) perifériás vérmintájából nyertünk ki RNS-t, azzal a céllal, hogy a szisztémás gyulladás indukálta alternatív splicing mechanizmus révén létrejött lehetséges *NR3C1* gén ortológokat vizsgáljuk. A tisztított és minősített mRNS ún. újgenerációs szekvenálással került vizsgálatra.

A CanFam3.1 referencia genom alapján ismert szekvenciák illesztésekor azonosításra került a cGR egy, a 7-es intron retencióját tartalmazó canine *NR3C1* transzkript variánsa (**9. sz. ábra**). Az 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 magasabb volt, mint a globális intron: exon arány. Ez alapján kimondható, hogy ez az alternatív mRNS transzkript egy bona fide splice variáns (Melléklet 3. adattábla). Az mRNS-Seq adatok alapján ennek az eddig nem ismert izoformának az expressziós szintje a klasszikus cGR α transzkripthez viszonyítva kb. 20% volt.

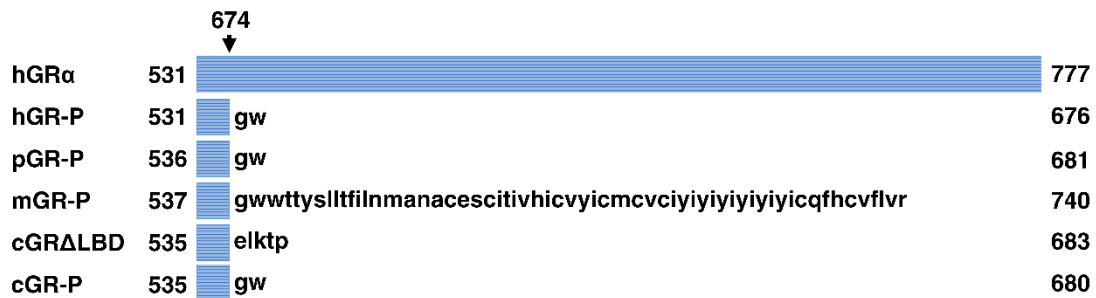
A következő lépésben a kapott transzkript nukleotid sorrendjét vetettük össze az ismert kutya glükokortikoidreceptor genomi struktúrájával. Az exonok tekintetében 100%-os megegyezést találtunk (nem publikált adat), míg az intron retenció által keletkezett, a 7-es és 8-as exon közötti, 8234-bp hosszúságú szekvencia esetében az egyezés mértéke 98% volt (Melléklet, 1. ábra).

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 vad-típusú glükokortikoidreceptorhoz képest 101 aminosavval rövidebb. A rövidülés a ligandkötő domén részleges hiányához vezet (**9b. sz. ábra**). Tekintve a szerkezetbeli homológiát a korábban már leírt humán és sertés GR-P izoformával (**9. sz. ábra**) a továbbiakban az újonnan talált kutya GR splice variánst cGR-P izoformaként hivatkozunk. A cGR-P fehérje szekvenciáját összevetve a korábban már más fajokban leírt GR-P izoformák szekvenciájával, 92%, 90%, illetve 80% egyezést találtunk, az ember, a sertés és az egér ortológjait tekintve (Melléklet, 2. ábra).

a



b

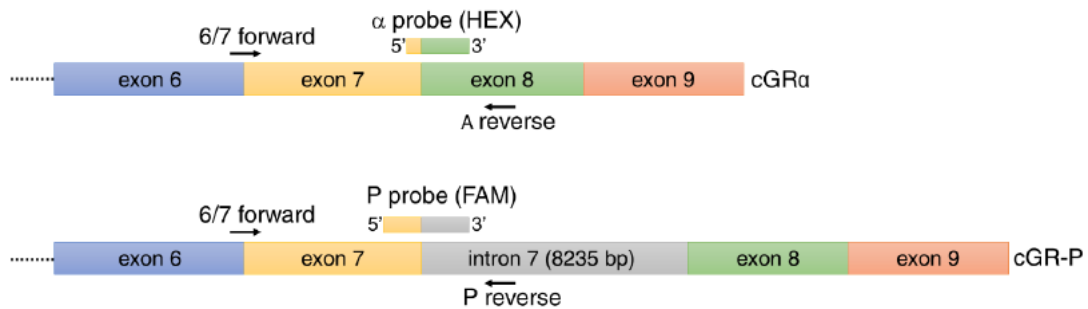


9. sz. ábra. Sematikus ábra a humán (h), a sertés (p), az egér (m), valamint a kutya (c) *NR3C1* génjének 3' vég splice variánsairól, valamint a fehérje illeszkedésről a különböző fajok GR-P isoformái között. **(a)** A fő 3' vég splice variánsai az ember, a sertés, az egér és a kutya glükokortikoidreceptor transzkriptjának. A nem transzlálódó régiók világos szürke téglalapokként kerültek feltüntetésre. Az aminosav kódoló exonok színe a GR fehérje doménjeit kódoló színeknek feltethetőek meg: narancssárga: transzaktivációs régió, zöld: DNS-kötő domén, kék: ligandkötő domén, sötét szürke: alternatív exont kódoló aminosavak.

(b) A ligandkötő domén fehérjeszekvencia illeszkedése a különböző fajok GR-P izoformáiban.

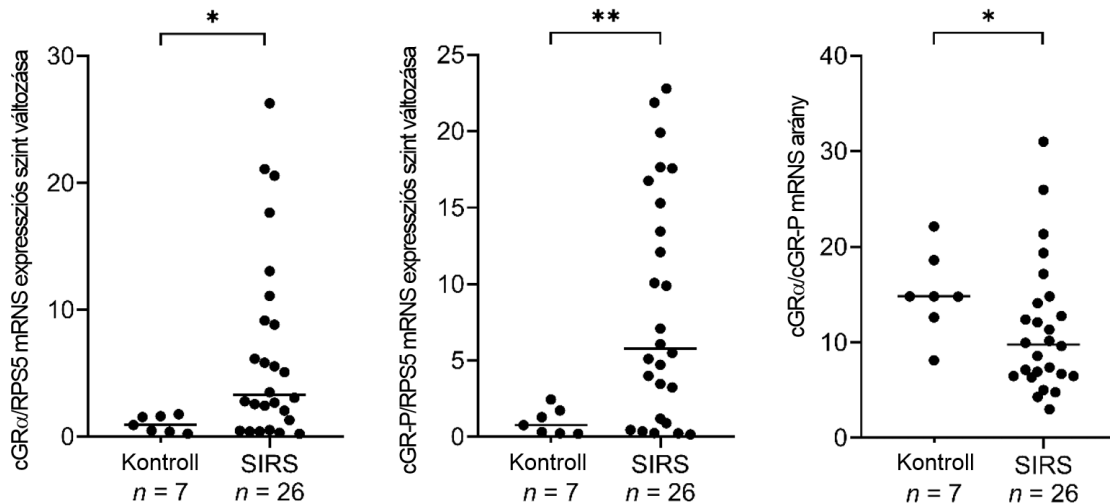
3. Glükokortikoidreceptor izoformák mRNS expressziójának vizsgálata egészséges és kritikus állapotú kutyák perifériás vérmintáiból

A cGR-P ortológ univerzális jelenlétének igazolására egészséges (n=7) és kritikus állapotú, SIRS-ben szenvedő kutyák (n=26) perifériás vérmintáit (Melléklet, 2. adattábla) vizsgáltuk TaqMan real-time PCR-rel. Az mRNA-Seq eredmények alapján megtervezett specifikus primerek egyidejű alkalmazásával (**10. sz. ábra**), mind a cGR α , mind a cGR-P splice variáns detektálható volt a reakcióban.

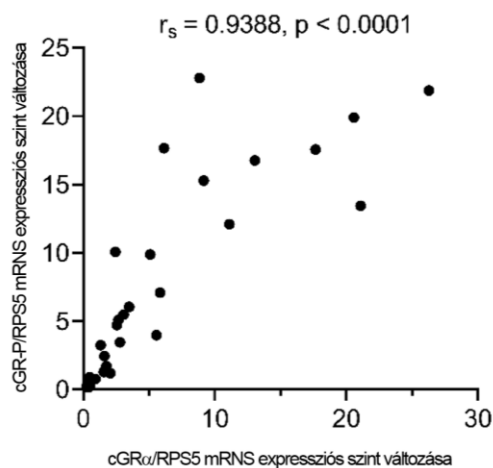


10. sz. ábra. A cGR α és cGR-P splice variánsok sematikus ábrája és a qPCR során alkalmazott izoforma specifikus primerek és próbák kötődési helyei. A 6-os és 7-es exon kapcsolódási pontjához illeszkedő forward primert, egyidejűleg alkalmazva a 8-as exonnal, illetve a 7-es intronnal komplementer primerekkel sikerült elkülöníteni a cGR α és cGR-P splice variánsokat. Az izoforma-specifikus fluoreszcens próbák (HEX és FAM) vagy a cGR α 7-8-as exon kapcsolódási pontjához tudnak bekötni, vagy a 7-es exon és 7-es intron határán kötődnek be a cGR-P esetén.

A kapott qPCR adatok megerősítették az mRNA-Seq során kapott eredményeket és bizonyították, hogy mindkettő cGR izoforma megtalálható a perifériás vérmintákban, beleértve az egészséges egyedek mintáit is (**11. sz. ábra**). A kapott eredményeket a *RPS5* háztartási gén expressziós szintjéhez és a kontroll csoport átlagához normalizáltuk (Melléklet, 4. adattábla). A klasszikus cGR α variáns és a cGR-P izoforma medián génexpressziós szintje SIRS-ben szenvedő kutyákban 3,5-szer ($p = 0,0120$) és 7,5-szer ($p = 0,0067$) nagyobb volt, mint az egészséges egyedek mintáiban (**11. sz. ábra**). Továbbá erős pozitív korreláció volt megfigyelhető a SIRS kohort ($r_s = 0,9077$, $p < 0,0001$) cGR α és a cGR-P mRNS expressziója között (**12. sz. ábra**). A medián cGR α /cGR-P mRNS expressziós arány szignifikánsan alacsonyabb volt ($p = 0,0497$) a SIRS csoportban (9,77), mint a kontroll csoportban (14,80), ugyanakkor figyelemre méltó adat, hogy a cGR α /cGR-P arány tág tartományban mozgott (3 - 31) a vizsgált mintákban (**11. sz. ábra**).



11.sz. ábra. Real-time PCR adatok a cGR α és cGR-P mRNA expressziójáról, valamint a cGR α /cGR-P mRNA arányokról a kontroll és a SIRS csoportban. Az egyes csoportokba tartozó egyedek számát a grafikonok alatt tüntettük fel. A cGR α és cGR-P mRNA expressziót a háztartási gén (*RPS5*) expressziójához normalizáltuk és a kontroll csoport átlagával került összevetésre. A vízszintes vonalak az ábrán a medián értékeket reprezentálják. A két csoport értékeinek az összehasonlításához nem-parametrikus Mann-Whitney *U* tesztet alkalmaztunk. A statisztikailag szignifikáns különbségek * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ jelöléssel kerültek feltüntetésre.



12. sz. ábra. Korreláció a SIRS betegek cGR α és cGR-P mRNA expressziója között a kórházi felvétel idején vett perifériás vérmintákban vizsgálva. A cGR α és cGR-P mRNA expressziót a háztartási gén (*RPS5*) expressziójához normalizáltuk és az egészséges csoport átlagával került összehasonlításra. A korrelációs analízis a Spearman-féle rangkorreláció szerint került elvégzésre és a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikáns eredménynek.

4. A perifériás fehérvérsejtek glükokortikoidreceptor izoformáinak expressziós mintázata egészséges és kritikus állapotú kutyákban, különös tekintettel a lehetséges összefüggésre az expressziós mintázat és túlélés valószínűsége között.

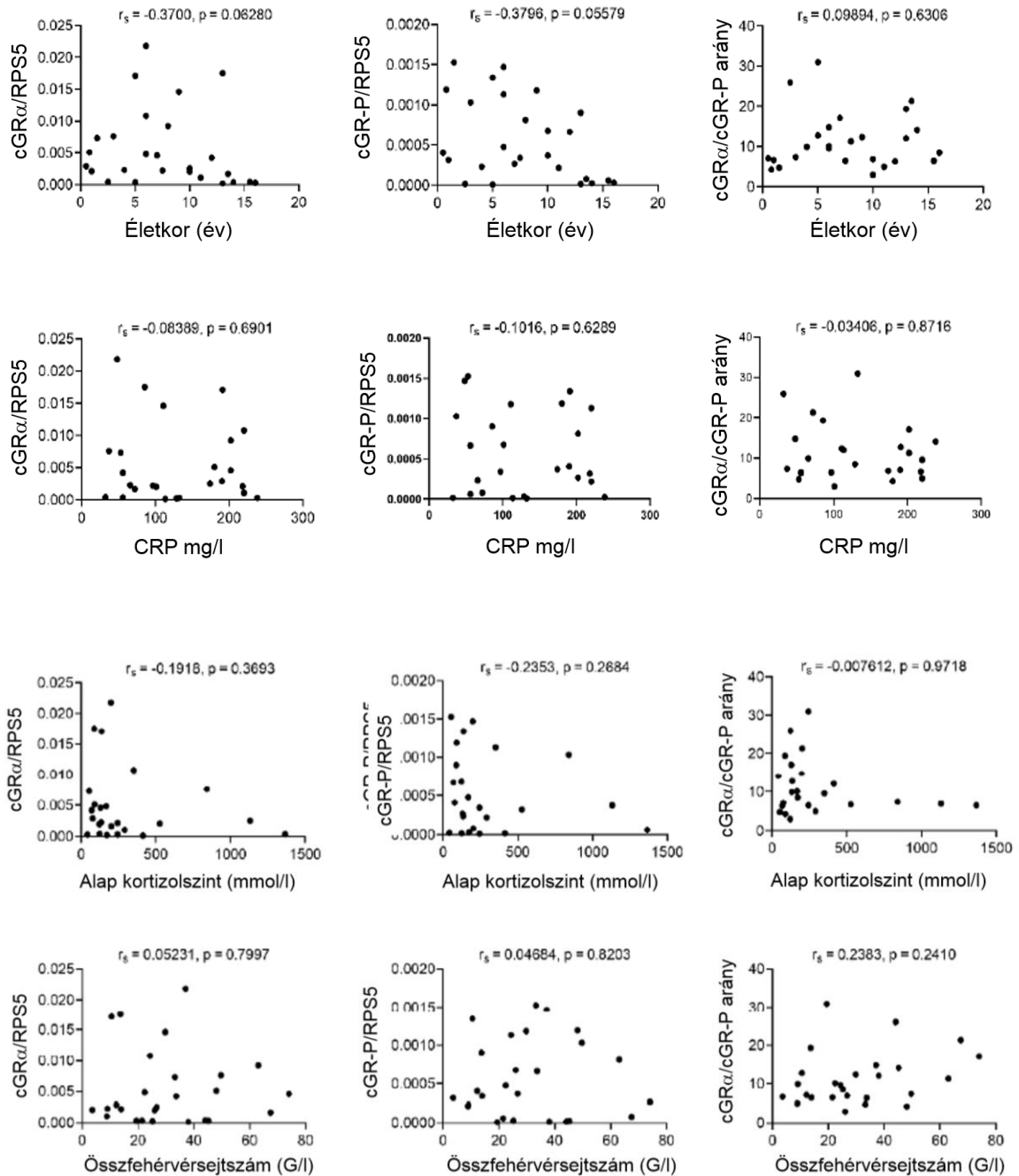
A TaqMan qPCR eredményei alapján a SIRS-betegcsoportban a cGR α and cGR-P izoformák génexpressziója fokozott volt az egészséges egyedek expressziós szintjeivel összevetve. A két kohort egyes demográfiai adatait (**8. sz. táblázat**), továbbá a kórházi felvételkor detektált klinikopatológia paramétereit (életkor, szérum CRP-szint, szérum kortizolszint, összfehérvérsejtszám (WBC), vörösvérsejtszám (RBC) és vérlemezkesszám (PLT)) vetettük össze a cGR splice variánsok expressziós szintjeivel (**13. sz. ábra**).

8. sz. táblázat. Az egészséges és a SIRS csoport demográfiai és klinikopatológiai adatai. Az életkor, az összfehérvérsejtszám, a vörösvérsejtszám, a vérlemezkesszám, a szérum CRP- és kortizolszint tekintetében a medián érték, illetve zárójelben a teljes tartomány került feltüntetésre.

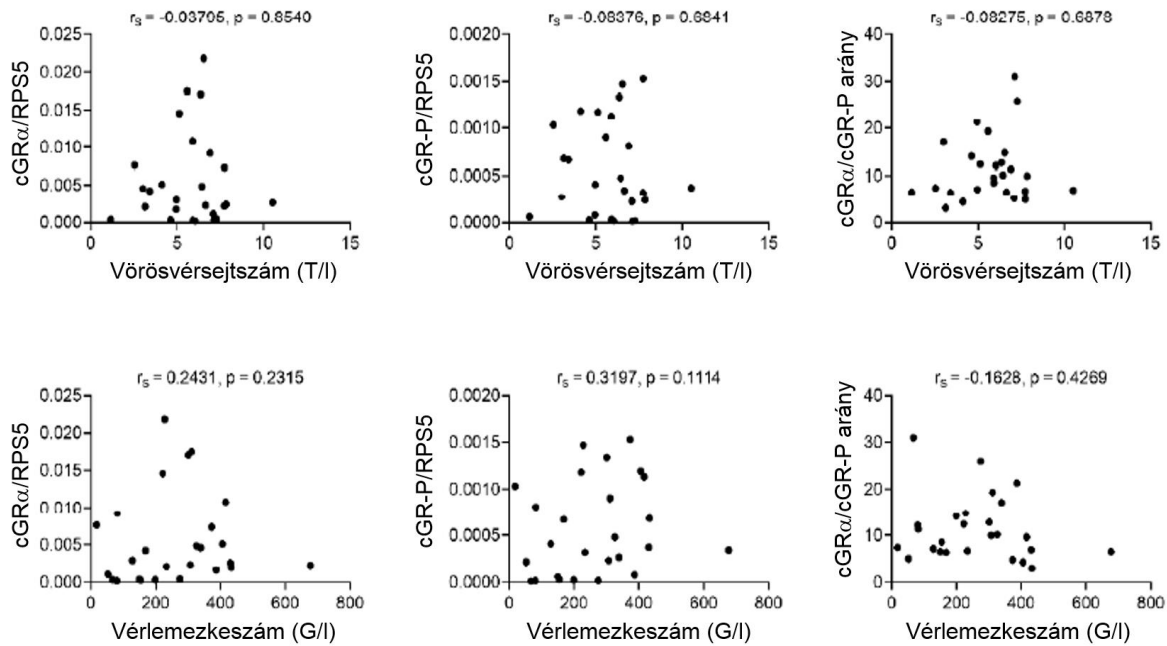
^a:Fisher-féle egzakt teszt, ^b: Mann-Whitney U teszt

Paraméter	Kontroll csoport (n=7)	SIRS-csoport (n=26)	p-érték
Ivar			
nőstény	4/7	9/26	0,3926 ^a
hím	3/7	17/26	
ivartalanított	5/7	11/26	0,2245 ^a
Életkor (év)	2,2 (1,0 - 4,5)	7,3 (0,5 - 16,0)	0,0085^b
Összfehérvérsejtszám (G/l)	9,93 (8,03 - 21,8)	26,36 (3,63 - 74,00)	0,0056^b
Vörösvérsejtszám (T/l)	6,52 (5,29 - 8,50)	5,97 (1,15 - 10,51)	0,1197 ^b
Vérlemezkesszám (G/l)	272,0 (127,0 - 360,0)	254,5 (18,0 - 677,0)	>0,9999 ^b
Szérum CRP (mg/l)	12,5 (12,5 - 35,8)	113,6 (32,2 - 238,3)	<0,0001^b
Szérum kortizol (nmol/l)	168 (51,3 - 315)	184,5 (41,6 - 1380,0)	0,4178 ^b

Bár a SIRS- és az egészséges csoport medián életkora, összfehérvérsejtszáma, valamint szérum CRP-szintje szignifikánsan különbözött, de a **13. sz. ábrán** összesített adatok alapján a kórházi felvétel időpontjában gyűjtött perifériás vérmintákban a detektált cGR α és a cGR-P expresszió, valamint a cGR α /cGR-P mRNS expressziós arány nem mutatott szignifikáns korrelációt a páciensek életkora, szérum C-reaktív protein (CRP) és alap kortizol szintje, valamint az összfehérvérsejtszám, a vörösvérsejtszám és a vérlemezkesszám eredményével.

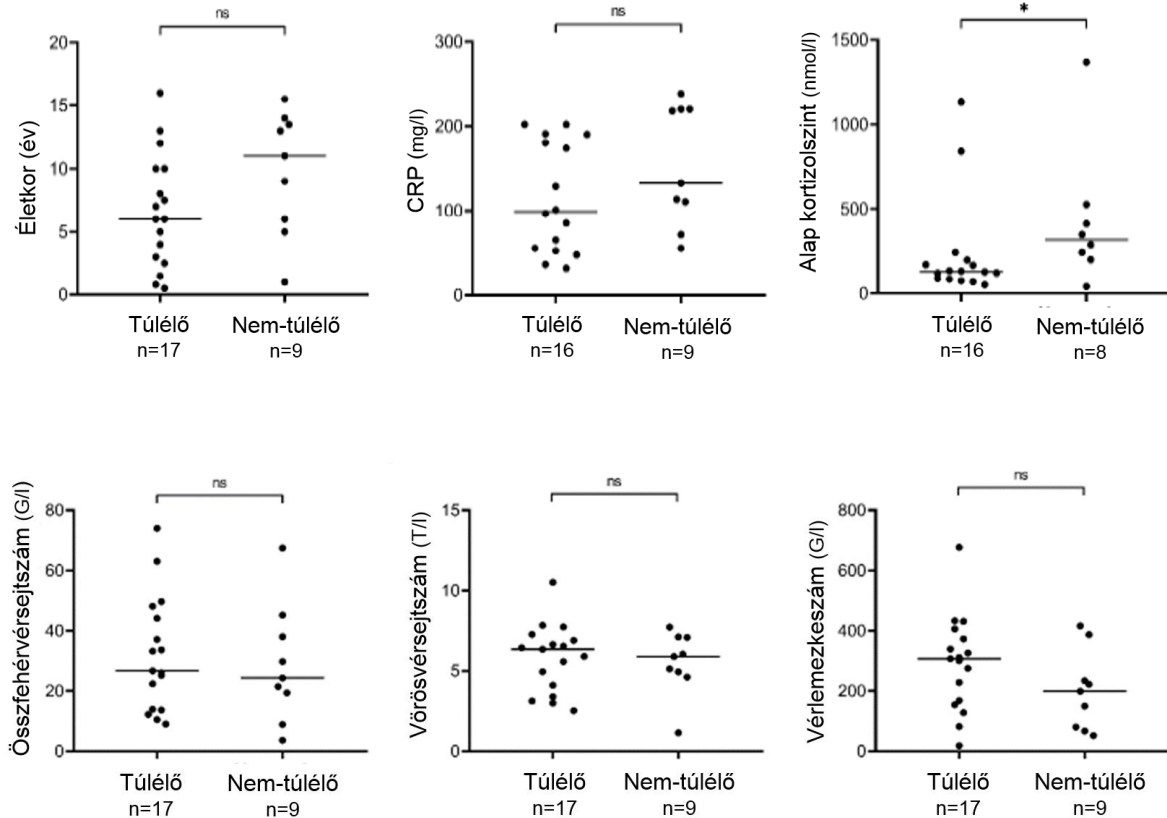


13. sz. ábra. A SIRS-ben szenvedő kutyák klinikopatológiai paramétereinek korrelációja a glükokortikoidreceptor izoformák (cGR α és cGR-P) génexpressziós szintjével, valamint a cGR α /cGR-P arány mRNS expressziójával. A vizsgált paraméterek: életkor ($n = 26$), szérumszint CRP ($n = 25$), szérumszint alap kortizolszint ($n = 24$), valamint összfehérvérsejtszám ($n = 26$) voltak. A zárójelben az egyedszámot tüntettük fel. A cGR α és cGR-P mRNS expresszióját az *RPS5* háztartási gén expressziójára normalizáltuk. A korrelációk analizálására Spearman-féle rang korrelációt alkalmaztunk és $p < 0,05$ tekintettük statisztikailag szignifikáns értéknek. (Az ábra folytatása a következő oldalon).



13. sz. ábra (folytatás). A SIRS-ben szenvedő kutyák klinikopatológiai paramétereinek korrelációja a glükokortikoidreceptor izoformák (cGR α és cGR-P) génextpressziós szintjével, valamint a cGR α /cGR-P arány mRNS expressziójával. A vizsgált paraméterek: vörösvérsejtszám ($n = 26$) és vérlemezke szám ($n = 26$). A zárójelben az egyedszámot tüntettük fel. A cGR α és cGR-P mRNS expresszióját az *RPS5* háztartási gén expressziójára normalizáltuk. A korrelációk analizálására Spearman-féle rang korrelációt alkalmaztunk és $p < 0,05$ tekintettük statisztikailag szignifikáns értéknek.

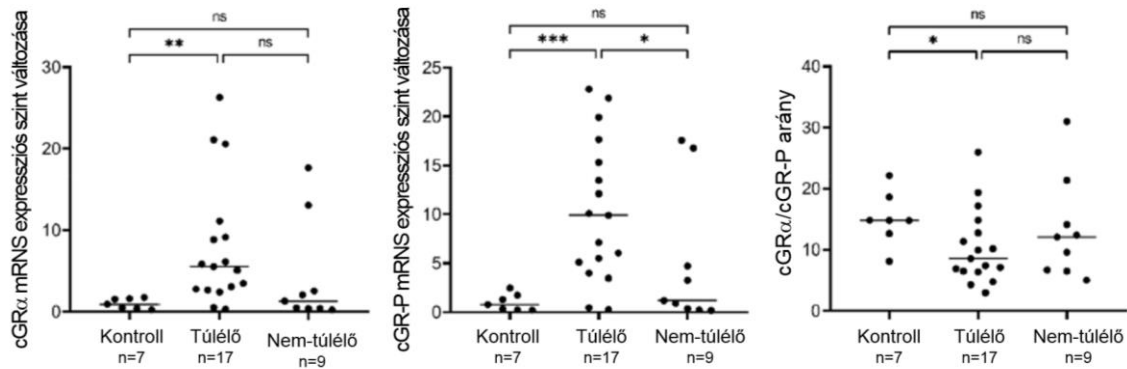
Mivel a cGR α és a cGR-P génextpresszió tág határok között változott és jelentős interindividuais variabilitást mutatott, a SIRS-ben szenvedő pácienseket túlélő és nem-túlélő csoportba soroltuk. Az egyedek ezen besorolása alapján az alap kortizolszint szignifikánsan magasabb volt a nem-túlélő (medián 320,0 nmol/l; 41,6 - 1366,0 nmol/l), mint a túlélő (131,0 nmol/l; 52,0 - 1131,0 nmol/l) csoportban ($p = 0,0336$). A két csoport egyéb paramétereit, mint az életkor, szérum CRP-szint, összfehérvérsejtszám, vörösvérsejtszám és vérlemezkeszám nem különböztek (**14. sz. ábra**).



14. sz. ábra. A túlélő- és a nem-túlélő SIRS kohort paramétereinek összehasonlítása.

A vizsgálat során az életkor, a szérums CRP-szint, az alap kortizolszint, valamint az összfehérvérsejtszám, a vörösvérsejtszám és a vérlemezeszám került elemzésre. Az egyes paraméterekhez tartozó egyedszámot a grafikon alatt jeleztük. A vízszintes vonalak a medián értéket reprezentálják. A statisztikai kiértékeléshez nem-parametrikus Mann-Whitney *U* tesztet alkalmaztuk. A statisztikailag szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) „*“-gal, a nem szignifikáns különbséget pedig „ns”-sel jelöltük.

A $cGR\alpha$ medián mRNS expressziója 5,6-szor nagyobb (0,3–26,3) volt a SIRS-ben szenvedő, de túlélő kutyákban az egészséges egyedek értékéhez viszonyítva ($p = 0,0008$), míg a SIRS-ben szenvedő, de nem-túlélő páciensek expressziós szintje nem különbözött a kontroll csoport értékétől ($p = 0,5360$) (15. sz. ábra). A $cGR-P$ medián mRNS expressziója 9,8-szor nagyobb (0,3–22,8) volt a túlélőkben a kontroll állatok értékéhez képest ($p = 0,0005$), és hasonlóan a $cGR\alpha$ expresszióhoz, a $cGR-P$ mRNS expressziója sem különbözött szignifikánsan a nem-túlélő és az egészséges egyedek között ($p = 0,3510$) (15. sz. ábra). Figyelemreméltó eredmény, hogy a medián $cGR\alpha/cGR-P$ mRNS expresszió aránya nem különbözött szignifikánsan a nem-túlélő csoport és a túlélő csoport, ($p = 0,4337$), illetve a nem-túlélő és a kontroll kohortot értékeit összevetve ($p = 0,1738$) között (15. sz. ábra).



15. sz. ábra. A cGR α , a cGR-P mRNA expressziója, valamint a cGR α /cGR-P génexpresszió aránya a kontroll, valamint a túlélő, és a nem-túlélő SIRS alcsoportokban. Az egészséges egyedek, a túlélő- és a nem túlélő SIRS páciensek perifériás vérmintában a cGR α és a cGR-P mRNA expressziója, valamint az arányuk került összehasonlításra. Az egyes csoportokba tartozó egyedek számát a grafikonok alatt tüntettük fel. A cGR α és cGR-P expressziós szinteket a háztartási gén (*RPS5*) expressziójára normalizálva fejeztük ki és az egészséges csoport átlagával hasonlítottuk össze. A vízszintes vonalak az ábrán a medián értékeket reprezentálják. A két csoport értékeinek az összehasonlításához nem-parametrikus Mann-Whitney *U* tesztet alkalmaztunk. A statisztikailag szignifikáns különbségek *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$) jelöléssel, és „ns” (nem-szignifikáns) jelöléssel kerültek feltüntetésre.

VII. Megbeszélés

1. A kritikus állapotú kutyák kortizol válaszkészségének vizsgálata és összevetése a szisztémás gyulladás mértékét mutató paraméterekkel, valamint a betegség kimenetelével

A kritikus állapotú kutyák gyulladásos paramétereinek és a mellékvese kortizol rezerv kapacitásának vizsgálata során célunk volt az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatkórházának Intenzív Osztályán kezelt kritikus állapotú kutyákban a CIRCI-szindróma előfordulási gyakoriságának felmérése, valamint a szisztémás gyulladás súlyosságának és a mellékvese kortizol válaszkészségének összevetése, továbbá a kapott eredmények összehasonlítása a túlélő- és a nem-túlélő betegcsoportokban.

Az általunk vizsgált populációban detektált magas mortalitási ráta összhangban van Giunti és mtsai. (2015), valamint Marchetti és mtsai. (2021) által kritikus állapotú kutyákban tapasztalt és publikált adatokkal. Az eredményeink alapján a kórházi felvételkor vizsgált és rögzített APPLE_{fast} pontérték (**6.sz. ábra**) segítheti a betegség lehetséges kimenetelének megbecsülését a kiváltó kóroktól függetlenül.

A vizsgálatkor mért testhőmérséklet jól korrelált a páciens szérum C-reaktív fehérje szintjével. Ez az eredmény nem meglepő tekintve, hogy mindkét paraméter a gyulladáskeltő citokinek okozta akut fázis-válaszreakció következménye. Ugyanakkor a kórházi felvételkor mért szérum CRP-szint nem volt alkalmas a betegség kimenetelének megítélésére az általunk vizsgált betegcsoportban. Ez korábbi kutatási eredményekkel is összhangban áll (Whittemore et al, 2011; Giunti et al, 2015). Gebhardt és mtsai. (2009) 61 szeptikus vagy nem-szeptikus oktanú SIRS-ben szenvedő kutya adatait vizsgálva arra a megállapításra jutottak, hogy a kezdeti szérum C-reaktív fehérje szint ugyan nem korrelál a betegség kimenetelével, de a kezelést megkezdését követő 72 órán belüli CRP-koncentráció változásnak magas a prognosztikai értéke a betegség kórlefolását illetően. A terápia megkezdését követően a szérum CRP-szint nyomon követése az általunk vizsgált populációban is hasznos lett volna, nem csak a terápiára adott válasz, hanem a betegség várható kimenetelének megítélése szempontjából is.

A SIRS- és nem-SIRS populáció egyedeiben mért szérum C-reaktív fehérje koncentráció között nem volt szignifikáns különbség. Ahogy az irodalmi összefoglalóban is jeleztük, a de Laforcade-féle SIRS-kritériumrendszer (2009) specificitása csak 64%, míg a szenzitivitása rendkívül magas (97%). Ezen kívül figyelembe kell venni, hogy a beválasztási kritériumoknak megfelelt páciensek csoportja rendkívül heterogén volt a betegségük típusa, illetve stádiuma tekintetében. Továbbá, az irodalmi összefoglalóban jelzett intra- és interindividuais eltérések

okán a szérumban C-reaktív fehérjeszint emelkedés elbírálásakor nem csak a populáció alapú referencia intervallumot érdemes figyelembe venni (Carney et al, 2011). Azonban egy mérési eredmény alapján a páciens saját „referencia tartományához” (ún. homeostatic set point) képest a kritikus különbség (ún. reference change value) nem határozható meg.

A gyulladáscsökkentő citokinek a HBM-tengely minden szintjét, valamint a célsejtek szintjén is modulálhatja a GRK-hatást. Ennek ellenére az általunk vizsgált kislétszámú populációban nem találtunk statisztikai összefüggést a kórházi felvétel idején vett vérmintától meghatározott szérumban C-reaktív fehérjeszint, valamint az alap és stimulált kortizolszintek között. Tekintve, hogy a CRP-szint és kortizolszint is dinamikusan változhat a betegség során, akár az alkalmazott terápiás beavatkozások következtében is, érdemes lenne nagyobb egyedszámú, és betegségük típusát és stádiumát tekintve homogénebb populációban vizsgálni a fenti lehetséges kapcsolatot, különös tekintettel, hogy nem találtunk erre vonatkozó információt az állatorvosi szakirodalomban. Mindemellett a szérumban C-reaktív fehérjeszint helyett/mellett a gyulladáscsökkentő citokinek sorozat mérése még pontosabb képet adhat a szervezetben zajló gyulladáscsökkentő folyamatról. Továbbá a glukokortikoidhatás nemcsak a szérumban kortizolszint, hanem a célsejtekben zajló receptorális és posztreceptorális folyamatok függvénye is.

A SIRS-ben szenvedő kutyák egyikében sem detektáltunk az ACTH-stimulációra adott csökkent kortizoltermelést, ami a CIRCI tradicionális értelmezése (csökkent adrenalis válaszkészség) alapján várható lett volna. További elgondolkodtató, de nem meglepő eredmény, hogy a Δ kortizol értéke a túlélő- és a nem-túlélő betegcsoportban nem különbözött szignifikánsan. Figyelembe véve azt, hogy a betegség kimenetelét a mellékvese rezerv kapacitásán kívül számos egyéb belső és külső hatás befolyásolhatja, az ellentmondás feloldását jelentheti, ha a kritikus állapotban lévő betegek esetén a kortikoszteroidhiányt nem, mint abszolút hypocortisolaemiát definiáljuk, hanem a célsejtek szintjén megjelenő elégtelen kortizolhatást, függetlenül a keringő összkortizol mennyiségétől (Beishuizen and Thijs, 2001; Venkatesh and Cohen, 2011; Burkitt Creedon, 2015).

Hipotézisünk szerint ezekben, a kritikus állapotú kutyákban a célsejtek glukokortikoidreceptor expressziójának, illetve a sejtek kortizolválaszának további vizsgálata javasolt. Tekintve, hogy az egyes célszervek/célsejtek GR expressziós mintázata különböző lehet, így a perifériás fehérvérsejteken kívül más sejtek/szövetek (pl. máj, harántcsíkolt izomszövet, valamint a központi idegrendszer sejtjei) glukokortikoid válaszána vizsgálatára is javasolt.

A fenti eredmény kiértékelésekor figyelembe kell venni a kislétszámú vizsgálati csoportban végzett statisztikai vizsgálatokban kapott eredmények limitációit, valamint a kórházi felvételt megelőzően alkalmazott, de nem kizáró jellegű gyógykezelés (pl. antibiotikum adása,

folyadékterápia, nem-szteroid típusú láz- és fájdalomcsillapítók) esetleges hatását a HHM-tengely működésére.

Hasonlóan korábbi kutatási eredményekhez, egyetlen kritikus állapotú betegünkben sem volt referenciatartomány alatti alap kortizolszint vagy csökkent Na^+/K^+ arány detektálható (Prittie et al., 2002; Goy-Thollot et al., 2006; Martin et al., 2008; Marchetti et al. 2021). Ugyanakkor az alap és a stimulált kortizolszint referencia tartománya egészséges kutyapopuláció adatai alapján került meghatározásra, ami elsősorban a tipikus Addison-betegség kizárását segíti. Jelenleg nincs kritikus állapotú kutyák kortizol szintjét alapul vevő referencia intervallum, amihez viszonyítva az egyes betegek kortizol koncentrációját interpretálni lehetne (Prittie, 2009; Martin, 2011). Az irodalmi összefoglalóban már megjegyzésre került, hogy az ACTH-stimulációs teszt során mért kortizol értékek individualitási indexe köztes értékkel bír, ami alapján a populáció alapú referenciatartomány figyelembevétele önmagában nem feltétlenül elegendő a „kóros” kortizolszinttel bíró egyedek azonosítására (Gal et al, 2017).

Sweeney és mtsai. (2010) meghatározták ugyan az alap és az ACTH-stimulált kortizolszintet olyan kutyákban, amelyek különböző intenzív osztályon alkalmazható terápiás beavatkozásokon mentek keresztül (pl. szedáció, tracheosztómia, intubáció és mechanikus lélegeztetés stb.), de ezek az egyedek egyébként teljesen egészségesek voltak, így a szisztémás gyulladás hatását a szérum kortizol koncentrációra nem tudták vizsgálni.

Saját vizsgálatunkban a nem túlélő 18 kutyából, 17 egyednek volt emelkedett az alap és/vagy a stimulált kortizol szintje. Korábbi vizsgálatokkal összhangban azt találtuk, hogy az emelkedett alap és/vagy stimulált kortizolszint, valamint a túlélés esélye között fordított arányosság tapasztalható (Goy-Thollot et al., 2006; Schoeman et al., 2007; Schoeman - Herrtage, 2008a; Bendel et al, 2008; Marchetti et al. 2021).

A fentiek tükrében a nemzetközi állatorvosi szakirodalomban jelenleg használatos Critical Illness-related Corticosteroid Insufficiency szindróma átnevezésének megfontolását javasoljuk Critical Illness-related *Relative* Corticosteroid Insufficiency kórképre.

Az ACTH-stimulációs tesztre adott csökkent kortizol válaszkészség szepszisben szenvedő emberekben előre jelzi a betegség kedvezőtlen kimenetelét (Juutilainen et al, 2011). A nem megfelelő kortizolválaszkészség és az elhullás fokozott kockázata közötti kapcsolat kutyákban is leírt jelenség. Burkitt és mtsai. (2007) szepszisben szenvedő kutyákban azt találták, ha a Δ kortizol érték kisebb, mint 83 nmol/l akkor a hipotenzió kialakulásának és a rossz prognózisnak esélye szignifikánsan megnő. Ebben a vizsgálatban a szintetikus ACTH injekció 250 μg -nyi dózisát intramuszkulárisan adták be, így az ACTH injekció adagolásának módja is befolyásolhatta a kapott eredményeket. Ugyanis egy hipotenzív betegben az izomba adott

hatóanyag felszívódása csökkent és/vagy késleltetett lehet, így az ACTH-ra adott csökkent válaszkészség lehet oka vagy következménye is a hypotenzív állapotnak. Egy másik klinikai kísérletben szeptikus, traumatizált vagy gyomorcsavarodásban szenvedő kutyákat vizsgáltak. A Δ kortizol értékét itt intravénásan adott 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dózisú ACTH beadását követően mérték meg. Azon egyedek, amelyek Δ kortizol értéke $\leq 83 \text{ nmol/l}$ volt, 5,7-szer nagyobb eséllyel igényelték vazopresszor terápiát, összehasonlítva azon páciensekkel, amelyeknél a Δ kortizol érték nagyobb volt, mint 83 nmol/l. Ugyanakkor a betegség kimenetelét tekintve nem volt szignifikáns különbség a két csoport között (Martin et al, 2008). Schoeman és Herrtage (2008a) *Babesia rossi*-val fertőzött kutyák kortizol válaszkészségét vizsgálta 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dózisú ACTH injekció adásával. A nem-túlélő egyedek jellemzően alacsonyabb Δ kortizol értékkel rendelkeztek, mint a túlélő kutyák, de az összefüggés nem volt statisztikailag szignifikáns. Ezzel ellentétes összefüggésre jutott Goy-Thollot és mtsai. (2006), akik azt találták, hogy 250 μg dózisú ACTH intravénás beadását követően a Δ kortizol érték magasabb volt nem-túlélő, mint túlélő kritikus állapotú kutyákban.

Az általunk vizsgált populációban a 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dózisú ACTH-stimulációs teszt elvégzése során nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a túlélő és nem-túlélő egyedek Δ kortizol értékei között. A „kisdózisú” ACTH-stimulációs teszt elvégzése mellett egyfelől az szöveg, hogy a magasabb 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, illetve 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dózis „szuprafiziológiás” mennyiségnek tekinthető és elfedheti a CIRCI-ben szenvedő és a megfelelő kortizol válaszkészségű csoportok közötti finom különbségeket. Másfelől a szakirodalmi adatok igazolták, hogy egészséges kutyákban már 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mennyiségű ACTH injekció intravénás beadása is kiváltja a maximális adrenalis válaszreakciót (Martin et al, 2007).

Nagy létszámú, betegségüket tekintve homogén csoportot alkotó, kritikus állapotú kutyák egységes protokoll alapján (sztenderd ACTH dózis és applikációs mód, illetve azonos mérőmódszer és reagens) végzett ACTH-stimulációs teszt elvégzése javasolt a Δ kortizol értéknek egy esetleges klinikai döntéshozatalt segítő, ún. cut off érték meghatározására.

Mivel a daganatos megbetegedés nem volt kizáró ok a beválasztási kritériumoknál, így ezen egyedek vélhetően magasabb mortalitási rátája befolyásolja a betegség kimenetelét vizsgáló statisztikai próbákat. Ugyanakkor a szisztémás gyulladásoz válaszreakció, illetve a kritikus állapotú betegek kortikoszteroid-elégtelenség szindrómája onkológiai betegekben is ismert és leírt kórkép. Olyan daganatos megbetegedésben szenvedő emberekben, akikben súlyos szepszis vagy szeptikus sokk alakult ki szövődményként, a CIRCI előfordulási gyakorisága csaknem 60% volt (Bruno et al, 2012). Boozer és mtsai. (2005) 35 nem-szeptikus, daganatos megbetegedésben szenvedő kutya (20 lymphoma, 15 nem-lymphoproliferatív daganatos betegség) kortizol válaszkészségét vizsgálták ACTH-stimulációs teszttel, valamint

meghatározták a betegek endogén ACTH-szintjét is. Tizenöt betegnek (10 lymphomás, 5 nem-lymphoproliferatív daganatos betegségben szenvedő) valamely hormonszintje a populáció alapú referencia tartományon kívüli érték volt. A kapott eredmények interpretációja és klinikai relevanciája a szerzők szerint további vizsgálatokat igényel.

A klinikai vizsgálatok sajátossága, hogy a vizsgált populáció létszáma, illetve a kísérleti elrendezés nem feltétlenül optimális. A bevásztási kritériumaink szigorúak voltak a tekintetben, hogy a páciens nem részesülhetett a HHM-tengely működését befolyásoló gyógyszeres kezelésben. A kisállatpraxisban általánosan alkalmazott glükokortikoidterápia jelentősen csökkentette a vizsgálatba bevonható egyedek számát. Az általunk kiválasztott populáció betegségtípus (különböző gyulladással és daganatos kórképek), súlyosság (mérsékelt, súlyos) és betegség stádium (akut, szubakut, krónikus) tekintetében is heterogén volt. Egyes terápiás beavatkozások (pl. antibiotikum, nem-szteroid típusú gyulladáscsökkentő gyógyszerek, folyadékterápia) nem jelentettek kizáró feltételt, habár ezek a beavatkozások a kiválasztott betegek klinikai tüneteit (pl. testhőmérséklet), illetve laboratóriumi eredményeit, valamint a betegség kimenetelét is befolyásolhatták. A betegség kezdetének pontos időpontja sem volt minden esetben ismert, ugyanakkor a SIRS és CIRCI szindrómák a betegség bármely szakaszában kialakulhatnak, emiatt nem volt ez kizáró feltétel. A vérvétel időpontja sem volt egységes, ugyanakkor kutyában az eddigi ismeretek szerint nem kell számolni a kortizolszint cirkadián ritmusával, illetve embereknél kimutatták, hogy szeptikus állapot fennállásakor a kortizol szekréció fiziológiás napi ritmusa megszűnik (Bendel et al, 2008).

A páciensek életkora a betegség kimenetelét befolyásolhatja, így nem meglepő, hogy az általunk vizsgált populációban a túlélő páciensek szignifikánsan fiatalabbak voltak a nem-túlélő egyedeknél. Az életkor hatását csak olyan kísérleti elrendezésben tudtuk volna vizsgálni, ahol a minden túlélőre jut egy azonos életkorú, ivarú és fajtájú/testtömegű nem-túlélő egyed.

A szabad kortizolszint meghatározása kritikus állapotú betegekben az összkortizol koncentráció mérése helyett pontosabb képet adhat a biológiailag elérhető kortizol mennyiségéről a szervezetben, ugyanakkor a szabad kortizolszint nem feltétlenül diszkriminatív a betegség kimenetelét tekintve (Bendel et al, 2008; Cortés-Puch et al, 2014). A humán szabad kortizol frakció mérésével kapcsolatos eredményeknél figyelembe kell venni azt is, hogy emberben a kortizol kb. 80 - 90%-a kapcsolódik speciális szállítófehérjéhez (CBG), kb. 14%-a albuminhoz és a szabad frakció kb. 6%. A CBG szaturációja emberben kb. 690 nmol/L-es kortizolszint mellett teljessé válik, az e feletti kortizolmennyiség az albuminhoz kötődik nem-specifikusan, illetve szabadon kering (Bendel et al, 2008). Egészséges kutyákban a szabad kortizolfrakció az emberhez képest kicsivel magasabb (kb. 13%) (Meyer - Rothuizen, 1993). A szabad kortizolszint mérése vagy kalkulációja akut fázis reakció fennállása, illetve

hypoalbuminaemia/hypoproteinaemia fennállása esetén lehet különösen érdekes (Martin, 2011; Venkatesh and Cohen, 2011). Az albumin mellett a CBG szintje is csökken akut fázis válaszreakció során (ún. negatív akut fázis fehérjék) és mindkét fehérje részt vesz a kortizol vérkeringésben történő szállításában. A csökkent CBG és albumin koncentráció okán a keringésben megnövekszik a nem-kötött, azaz szabad kortizol frakció mennyisége, emiatt az összkortizol mennyiségének meghatározása alábecsülheti a szabad frakció arányát. Habár a szabad kortizolszint mérése pontosabb képet ad a biológiailag elérhető kortizol mennyiségéről, ezen frakció meghatározása az állatorvosi klinikai laboratóriumi diagnosztikában rutinszerűen nem érhető el. Az általunk vizsgált populáció adatait tekintve érdekes eredményünk ezzel kapcsolatban, hogy a túlélő- és nem túlélő csoport albuminszintje szignifikánsan nem különbözött.

A fenti eredményeink interpretálásakor figyelembe kell venni azt is, hogy a kapott adatok elsősorban hely- és módszerspecifikusak és a Kisállatkórházban kezelt, kritikus állapotú kutyák esetében tekinthetőek relevánsak.

Összefoglalásként elmondható, hogy az általunk vizsgált kritikus állapotú egyedekben hypocortisolaemia fennállása (tradicionális értelmezés szerinti CIRCI) nem volt igazolható. Épp ellenkezőleg, a nem túlélő egyedek 94%-ának emelkedett volt az alap és/vagy a stimulált kortizol szintje. Ezek az eredmények is ösztönöztek bennünket arra, hogy további kísérleteket végezzünk a szisztémás gyulladás és a perifériás fehérvérsejtek GLK receptor izoformáinak expressziója közötti lehetséges összefüggés tekintetében.

2. A Glükokortikoidreceptor P izoforma detektálása kritikus állapotú kutya perifériás vérmintájából mRNA-Seq módszerrel

Az mRNS-Seq adatait kiértékelve megállapítottuk, hogy a szeptikus peritonitisben szenvedő kutya perifériás vérmintájában a 7-es intron retenciójával létrejövő cGR-P izoforma a klasszikus cGR α splice variánst követő legnagyobb mennyiségben jelen levő transzkript variáns. Ennek, az újonnan leírt cGR izoformának az általános kifejeződését egészséges egyedek és SIRS-ben szenvedő kutyák perifériás vérmintáiban is igazoltuk izoforma-specifikus primerek és TaqMan próbák alkalmazásával real-time PCR módszerrel.

A cGR-P egy „csonkolt” fehérjét kódol, ami a klasszikus cGR α -hoz képest egy megrövidült ligandkötő doménnal rendelkezik. Az általunk leírt új izoforma aminosav sorrendje nagy mértékű homológiát mutat más fajokban (ember, sertés, egér) már megismert GR-P transzkript variánsokkal, ezért az mRNA-Seq során detektált splice variánst a kutya glükokortikoid receptor P-izoformájaként (cGR-P) azonosítottuk.

A humán GR-P izoforma a 90-es években került leírásra glükokortikoid-rezisztens myeloma multiplex tumorsejtekben, valamint ACTH-t termelő kis-sejtes tüdőcarcinoma sejtvonalban és

a fokozott expressziójuk a sejtek GLK-rezisztenciájához vezetett (Moalli et al, 1993; Gaitan et al, 1995; Krett et al, 1995; Parks et al, 1998). Azóta igazolásra került, hogy a hGR-P transzkript a hGR α után a második legnagyobb mennyiségben jelen lévő splice variáns egészséges emberekben is. A hGR-P izoforma mRNS expressziós szintje a mononukleáris sejtekben eléri akár a hGR α 25%-át is (Hagendorf et al, 2005). További, ezzel összhangban álló mRNS expressziós arányokat detektáltak vérképzőszervi (De Lange et al, 2011; Koga et al, 2005; Tissing et al, 2005; Sun et al, 2015) és más daganatokban (Gaitan et al, 1995; Parks et al, 1998), hyper- és hypocortisolismus fennállása esetén (Hagendorf et al, 2005), valamint egyes májbetegségekben (ter Borg et al, 2004), továbbá kritikus állapotú betegekben (Peeters et al, 2009; van den Akker et al, 2009), illetve vesetranszplantált egyéneknél (Chen et al, 2009), és egyes pszichiátriai kórképekben (Alt, et al, 2010, Cao-Lei et al, 2013), illetve humán placentamintákban (Johnson et al, 2008) is.

Azóta más fajokban, így például sertésből származó neuroendokrin szövet GR-P génexpressziójának vizsgálata során is hasonlóan magas expressziós szintet (14 - 25%) detektáltak (Reyer et al, 2013).

A kutya 2-es kromoszómáján elhelyezkedő *NR3C1* gén és az általa kódolt glükokortikoidreceptor (cGR α), illetve egyes polimorfizmusai már leírásra kerültek. (http://www.ensembl.org/Canis_lupus_familiarisboxer/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSCAFG00000006293;r=2:35169173-35286712;t=ENSCAFT00000010207). Costa és mtsai. (2015) 10 egészséges kutya májszöveti mintájából kivont RNS-t vizsgálva nem találtak a 9-es exon alternatív splicingja révén létrejövő más izoformát, de cGR α -t kódoló *NR3C1* génben 6 SNP-t mutattak ki.

Az általunk beazonosított cGR-P izoforma eltér a Yamanaka és mtsai (2019) által egy iatrogén Cushing-szindrómában szenvedő kutya perifériás vérmintájában detektált, általuk cGR Δ LBD-ként jelölt, a cGR α inzerációs mutációjaként leírt transzkript variánstól. Ezt az általuk „mutációként” megnevezett transzkriptot 2 másik, egészséges kutyában nem találták meg, továbbá a iatrogén Cushing szindrómában szenvedő kutyában a humán familiáris glükokortikoidrezisztencia szindrómához hasonló kórkép fennállását gondolták az inzerációs mutáció jelenléte miatt. Az általuk megadott szekvenciát figyelembe véve azt gondoljuk, hogy a talált transzkript variáns nem tekinthető a GR mutációjának, hanem az alternatív kivágódás egy termékét azonosították. A Yamanaka és mtsai. (2019) által végzett transzfekciós kísérletben a cGR Δ LBD-t COS-7 sejtvonalba ültették és *in vitro* körülmények között nagyon alacsony prednizolon-kötő kapacitást tapasztaltak.

Mivel az általunk leírt cGR-P és a cGR Δ LBD között csupán 5 aminosavban tér el, így felmerül, hogy a cGR-P izoforma is csökkent GLK-kötő képességgel rendelkezhet, ugyanakkor

az általunk detektált cGR-P izoforma ligandkötő képességéről, illetve genomi hatásáról nincs információnk.

További érdekes adat, hogy a *POMC* gén nGRE-éhez a hGR-P kötődni képes és a génrepressziót nem gátolja (Turney - Kovacs, 2001). A *POMC* gén, egy példája a nGRE-által szabályozott transzkripciónak, de a negatív GRE-k számos, proinflammatoricus mediátorokat kódoló génben is jelen vannak és a GLK-függő génrepresszióért felelősek (Vandevyver et al, 2013). Ezen eredmények figyelembevételével feltételezhető, hogy a GR-P megőrzi a nGRE-khez történő kötőképességét, de nem képes a transzkripció szabályozásához szükséges fehérjék „toborzására”. További elgondolkodtató eredményeket publikáltak De Lange és mtsai. (2001) a hGR-P fehérjeexpresszió fiziológiai szerepéről. Vizsgálatukban azt találták, hogy az α és P izoforma együttes expressziója a hGR α hatását erősítette sejtspecifikus és koncentrációfüggő módon. Ez az eredmény egy másik vizsgálat adataival összevetve tovább bonyolítja a képet az egyes transzkript variánsok biológiai hatásáról. Tissing és mtsai (2005). akut lymphoblastos leukémiában vizsgálta a hGR-P és egy másik LBD-csonkolt izoforma, a hGR β hatását a GLK-érzékenységre. A két splice variáns együttes, fokozott expressziója gátolta a GLK-reszponzív gének transzaktivációs aktivitását. Elméletük szerint a hGR- β és hGR-P a hGR α -val való nem-funkcionális heterodimerek létrehozásával akadályozza a glükokortikoidreceptor és az NF-kB, valamint az AP-1 közötti interakciókat.

Végezetül az egyes GR-izofomák expressziójának hatását a sejtek glükokortikoid érzékenységére csak kontextusban lehet értelmezni. Erre példa az újonnan azonosított, a H intron retenciója által létrejött 2 humán glükokortikoidreceptor splice variáns, a hGR-S1 és hGR-S1(j349A) *in vitro* körülmények között eltérő transzkripciós aktivitása. Mindkettő transzkript variáns csökkent transzaktivációs potenciállal bír a hGR α -hoz képest exogén glükokortikoidhatás hiányában, ugyanakkor exogén szteroid hozzáadásával a hGR-S1(j349A) izoforma transzkripciós aktivitása jelentősen fokozódott, míg a hGR-S1-é nem változott (Baker et al, 2012).

A fenti kutatási eredmények tovább árnyalják a strukturálisan hasonló, de funkcionalitásukban különböző izofomák lehetséges biológiai szerepét, valamint a celluláris milió hatását az egyes izofomák transzkripciós aktivitására vonatkozóan.

A saját vizsgálati populációnkban, mind a klinikailag egészséges, mind a kritikus állapotú betegekben kimutatható volt a cGR-P izoforma. A mérési eredményeink alapján a cGR-P expressziója a szisztémás gyulladás fennállása során fokozódott. Jelenlegi tudásunk alapján a cGR-P splice variáns szerepe és jelentősége sem egészséges, sem SIRS-ben szenvedő kutyák esetében sem ismert. A cGR-P és a cGR α koregulációjára utaló mRNS expressziós adatok alapvetően a GLK hatás felerősödését eredményezhetik a célsejteken, de a

ligandkötés *in vitro* vizsgálatával, valamint a GR izoformák fehérjeszintű kifejeződésével való összevetése javasolt az mRNS-szinten tapasztalt expressziós mintázatoknak.

Habár a perifériás vérmintában mRNA-Seq módszerrel egyéb transzkript variáns nem került detektálásra, ez nem zárja ki más izoformák expresszióját egyéb típusú mintákban vagy más kórképek fennállása során. Ugyanakkor, az eredményeink összhangban állnak a humán perifériás vérmintákból detektált GR izoformák génexpressziós szintjeivel, így feltételezzük, hogy az általunk a perifériás vérmintákból detektált génexpressziós arányok reprezentatívnak tekinthetők.

3. Glükokortikoidreceptor izoformák mRNS expressziójának vizsgálata egészséges és kritikus állapotú kutyák perifériás vérmintájából

Habár a vizsgált, kritikus állapotban lévő betegek csoportja kifejezetten heterogén volt az alapbetegség típusát és stádiumát (perakut, akut, krónikus) tekintve, de a lymphoproliferatív kórképekben szenvedő kutyák, illetve azon egyedek, amelyeknek ismert vagy újonnan megállapított adrenalis betegségük (Cushing-szindróma, Addison-kór) volt, továbbá a vizsgálatot megelőző egy hónapban glükokortikoid vagy más a HHM-tengely működését befolyásoló gyógyszeres (pl. gesztagének, major analgetikumok, azoltípusú gombaellenes szerek) kezelésben részesültek, automatikusan kizárásra kerültek a vizsgálati csoportból. Kontroll csoportként klinikailag egészséges egyedek vérmintái került feldolgozásra.

A vizsgálatba bevont egyedek heterogén testtömeg, fajta és életkor megoszlása reprezentatívnak tekinthető egyfelől a Kisállatkórházban kezelt kritikus állapotú kutyák populációját, másfelől a SIRS kórképet illetően. Az általunk vizsgált populációban a GR expressziót SIRS-betegségben nem befolyásolja az életkor (**13. sz. ábra**). Van den Akker és mtsai (2009) eredményei alapján a neutrophil granulocyták mRNS expressziója a szepsziszből felgyógyult gyermekekben nem különbözött a felnőtt kontroll csoport értékeitől. Mindettől függetlenül az életkor hatását csak olyan kísérleti elrendezésben tudtuk volna vizsgálni, ahol a minden túlélőre jut egy azonos életkorú, valamint ivarú és fajtájú/testtömegű nem-túlélő egyed.

Egyes tanulmányok szerint a hGR α mRNS expressziója nem különbözik érdemben az egészséges és a gyulladással kórképekben szenvedő emberekben (Goecke - Guerrero, 2006; Cohen et al, 2016), ugyanakkor számos publikáció alapján a szisztémás gyulladás fennállását a hGR α mRNS és fehérje expressziójának fokozódása kíséri, és az alacsonyabb szérumszintű kortizolszint nagyobb valószínűséggel vezet kedvező betegség kimenetelhez (Van den Akker et al, 2009; Vardas et al, 2017; Alder et al, 2018; Li et al, 2021). Továbbá, immun-mediált

thrombocytopenia esetén a glükokortikoidreszponzív betegek szignifikánsan magasabb hGR α mRNS expressziót mutattak, a GLK-rezisztens páciensek mintáival összevetve (Ma et al, 2013).

A vizsgálatunkban cGR α és cGR-P-specifikus primereket és próbákat alkalmaztunk, hogy egészséges és SIRS-ben szenvedő, kritikus állapotú kutyák perifériás vérmintájában detektáljuk a két GR splice variáns mRNS expressziós szintjeit real-time PCR-rel. Eredményeink alapján a SIRS-ben szenvedő kutyák cGR α és cGR-P transzkript variánsainak génexpressziója fokozottabb volt, az egészséges egyedek értékeihez képest, összhangban állva a már hivatkozott humán adatokkal. A hGR α és hGR-P együttes expresszióját perifériás vérmintákban csak néhány közlemény vizsgálta, de az általunk detektált szoros korrelációt a két splice variáns mRNS expressziója között összességében megerősítették és hasonló GR α /GR-P arányokat találtak egészséges és beteg egyénekben (De Lange et al, 2011, Hagendorf et al, 2005; Peeters et al, 2009; Sun et al, 2015). Ezek alapján valószínű, hogy a két transzkript variáns szabályozása nem független egymástól.

Ugyanakkor a GR génexpressziós adatok interpretációja óvatosságot igényel, mivel a GR α és a GR-P izoformák expressziós szintje jelentős interindividuális eltérést mutat emberekben (Koga et al, 2005; Ledderose et al, 2012; Guerrero et al, 2013; Vassiliou et al, 2019) és jelentős eltéréseket detektáltunk az általunk vizsgált kutyapopulációban is (**11. sz. ábra**).

Összefoglalva, a SIRS-ben szenvedő kutyák cGR α és cGR-P mRNS expressziós szintjének fokozódását detektáltuk és hipotézisünk szerint a szimultán upreguláció célja a fennálló szisztémás gyulladás mérséklése. Ez megvalósulhat a genomi szabályozáson keresztül, beleértve az nGRE-ken („gátlás gátlása”) történő hatást is.

4. A perifériás fehérvérsejtek glükokortikoidreceptor izoformáinak expressziós mintázata egészséges és kritikus állapotú kutyákban, különös tekintettel a lehetséges összefüggésre az expressziós mintázat és a túlélés valószínűsége között

A kutya GR α és GR-P transzkript variánsok mRNS expressziója és a betegség kimenetel közötti szoros összefüggést a SIRS-csoportba tartozó kutyák további klasszifikációjával mutattuk ki. A kontroll csoport génexpressziós szintjeihez képest a nem-túlélő kohortba tartozó egyedek perifériás vérmintáiban a cGR α és a cGR-P expressziója nem volt szignifikánsan emelkedett, míg a túlélő egyedek GR izoformáinak relatív génexpressziója szignifikáns emelkedést mutatott a kontroll csoporthoz képest. A statisztikai vizsgálatok alapján a cGR α /cGRP-P expresszió aránya a túlélés valószínűségével nem korrelált.

Az általunk vizsgált SIRS-populációban az alap kortizolszint tág határok között volt mérhető, mind a túlélő, mind a nem-túlélő egyedekben, de a nem-túlélő kohort medián kortizol szintje szignifikánsan magasabb volt a túlélő csoport medián értékéhez képest. Ez az eredmény is összhangban áll korábbi kutya, illetve humán adatokkal, miszerint a vérplazma kortizol szintje tág határok között detektálható a kritikus állapotú betegekben, de a magasabb kortizolszint magasabb mortalitási rizikó kíséri (Bendel et al, 2008; Schoeman - Herrtage, 2008a; Venkatesh - Cohen, 2011; Cohen et al, 2016; Vardas et al, 2017; Alder et al, 2018; Li et al, 2021).

A vizsgált SIRS populációban nem találtunk statisztikailag szignifikáns összefüggést a kórházi felvétel idején vett vérmintában detektált szérumszintű CRP- és kortizolszint, valamint a cGR α és cGR-P mRNS expressziója, illetve a cGR α /cGR-P arány között. Ez lehet a vizsgált populáció kis egyedszáma, illetve heterogenitása miatt, illetve a korábban már említett, az egyes paraméterek analitikai és biológiai variációjának okán is.

A kritikus állapotú betegekben a HPM-tengely aktiválódása a célsejtek glükokortikoid érzékenységének a fokozódásával jár együtt (Peeters et al, 2009), így a perifériás fehérvérsejtek fokozott cGR α és cGR-P mRNS expressziója ennek az adaptív mechanizmusnak lehet a következménye, ezáltal biztosítva a kortizolhatás érvényesülését, és a szisztémás gyulladás csillapodását. Ugyanakkor, a SIRS-betegekben detektált jelentős hypercortisolaemia az ún. ligand-indukálta receptor downreguláció révén a GR izoformák csökkent génexpressziójához is vezethet (Nicolaidis et al, 2014).

Az eredményeink összhangban vannak humán publikációkban talált összefüggéssel, miszerint a sepsztikus és nem-sepsztikus SIRS-betegekben az emelkedett szérumszintű kortizol és/vagy a perifériás fehérvérsejtek csökkent glükokortikoidreceptor expressziója, a súlyosabb betegség lefolyás, valamint a magasabb mortalitási rizikó között összefüggés áll fenn (Cohen et al, 2016; Alder et al, 2018; Li et al, 2021).

Az eredményeink alapján a cGR α /cGR-P aránya a túlélő- és nem túlélő egyedek csoportja között nem tér el, ez alapján arra következtethetünk, hogy az összes cGR génexpresszió fontosabb a glükokortikoid hatás érvényesülése szempontjából, mint az egyes izoformák expressziójának mértéke.

Tekintettel arra, hogy a kutya számos humán, gyulladásos megbetegedés modell állataként szolgál, mint például, a sepszis (Alves et al, 2020), a rheumatoid arthritis (Hu et al, 2013), az atópiás dermatitis (Marsella - Girolomoni, 2009) és a gyulladásos bélbetegség (Cerquetella et al, 2010), az eredményeink hozzájárulhatnak a humán GR-mediálta jelátviteli utak további vizsgálatához.

VIII. 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 vérmintáiból

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 real-time PCR-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.

IX. Irodalomjegyzék

Alder, M.N., Opoka, A.M., Wong, H.R.: **The glucocorticoid receptor and cortisol levels in pediatric septic shock.** Crit. Care, 22. 1 - 7, 2018.

Alves, F., Prata, S, Nunes, T., Gomes, J., Aguiar, S., Aires da Silva, F., Tavares, L., Almeida, V., Gil, S.: **Canine parvovirus: A predicting canine model for sepsis.** BMC Vet. Res., 16. 1 - 11, 2020.

Alt, S.R., Turner, J.D., Klok, M.D., Meijer, O.C., Lakke, E.A.J.F., Derijk, R.H., Muller, C.P.: **Differential expression of glucocorticoid receptor transcripts in major depressive disorder is not epigenetically programmed.** Psychoneuroendocrinology, 35. 544 – 556, 2010.

Annane, D.: **Corticosteroids for severe sepsis: an evidence-based guide for physicians,** Ann. Intensive Care, 13. 1 - 7, 2011.

Annane, D.: **The Role of ACTH and Corticosteroids for Sepsis and Septic Shock: An Update,** Front. Endocrinol. 7. 70 - 77, 2016.

Baker, A.C., Green, T.L., Chew, V.W., Tung, K., Amini, A., Lim, D., Cho, K., Greenhalgh, D.G.: **Enhanced steroid response of a human glucocorticoid receptor splice variant.** Shock, 38. 11 - 17, 2012.

Bamberger, M.C., Bamberger, A.M., de Castro, M., Chrousos, G.P.: **Glucocorticoid Receptor β , a Potential Endogenous Inhibitor of Glucocorticoid Action in Humans,** J. Clin. Invest., 95. 2435 - 2441, 1995.

Barnes, P.J.: **Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation,** J. Steroid. Biochem. Mol. Biol., 120. 76 - 85, 2010.

Barnes, P.J. - Adcock, I.M.: **Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases,** Lancet, 373. 1905 - 1917, 2009.

Bathen-Noethen, A., Carlson, R., Menzel, D., Mischke, R., Tipold, A.: **Concentrations of Acute-Phase Proteins in Dogs with Steroid Responsive Meningitis-Arteritis,** J. Vet. Intern. Med., 22. 1149 -1156, 2008.

Bazsó, A.; Kövesdi, A.; Rásonyi, R., Nagy, E., Poór, Gy., Patócs, A., Kiss, E.: **Glucocorticoid receptor polymorphisms in rheumatoid arthritis: results from a single centre.** Clin Exp Rheumatol., 38. 858 - 863, 2020.

Bell, R., Cotter, S., Lillquist, A., Sallan, S., McCaffrey, R.: **Characterization of Glucocorticoid Receptors in Animal Lymphoblastic Disease: Correlation With Response to Single-Agent Glucocorticoid Treatment**, *Blood*, 2. 380 - 383, 1984.

Beishuizen, A. - Thijs, L.G.: **The immunoneuroendocrine axis in critical illness: beneficial adaptation or neuroendocrine exhaustion?**, *Curr. Opin. Crit. Care.*, 10. 461 – 467, 2004.

Bendel, S., Karlsson, S., Pettila, V., Varpula, M., Ruokonen, E.: **Free Cortisol in Sepsis and Septic Shock**, *Anesth. Analg.*, 106. 1813 - 1819, 2008.

Bhatia, R., Muraskas, J., Janusek, L.W., Mathews H.: **Measurement of the glucocorticoid receptor: Relevance to the diagnosis of critical illness-related corticosteroid insufficiency in children**, *J. Crit. Care*, 29. 691 - 696, 2014.

Boag, A.M., Brown, A., Koenigshof, A., Homer, N., Sooy, K., Jamieson, P.M.: **Glucocorticoid metabolism in critically ill dogs (*Canis lupus familiaris*)**. *Domest. Anim. Endocrin.*, 106437, 2020.

Boller, E.M. - Otto, C.M.: **Sepsis** (Chapter 106) in John D. Bonagura - David C. Twedt: *Kirk's Current Veterinary Therapy*. Elsevier 2009.

Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B. Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, K.M., Sibbald, W.J.: **Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine**, *Chest*, 101. 1644 - 1655, 1992.

Boonen, E., Meersseman, P., Vervenne, H., Meyfroidt, G., Guïza, F., Wouters, P.J., Veldhuis, J.D., Van den Berghe, G.: **Reduced nocturnal ACTH-driven cortisol secretion during critical illness**, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 306. 883 - 892, 2014.

Boonen, E. - Van den Berghe, G.: **New concepts to further unravel adrenal insufficiency during critical illness**, *Eur. J. Endocrinol.*, 175. 1 - 9, 2016.

Boozer, A.L.; Behrend, E.N.; Kemppainen, R.J.; Whitley, E.M.; Smith, A.N.; Busch, K.A.: **Pituitary-adrenal axis function in dogs with neoplasia**, *Vet. Comp. Oncol.*, 3. 194 - 202, 2005.

Bornstein, S.R. - Chrousos, G.P.: **Adrenocorticotropin (ACTH)- and Non-ACTH-Mediated Regulation of the Adrenal Cortex: Neural and Immune Inputs**. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84. 1729 - 1736, 1999.

- Botsford, A.; Behrend, E.N.; Kemppainen, R.J.; Gaillard, P.R.; Oprandy, F.; Lee, H.P.: **Low-dose ACTH stimulation testing in dogs suspected of hypoadrenocorticism**, JVIM, 32. 1886 - 1890, 2018.
- Brinkhof, B., Spee, B., Rothuizen, J., Penning, L. C. **Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression**. Anal. Biochem., 356. 36 - 43, 2006
- Bruno, J.J., Hernandez, M., Ghosh, D, Pravinkumar, S.E.: **Critical illness-related corticosteroid insufficiency in cancer patients**, Support. Care Cancer, 20. 1159 - 1167, 2012.
- Burkitt Creedon, J.M., Haskins, S.C., Nelson, R.W., Kass, P.H.: **Relative Adrenal Insufficiency in Dogs with Sepsis**, J. Vet. Intern. Med., 21. 226 - 231, 2007.
- Burkitt Creedon, J.M.: **Controversies surrounding critical illness-related corticosteroid insufficiency in animals**, J. Vet. Emerg. Crit. Care, 25. 107 - 112, 2015.
- Cao-Lei, L., Suwansirikul, S., Jutavijittum, P., Mériaux, S.B., Turner, J.D., Muller, C.P.: **Glucocorticoid receptor gene expression and promoter CpG modifications throughout the human brain**. J.Psychiatr. Res., 47. 1597 - 1607, 2013.
- Carney, P.C., Ruaux, C.G., Suchodolski, J.S., Steiner, J.M.: **Biological Variability of C-Reactive Protein and Specific Canine Pancreatic Lipase Immunoreactivity in Apparently Healthy Dogs**, J. Vet. Intern. Med., 25. 825 - 830, 2011.
- Cerón, J.J., Eckersall, P. D., Martínez-Subiela, S.: **Acute phase proteins: current knowledge and future perspectives**, Vet. Clin. Pathol., 34. 85 - 99, 2005.
- Chen, Y., Burckart, G. J., Shah, T., Pravica, V. & Hutchinson, I. V.: **A novel method for monitoring glucocorticoid-induced changes of the glucocorticoid receptor in kidney transplant recipients**. Transpl. Immunol., 20. 249 - 252, 2009.
- Cerquetella, M., Spaterna, A., Laus, F., Tesei, B., Rossi, G., Antonelli, E., Villanacci, V., Bassotti, G.: **Inflammatory bowel disease in the dog: Differences and similarities with humans**. World J. Gastroenterol., 16. 1050 - 1056, 2010.
- Chikanza, I.C. - Kozaci, D.L.: **Corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: molecular and cellular perspectives**, Rheumatology, 43. 1337 - 1345, 2004.

- Chrigher, R.S., Elias, L.L.K., da Silva, Jr., I.M., Vieira, J.G.H., Moreira, A.C., de Castro, M.: **Glucocorticoid Sensitivity in Young Healthy Individuals: in Vitro and in Vivo Studies**, J. Clin. Endocrin. Metab., 90. 5978 - 5984, 2005.
- Christensen, M. B., Eriksen, T., Kjelgaard-Hansen, M.: **C-reactive protein: quantitative marker of surgical trauma and postsurgical complications in dogs: a systematic review**, Acta. Vet. Scand., 51. 71 - 80, 2015.
- Cohen, J., Pretorius, C.J., Ungerer, J.P.J., Cardinal, J., Blumenthal, A., Presneill, J., Gatica-Andrades, M., Jarrett, P., Lassig-Smith, M., Stuart, J., Dunlop, R., Starr, T., Venkatesh, B.: **Glucocorticoid sensitivity is highly variable in critically ill patients with septic shock and is associated with disease severity**. Crit. Care Med. 44. 1034 - 1041, 2016.
- Cortés-Puch, I.; Hicks, C.W.; Sun, J.; Solomon, S.B.; Eichacker, P.Q.; Sweeney, D.A.; Nieman, L.K.; Whitley, E.M., Behrend, E.N., Natanson. C; Danner, R.L.: **Hypothalamic-pituitary-adrenal axis in lethal canine Staphylococcus aureus pneumonia**, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 307. E994 - E1008, 2014.
- Costa, R.K., Sellon, M., Court, M., Burke, N.S., Mealey, K.L.: **Polymorphisms in the canine glucocorticoid receptor alpha gene (NR3C1 α)**. J. Vet. Pharmacol. Therap., 39. 16 - 21, 2015.
- Čikoš, Š., Babel'ová, J., Kovaříková, V., Koppel, J., Fabian, D.: **Glucocorticoid receptor isoforms and effects of glucocorticoids in ovulated mouse oocytes and preimplantation embryos**. Biol. Reprod., 100. 351 - 364, 2019.
- Dabrowsky, R., Kostro, K., Lisiecka, U., Szczubiał, M., Krakowski, L.: **Usefulness of C-reactive protein, Serum Amyloid A component and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications**, Theriogenology., 72. 471 - 476, 2009.
- Dallman, M.F.: **Fast glucocorticoid actions on brain: Back to the future**, Front. Neuroendocrinol., 26. 103 - 108, 2005.
- Dejager, L., Vandevyver, S., Petta, I., Libert, C.: **Dominance of the strongest: Inflammatory cytokines versus glucocorticoids**, Cytokine & Growth Factor Reviews, 25. 21 - 33, 2014.
- de Laforcade, A.M.: **Systemic inflammatory response syndrome** (Chapter 11) in John D. Bonagura, J.D. - Twedt, D.C. (eds) Kirk's Current Veterinary Therapy. Elsevier. 2009.

De Lange, P., Segeren, C.M., Koper, J.W., Wiemer, E., Sonneveld, P., Brinkmann, A.O., White, A., Brogan, I.J., de Jong F.H., Lamberts, S.W.: **Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells.** *Cancer Res.*, 61. 3937 - 3941, 2001.

DeClue, A.: **Sepsis and the Systemic Inflammatory Response Syndrome** (Chapter 138) in *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 7th Edition Stephen J. Ettinger, Edward C. Feldman, Elsevier 2009.

DeClue, A.E., Sharp, C.R., Harmon, M.: **Plasma Inflammatory Mediator Concentrations at ICU Admission in Dogs with Naturally Developing Sepsis,** *J. Vet. Intern. Med.*, 26. 624 - 630, 2012.

Dendoncker, K. - Libert, C.: **Glucocorticoid resistance as a major drive in sepsis pathology,** *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 35. 85 - 96, 2017.

DuBois, D.C., Sukumaran, S., Jusko, W.J., Almon, R.R.: **Evidence for a Glucocorticoid Receptor Beta Splice Variant in the Rat and Its Physiological Regulation in Liver.** *Steroids*, 78. 312-320, 2013.

Eckersall, P.D., Bell, R.: **Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine,** *Vet. J.*, 185. 23 - 27, 2010.

Farrell, R.J. - Kelleher, D.: **Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease,** *J. Endocrinol.*, 178. 339 - 346, 2003.

Gaitan, D., DeBold, C.R., Turney, M.K., Zhou, P., Orth, D.N., Kovacs, W.J.: **Glucocorticoid receptor structure and function in an adrenocorticotropin-secreting small cell lung cancer.** *Mol. Endocrinol.*, 9. 1193 - 1201, 1995.

Gal, A., Weidgraaf, K., Bowden, J.P., Lopez-Villalobos, N., Cave, N.J., Chambers, J.P., Castillo-Alcala, F.: **Biological Variability in Serum Cortisol Concentration Post-adrenocorticotropic Hormone Stimulation in Healthy Dogs,** *J. Vet. Intern. Med.*, 31. 711 - 716, 2017.

Galac, S., Reusch, C.E., Kooistra, H.S., Rijnberk, A.: **Adrenals.** In: Rijnberk, A. – Kooistra, H. S. (eds.): *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats.* Schlütersche. 2nd Edition Hannover, 93 - 154, 2010.

Gebhardt, C., Hirschberger, J., Rau, S., Arndt, G., Krainer, K., Schweigert, F.J., Brunnberg, L., Kaspers, B., Kohn, B.: **Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis**, J. Vet. Emerg. Crit. Care., 19. 450 - 458, 2009.

Gibson, S. C., Hartman, D. A., Schenck, J. M.: **The Endocrine Response to Critical Illness: Update and Implications for Emergency Medicine**, Emerg. Med. Clin. N. Am., 23. 909 - 929, 2005.

Giunti, M.; Troia, R., Bergamini, P.F.; Dondi, F.: **Prospective evaluation of the acute patient physiologic and laboratory evaluation score and an extended clinicopathological profile in dogs with systemic inflammatory response syndrome**. J. Vet. Emerg. Crit. Care, 25. 226 - 233, 2015.

Goecke, A., Guerrero, J.: **Glucocorticoid receptor β in acute and chronic inflammatory conditions: Clinical implications**, Immunobiology, 211. 85 - 96, 2006.

Goy-Thollot, I., Decosne-Junot, C., Berny, P., Bonnet, J-M.: **Adrenal responsiveness in critically ill dogs: prospective study**, Revue Méd. Vét., 157. 213 - 218, 2006.

Goy-Thollot, I., Garnier, F., Bonnet, J-M.: **The effects of 10% hypertonic saline, 0.9% saline and hydroxy ethyl starch infusions on hydro-electrolyte status and adrenal function in healthy conscious dogs**, Research Vet Sci., 83. 322 - 330, 2007.

Griebsch, C., Arndt, G., Raila, J., Schweigert, F.J., Kohn, B.: **C-reactive protein concentration in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia**, Vet. Clin. Pathol., 38. 421 - 442, 2009.

Gross, K.L., Lu, N.Z., Cidlowski, J.A.: **Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance**, Mol. Cell. Endocrinol., 300. 7 - 16, 2009.

Guerrero, J., Gatica, H.A., Rodríguez, M., Estay, R., Goecke, I.A.: **Septic serum induces glucocorticoid resistance and modifies the expression of glucocorticoid isoforms receptors: a prospective cohort study and *in vitro* experimental assay**, Crit. Care, 17. 1 - 11, 2013.

Hagendorf, A., Koper, J.W., de Jong, F.H., Brinkmann, A.O., Lamberts, S.W.J., Felders, R.A.: **Expression of the human glucocorticoid receptor splice variants α , β , and P in peripheral blood mononuclear leukocytes in healthy controls and in patients with hyper- and hypocortisolism**. J. Clin. Endocrinol. Metab., 90. 6237 - 6243, 2005.

Hamid, Q.A., Wenzel, S.E., Hauk, P.J., Tsicopoulos, A, Wallaert, B., Lafitte, J-J., Chrousos, G.P., Szeffler, S.J., Leung, D.Y.M.: **Increased Glucocorticoid Receptor b in Airway Cells of Glucocorticoid-insensitive Asthma**, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 159. 1600 - 1604, 1999.

Hauk, P.J., Hamid, Q.A., Chrousos, G.P., Leung, D.Y.M.: **Induction of corticosteroid insensitivity in human PBMCs by microbial superantigens**, J. Allergy Clin. Immunol., 105. 782 - 787, 2000.

Hayes, G., Mathews, K., Doig, G., Kruth, S., Boston, S., Nykamp, S., Poljak, Z., Dewey, C.: **The Acute Patient Physiologic and Laboratory Evaluation (APPLE) Score: A Severity of Illness Stratification System for Hospitalized Dogs**, J. Vet. Intern. Med., 24. 1034 - 1047, 2010.

Hillström, A., Hagman, R., Tvedten, H., Kjelgaard-Hansen, M.: **Validation of a commercially available automated canine-specific immunoturbidimetric method for measuring canine C-reactive protein**, Vet. Clin. Pathol., 43. 235 - 243, 2014.

Hinds, T.D., Ramakrishnan, S. Jr., Cash, H.A., Stechschulte, L.A., Heinrich, G., Najjar, S.M., Sanchez, E.R.: **Discovery of Glucocorticoid Receptor-b in Mice with a Role in Metabolism**, J. Mol. Endocrinol., 24. 1715 - 1727, 2010.

Holowaychuk, M.K., Hansen, B.D., DeFrancesco, T.C., Marks, S.L.: **Ionized Hypocalcemia in Critically Ill Dogs**, J. Vet. Intern. Med., 23. 509 - 513, 2009.

Holowaychuk, M.K.: **Hypocalcemia of Critical Illness in Dogs and Cats**, Vet. Clin. Small Anim., 43. 1299 - 1317, 2013.

Hu, Y., Cheng, W., Cai, W., Yue, Y., Li, J., Zhang, P.: **Advances in research on animal models of rheumatoid arthritis**. Clin. Rheumatol., 32. 161 – 165, 2013.

Ito, K., Chung, K. F., Adcock, I. M.: **Update on glucocorticoid action and resistance**, J. Allergy Clin. Immunol., 117. 522 - 543, 2006.

Jergens, A.E., Schreiner, C.A., Frank, D.E., Niyo, Y., Ahrens, F.E., Eckersall, P.D., Benson, T.J., Evans, R.: **A Scoring Index for Disease Activity in Canine Inflammatory Bowel Disease**, J. Vet. Intern. Med., 17. 291 - 297, 2003.

Johnson, V., Gaynor, A., Chan, D.L., Rozanski, E.: **Multiple organ dysfunction syndrome in humans and dogs**, J. Vet. Emerg. Crit. Care., 14. 158 - 166, 2004.

Johnson, R.F., Rennie, N., Murphy, V., Zakar, T., Clifton, V., Smith, R.: **Expression of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid transcripts in the human placenta at term.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 93. 4887 - 4893, 2008.

Juutilainen, A.; Hämäläinen, S.; Niemenpää, J.; Kuittinen, T.; Pulkki, K.; Koivula, I.; Niskanen, L.; Jantunen, E.: **Serum cortisol and inflammatory response in neutropenic fever.** Ann. Hematol., 90. 1467 - 1475, 2011.

Kadmiel, M., Cidlowski, J. A.: **Glucocorticoid receptor signalling in health and disease,** Trends Pharmacol. Sci., 34. 518 - 530, 2013.

Kaplan, A.J., Peterson, M.E., Kemppainen, R.J.: **Effects of disease on the result of diagnostic tests for use in detecting hyperadrenocorticism in dogs,** JAVMA, 207. 445 - 451, 1995.

Kanczkowski, W., Sue, M., Zacharowski, K., Reincke, M., Bornstein, S.R.: **The role of adrenal gland microenvironment in the HPA axis function and dysfunction during sepsis,** Molecular and Cellular Endocrinology, 408. 241 - 248, 2015.

Keany, K.M., Fosgate, G.T., Perry, S.M., Stroup, S.T., Steiner, J.M.: **Serum concentrations of canine pancreatic lipase immunoreactivity and C-reactive protein for monitoring disease progression in dogs with acute pancreatitis,** JVIM, 35. 2187 - 2195, 2021.

Kemppainen, R. J., Behrend, E. N., Busch, K. A.: **Use of Compounded Adrenocorticotropic Hormone (ACTH) for Adrenal Function Testing in Dogs,** J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 41. 368 - 372, 2005.

Kenney, E.M. et al: **Association between outcome and organ system dysfunction in dogs with sepsis: 114 cases (2003-2007),** JAVMA, 236. 83 - 87, 2010.

Kjelgaard-Hansen, M., Jensen, A.L., Houser, G.A., Jessen, L.R., Kristensen, A.T.: **Use of serum C-reactive protein as an early marker of inflammatory activity in canine type II immune-mediated polyarthritis: case report,** Acta Vet Scand., 48. 9 - 13, 2006.

Kocaturk, M., Martinez, S., Eralp, O., Tvarijonaviciute, M., Ceron, J., Yilmaz, Z.: **Prognostic value of serum acute phase proteins in dogs with parvoviral enteritis,** J. Small. Anim. Pract., 51. 478 - 483, 2010.

Koga, Y., Matsuzaki, A., Suminoe, A., Hattori, H., Kanemitsu, S., Hara, T.: **Differential mRNA expression of glucocorticoid receptor α and β is associated with glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia in children.** *Pediatr. Blood Cancer* 45, 121 - 127, 2005.

Kozyra, E.F.; Wax, R.S.; Burry, L.D.: **Can 1 μ g of Cosyntropin Be Used to Evaluate Adrenal Insufficiency in Critically Ill Patients?** *Ann. Pharmacother.*, 39. 691 - 698, 2005.

Krett, N.L., Pillay, S., Moalli, P.A., Greipp, P.R., Rosen, S.T.A: **Variant Glucocorticoid Receptor Messenger RNA Is Expressed in Multiple Myeloma Patients.** *Cancer Res.*, 55. 2727 - 2729, 1995.

Kwon, Y.S., Suh, G.Y., Jeon, K., Park, S.Y., Lim, S.Y., Koh, W-J., Chung, M.P., Kim, H., Kwon, O.J.: **Serum cytokines and critical illness-related corticosteroid insufficiency,** *Intensive Care Med.*, 36. 1845 - 1851, 2010.

Langhorn, R., Thawley, V., Oyama, M.A., King, L.G., Machen, M.C., Trafny, D.J., Willesen, J.L., Tarnow, I., Kjølgaard-Hansen, M.: **Prediction of Long-Term Outcome by Measurement of Serum Concentration of Cardiac Troponins in Critically Ill Dogs with Systemic Inflammation,** *J. Vet. Intern. Med.*, 28. 1492 - 1497, 2014.

Latimer, K.S.: **Proteins, Lipids and Carbohydrates** (Chapter 6) in Duncan and Prasse's *Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology* 5th Ed. 2011.

Ledderose, C., Möhnle, P., Limbeck, E., Schütz, S., Weis, F., Rink, J., Briegel, J., Kreth, S.: **Corticosteroid resistance in sepsis is influenced by microRNA-124-induced downregulation of glucocorticoid receptor- α ,** *Crit. Care. Med.*, 40. 2745 - 2753, 2012.

Leung, D.Y.M., Hamid, Q., Vottero, A., Szefer, S.J., Surs, W., Minshall, E., Chrousos, G.P., Klemm, D.J.: **Association of Glucocorticoid Insensitivity with Increased Expression of Glucocorticoid Receptor β ,** *J. Exp. Med.*, 9. 1567 - 1574, 1997.

Leventhal, S. M., Lim, D., Green, T.L., Cantrell, A.E., Cho, K., Greenhalgh, D.G.: **Uncovering a multitude of human glucocorticoid receptor variants: An expansive survey of a single gene.** *BMC Genet.*, 20. 1 - 15, 2019.

Lewis-Tuffin, L.J. - Cidlowski, J.A.: **The Physiology of Human Glucocorticoid Receptor β (hGR β) and Glucocorticoid Resistance,** *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1069. 1 - 9, 2006.

Li, J., Xie, M., Yu, Y., Tang, Z., Hang, C., Li, C.: **Leukocyte glucocorticoid receptor expression and related transcriptomic gene signatures during early sepsis.** Clin.Immunol., 223. 108660, 2021.

Lu, N.Z. - Cidlowski, J.A.: **The Origin and Functions of Multiple Human Glucocorticoid Receptor Isoforms,** Ann. N.Y. Acad. Sci., 1024. 102 - 123, 2004.

Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C.J., Marchler-Bauer, A.: **The conserved domain database in 2020.** Nucleic Acids Res., 48. D265 - D268, 2020.

Ma, L., Fang, M., Liang, Y., Xiang, Y., Jia, Z., Sun, X., Wang, Y., Qin, J.: **Low expression of glucocorticoid receptor alpha isoform in adult immune thrombocytopenia correlates with glucocorticoid resistance,** Ann. Hematol., 92. 953 - 960, 2013.

Madeira, F., mi Park, Y., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A.R.N., Potter, S.C., Finn, R.D., Lopez, R.: **The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019.** Nucleic Acids Res., 47. W636–W641, 2019.

Marchetti, M., Pierini, A., Favilla, G., Marchetti, V.: **Critical illness-related corticosteroid insufficiency in dogs with systemic inflammatory response syndrome: A pilot study in 21 dogs.** The Veterinary Journal, 273. 105677, 2021.

Marik, P.E., Pastores, S.M., Annane, D., Meduri, G.U., Sprung, C.G., Arlt, W., Keh, D., Briegel, J., Beishuizen, A., Dimopoulou, I., Tsagarakis, S., Singer, M., Chrousos, G.P., Zaloga, G., Bokhari, F., Vogeser, M, American College of Critical Care Medicine: **Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: Consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine,** Crit. Care Med., 36. 1937 - 1949, 2008.

Marik, P.E.: **Critical Illness-Related Corticosteroid Insufficiency,** CHEST, 135.181 - 193, 2009.

Marsella, R. - Girolomoni, G.: **Canine models of atopic dermatitis: A useful tool with untapped potential.** J. Invest. Dermatol., 129. 2351 – 2357, 2009.

Martin, L.G., Behrend, E.N., Mealey, K.L., Carpenter, D.M., Hickey, K.C.: **Effect of low doses of cosyntropin on serum cortisol concentrations in clinically normal dogs,** Am. J. Vet. Res., 68. 555 - 560, 2007.

Martin, L.G., Groman, R.P., Fletcher, D.J., Behrend, E.N., Kemppainen, R.J., Moser, V.R., Hickey, K.C.: **Pituitary-adrenal function in dogs with acute critical illness**, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 233. 87 - 95, 2008.

Martin, L.G.: **Critical illness-related corticosteroid insufficiency in Small Animals**, *Vet. Clin. Small. Anim.*, 41. 767 - 782, 2011.

Matijatko, V., Mrljak, V., Kis, I., Kucer, N., Forsek, J., Zivicnjak, T., Romić, Z., Simec, Z., Ceron, J.J.: **Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with Babesia canis**, *Vet. Parasitol.*, 144. 242 - 250, 2007.

Matsuda, A., Tanaka, A., Amagai, Y., Ohmori, K., Nishikawa, S., Xia, Y., Karasawa, K., Okamoto, N., Oida, K., Jang, H., Matsuda, H.: **Glucocorticoid sensitivity depends on expression level of glucocorticoid receptor in canine neoplastic mast cells**, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 144. 321 - 328, 2011.

Matsuda, A., Tanaka, A., Muto, S., Ohmori, K., Furusaka, T., Jung, K., Karasawa, K., Okamoto, N., Oida, K., Itai, A., Matsuda, H.: **A novel NF- κ B inhibitor improves glucocorticoid sensitivity of canine lymphoid cells by up-regulating expression of glucocorticoid receptors**, *Res. Vet. Sci.*, 89. 378 - 382, 2010.

McClure, V., van Schoor, M., Thompson, P.N., Kjelgaard-Hansen, M., Goddard, A.: **Evaluation of the use of serum C-reactive protein concentration to predict outcome in puppies infected with canine parvovirus**, *JAVMA.*, 243. 361 - 366, 2013.

Mealey, K.L., Gay, J.M., Martin, L.G., Waiting, D.K.: **Comparison of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in MDR-1-1 Δ and MDR1 wildtype dogs**, *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, 17. 61 - 66, 2007.

Meij, B.P., Kooistra, H.S., Rijnberk, A.: **Hypothalamus-Pituitary System**, in: Rijnberk, A. - Kooistra, H. S.: *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats*, Schültersche, 2010.

Merlo, A., Gagliano Rezende, B.C., Franchini, M.L., Nunes Simões, D.M., Ricci Lucas, S.R.: **Serum C-reactive protein concentrations in dogs with multicentric lymphoma undergoing chemotherapy**, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 230. 522 - 526, 2007.

Meyer, H.P. - Rothuizen, J.: **Determination of the percentage of free cortisol in plasma in the dog by ultrafiltration/dialysis**, *Domest. Anim. Endocrinol.*, 10. 45 - 53, 1993.

Mischke, R. - Waterston, M. - Eckersall, P.D.: **Changes in C-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia**, *Vet. J.*, 174. 188 - 192, 2007.

- Mitchell, K.D., Kruth, S.A., Wood, R.D., Jefferson, B.: **Serum Acute Phase Protein Concentrations in Dogs with Autoimmune Hemolytic Anemia**, J. Vet. Intern. Med., 23. 585 - 591, 2009.
- Moalli, P. A., Pillay, S., Krett, N. L., Rosen, S. T.: **Alternatively Spliced Glucocorticoid Receptor Messenger RNAs in Glucocorticoid-resistant Human Multiple Myeloma Cells**, Cancer Res., 53. 3877 – 3879, 1993.
- Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M.: **Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview**, Vet. J., 168. 28 - 40, 2004.
- Necela, B.M. - Cidlowski, J.A.: **Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action in Noninflammatory and Inflammatory Cells**. Proc. Am. Thorac. Soc., 3. 239 - 246, 2004.
- Leung, D.Y.M. - Bloom, J.W.: **Update on glucocorticoid action and resistance**, J. Allergy Clin. Immunol., 117. 522 - 543, 2003.
- Nagy, Zs.; Ács, B.; Butz, H.; Feldman, K.; Márta, A.; Szabó, P.M.; Baghy, K.; Pazmany, T.; Rácz, K.; Liko, I.; Patócs, A.: **Overexpression of GR β in colonic mucosal cell line partly reflects altered gene expression in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease**. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 155. 76 - 84, 2016.
- Newton, R.: **Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?** Thorax, 55. 603 - 613, 2000.
- Nicolaides, N.C., Charmandari, E., Chrousos, G.P., Kino, T.: **Recent advances in the molecular mechanisms determining tissue sensitivity to glucocorticoids: novel mutations, circadian rhythm and ligandinduced repression of the human glucocorticoid receptor**, BMC Endocr. Disord., 14. 71 - 82, 2014.
- Nicolaides, N.C., Galata, Z., Kino, T., Chrousos, G.P., Charmandari, E.: **The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function**, Steroids, 75. 1 - 12, 2010.
- Nixon, M., Andrew, R., Chapman, K.E.: **It takes two to tango: Dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions**. Steroids, 78. 59 - 68, 2013.
- O'Connor, T.M., O'Halloran, D.J., Shanhan, F.: **The Stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia**, Q. J. Med., 93. 323 - 333, 2000.
- Oakley, R.H. - Cidlowski, J.A.: **Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue-specific Actions of Glucocorticoids**, J. Biol. Chem., 286. 3177 - 3184, 2011.

Oakley, R. H., Cidlowski, J. A.: **The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease**, J Allergy Clin Immunol., 132. 1033 - 1044, 2013.

Orii, F., Ashida, T., Nomura, M., Maemoto, A., Fujiki, T., Ayabe, T., Imai, S., Saitoh, Y., Kohgo, Y.: **Quantitative analysis for human glucocorticoid receptor a/b mRNA in IBD**, Biochemical and Biophysical Research Communications, 296. 1286 - 1294, 2002.

Osterbur, K., Mann, F.A., Kuroki, K., DeClue, A.: **Multiple organ dysfunction syndrome in humans and animals**, J. Vet. Intern. Med., 28. 1141 - 1151, 2014.

Parks, L.L., Turney, M.K., Detera-Wadleigh, S., Kovacs, W.J.: **An ACTH-producing small cell lung cancer expresses aberrant glucocorticoid receptor transcripts from a normal gene**. Mol. Cell. Endocrinol., 142. 175 - 181, 1998.

Peeters, R.P., Hagendorf, A., Vanhorebeek, I., Visser, T.J., Klootwijk, W., Mesotten, D., Wouters, P.J., Koper, J.W., de Jong, F.H., Feelders, R.A., Lamberts, S.W.J., Van den Berghe, G.: **Tissue mRNA expression of the glucocorticoid receptor and its splice variants in fatal critical illness**. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 71. 145 - 153, 2009.

Pessina, P., Fernández-Foren, A., Cueto, E., Delucchi, L., Castillo, V., Meikle, A.: **Cortisol secretion after adrenocorticotrophin (ACTH) and Dexamethasone tests in healthy female and male dogs**, Acta Vet. Scand., 51. 33 - 38, 2009.

Petta, I., Dejager, L., Ballegeer, M., Lievens, S., Tavernier, J., De Bosscher, K., Libert, C.: **The Interactome of the Glucocorticoid Receptor and Its Influence on the Actions of Glucocorticoids in Combatting Inflammatory and Infectious Diseases**. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 80. 495 – 522, 2016.

Peyton, J.L., Burkitt, J.M.: **Critical illness-related corticosteroid insufficiency in a dog with septic shock**, J. Vet. Emerg. Crit. Care., 19. 262 - 268, 2009.

Piotrowski, P., Burzyński, M., Lianeri, M., Mostowska, M., Wudarski, M., Chwalińska-Sadowska, H., Jagodziński, P.P.: **Glucocorticoid receptor beta splice variant expression in patients with high and low activity of systemic lupus erythematosus**, *Folia Histochem Cytobiol.*, 45. 339 - 342, 2007.

Prechl József - Gergely János: **A gyulladás immunológiai vonatkozásai**. In Erdei Anna (Szerk.): *Immunológia. Medicina*, 2012.

Prigent, H.; Maxime, V.; Annane, D.: Science review: **Mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular actions of glucocorticoids**, *Crit Care.*, 8. 243 - 252, 2004.

Prittie, E.J.: **Adrenal Insufficiency in Critical Illness**, Chapter 50. in Bonagura, J.D.- Twedt, D.C.: *Kirk's Current Veterinary Therapy*. Elsevier. 2009. 228 - 230.

Prittie, J.E., Barton, L.J., Peterson, M.E., Kempainen, R.J., Herr, L.G., Fox, P.R.: **Pituitary ACTH and adrenocortical secretion in critically ill dogs**, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 220. 615 - 619, 2002.

Puder, J.J., Freda, P.U., Goland, R.S., Wardlaw, S.L.: **Estrogen Modulates the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal and Inflammatory Cytokine Responses to Endotoxin in Women**, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86. 2403 - 2408, 2001.

Pujols, L., Mullol, J., Roca-Ferrer, J., Torrego, A., Xaubet, A., Cidrowski, J.A., Picado, C.: **Expression of glucocorticoid receptor α - and β -isoforms in human cells and tissues**, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 283. 1324 - 1331, 2002.

Ripanti, D., Dino, G., Piovano, G., Farca, A.: **Application of the Sequential Organ Failure Assessment Score to predict outcome in critically ill dogs: Preliminary results**, *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 154. 325 - 330, 2012.

Reyer, H., Ponsuksili, S., Wimmers, K., Murani, E.: **Transcript variants of the porcine glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*)**. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 189. 127 - 133, 2013.

Russcher, H.; Smit, P., van den Akker, E.L.T., van Rossum, E.F.C., Brinkmann, A.O., de Jong, F.H., Lamberts, S.W.J., Koper, J.W.: **Two Polymorphisms in the Glucocorticoid Receptor Gene Directly Affect Glucocorticoid-Regulated Gene Expression**, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90. 5804 - 5810, 2005.

Russell, N.J.; Foster, S.; Clark, P.; Robertson, I.D.; Lewis, D.; Irwin, P.J.: **Comparison of radioimmunoassay and chemiluminescent assay methods to estimate canine blood cortisol concentrations**, *Aust. Vet. J.*, 85. 487 - 494, 2007.

Santos, L.: **Stress Response in Critical Illness**, *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care*, 43. 264 - 272, 2013.

Sanchez-Vega, B., Krett, N., Rose, S.T., Gandhi, V.: **Glucocorticoid receptor transcriptional isoforms and resistance in multiple myeloma cells**, *Mol. Cancer Ther.*, 5. 3062 -3070, 2006.

Schaaf, M.J.M., Champagne, D., van Laanen, I.H.C., van Wijk, D.C.W.A., Meijer, A.H., Meijer, O.C., Spaink, H.P., Richardson, M.K.: **Discovery of a Functional Glucocorticoid Receptor β -Isoform in Zebrafish**, *Endocrinology*, 149. 1591 - 1599, 2008.

Schmidt, S., Rainer, J., Ploner, C., Presul, E., Riml, S., Kofler, R.: **Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance**, Cell. Death. Differ., 11. 45 - 55, 2004.

Schmittgen, T.D. - Livak, K.J.: **Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method**. Nat. Protoc., 3. 1101 -1108, 2008.

Schoeman, J. P. - Herrtage, M. E.: **Adrenal response to the low dose ACTH stimulation test and the cortisol-to-adrenocorticotrophic hormone ratio in canine babesiosis**, Vet. Parasit., 154. 205 - 213, 2008/a.

Schoeman, J. P. - Herrtage, M. E.: **Serum thyrotropin, thyroxine and free thyroxine concentrations as predictors of mortality in critically ill puppies with parvovirus infection: a model for human paediatric critical illness?** Microbes and Infection, 10. 203 - 207, 2008/b.

Schoeman, J.P., Rees, P., Herrtage, M. E.: **Endocrine predictors of mortality in canine babesiosis caused by Babesia canis rossi**, Vet Parasitol., 148. 75 - 82, 2007.

Schulte, W. - Bernhagen, J. - Bucala, R.: **Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets - An Updated View**, Mediators of Inflammation. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/165974>, 2013.

Schultze, A. E.: **Interpretation of Canine Leukocyte Responses**, in Weiss, D.J. - Wardrop, K.J.: Schalm's Veterinary Hematology, Wiley-Blackwell, 6th Ed, 2010.

Silverman, M.N. - Sternberg, E.M.: **Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction**, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1261. 55 - 63, 2012.

Singer, M., De Santis, V., Vitale, D., Jeffcoate, W.: **Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation**, Lancet., 364. 545 - 548, 2004.

Souza, M.C.L.A., Martins, C.S., Silva-Junior, I.M., Chriguer, R.S., Bueno, A.C., Antonini, S.R., Araújo Silva Jr, W., Zago, M.A., Moreira, A.C., de Castro, M.: **NR3C1 polymorphisms in Brazilians of Caucasian, African, and Asian ancestry: glucocorticoid sensitivity and genotype association**, Arq. Bras. Endocrinol. Metab., 58. 53 - 61, 2014.

Stevens, A., Ray, D.W., Zeggini, E., John, S., Richards, H.L., Griffiths, C.E.M., Donn, R.: **Glucocorticoid Sensitivity Is Determined by a Specific Glucocorticoid Receptor Haplotype**, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 89. 892 - 897, 2004.

Stockham, S. L. - Scott, M. A.: **Proteins** (Chapter 7.) in *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology* 2nd Ed 2008.

Strickland, I., Kisich, K., Hauk, P.J., Vottero, A., Chrousos, G.P., Klemm, D.J., Leung, D.Y.: **High constitutive glucocorticoid receptor in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids**. *J. Exp. Med.*, 193. 585 - 594, 2001.

Summers, A. M., Culler, C., Yaxley, P.E., Guillaumin, J.: **Retrospective evaluation of the use of hydrocortisone for treatment of suspected critical illness–related corticosteroid insufficiency (CIRCI) in dogs with septic shock (2010–2017): 47 cases**. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, 2021;1–9.

Sun, X., Fang, M., Guan, Y., Si, Y., Ma, L., Wang, Y., Jia, Z.: **Changes of glucocorticoid receptor isoforms expression in acute lymphoblastic leukemia correlate with glucocorticoid resistance**. *Pharmazie*, 70. 316 – 321, 2015.

Sweeney, D.A., Natanson, Ch., Banks, S.M., Solomon, S.B., Behrend, E.N.: **Defining Normal Adrenal Function Testing in the Intensive Care Unit Setting: A Canine Study**, *Crit Care Med.*, 38. 553 - 561, 2010.

Tait, A.S., Butts, C.L., Sternberg, E.M.: **The role of glucocorticoids and progestins in inflammatory, autoimmune, and infectious disease**, *J. Leukoc. Biol.*, 84. 924 - 931, 2008.

Takahashi, T., Kadosawa, T., Nagase, M., Mochizuki, M., Matsunaga, S., Nishimura, R., Sasaki, N.: **Inhibitory Effects of Glucocorticoids on Proliferation of Canine Mast Cell Tumor**, *J. Vet. Med. Sci.*, 59. 995 - 1001, 1997.

Tan, C. K. - Wahli, W.: **A trilogy of glucocorticoid receptor actions**, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 113. 1115 - 1117, 2016.

ter Borg, P. C. J., Hagendorf, A., van Buuren, H. R., Koper, J. W. & Lamberts, S. W. J.: **A pilot study exploring the role of glucocorticoid receptor variants in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis**. *Neth. J. Med.*, 62. 326 - 331, 2004.

Thacker, E.L.: **Immunomodulators, Immunostimulants, and Immunotherapies in Small Animal Veterinary Medicine**, *Vet. Clin. Small. Anim.*, 40. 473 - 483, 2010.

Thomas, Z., Bandali, F., McCowen, K., Malhotra, A.: **Drug-induced endocrine disorders in the intensive care unit**, Crit. Care. Med., 38. 219 - 230, 2010.

Tissing, W.J.E., Lauten, M., Meijerink, J.P.P., den Boer, M.L., Koper, J.W., Sonneveld, P., Pieters, R.: **Expression of the glucocorticoid receptor and its isoforms in relation to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphocytic leukemia**. *Haematologica* 90, 1279 - 1281, 2005.

Torrente, C., Manzanilla, E.G., Bosch, L., Fresno, L., Rivera Del Alamo, M., Andaluz, A., Saco, Y., Ruiz de Gopegui, R.: **Plasma iron, C-reactive protein, albumin and plasma fibrinogen concentration in dogs with systemic inflammatory response syndrome**, J.Vet. Emerg. Crit. Care., 25. 611 - 619, 2015.

Turney, M. K. - Kovacs, W. K.: **Function of a truncated glucocorticoid receptor form at a negative glucocorticoid response element in the proopiomelanocortin gene**. J. Mol. Endocrinol., 26. 43 - 49, 2001.

Tvedten, H.; Pettersson, H.; Adolfsson, S., Ekstran, C., Lilliehöök, I.: **Changes of Canine leukocyte concentration after treatment with prednisolone**. Oral Presentation in Joint Congress of Veterinary Pathology and Veterinary Clinical Pathology, 2019.

Ueda, Y., Hopper, K., Epstein, S.E.: **Incidence, Severity and Prognosis Associated with Hyponatremia in Dogs and Cats**, J. Vet. Intern. Med., 29. 801 - 807, 2015.

van den Akker, E.L.T., Koper, J.W., Joosten, K., de Jong, F.H., Hazelzet, J.A., Lamberts, S.W.J., Hokken-Koelega, A.C.S. et al.: **Glucocorticoid receptor mRNA levels are selectively decreased in neutrophils of children with sepsis**, Intensive Care Med., 35. 1247 - 1254, 2009.

van den Berghe, G.: **Endocrine evaluation of patients with critical illness**, Endocrinol. Metab. Clin. N. Am., 32. 385 - 410, 2003.

Vandewalle, J. - Libert, C.: **Glucocorticoids in Sepsis: To Be or Not to Be**, Front. Immunol., 11. 13 - 18, 2020.

Vandevyver, S., Dejager, L., Tuckermann, J. & Libert, C.: **New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: An emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation**. Endocrinology, 154. 993 - 1007, 2013.

Vandevyver, S., Dejager, L., Libert, C.: **Comprehensive Overview of the Structure and Regulation of the Glucocorticoid Receptor**, Endocrine Reviews, 35. 671 - 693, 2014.

Vanhorebeek, I., Peeters, R.B., Vander Perre, S., Jans, I., Wouters, P.J., Skogstrand, K., Hansen, T.K., Bouillon, R., Van den Berghe, G.: **Cortisol Response to Critical Illness: Effect of Intensive Insulin Therapy**, J. Clin. Endocrinol. Metab., 91. 3803 - 3813, 2006.

Venkatesh, B. - Cohen, J.: **Adrenocortical (dys)function in septic shock - A sick euadrenal state**, Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., 25. 719 - 733, 2011.

Vardas, K., Ilija, S., Sertedaki, A., Charmandari, E., Briassouli, E., Goukos, D., Apostolou, K., Psarra, K., Botoula, E., Tsagarakis, S., Magira, E., Routsis, C., Stratakis, C.A., Nanas, S., Briassoulis, G.: **Increased glucocorticoid receptor expression in sepsis is related to heat shock proteins, cytokines, and cortisol and is associated with increased mortality**. Intensive Care Med. Exp., 5. 10, 2017.

Vassiliou, A.G., Floros, G., Jahaj, E., Stamogiannos, G., Gennimata, S., Vassiliadi, D.A., Tsagarakis, S., Tzanela, M., Ilias, I., Orfanos, S.E., Kotanidou, A., Dimopoulou, I.: **Decreased glucocorticoid receptor expression during critical illness**. Eur. J. Clin. Invest., 49. e13073, 2019.

Veterinary Medicine Expert Committee on Drug Information, United States Pharmacopeia: **USP Veterinary Pharmaceutical Information Monographs - Anti-inflammatories**. J Vet Pharmacol Ther., 27. Suppl 1:1-110, 2004.

Viviano, K. R.: **Update on Immunosuppressive Therapies for Dogs and Cats**. Vet Clin Small Anim., 30. 1149 - 1170, 2013.

Webster, J.C., Oakley, R.H., Jewell, C.M., Cidrowski, J.A.: **Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative b isoform: A mechanism for the generation of glucocorticoid resistance**, PNAS, 98. 6865 - 6870, 2001.

Whitley, N.T. - Day, M.J.: **Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease**, J. Small. Anim. Pract., 52. 70 - 85, 2011.

Whittemore, J. C., Marcum, B. A., Mawby, D.I., Coleman, M.V., Hacket, T.B., Lappin, M. R.: **Associations among Albuminuria, C-Reactive Protein Concentrations, Survival Predictor Index Scores, and Survival in 78 Critically Ill Dogs**, J. Vet. Intern. Med., 25. 818 - 824, 2011.

Yamamoto, S., Shida, T., Okimura, T., Otabe, K., Honda, M., Ashida, Y., Furukawa, E., Sarikaputi, M., Naiki, M.: **Determination of C-reactive protein in serum and plasma from healthy dogs and dogs with pneumonia by ELISA and slide reversed passive latex agglutination test**, Vet. Q., 16. 74 - 77, 2011.

Yamanaka, K., Okuda, M., Mizuno, T.: **Functional characterization of canine wild type glucocorticoid receptor and an insertional mutation in a dog**. BMC Vet. Res., 15. 1 – 9, 2019.

Yudt, M. R. - Cidlowski, J. A.: **The Glucocorticoid Receptor: Coding a Diversity of Proteins and Responses through a Single Gene**, Molec. Endocrinology, 16. 1719 - 1726, 2002.

Zhou, J., Cidlowski, J. A.: **The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses**. Steroids, 70. 407 - 417, 2005.

http://www.ensembl.org/Canis_lupus_familiarisboxer/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSCAFG00000006293;r=2:35169173-35286712;t=ENSCAFT00000010207

X. A doktori kutatás eredményeinek közlései

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.

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

Egyéb, a kutatási témához nem kapcsolódó publikációk

Judit Csöndes - Gábor Majoros - Zoltán Lajos - Roland Psáder - Péter Vajdovich - Ferenc Manczur - Ákos Máthé: **Angiostrongylosis-related restrictive pneumopathy assessed by arterial blood gas analysis in a dog.** *Acta Veterinaria Hungarica* (2015).

Mónika Keresztes - Judit Csöndes - Péter Vajdovich: **Blood lactate and serial blood lactate measurement in critically ill dogs.**

Poster presentation ESVCP Congress Berlin; November 6 - 9 2013

Judit Csöndes - Gábor Majoros - Roland Psáder: **Canine Pulmonary Angiostrongylosis, an unusual respiratory disorder followed by arterial blood gas analysis.**

Poster presentation Fourth European *Dirofilaria* and *Angiostrongylus* Days; July 2 - 4 2014

Nándor Balogh - Judit Csöndes - Viktória Kunos et al: **First molecular detection of *Babesia gibsoni* in dogs from Hungary and Austria, - case series with clinicopathological data with breed predilection.**

Poster presentation ESVCP Congress Athens; October 17 - 20 2018

Judit Csöndes, Viktória Kunos, Zoltán Lajos, Balázs Bende, Bálint Tóth, Nándor Balogh: **Pleural fluid accumulation in a kitten**

Case Session, Joint Congress of Veterinary Pathology and Clinical Pathology, Arnhem, September 25 - 28 2019

Bálint Tóth - Judit Csöndes - Viktória Kunos - Rabnecz Gyula - Nándor Balogh: **Unique thrombocyte scattergram in a dog with babesiosis.**

Poster presentation ESVCP & ACCP Joint Congress Vienna; 24 - 27 June 2020

Judit Csöndes, Brigitta Margit Kállai, Gergely Kiss, Ákos Máthé, Nándor Balogh, Zsolt Rónai, Tamás Mészáros: **mRNA expression of canine glucocorticoid receptor α and P splice variants in peripheral blood samples of dogs with Cushing's syndrome.**

Poster presentation ECVIM Congress Gothenburg; 1 - 3 Sept 2022

XI. 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 segítsége 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 idáig.

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 a családomnak, akik kezdettől fogva támogatásukról biztosítottak és hittek bennem és abban, amit célul tűztem ki magam elé.

XII. Mellékletek

Adattábla 1: A vizsgálatban részt vett 50 kritikus állapotú kutya demográfiai és klinikopatológiai jellemzői

Adattábla 2: Az egészséges és a kritikus állapotú kutyák demográfiai és klinikopatológiai adatai

Adattábla 3: A szeptikus peritonitisben szenvedő kutya perifériás vérmintájának új generációs mRNS-szekvenálással (mRNA-Seq) nyert adatainak összegzése

Adattábla 4: A kontroll és SIRS csoport $cGR\alpha$ és $cGR-P$ mRNS expresszió $RPS5$ -re normalizált eredményei

Ábra 1: A kutya glükokortikoidreceptor (cGR) intron 8 nukleotid sorrendje

Ábra 2: A humán, a sertés, az egér, valamint a kutya $GR-P$ izoformák aminosav sorrendjének összevetése a $hGR\alpha$ -val

1141 TATATGTACTTTTTTCATTGCATAGGATATAAAAAAGTAACTGAACTACTATGTATCAC
1141

1201 TGGSTCCTTTACAAAAAAAAAAAAAAAAAGGATAGAATTAACAAGAAATAAATATATACCATA
1201

1261 AGATATAATCAGACTTCTACTCTGATGGAATATTAGAATAGATACCCTAACCTCCCACTA
1261

1321 AAAATGCTAGAGGAAGCAGGCAAAAAAACCAAAGAGGTTAGCTATACTAAGAGGGTATAT
1321C.....

1381 TTAATAAGTTCAAAGACAGGAAACATACATGAAATTTTATAGTCAGAATGCAGTTTTTTTA
1381

1441 AATGCATATATAGGTACATGTGTGTACCATGTACATAAATGAACAGAAATAGAGATACGA
1441

1501 GTGAGGGAAGAGGGCTGAAACCGTGCTTTAAAAAAGTGATCCCATTTGTGACCACCATCA
1501

1561 CAAATGATTATCCTAACCCATTAGTTAGGATAACTATTAGTAACTACATTCATACATACT
1561

1621 AACTGCTATTAGTAACTACATTCACAGTATACCAGTTGAAAAAAAGGCTTTGGTCTAAC
1621

1681 GTGATCATCAGAGATCCACAATGAAAGGTGGACAGAATAGGGAAGGAATTATACAAAG
1681

1741 AGTGGCTGAGAATTTTCTGGAATTGTGTAAAGACACCAACCCCCCTACCTTACTAGGCA
1741

1801 GGCTCAGTGAGTTCCATATAACAACACAAGTAAAATCCAAATGACTGAAAAAAAAAATCTT
1801

1861 CAAAGGAGAAGCAATTTAATAACCACAATAGCAAAGAAGAAATGGAATGCTATATAACG
1861

1921 CTAAAGGAAAATATACTGGAAAATAAAGGTGGACTTCCAGTTTTAGCTCTGACAAACTGC
1921A.....

1981 TTGGACAGTGCCATTCCCATTCTCCACAAGCAGCAGCTCAAATGAAAATCTGTAACCTTC
1981

2041 CTCAGATCTATCAGAGAATTGAGGTCACGAGGCAATGACCACATCAGAATCTGGAGAA
2041 ...G.....N.....

2101 TAGGCAAACACAGAGACACACAGCCATGATCAGTTTATTAGGGACAGAAGAAATCTGGAGC
2101

2161 CAGGAACTACTAGAAATGCTTACCGTAATTTTGATTAACACTACTGAACAGGGAGGAAGAGC
2161

3361 AGATGGAAAAAGAATCCGUTTTTCTCATAGAGGAACAAAGATAAAAAATGACATCAGAATGT
3361A.....
3421 TCTCCACATGTAGGAAGGGAGTCAAGGTGAAGCATTTAACGTTAAAAAATATATATATCA
3421
3481 ATCTACAATTTGGGTATTCAGTGAATTTGCTTCCAAAGTGAGGGTAAAATAAACAGTCT
3481
3541 CAAACAAAAACAGAATTAGTCACTAGAAACCTGTCTTGCATGAAATGTTTAAAGGAAGTT
3541
3601 CAGAGGAAATGAAAATGATGCAGTTCCAGAAATTTGGATCTACATAAAGGAGAACATGAGA
3601G.....
3661 GGAGGAAGCGATGAAAATGAAAATGACTTTTCTTCTTACTTGATCTACCACACAACCTGT
3661
3721 GGAAGGTGATTACAGCACCAAGTACATCATAACAACAGGAGAGTGGACCCGGGCATACTGT
3721C.....
3781 TAGCGGGTACCTGCACTATATGGATCAAGTAGAATGGTCATATTTAAGGAGCTGTAGAT
3781
3841 CCAGTGTCTATGTATATGTGGAACCCAGGGCAAGCACTGAAACCACTTTAAATACACGT
3841
3901 AATAATTGATATCCTGAGAACAGAGARTATAGAATCATATGAAATGCTCATCAAAAACGT
3901
3961 GAGAAGTAGAAAAGAGGGGAGGATTACAAAAGGAAGCATCAGTGCAAAGAGTGCAAAAACG
3961
4021 GTTACAACATAGTACCTATTAACCCBAATATATCGAATGGTCACCTGACATGTGTATAG
4021
4081 TCAAAAAGTCTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTAAATGAAGGTGAAA
4081A...T...N.....
4141 GGAAAAGTTTGCCACCACCGATCCTCAATATAATAACAAGACTAAAGGGTCTACTTAGGCT
4141
4201 AAGGGTAAGGAATCCCATGCTCTAAGAAGTAAAGAGGAACAGAGAGAATGGTAATATGTAA
4201
4261 ATATGTTTAAAGCTGACATCTATTATATAAAGTAACAGCAGTAGCGTTTTGGAAGATCTAA
4261

4321 AACCAGAACGCTAGAAGGATAGTTCAATAAGGAAGGTTCAAATTTCAATGACAATGGCTA
4321

4381 AAGATAGGAAAGGTACGCAGAGTACCRAAGCACCGAGGTGGGGGGGTGGAGCCCTTACGG
4381NNNNNNNNNNNNNNNNNN

4441 AAAACACTGTAAGGAAAAGGTGGGGGGGTGGAGCCCTTAAGGAAAACACTGTAAGGAAA
4441 NNNNNNNNNNNNNNNNNN.

4501 GCAACCCAAACACATGAAATGAAGGGGAGGGGGTAAACAAGCACACAGGAAGGGAAAAA
4501

4561 ACAAATGGTGAACAAATAAATTTATCTGCAATTTTCAATTAATAGACAGGAGATAAAAGTT
4561

4621 TCAACGTCAAAGATACACAAAGAAATCCAAGACTGGATAAAAAATAAAAAAAAAAAAA
4621

4681 GCTCCTCCATGATACTGAATGATTGACATTAAGGCCCTCCAGTAACCCAGTGGCGGTG
4681

4741 GACTTGCTGTAGAGCAGCATGTGGTAAATGTTCTCAGTGTGCAAGCAAGACTGTCAC
4741

4801 AGCTGCTCAACTCTGCTCCTTGCAGCATGAACACAGTCATCACCTAAAGAAAGAACAGGC
4801C.....

4861 ATGGTTATGTTCCAATAAAACTTTATTTACAAACACAGGCTGCTGGTGTGACCAGGCCAC
4861

4921 CAGTCGTGTTTTGCTGAGTGTTCUUTTGAACCAGAAAGAAAGCTGTGGCAGCTTCTTCAG
4921

4981 TTATGATCAGCACAGATGTTAAAGAGCTGGGTTTTTTTTTTTCTCACTTTATTTAAAGTT
4981GG.....

5041 ACTCCTTACATAAAGCATTCTACTTACCAGAAAAGTAATTCTAAGTATGTGCTTAAACG
5041

5101 CATAGAGCAAAAATTAATGAAGCTCCAAGATAATTAGGGGTAATTTGGGATAGATGGAA
5101

5161 TTCTTTTAAATATAAGCACTGATAGGACTTTGCCAATCATTATTTTTAGAGTTCAGGTAA
5161

5221 TAAGCAGGAAAAAATACAGCTCAACAATCGATGAAAGTATTAAATTTTAGTATTTAAGA
5221

5281 AATTAGCAATATATTAGGTTATCTGTAACATATTAATGTACTTTTAAACATGGTAAGCTCTT
5281

5341 AGCACTTCTGATGAAGTAGACTTCATTTTCACAGTTAATACTGACATCTTAGAAGTGCCA
5341

5401 AGTGTGCTTTATAGAATCTGAACTTTTCATGTGTGTTCCCTGGTCTAACCCCTATTCAA
5401

5461 AATCCAGGGAGAGTGGTACACCACATTAACAAAATGAAAGGTAAAAGTCATACAATCATC
5461

5521 TCAACAACAGGTGCAGAAAAAGCATCTAACAAAATTCAGTGTCTGTTTCATGATGAAAAACA
5521

5581 TTCAACAAAATGAGTACAGAGGGACATACCTCAGCATAATAGCCATATATGACAACCCAC
5581

5641 AGCTAACATCATACTTCATGGTGAAAAGCTGAAAGCTTTCTGTCTACAATCAGGAATAAA
5641C.....

5701 ACAAGGCTATCCACTGTCACTTTTATTCACCACAGTATTAAGGTTCTAGCCGAGCA
5701

5761 ATTAGACAAGAAATATAAAGGCATTCAAATCTAAAAGTACTAAATAAAACTCTCTCGGC
5761

5821 AGATGCCATGATATTATATATAGAAAAATTTAAGACTCCACAAAGAGACCCTTAAAAAC
5821T.....

5881 AAGTAAGTTCATAAGGATGCAGGATACAATATCGATATGCAAAAATCTGCGGCAGTTCGA
5881

5941 GACACTAATAATAAGAACTATCAGAGAACTAABAAATATAACTCCATTTACATTTGCCT
5941

6001 CAAAAATAATATCTAGGAATAAATGTTTTTAAGGAGGTGAAAGACCCATGCACTGAAAA
6001

6061 CAGTAAGACACTAATGAGAGAAATTTGAAGATGACAGAAATAAACGCAAAGATGTTCCATA
6061

6121 CTCATGGATTAGAAGAATATTTCTTAAAATGTTGACATTTCCAAAAGCAACCCACAAATTA
6121

6181 AGTGCAATCCCTGTTACAATTCAGTGGCATTTTTCACAAAAGAAATCCTAAATTTCTGTA
6181

6241 TAGAACTCTAAAAGACCCAGAATAGCCTAAGATACCGCAACATTACAGTACCACGTTCTAA
6241T.....A.....

6301 CTATAAAGCTTTCTCACCGCAAAGAAAATGATCAGCAAAATGAAAAGCAGCCTACAGCA
6301

6361 TGGGAGAAAATCCTTGCAAATCCTAATTGGCCAAAGGGCACATGAAAAGATGCTCATCAT
6361G.....

6421 TACTAGTCATTAACAAGGAAATGCAAATCAAACCCACATGAGATCCCACCTGACCTCTAT
6421

6481 TAGAATGTCTGTTACCAAAGACAAGGAATTAAGTGTGCTGGCGAAGGTGTGGAGAAGAGGGA
6481

6541 AGCTGTACTCACTGCAGGTGGGAATACAAATTGATGCAGCCACCGTGGAAACAATATGGG
6541T.....

6601 TGTTCCTCAACAAAGTGAAACAGGACTACTGCACGACCCTGCAGTTCACCTTCTGGGTAT
6601

6661 GTGTCCACAGAAAATGAAAATACTCGAAAATATATGTAGCCTCATACTCATGGCATAAT
6661

6721 TACTGATAGTAGCTAAGATACGGAAGCAGCTGAAGAGTCCACCTATGCAAGAGTCCACCT
6721

6781 ATGGTTTGTITTAGTAAATATATCCAATAGACCATTATTCCACCATAGAAAGGAGTGGAAAT
6781

6841 CTTGCCACTTGCAGCAGTTTGGATGGACCTTGAAGGCACTGCGCTAAGTGAAATAAGCCA
6841A.....

6901 GTCAGAGAAAACCTGAGCACAAACGAATATATATAGGGACGCCTGGGTGGTTCAGTGGTTG
6901

6961 AGCATCAGCCTTTGGCTTAGATTGTGATCCCGGGTCCCTGGGATCGAGTCTCACATCTGG
6961

7021 CTCCTGTGAGGAACCTGCTTCTCCCTCTGCCTCTCTCTCGGTGTCTCTCATGAATAAT
7021

7081 AAAATCTTAAAAAAAAAATATATATAATCTCACTTATACGTGGACTCTAAAAATAAATA
7081AG.....

7141 GGGACACGGGCTCTTGTATGCAGAGAACAGACTGGCAGTCTCCAGCGGAGGGTGTITTTGG
7141A.....

7201 AGGGTGGGAGAAATGAGGGAAGGAGAGGGTTAAAAAGTGCAAACCTTCCCGGTATAAAAAA
7201

7261 AGTCACATGGATGTCATGTGCAGCTTGGTGAATAGTTATTAATAATATATATTATATA
7261

7321 TATGAAAGTTGCTCAGTAAATATTAAATGTCATCATGAGAAAAAATGTATACTATCTGA
7321

7381 TGATGGATGTTAACTATAGATGTATTGTGATCGTTTTGCAATATATACAAATATTGGTC
7381

7441 ATTCGTGTGTACAACCTGAACTAATGTCAATTTATCTAAATTTTAGAACTTAAACT
7441

7501 CCATGAGAAAGATTAGGACATGCAGCTAAGGCAGGTATACTCAAATCCACTGGACAAGT
7501

7561 AAGAATTAAATCTTCCTGCTCCTAAAACCACTGCTTTTCCTTACCTTAATCCAGCATT
7561

7621 TCTAAGATGTCATCAACAATGAACTTAAGTTTGGGGAAACATCATGTTCCCTTCCCTAAT
7621

7681 TCTGGCTCTGATAAATCCTGAAAACCAATAGTCTACCTAACTTTGTATTAACCTTTAATT
7681

7741 TTGCTTACATTTTGACCAAATCCTTTTTTCCCTAACCATTAACACAGAACCAAAGTTCTG
7741

7801 AGGAGTACACTTGGAGAAATTTGGCCATGTACAAAAATCAGTCAGTCTTTCAGGATTCA
7801

7861 TGAACATGATTAACCTTCTGTTCACAGTCCTTCTTACTGGTATCAGTTTTTGAAGAGTAA
7861

7921 TAAATGATTCATTTTTATACCGATTTTACAATCTGGAATCCATAAGTTTTTTTCTAAGTG
7921

7981 CGTAAGGGAAGGCTGATACATGCTCCCCAGCAAGGCAAGACTCCAGGTTAAATCCTCTGA
7981

8041 TTTTCTATTATCCCCTCATCTCTCTTGCCTGTACTTTCAGGATCCTGTGAGATGCTTGTA
8041

8101 TTTTCATGGAATGTATCTAGAGTGTATATACAATACATGTCATGAAGCATGCTATTGTTA
8101

8161 ATAAATGCCCTACAGGCACATAGGCAGAGTTACCTTAAGAAAATTCTTTCCTTGACCACA
8161

8221 TCTTAACCTTTTAG
8221

Melléklet Adattábla 1. A vizsgálat első fázisába bevásztott 50 kritikus állapotú kutya demográfiai és klinikopatológiai jellemzői.

Páciens azonosító	Ivar (ivartalanított = 0, ivaros = 1)	Fajta	Életkor	Testtömeg (kg)	Diagnózis	SIRS
234091	nőstény 0	Bullmasztiff	10 év	47	IRA, anuria, septikaemia	igen
234521	nőstény 1	Bichon havanese	10 év	5	cholangiohepatitis, peritonitis	nem
234925	nőstény 0	Mopsz	13,5 év	5,6	PLE, hydrothorax, ascites, oedema pulmonum	igen
234145	hím 1	Yorkshire terrier	6 év	2,5	lymphangiectasia	nem
235339	hím 0	Yorkshire terrier	11 hónap	2	harapott sérülés, hydrocephalus	igen
157868	nőstény 0	Magyar vizsla	9,5 év	27	IMHA	igen
230953	nőstény 1	Szálkássz. tacsókó	3,5 év	7,4	IMPA, IMHA	igen
232579	hím 1	Doberman	6,5 év	40	heveny babesiosis, abscessus	igen
235964	hím 1	Ausztrál juhászkutya	7 év	27	HSA, metastasis	igen
236012	hím 0	Dél orosz juhászkutya	5,5 év	60	septikaemia	igen
236808	nőstény 0	Golden retriever	9,5 év	35	szeptikus shock, MODS, ARDS	igen
236854	nőstény 0	Westhighland white terrier	8,5 év	8,7	szeptikus pleuritis, perforatio oesophagii	igen
236621	hím 0	Kaukázusi juhász keverék	5 év	47	prostatatályog, szeptikus peritonitis, septikaemia	nem
237214	nőstény 1	Bichon frise	10 év	5,1	pancreatitis, peritonitis, ARDS	igen
237185	nőstény 1	Német juhászkutya	9 év	40	neoplasma mammae	nem
229334	hím 0	Német juhászkutya	8,5 év	38,5	AHDS, vasculitis	igen

Rövidítések: **SIRS** (Szisztémás Gyulladásos Válaszreakció Szindróma) - kritériumoknak (de Laforcade, 2009) való megfelelés; **IRA** (heveny veseelégtelenség); **PLE** (fehérjevesztéses enteropathia); **IMHA** (immun-mediált hemolyticus anaemia), **IMPA** (immun-mediált polyarthrititis), **HSA** (haemangiosarcoma), **MODS** (Többszervi Diszfunkció Szindróma), **ARDS** (Akut Respirációs Distressz Szindróma), **AHDS** (Akut Hemorrhagiás Hasmenés Szindróma)

Páciens azonosító	kortizol t0 (ref.: 40-110 nmol/L)	kortizol t1h (ref.: 150-470 nmol/L)	Δkortizol	testhőmérséklet (C°)	WBC (G/l)	Neu band (G/l)	Lymphocyta (G/l)
234091	105	231	126	39	52,7	0,69	4,22
234521	180	508	328	38,6	0,83	0,027	0,33
234925	244	439	195	38,9	67,43	6,74	2,7
234145	159	392	233	38,3	15,6	0,156	1,561
235339	251	571	320	38,7	6,25	0,188	0,437
157868	579	1219	640	39	36,12	2,88	2,16
230953	203	748	545	39,7	36,82	3,31	1,1
232579	1059	>1380	>321	37	10	2,1	1,7
235964	104	268	164	38,1	35,01	1,66	4,16
236012	109	220	111	39,7	15,61	0,82	0,93
236808	1156	1164	8	37,6	87,09	NA	NA
236854	87,5	430	342,5	39,2	27	2,43	2,97
236621	130	538	408	38,9	19,23	0,19	3,84
237214	1380	>1380	156	37,1	34,2	2,73	0,34
237185	>1380	>1380	534	38,5	7,96	NA	NA
229334	222	1153	931	38,7	29,8	NA	NA

Rövidítések: WBC (összfehérvérsejtszám); Neu band (band neutrophil granulocyták abszolút száma)

Páciens azonosító	RBC (T/l)	Hemoglobin (g/l)	PLT (G/l)	CRP (mg/L)	ÖsszBr (umol/l)	TChol (mmol/l)	Albumin (g/l)	ALT (U/l)	Lipáz (U/l)
234091	3,29	81	228	NA	7,3	NA	29,1	32	651
234521	4,06	81	58	NA	54,6	NA	16,8	201	38
234925	3,41	72	520	NA	3,5	5,3	15,3	5	163
234145	6,84	133	126	NA	1,4	NA	24,6	81	248
235339	4,49	161	160	NA	1,6	NA	23,2	135	81
157868	2,99	62	820	NA	364	NA	24,5	192	95
230953	4,92	103	388	NA	3,5	NA	20,3	17	22
232579	6,8	95	38	NA	167,5	NA	17,2	715	798
235964	1,49	41	720	NA	0,6	NA	28,2	23	37
236012	5,31	101	105	NA	3	NA	29	55	120
236808	4,61	98	239	NA	NA	NA	19,7	291	597
236854	5,45	132	463	NA	3,5	NA	19,8	148	37
236621	6,47	128	128	NA	5,8	NA	24,7	51	115
237214	6,86	139	204	131,8	119,7	7,1	16,1	367	52
237185	8,76	167	360	171,2	16,5	4,9	24	25	476
229334	5,29	101	123	180,3	8,1	1,7	17,1	165	41

Rövidítések: **RBC** (vörösvérsejtszám), **PLT** (vérelemzkeszám); **CRP** (C-reaktív fehérje koncentráció), **ÖsszBr** (Összbilirubinszint), **TChol** (Összkoleszterinszint), **ALT** (Alanin-amino-transzferáz aktivitás)

Páciens azonosító	Kreatinin (umol/l)	Glükóz (mmol/l)	Laktát (mmol/l)	Bikarbonát (mmol/l)	Káliumion (mmol/l)	Na/K arány	Nátriumion (mmol/l)	APPLEfast-score
234091	281	4,9	2,2	23	6,3	24,44	154	26
234521	119	6,7	1,9	17,1	4,05	35,80	145	26
234925	45	5,2	1,5	20,1	4,33	31,41	136	23
234145	54	3,6	0,6	18,1	3,6	39,44	142	20
235339	49	3,9	0,5	12	3,4	41,47	141	28
157868	400	6,2	1,93	16,6	3,3	46,67	154	22
230953	78	4,6	2,83	18,1	4	37,25	149	23
232579	116	9	1,2	15,5	3,4	40,29	137	26
235964	91	6,8	8,98	15,3	3,6	42,50	153	31
236012	91	6	0,98	18,2	3,9	38,21	149	29
236808	241	4,8	1,81	10,3	3	52,67	158	33
236854	69	4,1	2	13,4	4,4	35,91	158	22
236621	116	5,3	1,79	23,5	3,6	41,67	150	27
237214	125	4,8	1,3	14,3	3,5	44,29	155	33
237185	358	5,4	1,89	10,6	4,4	33,18	146	23
229334	84	7,4	0,83	19,1	4,2	32,86	138	26

Páciens azonosító	Betegség kimenetel (túlélő/elhullott)
234091	túlélő
234521	elhullott
234925	túlélő
234145	túlélő
235339	elhullott
157868	túlélő
230953	túlélő
232579	túlélő
235964	túlélő
236012	elhullott
236808	elhullott
236854	túlélő
236621	túlélő
237214	elhullott
237185	elhullott
229334	túlélő

Páciens azonosító	Ivar (ivartalanított = 0, ivaros = 1)	Fajta	Életkor	Testtömeg (kg)	Diagnózis	SIRS
238157	nőstény 1	Kaukázusi juhász	6 év	34	IBD	igen
237545	hím 0	Whippet	1,7 év	13,6	ileus paralyticus, IBD	igen
239414	nőstény 1	Basset hound	7 év	25,4	fever of unknown origin	nem
239374	nőstény 0	Német juhász-keverék	9 év	20	tüdőmetastasis	igen
239129	hím 1	Yorkshire terrier	6 év	4	pancreatitis, pancreas-abscessus, peritonitis	nem
238771	hím 1	Golden retriever	7 év	26	idegen test okozta bélperforatio, peritonitis	igen
236355	hím 1	keverék	1 év	8,7	AHDS	nem
175646	nőstény 1	Westhighland white terrier	11,5 év	5,1	diabetes mellitus, azotaemia	igen
225794	nőstény 0	Leonbergi	10 év	56	inflammatory carcinoma (emlő), DIC, IHA	igen
208613	hím 0	Jugoszláviai farkasölő-keverék	10,5 év	65	abscessus, septikaemia	igen
200530	hím 1	Moszkvai őrkutya	6,5 év	43	High grade Non-Hodgkin diffúz lymphoma	igen
241483	hím 0	Bichon bolognese	5 év	8,6	harapott sérülés, hernia abdom., PTX, peritonitis	nem
234925	nőstény 0	Mopsz	14 év	7	PLE, pulmonalis hypertensio	igen
242497	nőstény 0	Doberman	6 év	35	mastitis, setikaemia	igen
242473	nőstény 1	Tacskó	7 év	7,4	pleuropneumonia	igen
243317	hím 1	Törpe schnauzer	12 év	10,5	alimentáris B-sejtes/MALT lymphoma, dysbacteriosis	nem

Rövidítések: **IBD** (Inflammatory Bowel Disease), **DIC** (Disszeminált intravasculáris coagulatio), **IHA** (Immun-mediált hemolyticus anaemia), **PTX** (Pneumothorax).

Páciens azonosító	kortizol t0 (ref.: 40-110 nmol/L)	kortizol t1h (ref.: 150-470 nmol/L)	Δkortizol	testhőmérséklet (C°)	WBC (G/l)	Neu band (G/l)	Lymphocyta (G/l)
238157	81,40	717	635,60	39	16,9	0,33	2,02
237545	89,7	370	280,3	37,6	9,06	0,45	0,82
239414	190	510	320	37,8	3,97	0	0,71
239374	NA	886	NA	39,6	84,46	3,38	5,07
239129	NA	>1380	NA	37,8	18,49	8,52	2,11
238771	1338	> 1380	>1024	38,9	16,42	0	4,06
236355	193	274	81	NA	20,64	0,41	1,65
175646	177	494	317	39	22	1,1	5,94
225794	175	328	153	39	116	11,6	2,32
208613	119	323	204	39,2	28,66	1,71	1,71
200530	120	1007	887	39,3	30,79	0	4
241483	135	249	114	39,2	10,05	1,6	1,9
234925	201	356	155	37,9	31	1,86	2,17
242497	350	447	97	37,9	24,33	1,7	3,4
242473	129	452	323	38,6	74	24,4	4,44
243317	159	123	nem értelmezhető	39	22,9	1,14	5,03

Páciens azonosító	RBC (T/l)	Hemoglobin (g/l)	PLT (G/l)	CRP (mg/L)	ÖsszBr (umol/l)	TChol (mmol/l)	Albumin (g/l)	ALT (U/l)	Lipáz (U/l)
238157	3,67	65	346	NA	28,5	NA	10,4	30	128
237545	5,8	119	134	NA	6,5	NA	21,4	72	99
239414	4,57	67	10	42,5	18,2	6,6	24,3	89	266
239374	5,73	103	142	146,2	0,4	4,5	19,9	25	295
239129	5,22	99	12	NA	98,7	NA	18,3	46	5030
238771	8,65	168	106	NA	76,60	NA	29,6	36	1252
236355	7,04	140	103	76,9	25,5	3,2	29,7	3240	181
175646	4,56	86	791	41,4	9,7	10,6	28,6	74	1258
225794	2,74	61	15	44,6	9,3	4,8	29	19	186
208613	5,6	101	39	101,6	7	10,9	21,5	587	658
200530	6,55	158	397	162,5	3,4	3,6	16,3	60	82
241483	6,35	140	301	199,1	2,4	2,8	29,8	173	47
234925	4,94	143	387	71,9	NA	5,3	21,5	31	56
242497	5,89	129	416	>220	12,8	7,8	20	328	86
242473	3	67	339	202	5,6	3,4	19	20	27
243317	3,51	89	106	63,2	4,4	5,2	29,2	861	75

Páciens azonosító	Kreatinin (umol/l)	Glükóz (mmol/l)	Laktát (mmol/l)	Bikarbonát (mmol/l)	Káliumion (mmol/l)	Na/K arány	Nátriumion (mmol/l)	APPLEfast-score
238157	68	5,8	1,45	19,3	4,4	33,86	149	24
237545	113	5,1	1	23,8	3,8	39,74	151	27
239414	200	5,4	2,04	20,1	4,1	35,12	144	25
239374	174	3	1,44	14,3	5	26,00	130	22
239129	37	5,6	2,37	20,2	4,5	30,67	138	30
238771	352	7,1	8,29	21,6	3,7	36,22	134	35
236355	59	5,9	1,4	18,8	3,5	42,57	149	25
175646	326	20,5	4,18	11	4,1	33,90	139	16
225794	65	6,6	1,54	22,8	2,9	51,72	150	28
208613	201	3,4	0,95	13,6	4	40,00	160	26
200530	91	6,1	1,27	21	4,7	30,64	144	23
241483	72	5,8	1,01	22,2	3,4	41,76	142	22
234925	143	5,3	3,94	23	4,2	35,48	149	26
242497	256	5,4	1,76	14,1	4,3	34,42	148	23
242473	29,9	4,8	2,06	24	4,2	34,29	144	20
243317	81	5,5	7,24	20,3	3,6	39,17	141	27

Páciens azonosító	Betegség kimenetel (túlélő/elhullott)
238157	túlélő
237545	túlélő
239414	túlélő
239374	elhullott
239129	elhullott
238771	elhullott
236355	túlélő
175646	elhullott
225794	elhullott
208613	túlélő
200530	elhullott
241483	túlélő
234925	elhullott
242497	elhullott
242473	túlélő
243317	elhullott

Páciens azonosító	Ivar (ivartalanított = 0, ivaros = 1)	Fajta	Életkor	Testtömeg (kg)	Diagnózis	SIRS
243498	nőstény 0	Sharpei	9 év	23,5	urothelial cell carcinoma, zsákvese, IRA	igen
243574	hím 1	Német juhászkutya	7 hónap	27,5	bronchopneumonia	nem
244171	hím 0	keverék	8 év	17	abszcessus, septikaemia, endocarditis, thrombosis	igen
244589	hím 1	Bichon havanese	6 év	7,5	szeptikus purulens pleuritis	igen
243933	nőstény 1	Angol cocker spániel	6 év	9,8	dirofilariosis, pleuropneumonia	igen
244867	hím 1	Golden retriever	13 év	36	aspirációs pneumonia, megaesophagus	nem
249503	nőstény 1	Kuvasz	10 év	30	peritonitis, sarcoma	nem
248873	nőstény 0	Komondor	5 hónap	16,8	enteritis haemorrhagica, septikaemia	nem
249643	hím 1	Csehszlovák farkaskutya	1 év	30,2	pneumonia, septikaemia	igen
251520	nőstény 0	Cane corso keverék	4 év	40	gastroenteritis, shock	nem
252390	nőstény 0	Bolognese	13 év	3,5	csonkpyometra, peritonitis, IHA, vasculitis	igen
252084	hím 1	Cavalier King Charles pániel	3 év	10,3	diabetes mellitus, pancreatitis	nem
227916	hím 0	Landsheer	7,5 év	60	szeptikus peritonitis, pancreatitis	nem
252788	hím 1	keverék	10 év	10,3	FUO	igen
249407	hím 1	Német dog	1,5 év	54	aspirációs pneumonia	NA
228619	hím 0	Német juhászkutya	11 év	42	septikaemia, neoplasma pulmonum	nem
251107	hím 0	Angol cocker spániel	15,5 év	12,4	IMHA	igen
256060	hím 0	Bullterrier	10 hónap	21,5	szeptikus peritonitis, idegen test okozta ileus	nem

Rövidítések: NA (nincs adat), FUO (Fever of Unknown Origin).

Páciens azonosító	kortizol t0 (ref.: 40-110 nmol/L)	kortizol t1h (ref.: 150-470 nmol/L)	Δkortizol	testhőmérséklet (C°)	WBC (G/l)	Neu band (G/l)	Lymphocyta (G/l)
243498	>1380	>1380	nem értelmezhető	37,90	29,8	0,59	1,49
243574	75,9	279	203,1	39,1	12,2	0	1,81
244171	>1380	>1380	nem értelmezhető	39,1	63,06	4,55	4,55
244589	198	497	299	38,5	37,1	1,11	4,45
243933	167	866	699	39,4	22,4	0,67	2,01
244867	86,3	356	269,7	38,3	13,67	0,27	1,77
249503	73,7	162	88,3	38,1	17,63	0,17	1,22
248873	99	298	199	38,8	14,83	1,55	3,83
249643	527	662	135	39,7	3,63	0,33	0,79
251520	1131	1035	nem értelmezhető	38,6	26,7	0	3,2
252390	121	339	218	38,6	26,01	0,56	1,3
252084	841	886	45	37,7	49,7	4,56	4,05
227916	133	158	25	39,1	9,04	0,09	1,46
252788	88,8	281	192,2	39,8	48,12	10,11	3,36
249407	52,4	93,8	41,4	37,3	33,21	1,32	1,99
228619	290	679	389	38,70	8,88	0,28	0,56
251107	1366	>1380	nem értelmezhető	39,40	21,47	0	1,3
256060	69,3	303	233,7	38,20	33,67	0	7,07

Páciens azonosító	RBC (T/l)	Hemoglobin (g/l)	PLT (G/l)	CRP (mg/L)	ÖsszBr (umol/l)	TChol (mmol/l)	Albumin (g/l)	ALT (U/l)	Lipáz (U/l)
243498	5,12	115	222	110,7	38,4	8,7	21	39	3222
243574	4,95	101	128	190,2	0,7	7,7	25,6	16	26
244171	6,9	157	82	406,1	51,3	7,8	26,4	118	1048
244589	6,54	161	228	48	4	7,2	25,5	15	172
243933	6,44	136	326	NA	3,2	6,2	25,1	30	103
244867	5,58	124	311	85,5	4,5	8,7	21,9	58	103
249503	5,87	113,6	259	89,8	5,1	6,7	20,1	64	168
248873	5,74	116,3	541	18,9	0,9	3,6	18,5	13	852
249643	7,73	157,6	234	218	4,5	8,4	29,4	33	45
251520	10,51	236,8	431	174	186	7,1	52,5	2862	1620
252390	3,13	66	433	101	7,5	9,4	25,3	28	185
252084	2,53	56	18	36,8	295,6	4,8	20,5	75	656
227916	7,84	170,6	307	65,8	8,1	4,4	23,5	122	37
252788	4,11	97	406	180,3	7	5,2	19,5	44	96
249407	7,74	167,4	373	52,8	5,7	6,9	37,6	53	61
228619	7,08	144,7	52	257,1	6,9	8,1	27,6	99	3252
251107	1,15	90,2	150,5	290,4	69	7,4	30,6	934	876
256060	3,4	79,9	168	55,8	3,7	5,4	21,3	147	20

Páciens azonosító	Kreatinin (umol/l)	Glükóz (mmol/l)	Laktát (mmol/l)	Bikarbonát (mmol/l)	Káliumion (mmol/l)	Na/K arány	Nátriumion (mmol/l)	APPLEfast-score
243498	1368	5,8	0,61	15,5	5	27,00	135	24
243574	62	4,9	1,26	17,4	3,9	37,18	145	25
244171	416	5,3	4,48	13,7	3,4	39,71	135	33
244589	107	4,3	1,01	20	4,6	29,57	136	19
243933	57	5,5	2,38	15,9	4,7	32,98	155	24
244867	109	4,8	1,81	21,6	3,7	40,27	149	20
249503	85	4,6	2,59	24,9	4,7	30,85	145	27
248873	74	5,4	0,96	24,3	4	36,00	144	21
249643	NA	3,1	2,23	19,1	4	34,75	139	25
251520	288	5	3,53	14,4	3,7	34,05	126	22
252390	140	4,8	1,07	21,3	3,7	39,46	146	20
252084	128	7,2	1,83	31,8	3,8	34,47	131	29
227916	126	4,1	0,84	24,5	3,7	39,73	147	21
252788	72	4,8	1,18	18,5	4,3	34,19	147	20
249407	116	5,7	2,12	22,8	3,5	42,29	148	19
228619	189	3	1,78	16,2	4	36,75	147	25
251107	130	1,4	10,69	9,6	2,7	56,30	152	38
256060	101	4,8	0,74	20,7	4,1	34,39	141	26

Páciens azonosító	Betegség kimenetel (túlélő/elhullott)
243498	elhullott
243574	túlélő
244171	túlélő
244589	túlélő
243933	túlélő
244867	túlélő
249503	túlélő
248873	túlélő
249643	elhullott
251520	túlélő
252390	túlélő
252084	túlélő
227916	túlélő
252788	túlélő
249407	túlélő
228619	elhullott
251107	elhullott
256060	túlélő

Melléklet adattábla 2: A vizsgálat második fázisában résztvevő, egészséges, illetve kritikus állapotú kutyák demográfiai és klinikopatológiai adatai.

Páciens kód	Csoport	Páciens azonosító	Fajta	Ivar	Ivartalanított?	Életkor (év)	SIRS kritériumok (1 - 4)	Szérum CRP (mg/L)	WBC (G/l)	RBC (T/l)	PLT (G/l)	Szérum alap kortizol (nmol/l)	Diagnózis	Mortalitás
Control1	control	235743	Akita inu	hím	nem	2,2	-	12,5	8,03	6,51	127	168,0	-	-
Control2	control	235744	Shiba inu	hím	nem	4,5	-	12,5	9,05	7,63	227	59,3	-	-
Control3	control	242021	Labrador Retriever	nőstény	igen	2,2	-	35,8	9,93	6,06	272	51,3	-	-
Control4	control	211612	keverék	nőstény	igen	4,5	-	12,5	8,28	8,5	360	175,0	-	-
Control5	control	268749	keverék	hím	igen	3,2	-	12,5	21,80	6,52	283	132,0	-	-
Control6	control	268748	keverék	nőstény	igen	1,0	-	12,5	13,70	7,76	264	315,0	-	-
Control7	control	268747	keverék	nőstény	igen	1,0	-	21,2	18,50	5,29	309	249,0	-	-
Patient1	SIRS	244589	Bichon Havanese	hím	igen	6,0	3	48,0	37,10	6,54	228	198,0	szeptikus pleunitis	0
Patient2	SIRS	243933	Angol cocker spániel	nőstény	igen	6,0	4	N/A	22,40	6,44	326	167,0	pleuropneumonia heartworm infection polyradiculoneuritis	0
Patient3	SIRS	252084	Cavalier King Charles spániel	hím	igen	3,0	1 ^a	36,8	49,70	2,53	18	841,0	diabetes mellitus pancreatitis	0
Patient4	SIRS	251107	Angol cocker spániel	hím	nem	15,5	3	55,8	21,47	1,15	150	1366,0	immune-mediated hemolytic anaemia MODS	1
Patient5	SIRS	249407	Német dog	hím	igen	1,5	3	52,8	33,21	7,74	373	52,0	aspirációs pneumonia	0
Patient6	SIRS	228619	Német juhászkutya	hím	nem	11,0	1 ^b	220,0	8,88	7,08	52	290,0	neoplasma pulmonum septicaemia	1
Patient7	SIRS	244867	Golden Retriever	hím	igen	13,0	1 ^c	85,5	13,67	5,58	311	86,0	aspirációs pneumonia megaesophagus	0
Patient8	SIRS	243498	Shar-Pei	nőstény	nem	9,0	3	110,7	29,80	5,12	222	1380,0	<i>Babesia canis</i> infection urothelial cell carcinoma hydronephros pancreatitis acute kidney injury	1

Patient9	SIRS	249643	Csehszlovákiai farkaskutya	male	igen	1,0	3	218,0	3,63	7,73	234	527,0	pneumonia	1
Patient10	SIRS	242497	Doberman Pinscher	nőstény	nem	6,0	2	220,0	24,33	5,89	416	350,0	mastitis	1
Patient11	SIRS	242473	Szálkásszőrű tacskó	nőstény	igen	7,0	2	202,0	74,00	3	339	129,0	pleuropneumonia	0
Patient12	SIRS	234925	Mopsz	nőstény	nem	13,5	2	71,9	31,00	4,94	387	201,0	fehéjevesztő enteropathia IBD hydrothorax ascites oedema pulmonum	1
Patient13	SIRS	244171	keverék	him	nem	8,0	2	202,0	63,06	6,9	82	1380,0	abscessus endocarditis thrombosis MODS	0
Patient14	SIRS	241483	Bichon Havanese	him	nem	5,0	1 ^b	191,0	10,50	6,35	301	133,0	haragott sérülés traumás hasifali sérv pneumothorax purulent septic peritonitis	0
Patient15	SIRS	243574	Német juhászkutya	him	igen	0,5	1 ^c	190,2	12,20	4,95	128	76,0	bronchopneumoma	0
Patient16	SIRS	251520	Cane Corso - keverék	nőstény	nem	10,0	1 ^c	174,0	26,70	10,51	431	1131,0	heveny gastroententis MODS	0
Patient17	SIRS	256060	Bultermer	him	nem	12,0	1 ^c	55,8	33,67	3,4	168	69,0	szeptikus peritonitis lineáris idegen test okozta ileus és bélperforáció	0
Patient18	SIRS	227916	Landsheer	him	nem	4,0	1 ^c	65,8	9,04	7,84	307	133,0	purulens peritonitis pancreatitis	0
Patient19	SIRS	252788	Keverék	him	igen	0,8	3	180,3	48,12	4,11	406	89,0	fever of unknown origin	0
Patient20	SIRS	251092	Westhighland White Termer	nőstény	nem	7,5	N/A ^c	96,8	13,93	6,64	677	243,0	oesophagitis nyelőső idegen test	0
Patient21	SIRS	252390	Bichon Bolognese	nőstény	igen	10,0	3	101,0	26,01	3,13	433	121,0	csontkpyometra peritonitis IMHA	0
Patient22	SIRS	263974	Szamojéd	him	nem	16,0	N/A	128,8	25,20	5,9	154	171,0	pancreatitis purulens peritonitis	0
Patient23	SIRS	257131	Nápolyi masztiff	nőstény	igen	13,0	N/A	113,6	38,00	6,04	80	413,0	szeptikus peritonitis idegen test okozta ileus	1
Patient24	SIRS	268259	Tacskó	him	nem	5,0	N/A	132,5	19,40	7,11	67	243,0	pancreatitis purulens peritonitis	1
Patient25	SIRS	267984	keverék	him	nem	2,5	N/A	32,2	44,10	7,27	275	123,0	szeptikus peritonitis idegen test okozta ileus	0
Patient26	SIRS	267338	Orosz fekete terrier	him	nem	14,0	N/A	238,3	45,20	4,61	199	41,6	endocarditis	1

Melléklet adattábla 3. A szeptikus peritonitisben szenvedő kutya perifériás vérmintájának új generációs mRNS-szekvenálással (mRNA-Seq) nyert adatainak összegzése.

Total Reads: 44691037
 Total Tags: 55127177
 Total Assigned Tags: 51250379

Group	Total_bases	Tag_count	Tags/Kb
CDS_Exons	33014650	28742753	870.61
5'UTR_Exons	7221338	838597	116.13
3'UTR_Exons	19511230	5396171	276.57
Introns	917539223	9911519	10.8
Transcription Start Site upstream	1 kb	24856465	290963
	5 kb	112512194	751922
	10 kb	204774660	1092330
Transcription End Site	1 kb	25081957	2448377
	5 kb	110516934	4789196
	10 kb	197949325	5269009
<i>NR3C1</i> exons	7268	6140	844.80
<i>NR3C1</i> 7-8 intron	8234	1277	155.09

Global intron-exon ratio 0.012405095
NR3C1 7-8 intron-all exon ratio 0.183580514

Az intron-exon arányokról és egyéb genomi régiókról szóló statisztikában a "Tag"-ek jelen esetben a spliced read-ekkel együtt számolt read-számot jelenti. Az egyes régiók a kódoló exonok (CDS_Exons), az 5' nem kódoló exonok (5'UTR_Exons), 3' nem kódoló exonok (3'UTR_Exons), transzkripttól Upstream és Downstream régiók 1, 5 és 10 kb távolságban. Az egyes régiókra eső Tag-ek mellett (Tag count) az adott régió teljes méretére (Total_bases) normált érték is szerepel (Tags/Kb). Feltüntetésre került a teljes transzkriptomra vonatkozó intron-exon lefedettségének arány is.

Melléklet adattábla 4: A kontroll és SIRS csoport cGR α és cGR-P mRNS expressziójának RPS5-re normalizált eredményei

Páciens kód	Control1	Control2	Control3	Control4	Control5	Control6	Control7	Patient1	Patient2	Patient3	Patient4	Patient5	Patient6
Csoport	control	control	control	control	control	control	control	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS
cGRα/RPS5	0,001289	0,00077	0,00134	0,00146	0,00021	0,00034	0,0004	0,02179	0,00484	0,00759	0,00039	0,00733	0,00109
cGR-P/RPS5	0,000087	0,000052	0,00016	0,00012	0,000014	0,000015	0,000022	0,00147	0,00048	0,00103	0,000061	0,00153	0,00022

Páciens kód	Patient7	Patient8	Patient9	Patient10	Patient11	Patient12	Patient13	Patient14	Patient15	Patient16	Patient17	Patient18
Csoport	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS
cGRα/RPS5	0,01749	0,01464	0,00212	0,01082	0,0046	0,0017	0,00921	0,01706	0,0029	0,00256	0,00422	0,00231
cGR-P/RPS5	0,0009	0,00118	0,00032	0,00113	0,00027	0,000080	0,00081	0,00134	0,00041	0,00037	0,00067	0,00023

Páciens kód	Patient19	Patient20	Patient21	Patient22	Patient23	Patient24	Patient25	Patient26
Csoport	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS	SIRS
cGRα/RPS5	0,00509	0,00222	0,00203	0,00026	0,00018	0,00035	0,00044	0,00034
cGR-P/RPS5	0,00119	0,00034	0,00068	0,000031	0,000015	0,000011	0,000017	0,000024