

OTKA T-046896 sz.2004-2007 zárójelentéshez

**Cím:** A szimpatikus idegrendszer neurotranszmitter szintjét szabályozó mechanizmusok és a gyulladáshoz vezető mediátorok keletkezése közötti összefüggések vizsgálata

### **Részletes beszámoló**

Számos, az idegrendszert érintő betegségben, így a súlyos depresszióban is kimutatható a gyulladáshoz vezető immunológiai folyamatok túlműködése. A gyulladáshoz vezető mediátorok, mint esetleges oki tényezők szerepe azonban ezeknek a betegségeknek a kialakulásában még nem teljesen tisztázott. Jelenleg több irányzat is próbál egymástól függetlenül magyarázatot keresni a depressziót előidéző folyamatokra és valóban, ennek szimptomái feltehetően több, különböző eredetre is visszavezethetőek. Tekintve azonban, hogy a depresszió mind a szimpatikus idegrendszer alulműködése, mind a gyulladáshoz vezető folyamatok aktiválódása alapvető jellemzői, kérdés hogy az alacsony neurotranszmitter szint játszik-e közre a fokozott gyulladáshoz vezető mediátor termelésben, vagy pedig a gyulladáshoz vezető mediátorok idézik elő a szimpatikus idegrendszer olyan elváltozásait, amelyek az alacsony monoamin szint kialakulásához vezetnek. Ennek megfelelően a depresszió kialakulásának magyarázatában a két legelterjedtebb irányzat a monoamin teória és a makrofág teória. A pályázat során végzett munkában elért (az alábbiakban részletezett) eredményeink azonban azt mutatják, hogy a fenti két folyamat nem vizsgálható egymástól független jelenségként, azaz a makrofágoknak és a központi idegrendszer makrofág-szerű sejtjeinek aktiválódása során keletkező gyulladáshoz vezető mediátorok meghatározó szerepet játszanak a központi idegrendszerben lejátszódó eseményekben, ezek között is elsősorban a neurotranszmitterek szintjét befolyásoló monoamin felszabadulási és visszavételi folyamatokban. Az extracelluláris monoamin szint változásai viszont visszahatnak a gyulladáshoz vezető mediátorok termelésére és eredményeink alapján az ezekből a kölcsönhatásokból kialakuló egyensúly az, amelytől függ a depresszió tüneteinek kialakulása. Eredményeink arra utalnak, hogy akár a perifériás immunrendszert akár központi idegrendszert éri stimulus, mindkét rendszerben létrejönnek a védekező mechanizmusban szerepet játszó gének aktivációi és a neurotranszmitter- ill. immunmediátor szintek változásai, ezek a két rendszer között jellemző különbségeket mutatnak és eltérően szabályozhatóak.

*In vivo* állatkísérleteinkben vizsgáltuk, hogy az extracelluláris noradrenalin (NA) szint emelkedése mennyi idő alatt képes a gyulladáshoz vezető immunválaszt befolyásolni és ez az időbeli hatás milyen összefüggést mutat az antidepresszáns hatás kialakulásához szükséges idővel. Vizsgálati modellként kezeletlen, antidepresszánsokkal monoamin transzporter (MT) gátolt és

genetikailag noradrenalin transzporter (NAT)-hiányossá tett (NAT-KO) magas extracelluláris NA szintű egereket használtunk. Kísérleteinkben monoamin transzporter-gátlókkal (desipramin, nisoxetin, GBR12909, fluoxetin és citalopram) történő akut kezelések során tanulmányoztuk a rövid ideig tartó, gyors extracelluláris noradrenalin (NA) szint emelkedés immunmoduláns hatását amely még nem függ össze a monoamin-transzporter gátlók antidepresszáns hatásával. Az antidepresszáns hatás kialakulásához szükséges, három hétig tartó, krónikus kezelés során összehasonlítottuk a vizsgált drogok immunmoduláns hatását egyrészt az akut hatással, másrészt olyan krónikus kezelési modellrendszerben, amelyben a drog adását a mintavétel előtt egy nappal megszüntettük. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a NAT-KO állatok vérplazmájában magasabb az extracelluláris NA szint és ennek következtében csökken az LPS-indukálta TNF- $\alpha$  válasz. Ezzel igazoltuk a monoamin transzporterek által befolyásolható extracelluláris NA ill. monoamin koncentráció jelentőségét az immunmodulációban (2, 9, 10).

Kontrol (NAT+/+) állatokban különböző MT-gátlókkal végzett akut kezeléseink kimutatták, hogy a vizsgált drogok mindegyike hatékony volt, azaz különböző mértékben mindegyikük növelte az extracelluláris NA ill. monoamin mennyiséget, gátolta az LPS által kiváltott TNF- $\alpha$  a termelést és növelte az IL-10 mennyiségét. A vizsgált NAT-gátló (desipramin és nisoxetin), DAT-gátló (GBR12909) és szerotonin visszavétel-gátló (SSRI; fluoxetin és citalopram) drogok közül a leghatékonyabbnak az SSRI jellegű fluoxetin és citalopram bizonyultak. Feltűnő volt viszont az az észleletünk, hogy a drogok hatása hasonló volt a kontrol (NAT+/+) és a NAT-KO (NAT-/-) csoportokban. Tekintve, hogy a kevésbé specifikus NAT-gátló desipramin, valamint a specifikusnak tekinthető nisoxetin is hatékony volt a NAT-KO állatok esetén is (ahol pedig már nincsen NAT), valószínűnek látszik, hogy hatásuk a NAT gátlásán kívül más, az immunmoduláció szempontjából fontos - targeteken is érvényesül. Az eddig elvégzett krónikus kezelések eredményei azt mutatják, hogy az immunmoduláns hatás csak akkor érvényesül, ha a mintavételkor is jelen van a drog, azaz az aktuális extracelluláris monoamin szint magasabb. Ezzel igazoltuk, hogy a hosszabb távú kezelést igénylő antidepresszáns hatás kialakulása és az immunmoduláns hatás közötti összefüggés sokkal komplexebben érvényesül, mint csupán a monoamin szintek emelkedése az MT-gátlásán keresztül (10, 20).

A továbbiakban vizsgáltuk a szerotonin ill. a szerotonin transzporter működésének befolyásolásával (SSRI típusú antidepresszánsok) módosítható gyulladáscsökkentő citokin-termelést. Új eredményünk, hogy kimutattuk, az intraperitoneálisan adott szerotonin szignifikánsan

csökkenti az LPS-indukált TNF- $\alpha$  termelést, mind a genetikailag noradrenalin-transzporter hiányossá tett (NAT-KO), mind a vad típusnak (WT) megfelelő Black6/C57 egerekben. A szerotonin hatását a NA szint desipramin kezeléssel történő növelése a NAT-KO egerekben nem befolyásolta, míg a WT egerekben a kombinált kezelés további TNF- $\alpha$  termelés csökkenést eredményezett. Újabb bizonyítékokat szolgáltatunk arra is, hogy a monoamin transzporterek részben képesek egymást helyettesíteni. *In vivo* propranolollal részlegesen gátolni tudtuk a citalopram akut hatását, és ez a gátló hatás eltérő volt a WT ill. a NAT-KO egerek esetében. Eszerint a NA egy része a szerotonin tartalmu vesiculákból szabadul fel ahová a heterológ visszavétel folytán került (9, 10).

Eredményeink értelmezésében az egyes drogoknak a központi idegrendszerben (CNS) kialakuló koncentrációja fontos szerepet játszik. Ismeretes, hogy a xenobiotikumoknak a vér-agy gáton keresztül történő aktív eltávolítását az ABC transzporterek (az MDR géntermékei) végzik, így csökkenteni képesek a CNS-ben elérhető drog koncentrációt. Munkacsoportunk eredményei arra utalnak, hogy CNS-t is érintő malignus betegségekben (pl. leukémiák CNS-t érintő szövödményei), és különböző gyulladásos folyamatok következtében az MDR expressziója megváltozik, így befolyásolni képes a szisztémásan adott, CNS-ben ható drogok által kifejtett hatásokat (4, 5, 7, 8). Ezzel összhangban állnak a WT és NAT-KO egerekben a periférián és a hippocampusban LPS hatására indukálódó TNF- $\alpha$  mennyiségére vonatkozó új eredményeink. Kimutattuk, hogy míg az endotoxin által kiváltott gyulladás következtében a plazma TNF- $\alpha$  szintek szignifikánsan csökkennek antidepresszánsok hatására, addig a hippocampusban ezen drogok immunmoduláns hatása szignifikánsan kisebb, aminek magyarázata az adrenoceptoroknak a drogok által megváltozott szenzitivitása ill. a drogoknak az MDR fehérjék által előidézett csökkent mennyisége lehet (17, 20, 23).

A gyulladásos mediátorok képződésének és a neurotranszmitter transzporterek, valamint receptoraik szerepének vizsgálatában Balb-c, B6, WT129 és NAT-KO egerekben szisztémás gyulladást idéztünk elő LPS intraperitoneális injektálásával, ill. a vastagbél gyulladását *per os* dextránszulfáttal indukálva. Ez utóbbi modellben megállapítottuk, hogy bár a szimpatikus idegrendszeri neurotranszmitterek szintjének emelkedése antinflammatorikus hatású, az ebben résztvevő, így terápiás reményekkel kecsegetető adozin receptor ( $A_{2A}$ -receptor) agonista CGS-21680 nem volt képes a vastagbél gyulladását csökkenteni (16, 24). Az *in vivo* hatás elmaradása ellentétben áll azzal, hogy *in vitro* vizsgálataink makrofágokon és BV-2 mikroglia sejteken azt mutatták, hogy az adozin receptor ligandjai gyulladásgátló hatásúak és receptor által közvetített poszttranszkripciós folyamatokon keresztül az IL-10

termelődés fokozódását idézik elő. Ennek az ellentmondásnak magyarázatára további vizsgálatok szükségesek. Ezek során kimutattuk, hogy a gyulladásgátló hatások elsősorban a p38 MAPK jelpályán keresztül érvényesülnek, mivel ezek a p38 *in vitro* a gátlásával megszüntethetőek (13, 14, 15, 18, 24).

Az LPS adásával előidézett gyulladási modellekben elsősorban a plazma és a hippokampusz TNF- $\alpha$  termelését hasonlítottuk össze, optimalizáltuk a dózis és időadatokat, amelyek alkalmazásával ugyanabban az állatban értékelhető citokin mérési eredményeket kaphatunk a plazma és a hippokampusz esetén (23). Megállapítottuk, hogy 1-10 mg/kg LPS használata esetén 90 perc indukció után mindkét esetben maximumot ér el a gyulladási citokin (TNF- $\alpha$ ) termelődés, ennek mértéke azonban eltérő a vad típusú és a NAT-KO egerekben. Kimutattuk, hogy a hippokampusz kiindulási TNF- $\alpha$  értéke a NAT-KO állatokban magasabb, mint a WT egyedekben; az LPS indukált TNF- $\alpha$  válasz azonban nemcsak a plazmában kisebb, mint a WT állatok esetén, hanem a hippokampuszban is. Feltűnő különbséget mutattunk ki a periférián és a hippokampuszban észlelhető, LPS indukált TNF- $\alpha$  mennyiség antidepresszánsal történő modulációjában is (19). Míg a plazmában a szerotonin-transzporter gátló, antidepresszáns citalopram bolusban való adásával a TNF- $\alpha$  szint szignifikánsan csökken, addig a hippokampuszban az LPS indukált TNF- $\alpha$  mennyiség nem volt modulálható. Terveink szerint megvizsgáltuk néhány transzkripciós faktor szintjének alakulását is a NAT-KO és WT állatok hippokampuszában, minthogy a gyors, korai génekaktiváció (pl. c-fos) a neuroadaptáció egyik meghatározó folyamata. Megállapítottuk, hogy a NAT-KO egerek hippokampuszában a c-fos és a pCREB szintje nagyobb, mint a WT állatokban, míg a pERK1/2 szint kisebb. Az LPS-indukált NAT-KO egerek hippokampuszában mind a c-fos, mind a pERK1/2 és a pCREB szintje különböző mértékben, de csökken, míg a WT egerek esetén a pCREB szint nem változik, a pERK1/2 és a c-fos szint viszont nő. Feltételezhetjük, hogy a vizsgált transzkripciós faktoroknak az LPS indukció során a NAT-KO egerekben észlelt csökkenése összhangban áll az ezekben az állatokban mért kisebb mértékű TNF- $\alpha$  válasszal (2, 9, 18, 20). Ez az észlelet arra is felhívja a figyelmet, hogy míg az ERK1/2 aktiválódása előnyösnek bizonyul az immunaktiváció szempontjából, addig a sejtproliferáció szabályozása szempontjából ez nem ilyen egyértelmű, minthogy az ERK1/2 konstitucionális aktivációját írták le egyes malignus tumorokban. Klinikai együttműködésünk során ugyanis kutatócsoportunk kimutatta, hogy a humán éretlen myeloid sejtvonal, a K652, esetén az ERK1/2 aktiválódásának gátlása eritroid

differenciációhoz vezet, amely egyes leukémiás betegségekben (CML) előnyös és így terápiás konzekvenciákat is eredményez (3, 7, 8, 11).

Eredményeink közül a legnagyobb jelentőségűnek a stimulus függő adrenerg immunmoduláció felismerését és igazolását tartjuk. Kimutattuk, hogy míg a tankönyvi adatok és eddigi ismereteink szerint a  $\beta$ -adrenoceptor Gs fehérjéhez kötött, így az adenilát-cikláz aktivációja és a következményes cAMP szint növekedés eredményeképpen immunszuppresszánsként volt számontartva, ez a hatás csak bizonyos stimulusokkal (pl. LPS) együtt érvényesül. Egér intraperitoneális makrofágokon, izolált humán monocytákon és humán myelomonocytar sejtvonalon (PLB985) egyaránt bizonyítottuk, hogy míg az LPS által indukált TNF- $\alpha$  mennyiségét a  $\beta$ -adrenerg agonista isoproterenol és clenbuterol csökkenti, addig, ezzel ellentétben, ugyezen agonisták a proteinkináz-C (PKC) által indukált TNF- $\alpha$  mennyiségét tovább növelik. Ha figyelembe vesszük azt, hogy a PKC aktiválódása, amely számos biológiai folyamat során bekövetkezik, egy olyan eseménysorozatot indít el, amelyek pl. hemopoietikus sejtek esetén makrofág irányú sejt differenciációhoz, így a proinflammatorikus citokin gének fokozott expressziójához vezet, az ezzel egyidejű szimpatikus idegrendszeri aktiváció súlyos szepszis előidézőjévé is válhat. Vizsgálataink bizonyították tehát, hogy az adrenerg immunmoduláció Janus arcú, azaz az alkalmazott stimulustól függően akár immunszuppresszáns így gyulladásgátló, akár immunaktiváló, egyben gyulladás fokozó hatású is lehet (6, 12, 13, 14, 21).

Kimutattuk, hogy a béta–adrenerg receptornak a különböző stimulusok által előidézett immunmoduláns hatása összefügg a pERK szint növekedésével és a TNF- $\alpha$  indukálhatóságával. Ezzel kapcsolatos új eredményeink szerint a béta-adrenerg receptor stimulációja tranziens MAP-kináz foszforilációt eredményez, amely pertussis toxinnal gátolható. Ennek alapján igazoltuk, hogy a  $\beta$ -adrenerg receptor nemcsak Gs, hanem Gi fehérjéhez is képes kötődni. Ezzel elsőként mutattuk ki, hogy az immunrendszerben is létrejöhet az eddig csak szívizom és egyes más szövetek sejtjeiben ismert Gs/Gi átkapcsolás (22). Klinikai együttműködésünk során másrészt azt is igazoltuk, hogy a spontán TNF- $\alpha$  termelés szabályozottsága eltérő az LPS-indukálta TNF- $\alpha$  termelésétől, minthogy ezek szintje a terhesség alatt inverz módon változik (1).

Az a tény, hogy az adrenerg immunmoduláció és ezzel kapcsolatban a citokin termelés az alkalmazott stimulustól függően akár immunszuppresszáns gyulladásgátló, akár immunaktiváló gyulladásfokozó hatású is lehet, több új terápiás megközelítést, valamint új elméleti alapokon nyugvó gyógyszerek fejlesztését is lehetővé teszi.

## A pályázat során publikált eredményekből idézett munkáink

1. Rigó J.Jr., Szelényi J., Selmeczy Zs., Papp Z., Vizi E.S.: **Endotoxin induced TNF- $\alpha$  production changes inversely to its plasma level during pregnancy**, Eur. J. Obstetrics and Gynecology, 2004 114 p. 236-238, 2004
2. Szelényi J; Selmeczy Zs; Vizi ES: **Effect of monoamine transporter inhibitors on the LPS induced cytokine production**, Fundamental and Clinical Pharmacology Vol. 18. Suppl. 1 p. 95, 2004
3. A. Brózik, N.P Casey, A. Bors, P. Geiszt, K. Német and M. Magócsi: **Signalling mechanisms leading to erythroid differentiation of K562 cells with reduced Bcr-Abl function**, 30th FEBS 2005 July 2-7 Budapest D3 013p, 2005
4. Elkind NB, Szentpetery Z., Apati A., Ozvegy-Lacka C., Varady G., Ujhelly O., Szabo K, Homolya L, Varadi A., Buday:, Keri Gy., Nemet K., Sarkadi B.: **Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor inhibitor Iressa**, Cancer. Res. 65(5), 1770-7, 2005
5. Elkind NB, Szentpetery Z., Apati A., Ozvegy-Lacka C., Varady G., Ujhelly O., Szabo K, Homolya L, Varadi A., Buday:, Keri Gy., Nemet K., Sarkadi B.: **Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor inhibitor Iressa**, Cancer. Res. 65(5), 1770-7, 2005
6. Judit Szelényi, Vizi e. Szilveszter, Zsolt Selmeczy, Mária Magócsi: **Activation of MAPkinase pathway plays an essential role in the sympathetic regulation of inflammatory mediator production in macrophages**, 30th FEBS 2005 July 2-7 Budapest C3 052p,
7. Nahajevszky, S., Ádám, É., Andrikovich, H., Mikala, G., Magócsi, M.: **Imatinib kombináció hatása CML-BC basofil leukémiás meningitis formájában jelentkező relapszusában**, Magyar Hematológusok Társasága 2005
8. Nahajevszky, S., Magócsi Mária, Ádám, É., Andrikovich, H., Mikala, G. Massi T.: **Treatment of the central nervous system in CML patient with the combination of imatinib mesylate and valproic acid**, Blood 106(11), 301-2, 2005
9. Szelényi J., Selmeczy Zs. and Vizi E.S.: **Antidepressants affect the inflammatory response in mice\***, 6th Congress of Int. Soc. of Neuroimmunomodulation 2005  
\*Invited lecture p58, 2005
10. Szelényi J., Selmeczy Zs., Vizi E.S.: **The competence of multi-target drugs: Effect of monoamine transporter inhibitor antidepressants on the inflammatory response in mice**, Magyar Experimentális Farmakológia, Abstract p64, 2005
11. Anna Brózik, N.P. Casey, Cs. Hegedűs, A. Bors, A. Kozma, H. Andrikovics, M. Geiszt, K. Német, M. Magócsi: **Reduction of bcr-abl function leads to erythroid differentiation of K562 cell via downregulation of ERK**, Ann. N.Y. Acad. Sci., 2006 Vol.1090:344-54
12. Judit Szelenyi, Szilveszter E Vizi, Zsolt Selmeczy, Maria Magocsi: **Activation of MAPkinase pathway plays an essential role in the sympathetic regulation of inflammatory mediator production in macrophages**, International Workshop on Adrenergic Neurotransmission: from Benchside to Bedside 2006.10.06.-2006.10.07, 2006

13. Judith Szelenyi, Maria Magocsi, Zsolt Selmeczy, David Medgyesi, Sylvester E Vizi: ***The Sympathetic Modulation of Inflammatory Mediator Production is Stimulus Dependent in Macrophages***, 16th European Congress of Immunology Paris 2006.09.06.-2006.09.11 PA 1098, 2006
14. Judith Szelenyi, Zsolt Selmeczy, Anna Brozik, David Medgyesi, Maria Magocsi: ***Dual beta-adrenergic modulation in the immune-system.***, Neurochem. Int. 2006 49 p.94-103, 2006
15. Szelenyi J, Magocsy M, Selmeczy Zs, Vizi ES: ***Catecholamines and Inflammation: Stimulus Dependent Immunomodulatory Effects. Felkért előadás***, International Congress of Immunogenomics and Immunomics 2006. 10.08.-2006.10.12. Sy 15 p201, 2006
16. Zsolt Selmeczy, Balázs Csóka, Pál Pacher, Sylvester E. Vizi, György Haskó: ***The adenosine A2A receptor agonist CGS 21680 fails to ameliorate the course of dextrane-sulphate- induced colitis in mice.*** *Infkamm. Res*, 2007 Vol.56(5) p.204-9.
17. Szelenyi J. and Vizi E.S.: ***The catecholamine-cytokine balance: Interaction between the brain and the immune system***, Cell, Stress, and Chaperon Vol.12(2) p.421, 2007
18. J. Szelenyi and E.S. Vizi: ***Neuroimmune correlates of sleep in depression: role of cytokines***, NEUROIMMUNOLOGY OF SLEEP Eds.: Prof. G. Chrousos (NIH), Prof. P. Cardinali (Argentina), and S.R. Pandi-Perumal pp295-319 Springer Medical Publisher New York, 2007
19. Szelenyi J., Magócsi M., Brózik A., Vizi E.S.: ***A gyulladássos immunválasz perifériás vérben és hippocampusban***, Immunfarmakonok és Biológiai Hatóanyagok Gyógyszertana, 2007
20. Szelenyi J.: ***Neuroimmunmoduláció***, 37. MÉT Membrán-Transzport Konferencia Abstract p.38, 2007
21. Szelenyi J. and Vizi E.S.: ***The catecholamine-cytokine balance: Interaction between the brain and the immune system***, Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 1113 pp 311-324, 2007
22. Magócsi M., Vizi E.S., Selmeczy Z., Brózik A., Szelenyi J.: ***Multiple G-protein-coupling specificity of b-adrenoceptor in macrophages***, Immunology Vol. 122 pp 503-513, 2007
23. Bors A., Ribiczey P., Köblös G., Brózik A., Újfaludy Zs., Magócsi M., Váradi A., Tordai A., Kovács T., Arányi T.: ***External cell control polymerase chain reaction: replacing internal standards with an unbiased strategy for quantitative polymerase chain reaction normalization***, Anal. Biochem. 372 261-263, 2008
24. Selmeczy Z., Vizi E.S., Csóka B., Pacher P., Haskó G.: ***Role of non-synaptic communication in regulating the immune response***, Neurochem. Int. Vol. 52 pp 52-59, 2008