

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

A PACAP hiányának hatásai szisztémás szenilis amyloidosisban és a Peyer-plakkokban öregedés során



Dr. Sparks Jason Peter

Témavezetők:	Dr. Reglődi Dóra (egyetemi tanár), Dr. Szereday László (egyetemi tanár)
Doktori Iskola vezetője:	Dr. Reglődi Dóra (egyetemi tanár)
Programvezető:	Dr. Reglődi Dóra (egyetemi tanár)

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai Intézet

Pécs, 2025

Bevezetés

Amyloidosis

Az amyloid egy kóros fehérjeaggregátum, amely a fehérjék rendellenes feltekeredéséből származik, és több mint harminc különböző fibrillumképző fehérje lehet felelős a kialakulásáért. A fibrilláris lerakódások proteoglikánokat, glükózaminoglikánokat és plazmafehérjéket kötnek meg. Az amyloid legmegbízhatóbb kimutatási módszere a Kongó-vörös festés, amely polarizációs mikroszkóp alatt kettősen törő almazöld fluoreszcenciát eredményez.

Az amyloidosis olyan betegségcsoport, amelyben az amyloid extracelluláris lerakódása károsítja a sejtek működését, szervi elégtelenséghez vezethet. Két fő csoportja a szisztémás és a lokalizált amyloidosis. A szisztémás forma több szervet érint, míg a lokalizált változat egy adott szervben rakódik le. A lokalizált amyloidosisok közé tartozik például a 2-es típusú cukorbetegséggel összefüggő Langerhans-sziget amyloidosis, illetve az Alzheimer-kór, ahol az agyban a béta-amyloid plakkok lerakódása okozza a tüneteket. A szisztémás amyloidosis négy fő típusa: a primer amyloidosis (monoklonális plazmasejt-proliferációval), a szekunder amyloidosis (krónikus gyulladásos állapotokhoz kötődően), az örökletes amyloidosis (genetikai mutációk miatt kialakuló transthyretin lerakódás) és a hemodialízishez kapcsolódó amyloidosis (hosszan tartó dialízis következményeként). Az amyloidosis egy különleges alcsoportját képezi az időskorban jelentkező szenilis amyloidosis, amely előfordulhat lokalizált és szisztémás formában is. Emberben a szisztémás forma leggyakrabban 80 éves kor körül alakul ki, míg egerekben ez jellemzően a 1,5 éves életkorra tehető. Mechanizmusa nem teljesen ismert, de leginkább a transthyretin fehérje kóros felhalmozódásával hozható összefüggésbe.

Peyer-plakkok és az immunrendszer

A nyálkahártya-asszociált lymphoid szövet (MALT) kulcsszerepet játszik az immunrendszer működésében. Ide tartozik a bélhez kapcsolódó nyirokszövet (GALT), amelynek fő elemei a Peyer-plakkok (PP), az izolált lymphoid-tüszők és a feregnyúlvány (appendix vermiformis). A PP-ok a vékonybél antimesenterialis oldalán találhatók, amelyeket transzmucosális nyiroktüsző csoportok alkotnak és ellipszoid kiemelkedéseként jelennek meg a serosalis bélfelszínen. Emberben ezek száma 100-240, amelyek csak az ileumban találhatók, míg egerekben 5-14, és ezek a vékonybél bármely részén előfordulhatnak.

A PP szövettani szerkezetét vizsgálva négy fő régiót lehet megkülönböztetni: (1) folliculus-asszociált epithelium (FAE) a hámban; (2) subepithelialis dóm (SED) a lamina propriában; (3) B-sejtes tüszők a csíráközponttal (CG), a köpenyzónával (cortex) és a peremzónával (corona); és (4) interfollikuláris T-sejtes zóna, beleértve a magas endothelialis venulákat (HEV). Az M-sejtek fontos szerepet töltenek be az antigének transzcitózisában, amely az IgA-termeléshez szükséges immunválaszhoz vezet.

A PP és az autoimmun betegségek közötti lehetséges kapcsolatokat már régóta feltételezik. A Chron-betegségben az aphthoidális elváltozások gyakrabban fordulnak elő a terminális ileumban. Colitis ulcerosában az endoszkópos vizsgálatok a PP-ok erősen megváltozott megjelenését mutatta, ami a relapsus fokozott kockázatával jár. Továbbá igazolták, hogy a bélmikrobióta a PP-n keresztül fontos szerepet játszhat egyes autoimmun betegségekben.

Az immunsejtek felszínén expresszáldó immun checkpoint molekulák kulcsszerepet töltenek be a daganatterápiákban és a személyre szabott orvoslásban. Ezek a molekulák két fő csoportra oszthatók: gátló (pl. TIM-3, PD-1) és stimuláló típusokra, melyek ligandjaikkal (mint a Galectin-9 vagy PD-L1) való kölcsönhatás révén szabályozhatják az immunválaszt. Az immun checkpoint molekulák kulcsszerepet töltenek be az immuntolerancia fenntartásában, az autoimm folyamatok megelőzésében, a fertőzések elleni védekezésben és a daganatos sejtek felismerésének és eliminációjának szabályozásában. A GALT-ban különösen fontosak, mivel befolyásolják a lokális immunválaszt és közvetetten befolyásolják a bélmikrobióta összetételét és egyensúlyát is. Kísérletek igazolták, hogy PD-1 hiányában a Peyer-plakkok T-sejtjeinek regulációja zavart szenved, amelyhez károsodott IgA-termelés társulhat. Ez a folyamat hozzájárulhat a diszbiózis kialakulásához. Emellett a bél ischemiás reperfüziója során a PD-1/PD-L1 expresszió csökkenése gyengíti az immunvédelmet. A CD69 receptor, amely az immunsejtek aktivációjának korai markere, számos kóros állapotban – többek között autoimmun betegségekben, krónikus fertőzésekben és daganatos megbetegedésekben – szerepet játszik az immunválasz szabályozásában. A citotoxikus immunsejtekben tárolt perforin és granzyme B molekulák az immunológiai szinapszis kialakulását követően felszabadulnak és apoptózist indukálnak a célsejtekben. A citotoxikus molekulák emelkedett szintje hozzájárulhat például autoimmun bőrbetegségekhez, rheumatoid arthritishez, 1-es típusú diabéteszhez, és transzplantáció utáni szervkilökődéshez.

A PACAP és hiányának hatásai amyloidosisban, illetve a Peyer-plakkokra

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) egy neuropeptid, amely az adenilát-cikláz aktiválásán keresztül növeli a cAMP szintet. Két biológiailag aktív formája közül a PACAP-38 a domináns. Erősen konzervált szerkezete alapvető élettani szerepére utal. Hatásait három G-proteinhez kötött receptor közvetíti: PAC1, VPAC1 és VPAC2; ezek közül a PAC1 a legspecifikusabb. Receptorai főként az ideg-, endokrin és immunrendszerben találhatók. A PACAP számos élettani folyamatban vesz részt, többek között neuroprotektív, antioxidáns és antiapoptotikus hatású, továbbá szerepet játszik az immunhomeosztázis fenntartásában, a gyulladásos válaszok szabályozásában és a stresszreakciók modulálásában.

A homozigóta-PACAP génhiányos egereken végzett kutatások kimutatták, hogy a neuropeptid hiánya számos rendellenességhez vezet, például memóriazavarokhoz, csökkent szaporodási képességhez, fokozott oxidatív stresszhez és gyulladásokhoz. Az ilyen egerek érzékenyebbek különböző környezeti károsító hatásokra, és élettartamuk rövidebb. Azonban korábbi megfigyelések alapján már a heterozigóta PACAP-génhiányos egerekben tapasztalható részleges PACAP-hiány, illetve a PAC1-receptor génhiányos állatokban a PAC1-receptor hiány is súlyos következményekkel járt.

A PACAP öregedés során is fontos szerepet tölt be, mivel csökkenő szintje kihat a kognitív funkciókra, a vaszkuláris rendszerre és az immunválaszra. Jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a PACAP és az amyloidosis közötti kapcsolatáról. Megfigyeltük, hogy az endogén PACAP-ot nélkülöző egereknél a legtöbb szervben jelenlévő, korán kialakuló szisztémás amyloidosis jelenik meg. Ezen megfigyelések azt sugallták, hogy a PACAP génhiányos állatok a felgyorsult öregedés modelljeként szolgálhatnak. Kutatások szerint a PACAP csökkenti a béta-amyloid lerakódását Alzheimer-kórban, de az endogén PACAP és a szisztémás amyloidosis közötti kapcsolat még nem teljesen tisztázott.

A gasztrointesztinális rendszerben a PACAP szabályozza a vérkeringést, a bélmotilitást és a hormonfelszabadulást. Az endogén vagy exogén PACAP számos gasztrointesztinális kórképben jótékony hatású: colitis, ileitis, peritonitis, colorectalis carcinoma és Chron-betegség. Arról azonban az irodalom nem számol be, hogy a PACAP-hiánynak van-e valami szerepe a Peyer-plakkok makroszkópos, mikroszkópos megjelenésében, a benne található immunsejtek eloszlásában és aktivációs állapotában.

Célkitűzések

Korábbi eredmények igazolták, hogy az életkor előrehaladtával a PACAP szintje folyamatosan csökken és ez hozzájárul a sejtek, szövetek és szervek fokozott sérülékenységéhez. Kutatócsoportunk leírta, hogy a PACAP génhiányos egerekben a teljes PACAP-hiány felgyorsult öregedést okoz és a szenilis szisztémás amyloidosis megjelenésével többszervi elégtelenséghez vezet, amely valószínűleg felelős ezen egerek fokozott halálozásáért.

- (I) Első kísérletünk célja az volt, hogy felderítsük, vajon a PACAP heterozigóta egerekben a részleges PACAP-hiány, illetve a PAC1-R génhiányos állatokban a részleges PACAP-hatás is hozzájárul-e a szisztémás degeneratív folyamatok korábbi megjelenéséhez. Ennek érdekében a különböző korcsoportokba tartozó és eltérő genetikai háttérrel rendelkező egerek összehasonlítását végeztük el, az endogén PACAP öregedésben betöltött szerepének feltárása céljából. Mivel emberben időskorban nem teljes, hanem csupán részleges PACAP-hiány figyelhető meg, kutatásunk humán relevanciája megalapozott és indokolt.

Kutatások bebizonyították, hogy az immunsejtek expresszálják a PACAP-ot és receptorait, és a neuropeptid antiinflammatorikus hatással bír a szervezetben. Az öregedés egyik meghatározó jellemzője az immunrendszer strukturális és funkcionális átalakulása, amely a fertőzésekkel szembeni védekezés gyengülésében és gyengébb vakcina válaszbán mutatkozik meg.

- (II) Második kísérletünkben arra kerestünk választ, hogy a PACAP-hiány milyen hatással van a bél-asszociált nyirokszövetre (GALT), különös tekintettel az immunsejtek eloszlására és a Peyer-plakkokban (PP-k) történő immun checkpoint molekula expresszióra a különböző korcsoportú egerekben. Vizsgálataink célja a PACAP immunrendszerre gyakorolt szabályozó szerepének mélyebb megértése volt, különös figyelemmel annak öregedés során bekövetkező hiányára, valamint a bélrendszerhez kapcsolódó immunológiai patomechanizmusok jobb feltérképezése érdekében.

Kísérlet I. – A PACAP hiányának vizsgálata szisztémás amyloidosis során

Anyagok és módszerek

Kísérletünkben CD1 törzsű vad típusú (WT), homozigóta PACAP-génhiányos (KO) és heterozigóta PACAP-génhiányos (HZ), valamint WT (PAC1-R WT) és homozigóta PAC1-receptor-génhiányos (PAC1-R KO, C57BL/6J származású) egereket használtunk. A szövettani elemzéshez PACAP WT (n = 8) és PACAP HZ (n = 10); PAC1-R WT (n = 9) és PAC1-R KO (n = 3) egereket vizsgáltunk, ezeket 3-12 (fiatal) és 13-24 hónapos (idősödő) csoportokra osztottuk. A vérvizsgálathoz első körben fiatal és idősödő PACAP WT és PACAP KO egereket (n = 7 minden csoportban), majd 3,5 hónapos PACAP WT (n = 11) és PACAP HZ (n = 11) egereket használtunk. Az állatokat 12 órás világos-sötét ciklusban tartottuk, folyamatosan biztosítottunk számukra folyadékot és táplálékot. A kísérleti állatokkal végzett beavatkozásokat az egyetemi protokoll és az etikai előírások betartásával hajtottuk végre (etikai engedélyszámok: BA02/2000-24/2011; BA02/2000-20/2006). A genotipizálást PCR-módszerrel végeztük.

A szövettani vizsgálatokhoz az állatokat izofluránnal túlaltattuk, majd szerveiket 4%-os puffereelt paraformaldehidben fixáltuk és paraffinba ágyaztuk. A három mikrométer vastagságú metszeteket hematoxylin-eosinnal és Kongó-vörössel festettük, utóbbi segítségével az amyloid lerakódásokat azonosítottuk polarizációs mikroszkóp alatt. Az amyloid jelenlétét egy standardizált index alapján értékeltük. Az amyloid index értékek 0-tól 3-ig terjedő pontozását a következőképp végeztük: 0: nincs amyloid depozíció; 1: helyenként előfordul, fokálisan kevés; 2: már jelentősebb, csoportokban elszórtan, fokálisan sok vagy diffúzan kevés; 3: az egész metszetben domináns, diffúzan sok az amyloid depozíció.

A véranalízis során a vérvétel 3%-os izofluránnal történő túlaltatással kezdődött, majd közvetlenül a szívből szárnyastű segítségével a vért BD Vacutainer tubusokba gyűjtöttük. Szérumanalízisnél nátrium-heparinos, rutin teljes vérkép vizsgálatnál EDTA-s tubust használtunk. A Na⁺ és K⁺ ionok, alkalikus foszfatáz (ALP), kreatinin, koleszterin, triglicerid és high/low-density lipoproteinek (HDL, LDL) szintjét COBAS 8000 analizátorral, a vérkép vizsgálatot Sysmex XN-1000-V Multispecies Hematology Analyzer-rel mértük.

Az adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel elemeztük. A szövettani eredményekhez Mann–Whitney-tesztet és Kruskal–Wallis próbát, a vérmintákhoz kétutas ANOVA-t alkalmaztunk. A szérumparamétereknél Fisher-, a vérkép adatoknál Bonferroni post hoc tesztet használtunk. A $p \leq 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

A hisztológiai vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a részleges PACAP-hiány (PACAP HZ egerek) elegendő volt az amyloidosis fokozott kialakulásához, hasonlóan a teljes PACAP-hiányos (PACAP KO egerek) állapothoz. A PACAP HZ egerekben az amyloid lerakódások fiatalabb korban és súlyosabb mértékben jelentek meg, különösen a lépben, vesében, nyelőcsőben, bélrendszerben és bőrben. A lépben az amyloid mind a fehér-, mind a vöröspulpa területén felhalmozódott, a vese Malpighi-testjeiben homogén eozinofil masszát képezett, míg a nyelőcső és a bél kötőszövetében diffúz lerakódásokat figyeltek meg. A bőrben az amyloid főként a szőrtüszők, faggyúmirigyek és erek környezetében halmozódott fel, ami lokális vérellátási zavart és szerkezeti elváltozásokat eredményezett. Ezzel szemben a PAC1-receptor hiánya (PAC1-R KO egerek) nem vezetett amyloid lerakódásokhoz, sem fiatal, sem idős korban, ami arra utal, hogy a PACAP-receptor hiánya önmagában nem elégséges az amyloidosis kialakulásához.

A vérvizsgálatok során végzett szérumanalízis eredményei alapján a teljes PACAP-hiányt (PACAP KO) mutató egerekben jelentős emelkedést figyeltünk meg a szérum kreatininszintben. Ezzel szemben a lipidparaméterek csupán enyhe mértékű növekedést mutattak. A részleges PACAP-hiány (PACAP HZ) esetén az LDL-, HDL- és összkoleszterinszintek szignifikánsan magasabbak voltak WT társaikhoz képest, míg a kreatinin szintben nem mutatkozott eltérés. A teljes vérkép elemzése során nem találtunk szignifikáns eltéréseket a WT és a PACAP KO egerek között, viszont a PACAP HZ egerek esetében jelentős különbségeket figyeltünk meg a WT egerekhez képest. A vörösvértestek jellemző paraméterei közül szignifikáns változásokat tapasztaltunk az átlagos vörösvérsejt-hemoglobin-koncentrációban (MCHC), a vörösvértest-eloszlási szélesség szórásában (RDW-SD), a vörösvértest-eloszlási szélesség variációs együtthatójában (RDW-CV), a magas vörösvérsejtszámban (NRBC), a retikulocytaszámban (RET), a közepes fluoreszcenciájú retikulocyta-koncentrációban (MFR) és a retikulocyta-hemoglobin-tartalomban (RET-HE). A thrombocyta paraméterek közül a thrombocytacrit (PCT) értékében találtunk változást.

Kísérlet II. - A PACAP hiányának vizsgálata a Peyer-plakkokban öregedés során

Anyagok és módszerek

Kísérletünkben CD1 törzsű, vad típusú (WT) és homozigóta PACAP-génhiányos (KO) hím egereket használtunk. Az állatokat négy kísérleti csoportra osztottuk: fiatal WT (3 hónapos, n = 10), fiatal PACAP KO (3 hónapos, n = 14), idősödő WT (12-15 hónapos, n = 10) és idősödő PACAP KO (12-15 hónapos, n = 18) egerek. Az állatok tartása szabályozott körülmények között, standard laboratóriumi étrend mellett történt, a vonatkozó állatkísérleti etikai előírásoknak megfelelően (állatetikai engedélyszám: BA/73/00452- 6/2023). A genotipizálást PCR-módszerrel végeztük.

A fiatal és idősödő WT és PACAP KO hím egerek (n = 10 csoportonként) túlaltatását 100 mg/kg dózisú intraperitoneális nátrium-pentobarbitállal végeztük. Az altatást követően megnyitottuk a hasüregüket, majd a gyomor-bél traktust eltávolítottuk. Megszámoltuk a Peyer-plakkok számát és megmértük a vékonybél hosszát, a PP-ok méretét és a szomszédos PP-ok közötti távolságot. Ezt követően a gyomrot és a vastagbelet szintén eltávolítottuk. A PP-ok számát, méretét és eloszlását részletesen elemeztük, majd izoláltuk őket. Minden állatból egy-egy PP-t szövettani feldolgozásra használtunk fel, míg a többi PP-t flow citometriás analízis céljára különítettünk el.

A szövettani elemzéshez minden egérből egy PP-t 4%-os pufferezt paraformaldehidben fixáltunk, paraffinba ágyasztunk, 3 µm vastagságú metszeteket készítettünk, HE-festéssel megfestettük, majd kvalitatív elemzésnek vetettük alá.

Az immunsejtek izolálásához a Peyer-plakkokból mechanikus szétválasztást alkalmaztunk a sejtvészesség minimalizálása érdekében. A sejtfelszíni fehérjéket fluorokróm-jelölt monoklonális antitestekkel jelöltük, majd a sejteket FACS Canto II áramlási citométeren analizáltuk. A perforin és Granzyme B intracelluláris jelölését permeabilizálás után specifikus antitestekkel végeztük. Fixálást és tárolást követően flow citometriás analízist hajtottunk végre.

A statisztikai elemzésekhez két-utas ANOVA-t használtunk többszörös páronkénti összehasonlítással, hogy meghatározzuk az életkor és a csoport hatását az általunk vizsgált immunológiai paraméterekre. A statisztikailag szignifikáns eredményekhez parciális eta-négyzetértéket számoltunk a hatás nagyságának bemutatására. A Pearson-féle korrelációs együtthatót használtuk az immunológiai paraméterek közötti lineáris korreláció meghatározására. A 0,05-nél kisebb p-értékeket szignifikánsnak tekintettük.

Eredmények

A Peyer-plakkok makroszkópos vizsgálata során a fiatal WT egerekben a PP-ok átlagos száma magasabb volt, mint az idősebb egyedekben, míg a fiatal és öregedő PACAP KO egerekben hasonló értékeket kaptunk. Az öregedő WT és KO csoportok között szintén nem mutatkozott jelentős különbség. A PP-ok száma szignifikánsan csökkent az öregedő WT egerekben a fiatal WT állatokhoz, illetve a fiatal KO egerekben a fiatal WT csoporthoz képest. A PP-ok közötti távolság mindegyik csoportban változó volt, elhelyezkedésük véletlenszerű. A PP-ok mérete minden esetben 2–4 mm között mozgott. Az öregedő csoportokat összehasonlítva a PACAP KO egerekben a PP-ok vastagsága csökkent, és kevésbé emelkedtek ki a bél serosalis felszínéből.

A PP-k szövettani vizsgálata során sem a fiatal, sem az időződő állatcsoportok esetében nem találtunk kvalitatív vagy strukturális eltéréseket a WT és PACAP KO egerek között.

A flow cytometriás elemzés során alkalmazott kapuzási stratégia alapján meghatároztuk CD3⁺, CD8⁺, CD4⁺, valamint a CD4⁺/CD8⁺ T-lymphocytá szubpopulációkat, és ezek előfordulási gyakoriságát összehasonlítottuk a különböző vizsgálati csoportok között. A lymphocytá-populáción belül a CD3⁺ T-sejtek aránya jelentősen csökkent az időződő PACAP KO egerekben a fiatal PACAP KO egerekhez viszonyítva. A CD8⁺ T-sejtek gyakorisága szignifikáns csökkenést mutatott az időződő WT egerekben a fiatal WT egerekhez képest. Emellett a CD4⁺ T-sejtek aránya szignifikánsan alacsonyabb volt az időződő PACAP KO egerekben az időződő WT egerekhez képest. A CD3⁺ T-sejteken belül a CD8⁺ T-sejtek aránya jelentősen csökkent az időződő WT egerekben a fiatal WT csoporthoz képest, míg a CD4⁺ T-sejtek aránya szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az időződő PACAP KO egerekben az időződő WT állatokhoz képest. Ugyanakkor az időződő WT csoportban a fiatal WT egerekhez képest szignifikáns növekedést tapasztaltunk a CD3⁺ T-sejtekhez viszonyított CD4⁺ T-sejtek arányában. A CD8⁺ T-sejtek CD3⁺ T-sejtekhez viszonyított gyakorisága szignifikánsan csökkent az időződő PACAP KO egerekben a fiatal PACAP KO állatokhoz képest, viszont szignifikánsan magasabb értéket mutatott a fiatal PACAP KO egerekben, összevetve a fiatal WT társaikkal.

A PD-1 és PD-L1 immun checkpoint molekulák vizsgálata során a CD3⁺ és CD4⁺ T-sejtek PD-1-expressziója szignifikánsan csökkent az időződő PACAP KO egerekben az időződő WT társaikhoz képest, és szignifikánsan csökkent az időződő PACAP KO állatokban a fiatal PACAP KO egerekhez képest. A CD8⁺ T-sejtek PD-1-expressziója szignifikánsan csökkent az időződő PACAP KO állatokban a fiatal PACAP KO egerekhez képest. A CD4⁺/CD8⁺ T-sejtek

esetében a PD-1 expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt a fiatal PACAP KO egerekben a fiatal WT egyedekhez viszonyítva, ugyanakkor az idősödő PACAP KO egerekben szignifikáns növekedést mutatott az idősödő WT állatokhoz képest. Emellett az idősödő WT egerekben a CD4+/CD8+ T-sejtek PD-1-expressziója szignifikánsan csökkent a fiatal WT társaikhoz képest. A PD-L1 expressziója mindhárom T-sejtpopulációban (CD3+, CD4+ és CD8+) szignifikánsan csökkent az idősödő PACAP KO egerekben, összevetve a fiatal PACAP KO állatokkal. Ezzel szemben a CD4+/CD8+ T-sejtek esetében a PD-L1 expresszió nem mutatott szignifikáns eltérést a vizsgált egércsoportok között.

A TIM-3 immun checkpoint molekulák expressziója minden vizsgált T-sejtpopuláció (CD3+, CD4+, CD8+ és CD4+/CD8+) szignifikánsan csökkent az idősödő PACAP KO egerekben az idősödő WT társaikhoz képest. Ezzel szemben szignifikánsan magasabb volt az idősödő WT egerekben a fiatal WT csoporthoz viszonyítva, valamint az idősödő PACAP KO egerekben is emelkedést mutatott a fiatal PACAP KO társaikhoz képest. A Galectin-9 expressziója szintén minden vizsgált T-sejtpopulációban szignifikánsan csökkent az idősödő WT egerekben a fiatal WT társaikhoz képest, valamint szignifikánsan csökkenést mutatott az idősödő PACAP KO egerekben a fiatal PACAP KO csoporthoz képest.

A citotoxikus intracelluláris molekulák expressziójának analízise során azt találtuk, hogy a CD3+ és CD8+ T-sejtek perforin-expressziója szignifikánsan magasabb volt a fiatal PACAP KO egerekben, mint a fiatal WT típusú társaikban. A CD3+ T-sejtek granzyme B expressziója szignifikánsan csökkent az idősödő PACAP KO egerekben az idősödő WT társaikhoz képest, szignifikánsan magasabb volt az idősödő WT állatokban a fiatal WT egyedekhez képest, és szignifikánsan magasabb az idősödő PACAP KO egerekben a fiatal PACAP KO társaikhoz képest. A CD8+ T-sejtek granzyme B expressziója szintén szignifikánsan növekedett az idősödő WT egerekben a fiatal WT egyedekhez képest, valamint az idősödő PACAP KO egerekben is szignifikánsan magasabb értéket mutatott a fiatal PACAP KO egyedekhez képest.

A CD69 aktivációs marker expressziójának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a CD3+, CD4+ és CD8+ T-sejtek esetében a CD69-expresszió szignifikánsan csökkent az idősödő WT egerekben a fiatal WT egyedekhez, valamint az idősödő PACAP KO egerekben a fiatal PACAP KO társaikhoz képest. A CD4+/CD8+ T-sejtek esetében a CD69-expresszió szignifikánsan magasabb volt az idősödő PACAP KO egerekben az idősödő WT társaikhoz képest. Ugyanakkor szignifikáns csökkenést figyeltünk meg az idősödő WT állatokban a fiatal WT egyedekhez, valamint az idősödő PACAP KO állatokban a fiatal PACAP KO csoporthoz képest.

Diszkusszió

A modern orvostudomány fejlődése és az életkörülmények globális javulása világszerte elősegíti az öregedő társadalmak kialakulását. Az öregedés és az ehhez kapcsolódó betegségek komoly társadalmi és gazdasági kihívásokat jelentenek. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a PACAP-hiány és az öregedés együttesen miként járul hozzá a szisztémás szenilis amyloidosis progressziójához, valamint hogyan befolyásolják a Peyer-plakkok morfológiai és funkcionális elváltozásait, mint az immunrendszer enterális komponensei.

Első kísérletünkben a PACAP specifikus receptorának hiányát vizsgáltuk PAC1-receptor génhiányos egerekben. Hisztológiai megfigyeléseink szerint ezekben az állatokban nem alakult ki amyloidosis. Bár a PAC1-receptor számos élettani folyamatban kulcsszerepet tölt be, hiányát a szervezet kompenzációs mechanizmusokkal ellensúlyozhatja.

Ezzel szemben a PACAP-hiányos egerekkel folytatott kísérletekben jelentős patológiás elváltozásokat figyeltünk meg, különösen az öregedéssel összefüggésben, a szisztémás amyloidosis korai megjelenését és súlyosabb progresszióját tapasztaltuk. A PACAP-hiányhoz társuló elváltozások elsősorban a lépben, a vesében, a gasztrointesztinális traktusban és a bőrben jelentkeztek. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a PACAP fontos védő szerepet játszik az öregedéssel összefüggő degeneratív folyamatok megelőzésében és lassításában.

A teljes PACAP-hiány kóros következménnyel jár, többek között fokozott stresszérzékenységgel, növeli az infarktustérfogatot agyi ischaemia esetén, valamint fokozza a vese és retina károsodásának mértékét. Emellett a regenerációs folyamatok, mint az axonális növekedés és a csontképződés is zavart szenvednek. Bár emberben teljes PACAP-hiányt nem írtak le, részleges hiányt vagy alacsony PACAP-szintet több betegségben, például PTSD-ben és Alzheimer-kórban is kimutattak. A részleges PACAP-hiány vizsgálata különösen jelentős, mivel korábbi kutatások fokozott oxidatív stresszt és csökkent antioxidáns kapacitást írtak le ilyen esetekben. Idősebb PACAP-HZ egerekben száraz szem tünetei és retina sérülés után fokozott sejtpusztulás is megfigyelhető. Jelen vizsgálatunkban a részleges PACAP-hiányos egerekben a preszenilis szisztémás amyloidosis súlyossága a teljes PACAP-hiányhoz hasonló volt, megerősítve a PACAP védő szerepét az időskori degeneratív folyamatokkal szemben. Eredményeink alapján a PACAP ígéretes terápiás célpont lehet az öregedéssel összefüggő betegségek kezelésében.

A vérvizsgálatok során a teljes PACAP-hiányban szenvedő egerek teljes vérképében nem találtunk szignifikáns eltéréseket a vad típusú társaikhoz képest, a szérum lipidparamétereiben enyhe emelkedést figyeltünk meg. Eredményeink, korábbi kutatásokkal

összhangban, arra utalnak, hogy a PACAP szerepet játszik a lipidanyagcsere szabályozásában. Emellett a PACAP KO egerekben szignifikáns kreatininszint-emelkedést észleltünk, amely vesekárosodásra, illetve amyloid okozta glomeruláris diszfunkcióra utalhat. Részleges PACAP-hiány esetén (PACAP HZ) a lipidprofil szignifikánsan emelkedett, különösen az LDL-, HDL- és összkoleszterinszintekben. A vérképben kisebb, de szignifikáns eltéréseket találtunk a vörösvértestek és vérlemezkék érésében, ami a PACAP hematopoézisben betöltött szabályozó szerepét is jelzi.

Második kísérletünkben szintén központi szerepet kapott az öregedés és a PACAP-hiány vizsgálata. A PACAP szintjének életkorral csökkenő tendenciája szisztémás elváltozásokat okoz, melyek szinte minden szervrendszert érintenek. A bél-agy tengelyen keresztül a neuropeptidek, köztük a PACAP, az immun- és stresszválaszokra is hatással vannak. Emelkedett PACAP-szint összefügghet gyulladásos bélbetegségekkel, míg hiánya fokozhatja a vastagbélgyulladás és -rák kockázatát, részben a jótékony bélmikrobióta csökkenésén keresztül. Az öregedés rontja a Peyer-plakkok működését, gyengítve az orális toleranciát. Kísérleteink igazolták, hogy a GALT Peyer-plakkjai is életkorral összefüggő változásokon mennek keresztül.

A korábbi beszámolókat megerősítve az egér PP-ok mérete 2-4 mm között mozgott, számuk serdülőkorban tetőzött. A fiatal (3 hónapos) WT egerekben a PP-ok száma magasabb volt, mint az idősödő (12–15 hónapos) WT állatokban, míg ez a különbség PACAP KO egerekben nem volt kimutatható. A fiatal WT és PACAP KO egerek között szövettani szinten nem találtunk eltérést, azonban az idősödő PACAP KO egerekben jelentős változások jelentkeztek az immunsejt-populációkban és az immun checkpoint molekulák expressziójában, ami a PACAP-hiányhoz társuló megváltozott immunszabályozásra utal.

Áramlási citometriai vizsgálataink szerint a WT egerek öregedése a CD8⁺ T-sejtek jelentős csökkenését eredményezte, hasonlóan az időskorú emberekhez. Az idősödő állatok CD8⁺ T-sejtjei fokozott TIM-3, csökkent Gal-9 és alacsonyabb CD69 expressziót mutattak, ami csökkent aktivációra utal. Bár a perforin szint nem változott, a granzyme B expresszió emelkedett volt. Ezzel szemben az idősödő WT egerekben nőtt a CD4⁺ T-sejtek aránya, valamint a CD28-negatív CD4⁺ populáció progresszív bővülése is megfigyelhető volt. A CD4⁺ T-sejtek magasabb TIM-3 és alacsonyabb Gal-9 expressziója szabályozó funkciókra utal, míg a PD-1 expresszió változásai a T-sejtek csökkent funkcionális kapacitását tükrözték.

Az idősödő PACAP KO egerek csökkent PD-1, PD-L1, Gal-9 és CD69 expressziót mutattak a CD3⁺/CD4⁺ és CD3⁺/CD8⁺ T-sejtekben, és szignifikánsan magasabb TIM-3 expressziót, hasonlóan az idősödő WT egerek eredményeihez. Funkcionálisan a CD8⁺ T-sejtek

magasabb granzyme B expressziót mutattak az idősödő PACAP KO egerekben. Az általános feltételezésekkel ellentétben az idősödő egerekben megfigyelt csökkent citotoxikus T-lymphocytá válaszá háttérében nem citotoxikus aktivitás, hanem inkább a CD8⁺ T-sejtek klonális expanziója állhat.

A fiatal WT és PACAP KO egerek között nem találtunk szignifikáns eltérést az általános immunsejt-populációk gyakoriságában. Bár a CD4⁺/CD8⁺ T-sejtek PD-1 expressziója csökkent a fiatal PACAP KO egerekben, funkcionális analízisük csökkent aktivációt mutatott. A fiatal PACAP KO állatokban ez a csökkenés a perforin expressziójának jelentős növekedése mellett következett be mind a CD3⁺, mind a CD8⁺ T-sejtekben a WT társaikhoz képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a megváltozott immun checkpoint molekulák expressziója nem feltétlenül jelent fokozott T-sejt-aktivációt.

Az idősödő PACAP KO egerekben a CD4⁺ T-sejtek száma szignifikánsan csökkent a WT egerekhez képest, amit a PD-1 és TIM-3 expressziójának csökkenése kísért, utalva az immuntolerancia mechanizmusainak módosulására PACAP hiányában. Ugyanakkor a CD4⁺ T-sejtek funkcionális jellemzői hasonlóak maradtak az idősödő WT egerekéhez. A CD8⁺ T-sejtek TIM-3 expressziója is csökkent az idősödő PACAP KO egerekben, míg a CD4⁺/CD8⁺ T-sejtpopuláció fokozott aktivitást mutatott, amely összefüggésbe hozható a csökkent TIM-3 expresszióval. Ez egy lehetséges kompenzációs mechanizmust jelez, amely PACAP hiányában fenntarthatja az immunreaktivitást. Mindezzel szemben a CD3⁺ T-sejtekben a PD-1 és TIM-3 expresszió csökkenése ellenére a granzyme B szintje alacsonyabb volt, ami a PACAP-hiány immunrendszeri szabályozásra gyakorolt összetett, öregedésfüggő hatására utal.

A PACAP alapvető szerepet játszik a GALT immunhomeosztázisában, szabályozva az immunsejtek működését és az immun checkpoint molekulák expresszióját. Hiánya diszregulációt okoz, amely fokozza a gyulladásos bélbetegségek és daganatok kockázatát, különösen idős korban. A PACAP KO egerekben megfigyelt immunprofil-változások igazolják a PACAP védő szerepét a nyálkahártya-immunitás fenntartásában.

Az általunk választott kísérletekkel hozzájárultunk ahhoz, hogy jobban megértsük az öregedés-asszociált szisztémás szenilis amyloidosis pathomechanizmusát a PACAP hiányában. Továbbá, eredményeinkkel alátámasztottuk, hogy a PACAP-hiány és az öregedés együtt képes befolyásolni a Peyer-plakkok immunsejteinek eloszlását és aktivációját. Ez fontos szereppel bírhat az IBD-k pathomechanizmusának a megismerésében és a PACAP potenciális terápiás lehetőségként szolgálhat az IBD és az idősődéssel járó immunfunkciócsökkenés kezelésére.

Új eredmények összefoglalása - Tézisek

1. A PACAP részleges hiánya presenilis szisztémás amyloidosist okozhat, szemben a PAC1 receptor hiányával, amely nem váltott ki ilyen elváltozást.
2. A szisztémás degeneratív folyamatok kialakulásában más tényezők is szerepet kaphatnak, mint a lipidanyagcsere zavara és a csontvelő aktivitásának megváltozása, a korábban ismert gyulladásos és degeneratív zavarokon túl.
3. A PACAP fontos szerepet tölt be az immunhomeosztázis fenntartásában a bélhez asszociált nyirokszövetben; hiánya jelentős immunsejt-populációs változásokhoz vezet, különösen időskorban.
4. Kutatásunk a Peyer-plakkokat makroszkópos, mikroszkópos és funkcionális szinten egyidejűleg vizsgálta, ezáltal komplex képet nyújtva a PACAP-hiányhoz társuló immunológiai változásokról a GALT-ban.
5. A PACAP hiánya felgyorsítja az öregedési folyamatokat, mivel elmaradnak annak gyulladáscsökkentő, antioxidáns, antiapoptotikus és sejtvédő hatásai.
6. Eredményeink megerősítik a PACAP kulcsszerepét az immunrendszer integritásának fenntartásában és az öregedéssel összefüggő pathológiák megelőzésében.
7. A PACAP hiányához kapcsolódó immunológiai változások hozzájárulhatnak a gyulladásos bélbetegségek kialakulásához, kiemelve a neuropeptid bél immunrendszerben betöltött szerepét.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőim támogatását. Dr. Reglődi Dóra professzorasszony már általános orvosi tanulmányaim elején, neuroanatómia gyakorlatvezetőként inspirált arra, hogy bekapcsolódjak az Anatómiai Intézet kutatásaiba és az oktatásba demonstrátorként. Szakmai tudása és folyamatos mentorálása révén az évek során valódi példaképpé vált számomra, és mindig számíthattam a támogatására. Hálás vagyok másik témavezetőmnek, Dr. Szereday László egyetemi tanárnak is, aki PhD-tanulmányaim alatt önzetlenül segített eligazodni a tudományos publikációk és a labormunka világában. Optimizmusa és kreativitása mindig átsegített a nehezebb időszakokon. Köszönettel tartozom mindkettőjüknek, hogy megismertették velem a cikkírás rejtelseit, valamint a kutatói pálya szépségeit és lehetőségeit.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Jüngling Adél egyetemi tanársegédnek, aki már TDK-s koromban megtanított a tudományos közleményírás alapjaira, a laboratóriumi munkára, és végig támogatott az amyloidosisos kísérletek során. Hálás vagyok Dr. Meggyes Mátyás klinikai mikrobiológusnak is, aki a Peyer-plakkos kutatásban nyújtott nagy segítséget, különösen a flow citometriás mérések terén. Köszönöm Lugosi Hedvig biológus munkáját, aki a kísérletek során mindig készséggel segített.

Továbbá szeretnék azoknak is köszönetet nyilvánítani, akiktől kollaborációs kutatások alatt rengeteget tanulhattam: Dr. Garami András egyetemi docens és Dr. Garaminé Pákai Eszter tudományos munkatárs (Transzlációs Medicina Intézet), Dr. Juhász Tamás egyetemi adjunktus (Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar) és Dr. Somoskői Bence tudományos főmunkatárs (Állatorvostudományi Egyetem Budapest).

Köszönettel tartozom az Anatómiai Intézet összes munkatársának, akik kezdetektől fogva segítették kutatásom előrehaladását. Végül, de nem utolsó sorban, hálámat szeretném kifejezni Családomnak és Barátaimnak, akik mindvégig türelemmel és szeretettel bíztattak, támogattak és mellettem álltak munkám során.

A disszertáció megvalósításához a következő támogatók járultak hozzá: Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap támogatásai: FK129190, K135457, ÚNKP-20-3-I-PTE-541, ÚNKP-21-3-I-PTE-1193, ÚNKP-22-3-II-PTE-1438, ÚNKP-23-3-II-PTE-1781, EKÖP-24-4-I-PTE-89; PTE AOK TANDEM program; Nemzeti Agykutatási Program: NAP3.HUN-REN, HUN-REN TKI14016; valamint az Emberi Erőforrások Minisztériumának Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Programja: TKP2021-EGA-16.

Publikációs lista

1)

Sparks J, Jungling A, Kiss G, Hiripi L, Pham D, Tamas A, Hoffmann O, Bardosi S, Miseta A, Reglodi D.

Presence of systemic amyloidosis in mice with partial deficiency in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in aging.

Appl. Sci. 2021, 11, 7373.

Q2, Impakt Faktor: 2,838

2)

Sparks J, Meggyes M, Makszin L, Jehn V, Lugosi H, Reglodi D, Szereday L.

Effects of PACAP deficiency on immune dysfunction and Peyer's patch integrity in adult mice.

Int J Mol Sci. 2024 Oct 3; 25(19):10676.

Q1, Impakt Faktor: 4,9

3) A közlemény tartalmának 10%-a került beépítésre jelen doktori értekezésbe:

Reglodi D, Jungling A, Longuespée R, Kriegsmann J, Casadonte R, Kriegsmann M, Juhasz T, Bardosi S, Tamas A, Fulop BD, Kovacs K, Nagy Z, **Sparks J**, Miseta A, Mazzucchelli G, Hashimoto H, Bardosi A.

Accelerated pre-senile systemic amyloidosis in PACAP knockout mice - a protective role of PACAP in age-related degenerative processes.

J Pathol. 2018 Aug; 245(4): 478-490.

Q1, Impakt Faktor: 5,942

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk összesített impakt faktora: 13,68