

**A DMTS HATÁSA SZOMATIKUS ÉS NEUROPÁTIÁS
FÁJDALOMMODELLBEN**



DOMBI ÁGNES

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Neurofarmakológiai Program

Doktori iskola vezető, programvezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezetők: Dr. Pozsgai Gábor

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs, 2024.

BEVEZETÉS

Az International Association for the Study of Pain (IASP) definíciója szerint: „A fájdalom egy olyan kellemetlen érzékelési és érzelmi élmény, amely valós vagy potenciális szöveti károsodással áll összefüggésben, vagy amely ilyen élményre hasonlít”. A fájdalom érzékszervi és érzelmi komponensekre osztható, melyek a vélt vagy valós szövetkárosodásból erednek. Az érzékszervi fájdalom lehet nociceptív, melyet általában valamilyen szöveti sérülés okoz [1]; valamint lehet neuropátiás, amely a szomatoszenzoros idegrendszer sérülése vagy betegsége miatt jelentkezik [2]. A nociceptív fájdalom lehet szomatikus és lehet viscerális vagy zsigeri, mely a belső szervek valamely betegségét kíséri. Bármilyen típusú fájdalomról is legyen szó, annak hosszú távú fennállása az életminőség romlásához vezet.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. Tranziens Receptor Potenciál (TRP) csatornák

A tranziens receptor potenciál géncsalád integráns membránfehérjéket kódol, melyek ioncsatornaként működnek. A fehérjék szerkezeti hasonlóságot mutatnak egy ecetmuslicában leírt fototranszdukcióban szerepet játszó fényérzékeny receptorral, ezen topográfiai hasonlóság miatt kerültek a TRP családba, azonban többségük egyéb hasonlóságot nem mutat a tranziens receptorpotenciállal. A TRP csatornák a legtöbb eukarióta fajban, az élesztőktől a gerincesekig, szinte minden szövetben megtalálhatók. Mivel többségük ingerelhető és nem ingerelhető sejteken egyaránt expresszálódik, szerteágazó élettani folyamatokban vesznek részt. Szerepet töltenek be többek között különböző ingerek (hőmérséklet, fájdalom, kémiai, mechanikai, elektromos) érzékelésében, az izomkontrakcióban, gyulladási folyamatokban, valamint az ionháztartás szabályozásában. Jelátvitelük gyakran G-fehérjéhez kapcsolt és növekedési faktor receptorokhoz, valamint foszfolipáz C (PLC)-hez kötődik [3].

2. Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1

A TRPA az egyetlen a TRP alcsaládok közül, melybe eddig csak egyetlen kationcsatornát soroltak. A csatornát kódoló gént eredetileg tüdő fibroblaszt sejtekből klónozták 1999-ben [4]. A munkacsoport azonosított egy, két különálló domént tartalmazó, 1119 aminosavból álló fehérjét kódoló gént a humán 8-as kromoszómán. Megállapították, hogy a fehérje N-terminális doménje 18 szegmensből áll, melyek mindegyikéhez egy-egy ankirin kapcsolódik.

A fehérjét kódoló gént ANKTM1-nek nevezték el. Később további vizsgálatokat végezve felfedezték, hogy a fehérje nagyfokú hasonlóságot mutat a TRP csatornákkal, így a pontosabb szerkezeti azonosítás után közéjük sorolták.

3. Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1 előfordulása

A TRPA1-et először egy káros hidegre és csípős vegyületekre érzékeny nociceptív csatornaként azonosították, mely hátsó gyöki ganglionokban (DRG) és trigeminus ganglionokban (TG) fejeződik ki [5]. Az azóta történt vizsgálatok pontosabban feltárták a receptor, valamint az ioncsatorna szerkezetét és működését. A kutatások rávilágítottak, hogy a TRPA1 rendkívül széles körben expresszálódik, rendkívül sok sejttípus membránjában, illetve különböző sejtalkotók membránjában is megtalálható.

4. Neuronális TRPA1 ioncsatornák funkciója

A TRPA1 ioncsatornák multimodális, nem szelektív kationcsatornák, melyek leginkább elsődleges szenzoros nociceptorokon, központi idegrendszeri idegsejteken és glia sejteken expresszálódnak. A TRPA1 és/vagy a TRPV1 perifériás idegvégződéseken való aktivációja Na^+ és Ca^{2+} beáramláshoz vezet. A Na^+ influx hatására az aktivációs küszöb elérésekor akciós potenciál jön létre. Az idegvégződéseken levő ioncsatornák aktivációjának hatására kialakul a fájdalomérzet, a nocicepció. Ezzel egyidőben lokálisan neuropeptidok (pl: calcitonin gén rokon peptid, CGRP; P anyag, neurokinin A és neurokinin B) szabadulnak fel [6]. Az így felszabaduló proinflammatorikus mediátorok az arteriolák erőteljes értágulatát, az itt található venulákból plazmafehérjék kiáramlását, valamint gyulladásgátló sejtek aktivációját okozzák. Mindezek hatására lokális gyulladás alakul ki. A sérült vagy gyulladt szövetből felszabaduló proinflammatorikus és algogén mediátorok (pl.: szerotonin, bradikinin), valamint néhány lipidperoxidációs termék (pl. 4-hidroxi-hexánal, 4-hidroxi-nonénal, 4-oxo-nonénal) PLC, PKA és PKC útvonalakon keresztül képesek szabályozni a TRPA1 csatorna működését úgy, hogy foszforilálják azt [7].

Ezen ioncsatornák, hasonlóan más, szintén neuropeptideket expresszáló szenzoros neuronokban expresszált csatornákhöz, rendelkeznek szisztémás efferens funkcióval is [6]. A lokális efferens funkcióért felelős gyulladásgátló neuropeptidok felszabadulásán kívül az ioncsatorna aktivációjának hatására gyulladásgátló peptidok is felszabadulnak (pl.: szomatosztatin), melyek a keringésbe kerülve szisztémás gyulladásgátló és analgetikus hatásokat váltanak ki [8].

5. Nem neuronális TRPA1 ioncsatornák funkciója

Az agytörzsben a TRPA1 a zsigeri afferens pályán expresszálódik, és szabályozza a glutamát felszabadulását [9]. Az asztrocitákban, amelyek hozzájárulnak a szinapszisok kialakulásához és működéséhez, a TRPA1 expressziója összefügghet a gátló szinapszisok szabályozásával. A belső fülben is fontos a TRPA1, ott a stria vascularisban, a Corti-szervben és a csiga külső és belső szőrsejtjeiben (OHC és IHC) expresszálódik és egyedi ankyrin repeat domain szerkezete arra utal, hogy itt valószínűleg mechanoszenzitív csatornaként működik [10–12]. Az érrendszeri endotélsejtekben a TRPA1 működése összefügg az endotéliumból származó hiperpolarizáló faktor (EDHF) válaszokkal [13,14]. A kardiovaszkuláris rendszerben való szerepére irányuló kísérletek során azt találták, hogy az élelmiszerekkel a szervezetbe kerülő TRPA1 agonisták két különböző útvonalon keresztül is artériatágulást okozhatnak. A TRPA1 hasnyálmirigyben való expresszióját patkány hasnyálmirigy *Langerhans* szigetein mutatták ki [15]. A TRPA1 agonista allil-izotiocianát és a 15-deoxi-delta-prostaglandin J₂ (15dPGJ₂) [16,17] jelentősen fokozta a Ca²⁺ beáramlást a β sejtekben. A β sejtekben való kifejeződést specifikus TRPA1 antagonistákkal is megerősítették, melyek a vizsgálatok során blokkolták az elektrofil aktiválás által előidézett hatásokat [18]. A gasztrointesztinális rendszerben is fontos szerepe van a TRPA1-nek. A vékonybél és a vastagbél nyálkahártyáján a TRPA1 a bél szaganyag-receptorokkal (OR) együttműködve valószínűleg kemoszenzorként működik. A TRPA1 nagymértékben expresszálódik a legtöbb olyan nem neuronális sejt típusban is, amelyek a légzőrendszert alkotják. Alapvető szerepet játszik nemcsak a normális légúti működésben, hanem a betegségek modulálásában is. A nem neuronális bőrsejtjeiben, például a humán keratinocitákban és fibroblasztokban a TRPA1 aktiválása közvetíti az eikozanoidok, például a prosztoglandin E₂ (PGE₂) és a leukotrién B₄ (LTB₄) szekréciós mintázatát, és hosszan tartó helyi eritédiát idéz elő [19]. Melanocitákban a TRPA1 befolyásolja a proinflammatorikus citokinek, köztük az interleukin-1α és β (IL-1α, IL-1β) expresszióját [20]. Az emberi fogakban a TRPA1 nagymértékben expresszálódik a fogpulpa fibroblasztjaiban, ahol részt vehet a mechanotranszdukcióval kapcsolatos hidegválaszokban és fájdalomban [21].

6. Agonisták

Általában a TRPA1 csatorna agonistái a tiol-reaktív elektrofilek nagy csoportjába sorolhatók, amelyek kovalensen módosítják a csatornát; valamint nem elektrofil vegyületek csoportjába, amelyek nem kovalens módosítások révén képesek a csatorna aktivációját okozni.

6.1. Elektrofil agonisták

Az agonistáknak ebbe a csoportjába számos olyan vegyület tartozik, melyek a hétköznapi életben használt fűszerekben és gyógynövényekben is megtalálhatók. Ezek közé tartozik a fokhagymában található allicin, melyből alliináz enzim hatására alliin keletkezik. Az alliin egy tioszulfínát csoportot tartalmazó, szagtalan és erősen instabil vegyület, melyből különböző diallil-szulfidok (DAS), diallil-diszulfidok (DADS) és diallil-triszulfidok (DATS) keletkeznek. Ipari vegyszerek és illékony irritánsok, pl.: akrolein és kroton-aldehid [22,23]; hidrogén-peroxid [24]; különböző érzéstelenítők, pl.: izoflurán [25], lidokain [26], propofol [27]; laboratóriumi vegyszerek, pl.: formalin [28]; valamint endogén aktivátorok és oxidatív stressz komponensek, pl.: nitrogén-oxid (NO) [29] szintén agonistaként hatnak. Ezek az agonistaként viselkedő anyagok kovalensen módosítják a TRPA1 aminoterminális doménjén található cisztein és lizin oldalláncokat.

6.2. Nem elektrofil agonisták

Az agonistáknak ez a csoportja nem a cisztein oldalláncok kovalens módosítása révén fejtik ki aktiváló hatását. Az elektrofil agonista csoporthoz hasonlóan, ide is számos növényi összetevő és származék sorolható. Legismertebb ezek közül talán a mentol [30], és a hozzá szerkezetileg nagyon hasonló timol [31]. A nem elektrofil agonisták csoportjába tartozik továbbá az oregánóban, kakukkfűben és a szegfűszegben megtalálható karvakrol [32] és még számos egyéb vegyület.

7. Gazotranszmitterek (H₂S és NO)

Mindhárom gazotranszmitter (CO, H₂S, NO) *in vivo* szintetizálódik és a szervezetben neuromodulátor funkciót tölt be. A H₂S kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronokra gyakorolt potenciális biológiai hatását először 1990-ben írták le patkány tüdősérülés modellben [33]. Később a szulfid donor nátrium-hidrogén-szulfidot azonosították kapszaicin érzékeny neuronok aktivátoraként izolált patkány húgyhólyagban [34]. Az eredményeket összevetve Patacchini és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a H₂S vagy a TRPV1-re, vagy egy szenzoros neuronokon vele együtt expresszálódó, addig nem azonosított ioncsatornára hat [34]. Pár évvel később a TRPA1 patkány húgyhólyagban történő expresszióját fluoreszcens immunhisztokémiával és valós idejű PCR-rel vizsgálva azt találták, hogy a TRPA1 immunreaktivitást mutat az urotélium, a szuburoteliális térben és az izomrétegben, valamint az erek körül a húgyhólyag myelinizálatlan idegrostjain. NaHS-t alkalmazva a kísérletben arra a következtetésre jutottak, hogy a szulfid donor a húgyhólyag TRPA1 csatornáira hat [35]. Ezután számos, a H₂S és TRPA1 kapcsolatát vizsgáló kísérlet vette kezdetét.

Példaként Gratzke kísérlete, aki TRPA1 agonistákat alkalmazott emberi húgycsőből származó mintákon és azonosította a csatornák helyzetét a különböző rétegekben található idegrostokban. Vizsgálatai fényt derítettek arra, hogy a TRPA1 kolokalizációt mutat a TRPV1-et és CGRP-t is expresszáló idegsejtekben, valamint az uroteliális és intersticiális sejtekben. Az agonistákkal történő vizsgálati eredményei arra utalnak, hogy a TRPA1-nek szerepe van az emberi afferens és efferens szenzoros jelátvitelben [36]. A következő kulcsfontosságú megállapításokat Miyamoto és munkatársai tették 2011-ben [37], akik TRPA1-et expresszáló natív DRG neuronokon vizsgálták a H₂S hatását. Kísérleteikben a TRPA1 specifikus antagonistá HC030031-et és Ca²⁺ mentes extracelluláris oldatot alkalmaztak. Azt találták, hogy a NaHS által kiváltott Ca²⁺ növekedést gátolta a Ca²⁺ mentes oldat, valamint az antagonistá jelenléte, ami arra utal, hogy a NaHS ezen csatornák aktiválásával stimulálja a szenzoros neuronokat.

8. H₂S és NO kapcsolata

A két vegyület közti szinergizmusról először vaszkuláris simaizomzatra való hatással kapcsolatban számoltak be [38]. A kölcsönhatás eredményeként H₂S_n vegyületek keletkeznek, illetve nitroxil (HNO) és nitrozo-perszulfid (SSNO), amik képesek lehetnek aktiválni a TRPA1 csatornákat az asztrocitákban és (DRG) neuronokban [39].

CÉLKITŰZÉSEK

A korábban csak toxikus gáznak tartott H_2S molekula endogén gázotranszmitterként való azonosítása új fejezetet nyitott az élettani kutatások történetében. Azóta feltérképezték számos biológiai rendszerre gyakorolt multimodális hatását. A szervezetben számos kémiai átalakuláson esik át és a folyamatok során keletkező termékek is fontos szabályozó szerepet töltenek be. Bár az H_2S , annak endogén módon történő átalakulása és az így keletkezett molekulák komplex folyamatokban betöltött szerepe széles körű vizsgálatok tárgyát képezi, még mindig sok a kérdés ezen területen. A világ számos pontján végeznek kutatásokat poliszulfidok különböző folyamatokra gyakorolt hatásairól, de a legtöbb poliszulfid viszonylagos instabilitása miatt betegségmodellekben való alkalmazásuk megkérdőjelezhető. Ezen megfontolások alapján a fiziológias körülmények között meglehetősen stabil tulajdonságokkal rendelkező poliszulfidot, a dimetil-triszulfidod választottuk.

A TRPA1 receptor és biológiai szerepe régóta kutatott terület. Ismerjük már pontos szerkezetét, többféle liganddal való aktivációját és elhelyezkedését is a szervezet számos pontján. Irodalmi adatok szerint a H_2S képes aktiválni a TRPA1-et, ezért úgy gondoltuk, tanulmányozzuk a két terület kapcsolatát.

Célul tűztük ki a DMTS hatásának vizsgálatát egy gyulladáson és egy neuropátiás fájdalommodellben, valamint, hogy a hatásokhoz van-e valamilyen köze a TRPA1 receptor jelenlétének vagy hiányának.

KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok

Minden kísérletünket 8-15 hetes, 20-30 grammos, hím, funkcionális TRPA1 (TRPA1^{-/-}) és szomatosztatin 4-es receptor (SST4^{-/-}) génhíányos egereken, illetve vad típusú párjaikon végeztük (TRPA1^{+/+} és SST4^{+/+}) Mindkét génmódosított egértörzs C57BL/6 alapú.

2. Etikai vonatkozások

Minden kísérleti eljárás és vizsgálat eleget tett az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény és az állatkísérletek végzéséről szóló 40/2013 (II. 14.) számú kormányrendelet előírásainak, valamint az Európai Parlament és Tanács 2010/63/EU irányelvének és Nemzetközi Fájdalom Társaság ajánlásainak. A kísérleteket a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérleti Etikai Bizottsága hagyta jóvá, engedélyszám: BA02/2000-30/2016. Kutatásaink során mindvégig az állatok jólétét szem előtt tartva törekedtünk a kísérletbe bevont állatok számának, valamint az általunk okozott szenvedések csökkentésére.

3. DMTS oldat készítése

Először 1 M DMTS-oldatot készítettünk dimetil-szulfoxidban (DMSO), majd ezt 100 mM-ra hígítottuk 2% v/v poliszorbát 80-at tartalmazó sóoldatban. A lassú oldódást követően ezt fiziológiás sóoldatban tovább hígítottuk 25 mM-ra. Az elkészült 25 mM-os oldatot 10 ml/kg-nak megfelelően intraperitoneálisan adtuk be, ami így 250 µmol/kg dózist eredményezett. A vivőanyag 1 M DMTS oldat helyett DMSO-t tartalmazott. A végleges DMTS-oldat 2,24% v/v DMSO-t és 0,45% v/v poliszorbát 80-at tartalmazott. A vehikulum DMSO tartalma 2,5% v/v DMSO volt.

4. Kísérleti modellek

4.1. Seltzer szerinti mononeuropátia

A részleges idegsérülés hatására kialakuló spontán fájdalom vizsgálatára Seltzer 1990-ben megjelent cikkében ismertetett módszerét alkalmaztuk. Az általa alkalmazott patkánymodellt egerekre konvertáltuk. Bár az emberi szervezetben általában több ideget érintő úgynevezett polineuropátiáról beszélhetünk, kísérleteink során mi ennek általánosan elfogadott, leegyszerűsített, egy ideget érintő úgynevezett mononeuropátiás verzióját alkalmaztuk az ülődeg részleges elkötésével.

4.2. K/BxN szérumsztransfer artritisz

Kísérleteink során az ízületi gyulladást ilyen állatokból származó K/BxN szérumsz egy szeri 300 µL-es intraperitonális beadott injekcióval idéztük elő (Mócsai Attila, Semmelweis Egyetem, Budapest). A kontroll csoportot képviselő állatok nem artrogén BxN szérumszot kaptak ugyanazon mennyiségben.

5. Vizsgálati módszerek

5.1. Mechanikai allodinia kimutatása

A hátsó mancsok mechanikai fájdalomküszöbének előzetes, majd műtét utáni meghatározását, valamint ennek a küszöbértéknek a kezelés hatására bekövetkező változását dinamikus plantáris eszteziométerrel (DPA, Ugo Basile 37400, Comerio, Olaszország) végeztük.

5.2. Függeszkezési teszt

Az egereket merev fém rácsra helyeztük, majd a rácsot felemelve és megfordítva megvizsgáltuk a lógási hajlandóságukat. Egészséges állat esetén a rácsba való kapaszkodás és így a hanyatt történő lógás akár percekig is tarthat, ezért amikor a függeszkezési idő elérte a 60 másodpercet, az állatokat visszafordítottuk eredeti testhelyzetükbe.

5.3. Makrofágok lumineszcens képkalkotása

A képkalkotó vizsgálatok lucigenin (pH 7,4) alkalmazásával történtek. A lucigenin vizualizálja az extracelluláris szuperoxidot, melyet a makrofágok NADPH oxidáza termel [40]. Az egereket először ketamin (120 mg/kg) és xilazin (12 mg/kg) intraperitonális adott elegyével elaltattuk, majd foszfát pufferes sóoldatban (PBS) oldott lucigenint adtunk nekik szintén intraperitonális (25 mg/kg). A lumineszcens képkalkotást a lucigenin beadása után 10 perccel végeztük IVIS Lumina II (PerkinElmer, Waltham, Amerikai Egyesült Államok) készülékkel a következő beállítások mellett: akvizíciós idő = 120 s, F/stop = 1, Binning = 8 [41]. Az általunk vizsgált területen mért lumineszcens jelet foton/másodpercben fejeztük ki.

5.4. Mikroglia aktiváció mérése Ionizált kalcium-kötő adapter molekula 1 (IBA1) segítségével

A kalciumionok jelátviteli aktivitásukat különböző kalciumkötő fehérjékkel való kapcsolódáson keresztül fejtik ki, amelyek közül sokan az EF hand fehérjecsaldba sorolhatók. Az Iba1 egy 17 kDa nagyságú fehérje [42], mely szintén ezen család tagja [43]. Makrofágokban/mikrogliaokban fejeződik ki, melyek aktivációja során a fehérje termelése fokozódik. Iba1 specifikus antitestet alkalmazva az immunhisztokémia során, az aktivált sejtek detektálhatók.

5.5. Szöveti értékelés

Az IBA1 pozitív sejtek számát és a mikroglia aktivációs állapotát a gerincvelő dorzális szarvának 1-2 lamelláiban szoftver segítségével értékeltük.

5.6. Mancsduzzanat mérése pletizmométerrel

A hátsó mancsok térfogatát és annak gyulladás hatására bekövetkező változását pletizmométerrel (Ugo Basile, Gemonio, Olaszország) vizsgáltuk. A láb által kiszorított folyadék mennyisége cm^3 -ben kifejezve leolvasható egy a detektorhoz csatlakozó monitorról és mennyisége arányos a láb méretével.

5.7. Arthritisz pontszám

Egy független szakértő 0-tól 10-ig terjedő skála alapján értékelt a hátsó mancsok klinikai megjelenését. Azértékelésnél szempont volt az ödéma mértéke, a bőrpír és az alsó ugróizület mozgékonyága.

5.8. RNAScope In situ hibridizáció egér háti gyöki ganglionján

A kísérleti állatokat intraperitonálisan beadott pentobarbitál injekcióval (2,4 g/kg, i.p.) túlaltattuk, majd 4% paraformaldehidet tartalmazó Millonig foszfát pufferrel transzkardiálisan perfundáltuk. A megfelelően fixált állapot elérése után az L4 DRG-t eltávolítottuk, majd a posztfixáció után abból 20 μm -es metszeteket készítettünk. A gyártói protokoll alapján RNAScope vizsgálatot végeztünk. A DAPI a DNS adeninban és timinben gazdag régiójához kötődve azzal fluoreszcens komplexet képez és mikroszkóp alatt vizualizálható.

5.19. Patch clamp

A feszültséggel kapcsolt sejtek teljes sejtáramát manuális patchclamp elektrofiziológiával rögzítettük a szabványos protokollok szerint, számítógéphez csatlakoztatott Axopatch 200B erősítővel, és a Digidata 1550A (Molecular Devices, San Jose, Kalifornia, USA) segítségével digitalizáltuk. A GFP-pozitív TRPA1 transzfektált CHO (kínai hörcsög petefészek) sejteket Nikon Eclipse TE2000-U fluoreszcens mikroszkóp (Auro-science LLC, Budapest, Magyarország) segítségével azonosítottuk.

5.10. Plazma extravazáció mérése fluoreszcenciával

A mérésekhez IR676 fluoreszcens festéket használtunk. Az oldat Kolliphor HS 15-öt (5% V/V) tartalmazott a plazmaszivárgás kimutatására alkalmas részecskeméret elérése érdekében. Az egereket először intraperitonálisan adott ketamin (120 mg/kg) és xilazin (12 mg/kg) kombinációjával elaltattuk, majd a retrobulbáris vénás plexusba IR676-t tartalmazó injekciót adtunk.

Ezután IVIS Lumina II (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) készülékkel detektáltuk a szivárgás mértékét. A regisztrált jel nagyságát teljes sugárzási hatékonyságként fejeztük ki = (foton/s)/ μ W/cm²) [44].

5.11. Ízület metszet vizsgálata

A kezelésen átesett állatok tibiotarzális ízületeit 7 nappal a szérum beadás után eltávolítottuk, majd 4%-os pufferezt paraformaldehidben fixáltuk. A mintákat először dekalifikáltuk, lehetővé téve a csontok metszését, majd paraffinba ágyazva 3-5 μ m vastagságú metszeteket készítettünk. Az elkészült metszeteket hematoxilin-eozin festéssel megfestettük, majd független szakértővel kiértékelítettük, aki a következő hisztopatológias elváltozások alapján értékelt: porckárosodás, mononukleáris sejtek száma, szinoviális szövetszaporulat, fibroblasztok száma, kollagénlerakódás mértéke.

5.12. Adatelemzés, statisztika

A K/BxN artritisz modell esetén az adatok megjelenítéséhez és elemzéséhez Clampfit 10.7 (Molecular Devices, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) valamint GraphPad Prism 5 (GraphPad, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) programokat, a neuropátiás fájdalommodell elemzésére GraphPad Prism 8 (GraphPad, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) programot használtunk.

EREDMÉNYEK

1. A DMTS koncentrációfüggő hatásának vizsgálata TRPA1 ioncsatornákra

A TRPA1 ioncsatorna DMTS hatására bekövetkező aktivációját in vivo humán TRPA1-gyel transzfektált kínai hörcsög petefészek (CHO) sejteken vizsgáltuk patch clamp módszer segítségével. A sejtek membránjára mikroelektrodot csatlakoztattunk és az ioncsatorna nyílásakor létrejövő ionáramot rögzítettük. A DMTS az ismert trpa1-aktivátor allil-izotiocianát (AITC) által kiváltotthoz hasonló áramot indukált. Az áram a DMTS esetében sokkal lassabban nőtt, mint az AITC esetében. A kísérlet végén ellenőriztük az ioncsatornák funkcionalitását HC030031 szelektív TRPA1 antagonistá alkalmazásával, kizárva az esetleges más tényező általi ioncsatorna aktivációt. A koncentráció-hatás görbét az AITC által kiváltott válaszokra normalizált áramok felhasználásával készítettük el. Az EC₅₀ érték 6,92 μmol/L volt.

2. A Trpa1 mRNS vizsgálata egér hátsó gyöki ganglion neuronjaiban

Egér hátsó gyöki ganglionján RNAscope in situ hibridizációt alkalmaztunk, majd a különböző fluorescens jeleket különböző színű festéssel különítettük el egymástól és konfokális mikroszkóppal fényképeztük. A vizsgálat során Trpa1 mRNS és Calca (CGRP-t kódoló) mRNS fluoreszcens jelet is rögzítettünk egér L4-dorzális gyöki ganglionjában. A metszetek részletes vizsgálata rávilágított arra, hogy DRG-ben a Trpa1 a CGRP pozitív szenzoros neuronokon is megjelenik, vagyis a Trpa1 és a Calca gének részleges kolokalizációt mutatnak ezen területen. A vizsgálat kimutatta, hogy bár a kolokalizáció jelentős, de nem minden Trpa1-et expresszáló neuron volt peptiderg, ahogy nem minden peptiderg szenzoros neuron volt Trpa1 pozitív.

3. DMTS kezelés hatása K/BxN szérumsztransfer artritisz modellben

3.1. A DMTS hatásának vizsgálata a hátsó láb mechanikai érzékenységére

A gyulladáskeltő szérumsztransferben részesült egerek hátsó mancsának mechanikai érzékenységét DPA (Dynamic Plantar Aesthesiometer, Ugo Basile 21036, Gemonio, Olaszország) készülékkel mértük. Egy szoktató, valamint 3 kontroll mérést végeztünk, majd a széruminjekciót követő 5. és 7. napon ismét elvégeztük a vizsgálatot. A K/BxN szérumsztransferrel injektált állatok értékei várható módon jelentősen csökkentek a kontrollcsoportban BxN-t kapott állatokéhoz képest. Ezt a csökkenést a naponta történő DMTS-sel (125 μmol/L) való kezelés nem befolyásolta sem TRPA1 WT, sem TRPA1 KO állatokban.

3.2. A DMTS-kezelés hatásának vizsgálata az egerek függeszkedési teljesítményére

A K/BxN vagy BxN kezelési csoportba tartozó egereket függeszkedési tesztnek vetettük alá a megfelelő széruminjekció beadása utáni 5. és 7. napon. A lógó testhelyzetben eltöltött idő jelentősen csökkent az arthritiszes szérummal kezelt csoportban mindkét vizsgált törzsben. Ezen értékeken sem a DMTS-sel (125 $\mu\text{mol/L}$) való napi kezelés, sem a vehikulummal történő kezelés nem változtatott.

3.3. A DMTS-kezelés hatásának vizsgálata mancsduzzanatra és arthritisz súlyosságra

A K/BxN szérum beadása növelte a hátsó mancsok térfogatát és az arthritisz pontszámot a nem arthritiszes BxN-nel kezelt kontroll csoporthoz képest. A napi DMTS kezelés (125 $\mu\text{mol/L}$) csökkentette a hátsó mancsok duzzanatát a KBxN csoportban az arthritisz kialakulását követő 5. és 7. napon, a hatás mind a TRPA1 WT, mind KO állatoknál jelentkezett. Hasonlóan, a bokaizület bőrpírjából, duzzanatából és passzív mozgékonyaságából számított arthritisz pontszámot is csökkentette a DMTS kezelés, azonban nem volt hatással egyik vizsgált paraméterre sem a kontroll csoportban. A védőhatás TRPA1 WT és KO állatokban is megfigyelhető volt, ami arra utal, hogy a DMTS a TRPA1-től függetlenül fejt ki ezen vizsgált paraméterekre gyakorolt hatását.

3.4. A DMTS-kezelés hatásának vizsgálata MPO aktivitásra

A hátsó mancsok MPO-aktivitását lumineszcens képalkotással detektáltuk 2 és 6 nappal az arthritisz kezdete után. A széruminjekció beadás előtt kontrollmérést végeztünk, ehhez hasonlítottuk a kezelés után 2. és 6. napon mért értékeket. A szérumtranszfer arthritiszben szenvedő TRPA1 WT és KO egerek is a kontrollértékekhez képest emelkedett MPO-aktivitással rendelkeztek, ami függetlennek bizonyult a DMTS-sel vagy vehikulumával történő kezeléstől, vagyis a DMTS kezelésnek nem volt hatása a myeloperoxidáz aktivitásra. A vehikulummal kezelt TRPA1 KO állatok MPO-értékei magasabbak lettek az ugyanezt a kezelést kapott TRPA1 WT csoporthoz képest.

3.5. A DMTS-kezelés hatása a plazma extravazációra

A plazma extravazáció tényleges sebességét a hátsó mancsokban IR676 festék fluoreszcens képalkotásával mértük a K/BxN vagy BxN szérummal történő kezelés utáni 2. és 6. napon. E módszer segítségével egy 20 perces időintervallumban meghatározható a plazma extravazáció sebessége. A kezelések előtt kontroll értékeket vettünk fel, ezekhez hasonlítottuk a kezeléseket utáni értékeket.

A szérumszűrés artritisz megemelte az extravazáció sebességét a kontrollként felvett kiindulási értékekhez képest TRPA1 WT és KO egerekben egyaránt. A széruminjekciót követő 6. napon mérve a DMTS-sel kezelt csoportokban (WT és KO) csökkent plazma extravazációt detektáltunk, tehát ezen adatok alapján a DMTS TRPA1-től függetlenül képes csökkenteni a plazma extravazáció sebességét. A vehikulummal kezelt TRPA1 KO állatok a 6. napon magasabb extravazációt mutattak a szintén vehikulummal kezelt TRPA1 WT csoporthoz képest. A DMTS kezelés hatása nem különbözött TRPA1 WT és KO egerek között.

3.6. A DMTS-kezelés hatásának vizsgálata a bokaizület kollagénlerakódása

A K/BxN szérumszűrés beadása utáni 7. napon eltávolítottuk a leölt állatok tibiotarzáris izületeit, majd a további vizsgálatokra szövettani metszeteket készítettünk belőlük. Az elkészült szövettani metszeteket mikroszkóp alatt a módszertani leírásban is szereplő paraméterek mentén pontoztuk. A 4 vizsgált paraméter a következő volt: mononukleáris sejtek száma, szinoviális sejtszaporulat, fibroblasztok száma, kollagénlerakódás mértéke.

A porcuszulási értéket kivéve a többi három paraméter értéke statisztikailag szignifikánsan megemelkedett a KBxN széruminjekcióval kezelt egerekben a BxN-nel kontrollként kezeltékhez képest genotípustól függetlenül.

Az artritiszes, TRPA1 WT egerek porcuszulási értékei között nem tapasztaltunk különbséget a DMTS-sel, valamint a vehikulumával kezelt csoportokat összehasonlítva. Vagyis, míg a KO állatok esetén emelkedett a porcuszulási érték, ez az emelkedés WT állatokban nem volt megfigyelhető.

A fibroblaszt-szerű szinoviociták (FLS) száma és a kollagénlerakódás kisebbnek bizonyult a DMTS-t kapott TRPA1 KO állatokban, mint vad típusú társaikban. A kollagénlerakódás mértéke nem különbözött az artritiszes, DMTS-sel kezelt állatokban egyik egértörzsben sem a vehikulummal kezelt csoporthoz képest.

4. DMTS kezelés hatása neuropátiás fájdalom modellben

4.1. A DMTS-kezelés hatásának vizsgálata neuropátiás fájdalomra

A kísérletben részt vevő állatoknál egy szoktató, majd 3 kontroll mérés alapján mechanikai fájdalomküszöböt határoztunk meg DPA készülék segítségével. A kontrollmérések alapján egyértelmű, hogy a TRPA1 ioncsatornák jelenléte vagy hiánya nem befolyásolja az ép mancsok mechanikai érzékenységét. Az ülőidegbe történő varratbeültetés után 24 órával ismét elvégeztük a mérést és azokat az állatokat, melyeknél nem változott a műtött láb mechanikai érzékenysége, kizártuk a további vizsgálatokból.

A műtét után 7 nappal a vizsgálatot ismét elvégezve azt tapasztaltuk, hogy egy varrat beültetése az ülőidegbe 7 nap elteltével a mechanikai fájdalomküszöb jelentős csökkenését okozza szintén TRPA1 független módon, összehasonlítva a műtét előtt detektált értékekkel.

A vivőanyag kis mértékben emelte az alacsonyabb fájdalomküszöböt, az eltérés statisztikailag nem jelentős.

A DMTS alkalmazása pozitív hatással volt a műtött hátsó mancs mechanikai érzékenységére, különösen TRPA1 WT állatok esetében. Jelentősen megnőtt a műtött láb fájdalomküszöb értéke összehasonlítva a KO törzs egyedeinek értékeivel. A DMTS kezelés nemcsak a génihiányos kontrollhoz, de a vivőanyaggal kezelt hatóanyag kontrollhoz képest is statisztikai különbséget okozott a vizsgált paraméterben. A DMTS kezelés olyan mértékben volt képes növelni az ülőideg sértés hatására kialakuló kóros fájdalomérzékelést, hogy a különbség statisztikailag nem kimutatható sem a műtött láb műtét előtti kontroll értékéhez, sem a nem műtött (intakt) lábhoz képest.

A funkcionális TRPA1 ioncsatornák genetikai hiányában a DMTS előbbieken leírt helyreállító hatását nem tapasztaltuk. TRPA1 KO állatoknál a vehikulummal kezeltékhez hasonló fájdalomküszöb értékeket mértünk, a DMTS kezelés nem okozott semmi mérhető különbséget egyik csoporthoz képest sem.

Ezek a megállapítások mind azt sugallják, hogy a Trpa1 a DMTS neuropátiás fájdalomban kifejtett hatásának kulcsfontosságú közvetítője.

4.2. Az SST4 szomatosztain-receptor szerepének vizsgálata a DMTS antihiperalgéziás hatásában

Az előzőekben már ismertetett kísérletet elvégeztük SST4 WT és KO egereken is. Összevetve kontroll értékeiket TRPA1 WT, illetve KO egerekkel; nem tapasztunk törzsből fakadó alapvető különbségeket.

A DMTS vehikulumával történő kezelés nem befolyásolta sem az intakt, sem a műtött lábak mechanikai érzékenységét. Ellentétben a TRPA1 WT ill. KO egereknél tapasztaltakkal, nem növelte a műtét hatására kialakult alacsonyabb fájdalomküszöböt.

A műtét után 7 nappal mérve mind a Sstr4 WT, mind a Sstr4 KO állatokban erőteljes fájdalomküszöb csökkenést tapasztaltunk a kontroll értékekhez képest. Az idegelkötés okozta trauma hatására mechanikai hiperalgézia alakult ki. Az ezt követő DMTS kezelés hatására statisztikailag jelentős különbség alakult ki a neuropátiás hátsó lábak mechanikai érzékenységében Sstr4 WT állatoknál. A DMTS növelte a fájdalomküszöb értékeket a kezelés előtti értékekhez és a vehikulummal kezelt csoport kezelés utáni értékeihez viszonyítva is.

A 4-es szomatosztatin receptor genetikai hiányában szenvedő egerekben a DMTS-sel való kezelés semmilyen antihyperalgeziás hatást nem váltott ki.

Az, hogy a DMTS csak a Sstr4 jelenlétében képes pozitív hatást gyakorolni a részleges ülőidegkötés kiváltotta neuropátiás fájdalomra, valamint, hogy ebben a hatásban nincs szerepe a vehikulumnak, arra enged következtetni, hogy a DMTS hatásának a TRPA1 mellett egy másik kulcsfontosságú szereplője SST4.

4.3. A DMTS-kezelés hatásának vizsgálata a sérült ülőideg körüli makrofág aktivitásra

Szöveti sérülés hatására a sérült részeken makrofág aktiváció történik, és kemokinek, valamint gyulladáscitokinek szabadulnak fel az érintett területeken. Szakirodalmi adatok alapján ezek az aktivált makrofágokból felszabaduló kemokinek és gyökök hozzájárulnak a neuropátiás fájdalom patomechanizmusához [45,46].

Az idegi sérülést szenvedett hátsó láb sérülés körüli területének lucigeninnel vizualizált makrofág aktivitását vizsgálva azt mondhatjuk, hogy a DMTS kezelés csökkent lumineszcenciát eredményez TRPA1 WT és KO egerekben is a vehikulummal kezelt csoporthoz képest, a különbség azonban statisztikailag nem jelentős. A makrofág aktivitás szignifikánsan nagyobb volt a vehikulummal kezelt TRPA1 KO egerekben, mint a vad típusú társaiban.

A vizsgálatot elvégeztük SST4 WT és KO egereken is. A DMTS kezelés ezen törzsek esetében sem okozott érdemi eltérést a vehikulummal kezelt állatokhoz képest. Ellentétben a TRPA1 törzsekkel, a vehikulummal kezelt SST4 KO állatok nem mutattak nagyobb makrofág sejt aktivitást.

4.4. A DMTS-kezelés hatásának vizsgálata a gerincvelő hátsó szarvának mikroglia sűrűségére

Az IBA 1 mikroglia/makrofág-specifikus kalciumkötő fehérje jelenlétét vizsgáltuk a gerincvelő hátsó szarvának 1. és 2. laminájában. Mivel a fehérje mikroglia/makrofág aktiváció hatására upregulálódik, ezért az IBA 1 pozitív sejtek számából közvetlenül következtetni lehet a vizsgált terület mikroglia/makrofág aktivációjára.

A sűrűség nagyobb volt az ülőideg elköttést elszenvedett állatok esetében kezelési csoporttól és genotípustól függetlenül, összehasonlítva az idegsérülés nélküli társaikkal. Érdekes módon a műtött egerek lézióval ellentétes oldali mintáiban is szignifikánsan megnövekedett mikroglia-sűrűséget tapasztaltunk a nem kezelt kontroll állatokhoz képest. A léziós oldalon (jobb) a kontralaterális oldalhoz képest jelentősen megnövekedett sűrűségértékeket észleltünk a kezelést nem kapott és a vehikulumos kezelést kapott egereknél.

A DMTS kezelést kapott állatoknál ilyen különbséget nem tapasztaltunk egyik TRPA1 egértörzs esetében sem. Bár a DMTS kezelés csökkentette az aktivált mikroglia számát, az eredményekből jól látszik, hogy aktiváltsági állapotuk nem csökkent. A megnövekedett mikroglia sűrűség hiánya a lézió oldalán a DMTS-sel kezelt csoportban a DMTS védő hatására enged következtetni. Ez a hatás mind a TRPA1 WT és KO egerekben megfigyelhető, ami arra utal, hogy a hatás közvetítésében a TRPA1 nem játszik szerepet. A műtétilag részleges ülőideg lézióval rendelkező Trpa1 WT és KO egerek is fokozott mikroglia aktiválódást mutattak mind a nem műtött, mind a műtött egerek kontralaterális oldalán tapasztaltakhoz képest. Az intakt Trpa1 KO állatok nagyobb mikroglia aktivációt mutattak jobb- és bal oldalon egyaránt a WT állatokhoz képest. A kezeletlen, a vivőanyaggal kezelt és DMTS-sel kezelt egerek is nagyobb mikroglia aktivációt mutattak a sérülést elszenvedett oldalon a másik oldalhoz képest.

MEGBESZÉLÉS

In vitro és *in vivo* kísérleteink is megerősítik a korábbi megfigyeléseinket, miszerint a DMTS a TRPA1 ioncsatornák potens agonistája. A DMTS kezelés hatására a K/BxN szérum által kifejtett gyulladáscsökkentő fájdalommodellben mérséklődött az ödémaképződés és a plazmaextravazáció mértéke, ami a TRPA1 receptor jelenlététől függetlenül történt. TRPA1 WT egerekben nem alakult ki jelentős porckárosodás a kontroll csoport BxN nem-artritiszes szérumot kapott tagjaihoz képest, ellentétben a KO állatokkal, melyeknél nagymértékű porckárosodást tapasztaltunk. A DMTS kezelés nem volt hatással sem a hátsó lábak mechanikai hiperalgéziájára, sem az állatok lógási teljesítményére. Ezen kívül nem befolyásolta sem a neutrofil granulociták, sem a mononukleáris sejtek számát. A fibroblaszt-szerű szinoviociták mennyisége DMTS kezelés hatására csökkent, de csak TRPA1 KO állatok esetében. Fájdalomcsillapító hatást nem tapasztaltunk. Úgy tűnik a DMTS kezelésnek RA esetében csak az ödémfüggő mechanizmusokra, illetve a humorális gyulladásra van hatása, mely hatások TRPA1 receptor jelenlétében és hiányában is fennállnak. Neuropátiás fájdalom esetében a DMTS-nek egyértelműen kimutatható fájdalomcsillapító hatása volt. A kezelést követően az ülőideg sértése miatt kialakuló mechanikai hiperalgézia mértéke jelentősen csökkent. A hatás kialakulását a TRPA1 ioncsatorna mellett az SST4 szomatosztatin-receptor közvetíti. A szomatosztatin egy ciklikus neuropeptid, mely ingerlés hatására szabadul fel főként peptiderg fájdalomérző neuronokból. Faris és munkatársai [47] megállapították, hogy az izolált egérbőr idegvégződéseiből a szomatosztatin felszabadulása a TRPA1 ioncsatornák aktivációja miatt történt. Az így kiáramló szomatosztatint a szisztémás keringés a szomatosztatin-receptorokhoz szállítja, ahol kötődik és szisztémás gyulladáscsökkentő folyamatokat indít el. A szomatosztatin fájdalom- és gyulladáscsökkentő hatását a 4-es receptorok közvetítik. Az sst4 gén kiütése megszüntette a szomatosztatin gyulladáscsökkentő hatását [48].

Korábbi vizsgálatainkban a GYY4137 szulfiddonor hatását tanulmányoztuk K/BxN szérummal kiváltott RA-ben. A GYY4137-ből származó szerves nátrium-poliszulfid (POLY) hatásához képest a DMTS-é meglehetősen eltérő. A szerves poliszulfiddal történő kezelés csökkentette a mechanikai hiperalgéziát, az artritisz pontszámot és a porckárosodás mértékét is TRPA1 jelenlétében. TRPA1 KO állatoknál mind a mechanikai hiperalgézia, mind a plazma-extravazáció, mind a MPO-aktivitás fokozódott. DMTS kezelés hatására nem találtunk a POLY hatásánál tapasztaltakhoz hasonló eltéréseket WT és KO törzs között. A DMTS kezelés KO állatokban növelte a plazma-extravazáció sebességét. Ezt a hatást a vehikulummal való kezelésnél is tapasztaltuk, ezért ez valószínűleg a vivőanyag hatásának tulajdonítható.

A szervetlen szulfidhoz képest a DMTS se a mechanikai hiperalgéziát, se neutrofil sejtek felhalmozódását nem csökkentette. A DMTS kezelés hatására csökkent mancsduzzanat mértéke és csökkent az artritisz pontszám is, ami egybevág a munkacsoport korábbi vizsgálataival, amikor is a DMTS hatását vizsgálták karragenin indukálta mancsgyulladásban [49]. Az általunk vizsgált két fájdalommodell bár több ponton is különbözik egymástól, de közös bennük, hogy DMTS kezelés hatására mind az autoimmun, mind a nem-autoimmun reakción alapuló gyulladás esetében csökkent a plazma-extravazáció sebessége, ami területet behálózó erek állapotának jó indikátora. A kísérletek alapján megállapítottuk, hogy a DMTS valószínűleg a peptiderg fájdalomérző idegvégződésekből felszabaduló szomatosztatin felszabadulásán keresztül éri el hatását.

Jelen kísérletünk során a DMTS kezelést kapott artritiszes TRPA1 WT egerekben magas fibroblaszt-szerű szinoviocita (FLS) számot és nagyobb mértékű kollagénlerakódást figyeltünk meg, mint génhányos társaiknál. Ez összhangban van a munkacsoport korábbi eredményeivel, ahol a GYY4137 szulfiddonor hatását vizsgálták szintén K/BxN szérum transzfer artritiszben [50]. A TRPA1 ioncsatorna expresszióját többek között kimutatták már szív fibroblaszt sejtekben és a FLS-ben is [51]. Ezen szinoviociták gyulladásos citokineket és mátrix metalloproteinázokat (MMP) szabadítanak fel, amik hozzájárulnak az artritisz gyulladásos folyamataihoz. A felszabaduló citokinek és kemokinek egyebek mellett neutrofileket, makrofágokat és hízósejteket aktiválnak, ami tovább erősíti az autoimmun reakciót [52–54]. A TRPA1 aktivációjának hatására proinflammatorikus folyamatok indulnak meg fibroblasztokban. Az állítást számos tanulmány alátámasztja. Példaként Sieghart cikke [55], amiben leírják, hogy az antiepileptikumok közé tartozó fenitoin képes aktiválni a TRPA1 csatornákat humán fibroblaszt sejtekben és elősegíti a kollagénlerakódást; vagy akár Kloesch és munkatársai tanulmánya [56], akik leírták, hogy a FLS-ből történő citokin felszabaulást és a porcpusztulást TRPA1 antagonistá adása mérsékli. Ezen eredmények mind összhangban vannak azzal, hogy TRPA1 WT állatokban megnövekedett FLS megnövekedett számát és súlyosabb kollagénlerakódást figyeltünk meg. A szulfidokat felszabadító anyagokról régóta ismert, hogy gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek FLS-ben. Az S-propil-cisztein a Keap1/Nrf2 jelátviteli útvonalon keresztül gátolja az MH7A humán FLS-ből származó citokin, oxigénigényök és MMP felszabadulását [57]. Hasonló eredményeket publikáltak NaHS-dal oszteoartritiszes és RA FLS-ben [55–57]. A fokhagymából származó diallil-triszulfid (DATS) a DMTS-hez nagyon hasonló szerves szulfid, mely enyhítette a TNF- α által kiváltott citokin-felszabadulást kollagén-indukált artritiszben szenvedő állatokból izolált FLS-ben. A DATS hatása valószínűleg az NF- κ B és Wnt szignáltranszdukciós útvonalak gátlásán alapul [58].

Ezen mechanizmusok magyarázhatják az általunk tapasztalt alacsonyabb FLS-sűrűséget és kollagénlerakódást TRPA1 KO egerekben. A TRPA1 nemcsak az FLS-on keresztül hat a porcra, hanem expresszálódik is kondrocitákban. Az ioncsatorna aktiválása kondrocitákban gyulladási citokinek és MMP-k felszabadulását okozza [59,60].

Korábbi tanulmányokban a gerincvelő hátsó szarvában lévő mikrogliaikat azonosították, mint résztvevőket a neuropátiás fájdalom kialakulásában az ülőideg részleges elkötése után [61,62]. Az elváltozás oldalán a gerincvelő hátsó szarvában emelkedett ipsilaterális mikroglia sűrűséget tapasztaltunk, ami egybevág egy korábbi cikk eredményével [63], melyben hasonló idegi sértést követően megemelkedett IBA1-pozitív mikroglia számot írtak le gerincvelő hátsó szarvának 1. és 2. lamelláiban. A DMTS kezelés TRPA1 KO egerekben csökkentette az ipsilaterális mikrogliaik számát a hátsó szarvban, ezért az immunhisztológiai adataink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a DMTS TRPA1-függő antineuropátiás hatásában nem a mikrogliaik a fő érintettek.

A DMTS hatásairól nincsenek széleskörű irodalmi adatok, ugyanakkor DATS és a szerves POLY hatásaival több tanulmány is foglalkozik. A POLY hatását RAW264.7 egér makrofág sejtvonalon vizsgálták. A POLY gátolta a gyulladási citokinek felszabadulását, NF- κ B és a TLR4 (Toll-like receptor 4) aktivációját [64], valamint enyhítette a Kalmodulin-függő protein kináz II (CaMKII) aktivitását. A DATS hasonló hatásokat fejtett ki az lipopoliszacharid (LPS)-stimulált RAW264.7 sejtekben, mint a POLY a gyulladási citokin szekréció, az NF- κ B és a TLR4 (Toll-like receptor 4) szignalizáció tekintetében. Kísérleteink során a DMTS nem tudta statisztikailag szignifikáns módon csökkenteni a citokin-termelő makrofágok aktivitását a sérült ülőideg környezetében. Huang és munkatársai egér BV-2 sejtvonalat használtak a POLY és DATS mikrogliaikon való tesztelésére. A POLY-ból származó nitroxil mérsékelte az LPS által kiváltott apoptózist a vizsgált sejtekben [65]. A DATS azonos modellben történő vizsgálata hasonló eredményeket hozott [66]. Ezen megállapítások részben összhangban vannak a mi eredményeinkkel: a DMTS csökkentette a hátsó szarv mikroglia sűrűségét, azonban a mikroglia aktiváció szövettani markereit ez nem befolyásolta. Munkacsoportunk korábban a szerves POLY és a szerves DMTS TRPA1-gyel való kölcsönhatását vizsgálta CHO sejteken és egér trigeminális ganglion neuronok pimer tenyészetén kalcium-érzékeny fluoreszcens markerekkel és patch clamp módszerrel. Eredményeik igazolták az ioncsatorna mindkét szulfid vegyülettel való aktiválhatóságát [8,50]. A poliszulfidok képesek reagálni a fehérjék tiolcsoportjával, ezzel megváltoztatva azok funkcióját.

Példa erre Braunstein és Greiner munkái [67,68], akik aktint, gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázt (GAPDH), NF- κ B-t, ATP-érzékeny káliumcsatornát (KATP), fehérjetirozinfoszfataz 1B-t (PTP1B), Kelch-szerű ECH-asszociált protein-1-et (Keap1) és a foszfataz-és tenzin homológ proteint vizsgáltak poliszulfidokkal való moduláció tekintetében. Ezek alapján a DMTS a szervezet különböző szintjein különböző fehérjékre gyakorolt eltérő hatása magyarázhatja az általunk tapasztalt, makrofágokban kiváltott ellentétes hatását.

Eredményeinket összefoglalva, megállapíthatjuk, hogy a DMTS kezelés a TRPA1 ioncsatornától függetlenül csökkentette a mancsduzzanatot és a plazmaextravazáció mértékét K/BxN szérummal kiváltott reumatoid arthritisben, mely egy valid gyulladásofájdalommodell. A DMTS porcvédő hatást fejtett ki és hatással volt az FLS sejtekre is. Fájdalomcsillapító hatást nem tapasztaltunk, azonban szerepe volt a humorális gyulladás csökkentésében, ami szintén TRPA1 független módon valósult meg.

A DMTS mononeuropátiás fájdalomra gyakorolt csillapító hatásában a TRPA1 ioncsatornák és az SST4 receptorok is érintettek. Az SST4 receptor jelentőségét az általunk is alkalmazott modellben már bizonyították [69,70]. A DMTS kezelés csökkentette az IBA1-pozitív mikroglia számát TRPA1 WT és KO egerekben egyaránt, azonban ezen gyulladáscsökkentő hatást KO állatok esetében a viselkedési vizsgálatok adatai nem tükrözték.

A látszólag ellentétes eredményeket magyarázhatja, hogy különbözött a két kísérletsorozatban a DMTS adagolásának kinetikája, az arthritis modellnél az anyagot naponta egyszer adtuk 7 napon át, ezzel viszonylag alacsony szöveti koncentrációt elérve, ami az anyag rövid félélettideje miatt a következő dózis beadásának idejére valószínűleg teljesen kiürült a szervezetből. A mononeuropátiás modellben óránként adtuk az szulfidot, összesen hétszer egy napon belül, ami az adagolás kezdete után 2-2,5 órával egy viszonylag magas egyensúlyi koncentrációt ért el a szövetekben és az adagolás teljes időtartamában fennmaradt. Így a beadás módja magyarázhatja, hogy a Seltzer-féle modellben a DMTS olyan helyeken és olyan hatásokat is képes kifejteni, amit egy rövidebb adagolás vagy alacsonyabb koncentráció nem tesz lehetővé.

A kísérletsorozatok időbeni sorrendje miatt a DMTS hatását a K/BxN-es tanulmányban leírt beadási sémát alkalmazva nem vizsgáltuk neuropátiás fájdalomban és nem mértünk makrofágokra kifejtett hatását sem, amiatt a két cikket ilyen szempontból összehasonlítva nem tudunk megállapításokat tenni.

Makrofág depletált egerekkel végzett kísérletben a K/BxN szérum transzfer hatására nem alakult ki artritisz [71], ami arra enged következtetni, hogy a makrofágok szerepe a modellben kritikus. Mi nem mértünk itt makrofág aktivitást, de gátlódásuk magyarázhatná a tapasztalt enyhébb gyulladási reakciókat.

Korábban a GYY4137-ből származó szerves poliszulfidos kísérletnél a poliszulfidnak nemcsak fájdalomcsökkentő hanem fájdalomkeltő hatása is volt, és a fájdalomkeltő hatás TRPA1 függetlenül jött létre. A dolgozat tárgyát képező vizsgálatban nem láttunk hasonló hatást, valószínűleg azért, mert a DMTS nem csak TRPA1-en keresztül, hanem más fehérjéken keresztül is képes lehet hatni és a két hatás kiegyenlítheti egymást.

A két modell egy további lényeges különbsége az idegrendszeri szenzitizáció és kiterjedése. Az artritisz modellben legfeljebb perifériás szenzitizációról beszélhetünk, mely a gyulladási mediátorok érzékenyítésének hatására alakulhat ki a nociceptorok esetén. Mononeuropátiánál az idegsérülés következtében a perifériás szenzitizáció mellett centrális szenzitizáció is történik. A DMTS képes átjutni a vér-egy gáton [72], ezért lehetséges, hogy fájdalomcsillapító hatását a centrális szenzitizáció mérséklésén keresztül fejti ki.

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a DMTS mind reumatoid artritiszben, mind neuropátiás fájdalomban szenvedő betegek esetében potenciális kiegészítő kezelés lehet a jövőben, de ehhez még sokkal szélesebb körű vizsgálatok szükségesek.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Kim, K.-H.; Seo, H.-J.; Abdi, S.; Huh, B. All about Pain Pharmacology: What Pain Physicians Should Know. *Korean J Pain* **2020**, *33*, 108–120.
2. Murnion, B.P. Neuropathic Pain: Current Definition and Review of Drug Treatment. *Aust Prescr* **2018**, *41*, 60–63.
3. Clapham, D.E.; Julius, D.; Montell, C.; Schultz, G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels. *Pharmacol Rev* **2005**, *57*, 427–450.
4. Jaquemar, D.; Schenker, T.; Trueb, B. An Ankyrin-like Protein with Transmembrane Domains Is Specifically Lost after Oncogenic Transformation of Human Fibroblasts*. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 7325–7333.
5. Nilius, B.; Appendino, G.; Owsianik, G. The Transient Receptor Potential Channel TRPA1: From Gene to Pathophysiology. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* **2012**, *464*, 425–458.
6. Helyes, Z.; Pintér, E.; Sándor, K.; Elekes, K.; Bánvölgyi, Á.; Keszthelyi, D.; Szőke, É.; Tóth, D.M.; Sándor, Z.; Kereskai, L.; et al. Impaired Defense Mechanism against Inflammation, Hyperalgesia, and Airway Hyperreactivity in Somatostatin 4 Receptor Gene-Deleted Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 13088–13093.
7. Viana, F. TRPA1 Channels: Molecular Sentinels of Cellular Stress and Tissue Damage: TRPA1 Channels and Cellular Stress. *J Physiol* **2016**, *594*, 4151–4169.
8. Pozsgai, G.; Payrits, M.; Ságghy, É.; Sebestyén-Bátai, R.; Steen, E.; Szőke, É.; Sándor, Z.; Solymár, M.; Garami, A.; Orvos, P.; et al. Analgesic Effect of Dimethyl Trisulfide in Mice Is Mediated by TRPA1 and Sst4 Receptors. *Nitric Oxide* **2017**, *65*, 10–21.
9. Sun, Y.; Liu, L.; Ben-Shahar, Y.; Jacobs, J.S.; Eberl, D.F.; Welsh, M.J. TRPA Channels Distinguish Gravity Sensing from Hearing in Johnston’s Organ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 13606–13611.
10. Takumida, M.; Ishibashi, T.; Hamamoto, T.; Hirakawa, K.; Anniko, M. Expression of Transient Receptor Potential Channel Melastin (TRPM) 1–8 and TRPA1 (Ankyrin) in Mouse Inner Ear. *Acta Oto-Laryngologica* **2009**, *129*, 1050–1060.
11. Stepanyan, R.S.; Indzhukulian, A.A.; Vélez-Ortega, A.C.; Boger, E.T.; Steyger, P.S.; Friedman, T.B.; Frolenkov, G.I. TRPA1-Mediated Accumulation of Aminoglycosides in Mouse Cochlear Outer Hair Cells. *JARO* **2011**, *12*, 729–740.

12. Corey, D.P.; García-Añoveros, J.; Holt, J.R.; Kwan, K.Y.; Lin, S.-Y.; Vollrath, M.A.; Amalfitano, A.; Cheung, E.L.-M.; Derfler, B.H.; Duggan, A.; et al. TRPA1 Is a Candidate for the Mechanosensitive Transduction Channel of Vertebrate Hair Cells. *Nature* **2004**, *432*, 723–730.
13. Earley, S.; Gonzales, A.L.; Crnich, R. Endothelium-Dependent Cerebral Artery Dilation Mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ Channels. *Circulation Research* **2009**, *104*, 987–994.
14. Belvisi, M.G.; Dubuis, E.; Birrell, M.A. Transient Receptor Potential A1 Channels. *Chest* **2011**, *140*, 1040–1047.
15. Cao, D.-S.; Zhong, L.; Hsieh, T.; Abooj, M.; Bishnoi, M.; Hughes, L.; Premkumar, L.S. Expression of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) and Its Role in Insulin Release from Rat Pancreatic Beta Cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38005.
16. Pi, J.; Bai, Y.; Zhang, Q.; Wong, V.; Floering, L.M.; Daniel, K.; Reece, J.M.; Deeney, J.T.; Andersen, M.E.; Corkey, B.E.; et al. Reactive Oxygen Species as a Signal in Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes* **2007**, *56*, 1783–1791.
17. Togashi, K.; Hara, Y.; Tominaga, T.; Higashi, T.; Konishi, Y.; Mori, Y.; Tominaga, M. TRPM2 Activation by Cyclic ADP-Ribose at Body Temperature Is Involved in Insulin Secretion. *EMBO J* **2006**, *25*, 1804–1815.
18. Numazawa, S.; Takase, M.; Ahiko, T.; Ishii, M.; Shimizu, S.; Yoshida, T. Possible Involvement of Transient Receptor Potential Channels in Electrophile-Induced Insulin Secretion from RINm5F Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2012**, *35*, 346–354.
19. Jain, A.; Brönneke, S.; Kolbe, L.; Stäb, F.; Wenck, H.; Neufang, G. TRP-Channel-Specific Cutaneous Eicosanoid Release Patterns. *Pain* **2011**, *152*, 2765–2772.
20. Atoyán, R.; Shander, D.; Botchkareva, N.V. Non-Neuronal Expression of Transient Receptor Potential Type A1 (TRPA1) in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology* **2009**, *129*, 2312–2315.
21. El Karim, I.A.; Linden, G.J.; Curtis, T.M.; About, I.; McGahon, M.K.; Irwin, C.R.; Killough, S.A.; Lundy, F.T. Human Dental Pulp Fibroblasts Express the “Cold-Sensing” Transient Receptor Potential Channels TRPA1 and TRPM8. *Journal of Endodontics* **2011**, *37*, 473–478.
22. André, E.; Campi, B.; Materazzi, S.; Trevisani, M.; Amadesi, S.; Massi, D.; Creminon, C.; Vaksman, N.; Nassini, R.; Civelli, M.; et al. Cigarette Smoke-Induced Neurogenic Inflammation Is Mediated by α,β -Unsaturated Aldehydes and the TRPA1 Receptor in Rodents. *J. Clin. Invest.* **2008**, JCI34886.

23. Escalera, J.; von Hehn, C.A.; Bessac, B.F.; Sivula, M.; Jordt, S.-E. TRPA1 Mediates the Noxious Effects of Natural Sesquiterpene Deterrents. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 24136–24144.
24. Andersson, D.A.; Gentry, C.; Moss, S.; Bevan, S. Transient Receptor Potential A1 Is a Sensory Receptor for Multiple Products of Oxidative Stress. *Journal of Neuroscience* **2008**, *28*, 2485–2494.
25. Matta, J.A.; Cornett, P.M.; Miyares, R.L.; Abe, K.; Sahibzada, N.; Ahern, G.P. General Anesthetics Activate a Nociceptive Ion Channel to Enhance Pain and Inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 8784–8789.
26. Leffler, A.; Lattrell, A.; Kronewald, S.; Niedermirtl, F.; Nau, C. Activation of TRPA1 by Membrane Permeable Local Anesthetics. *Mol Pain* **2011**, *7*, 1744-8069-7–62.
27. Fischer, M.J.M.; Leffler, A.; Niedermirtl, F.; Kistner, K.; Eberhardt, M.; Reeh, P.W.; Nau, C. The General Anesthetic Propofol Excites Nociceptors by Activating TRPV1 and TRPA1 Rather than GABAA Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 34781–34792.
28. Fischer, M.; Carli, G.; Raboisson, P.; Reeh, P. The Interphase of the Formalin Test. *Pain* **2014**, *155*, 511–521.
29. Miyamoto, T.; Dubin, A.E.; Petrus, M.J.; Patapoutian, A. TRPV1 and TRPA1 Mediate Peripheral Nitric Oxide-Induced Nociception in Mice. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7596.
30. Karashima, Y.; Damann, N.; Prenen, J.; Talavera, K.; Segal, A.; Voets, T.; Nilius, B. Bimodal Action of Menthol on the Transient Receptor Potential Channel TRPA1. *Journal of Neuroscience* **2007**, *27*, 9874–9884.
31. Lee, S.P.; Buber, M.T.; Yang, Q.; Cerne, R.; Cortés, R.Y.; Sprous, D.G.; Bryant, R.W. Thymol and Related Alkyl Phenols Activate the hTRPA1 Channel: Activation of hTRPA1 by Thymol and Alkyl Phenols. *British Journal of Pharmacology* **2008**, *153*, 1739–1749.
32. Xu, H.; Delling, M.; Jun, J.C.; Clapham, D.E. Oregano, Thyme and Clove-Derived Flavors and Skin Sensitizers Activate Specific TRP Channels. *Nat Neurosci* **2006**, *9*, 628–635.
33. Prior, M.; Green, F.; Lopez, A.; Balu, A.; DeSanctis, G.T.; Fick, G. Capsaicin Pretreatment Modifies Hydrogen Sulphide-Induced Pulmonary Injury in Rats. *Toxicol Pathol* **1990**, *18*, 279–288.
34. Patacchini, R.; Santicioli, P.; Giuliani, S.; Maggi, C.A. Hydrogen Sulfide (H₂S) Stimulates Capsaicin-Sensitive Primary Afferent Neurons in the Rat Urinary Bladder: Special Report. *British Journal of Pharmacology* **2004**, *142*, 31–34.

35. Streng, T.; Axelsson, H.E.; Hedlund, P.; Andersson, D.A.; Jordt, S.-E.; Bevan, S.; Andersson, K.-E.; Högestätt, E.D.; Zygmunt, P.M. Distribution and Function of the Hydrogen Sulfide–Sensitive TRPA1 Ion Channel in Rat Urinary Bladder. *European Urology* **2008**, *53*, 391–400.
36. Gratzke, C.; Streng, T.; Waldkirch, E.; Sigl, K.; Stief, C.; Andersson, K.-E.; Hedlund, P. Transient Receptor Potential A1 (TRPA1) Activity in the Human Urethra—Evidence for a Functional Role for TRPA1 in the Outflow Region. *European Urology* **2009**, *55*, 696–704.
37. Miyamoto, R.; Otsuguro, K.; Ito, S. Time- and Concentration-Dependent Activation of TRPA1 by Hydrogen Sulfide in Rat DRG Neurons. *Neuroscience Letters* **2011**, *499*, 137–142.
38. Hosoki, R.; Matsuki, N.; Kimura, H. The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Smooth Muscle Relaxant in Synergy with Nitric Oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, *237*, 527–531.
39. Kimura, Y.; Mikami, Y.; Osumi, K.; Tsugane, M.; Oka, J.; Kimura, H. Polysulfides Are Possible H₂S-derived Signaling Molecules in Rat Brain. *FASEB j.* **2013**, *27*, 2451–2457.
40. Tseng, J.-C.; Kung, A.L. In Vivo Imaging of Inflammatory Phagocytes. *Chemistry & Biology* **2012**, *19*, 1199–1209.
41. Botz, B.; Bölskei, K.; Kereskai, L.; Kovács, M.; Németh, T.; Szigeti, K.; Horváth, I.; Máthé, D.; Kovács, N.; Hashimoto, H.; et al. Differential Regulatory Role of Pituitary Adenylate Cyclase–Activating Polypeptide in the Serum-Transfer Arthritis Model. *Arthritis & Rheumatology* **2014**, *66*, 2739–2750.
42. Imai, Y.; Ibata, I.; Ito, D.; Ohsawa, K.; Kohsaka, S. A Novel Gene in the Major Histocompatibility Complex Class III Region Encoding an EF Hand Protein Expressed in a Monocytic Lineage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, *224*, 855–862.
43. Deininger, M.H.; Meyermann, R.; Schluesener, H.J. The Allograft Inflammatory Factor-1 Family of Proteins. *FEBS Letters* **2002**, *514*, 115–121.
44. Borbély, É.; Hunyady, Á.; Pohóczky, K.; Payrits, M.; Botz, B.; Mócsai, A.; Berger, A.; Szőke, É.; Helyes, Z. Hemokinin-1 as a Mediator of Arthritis-Related Pain via Direct Activation of Primary Sensory Neurons. *Front. Pharmacol.* **2021**, *11*, 594479.
45. Giorgi, S.; Nikolaeva-Koleva, M.; Alarcón-Alarcón, D.; Butrón, L.; González-Rodríguez, S. Is TRPA1 Burning Down TRPV1 as Druggable Target for the Treatment of Chronic Pain? *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 2906.

46. De Logu, F.; Nassini, R.; Materazzi, S.; Carvalho Gonçalves, M.; Nosi, D.; Rossi Degl'Innocenti, D.; Marone, I.M.; Ferreira, J.; Li Puma, S.; Benemei, S.; et al. Schwann Cell TRPA1 Mediates Neuroinflammation That Sustains Macrophage-Dependent Neuropathic Pain in Mice. *Nat Commun* **2017**, *8*, 1887.
47. Faris, P.; Ferulli, F.; Vismara, M.; Tanzi, M.; Negri, S.; Rumolo, A.; Lefkimmiatis, K.; Maestri, M.; Shekha, M.; Pedrazzoli, P.; et al. Hydrogen Sulfide-Evoked Intracellular Ca²⁺ Signals in Primary Cultures of Metastatic Colorectal Cancer Cells. *Cancers* **2020**, *12*, 3338.
48. Szolcsanyi, J.; Pinter, E.; Helyes, Z.; Petho, G. Inhibition of the Function of TRPV1-Expressing Nociceptive Sensory Neurons by Somatostatin 4 Receptor Agonism: Mechanism and Therapeutical Implications. *CTMC* **2011**, *11*, 2253–2263.
49. Bártai, I.Z.; Horváth, Á.; Pintér, E.; Helyes, Z.; Pozsgai, G. Role of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Ion Channel and Somatostatin Sst4 Receptor in the Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Sodium Polysulfide and Dimethyl Trisulfide. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2018**, *9*, 55.
50. Bártai, I.Z.; Sár, C.P.; Horváth, Á.; Borbély, É.; Bölcskei, K.; Kemény, Á.; Sándor, Z.; Nemes, B.; Helyes, Z.; Perkecz, A.; et al. TRPA1 Ion Channel Determines Beneficial and Detrimental Effects of GYY4137 in Murine Serum-Transfer Arthritis. *Front Pharmacol* **2019**, *10*, 964.
51. Hatano, N.; Matsubara, M.; Suzuki, H.; Muraki, Y.; Muraki, K. HIF-1 α Dependent Upregulation of ZIP8, ZIP14, and TRPA1 Modify Intracellular Zn²⁺ Accumulation in Inflammatory Synoviocytes. *IJMS* **2021**, *22*, 6349.
52. Yin, S.; Wang, P.; Xing, R.; Zhao, L.; Li, X.; Zhang, L.; Xiao, Y. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Mediates Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammatory Responses in Primary Human Osteoarthritic Fibroblast-Like Synoviocytes. *Inflammation* **2018**, *41*, 700–709.
53. Yap, J.M.G.; Ueda, T.; Kanemitsu, Y.; Takeda, N.; Fukumitsu, K.; Fukuda, S.; Uemura, T.; Tajiri, T.; Ohkubo, H.; Maeno, K.; et al. AITC Inhibits Fibroblast-Myofibroblast Transition via TRPA1-Independent MAPK and NRF2/HO-1 Pathways and Reverses Corticosteroids Insensitivity in Human Lung Fibroblasts. *Respiratory Research* **2021**, *22*, 51.

54. Lowin, T.; Pongratz, G.; Straub, R.H. The Synthetic Cannabinoid WIN55,212-2 Mesylate Decreases the Production of Inflammatory Mediators in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts by Activating CB2, TRPV1, TRPA1 and yet Unidentified Receptor Targets. *Journal of Inflammation* **2016**, *13*, 15.
55. Sieghart, D.; Liszt, M.; Wanivenhaus, A.; Bröll, H.; Kiener, H.; Klösch, B.; Steiner, G. Hydrogen Sulphide Decreases IL -1 β -induced Activation of Fibroblast-like Synoviocytes from Patients with Osteoarthritis. *J. Cell. Mol. Med.* **2015**, *19*, 187–197.
56. Kloesch, B.; Liszt, M.; Broell, J. H₂S Transiently Blocks IL-6 Expression in Rheumatoid Arthritic Fibroblast-like Synoviocytes and Deactivates P44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Cell. Biol. Int.* **2010**, *34*, 477–484.
57. Wu, W.-J.; Jia, W.-W.; Liu, X.-H.; Pan, L.-L.; Zhang, Q.-Y.; Yang, D.; Shen, X.-Y.; Liu, L.; Zhu, Y.Z. S-Propargyl-Cysteine Attenuates Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis by Modulating the Nrf2-ARE Signaling Pathway. *Redox Biology* **2016**, *10*, 157–167.
58. Liang, J.J.; Li, H.R.; Chen, Y.; Zhang, C.; Chen, D.G.; Liang, Z.C.; Shi, Y.Q.; Zhang, L.L.; Xin, L.; Zhao, D.B. Diallyl Trisulfide Can Induce Fibroblast-like Synovial Apoptosis and Has a Therapeutic Effect on Collagen-Induced Arthritis in Mice via Blocking NF- κ B and Wnt Pathways. *International Immunopharmacology* **2019**, *71*, 132–138.
59. Nummenmaa, E.; Hämäläinen, M.; Moilanen, L.J.; Paukkeri, E.-L.; Nieminen, R.M.; Moilanen, T.; Vuolteenaho, K.; Moilanen, E. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Is Functionally Expressed in Primary Human Osteoarthritic Chondrocytes. *Arthritis Res Ther* **2016**, *18*, 185.
60. Nummenmaa, E.; Hämäläinen, M.; Pemmari, A.; Moilanen, L.J.; Tuure, L.; Nieminen, R.M.; Moilanen, T.; Vuolteenaho, K.; Moilanen, E. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Is Involved in Upregulating Interleukin-6 Expression in Osteoarthritic Chondrocyte Models. *IJMS* **2020**, *22*, 87.
61. Ueda, H.; Neyama, H.; Nagai, J.; Matsushita, Y.; Tsukahara, T.; Tsukahara, R. Involvement of Lysophosphatidic Acid-Induced Astrocyte Activation Underlying the Maintenance of Partial Sciatic Nerve Injury-Induced Neuropathic Pain. *PAIN* **2018**, *159*, 2170–2178.

62. Yamagata, R.; Nemoto, W.; Nakagawasai, O.; Hung, W.-Y.; Shima, K.; Endo, Y.; Tan-No, K. Etidronate Attenuates Tactile Allodynia by Spinal ATP Release Inhibition in Mice with Partial Sciatic Nerve Ligation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **2019**, *392*, 349–357.
63. Hunyady, Á.; Hajna, Z.; Gubányi, T.; Scheich, B.; Kemény, Á.; Gaszner, B.; Borbély, É.; Helyes, Z. Hemokinin-1 Is an Important Mediator of Pain in Mouse Models of Neuropathic and Inflammatory Mechanisms. *Brain Research Bulletin* **2019**, *147*, 165–173.
64. Zhang, T.; Ono, K.; Tsutsuki, H.; Ihara, H.; Islam, W.; Akaike, T.; Sawa, T. Enhanced Cellular Polysulfides Negatively Regulate TLR4 Signaling and Mitigate Lethal Endotoxin Shock. *Cell Chemical Biology* **2019**, *26*, 686-698.e4.
65. Huang, Y.; Zhang, X.; He, N.; Wang, Y.; Kang, Q.; Shen, D.; Yu, F.; Chen, L. Imaging of Anti-Inflammatory Effects of HNO via a near-Infrared Fluorescent Probe in Cells and in Rat Gouty Arthritis Model. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 305–313.
66. Lee, H.H.; Jeong, J.-W.; Hong, S.H.; Park, C.; Kim, B.W.; Choi, and Y.H. Diallyl Trisulfide Suppresses the Production of Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Mediators in BV2 Microglia by Decreasing the NF-κB Pathway Activity Associated With Toll-like Receptor 4 and CXCL12/CXCR4 Pathway Blockade. *Journal of Cancer Prevention* **2018**, *23*, 134–140.
67. Braunstein, I.; Engelman, R.; Yitzhaki, O.; Ziv, T.; Galardon, E.; Benhar, M. Opposing Effects of Polysulfides and Thioredoxin on Apoptosis through Caspase Persulfidation. *Journal of Biological Chemistry* **2020**, *295*, 3590–3600.
68. Greiner, R.; Pálinkás, Z.; Bäsell, K.; Becher, D.; Antelmann, H.; Nagy, P.; Dick, T.P. Polysulfides Link H₂S to Protein Thiol Oxidation. *Antioxid Redox Signal* **2013**, *19*, 1749–1765.
69. Kántás, B.; Börzsei, R.; Szőke, É.; Bánhegyi, P.; Horváth, Á.; Hunyady, Á.; Borbély, É.; Hetényi, C.; Pintér, E.; Helyes, Z. Novel Drug-Like Somatostatin Receptor 4 Agonists Are Potential Analgesics for Neuropathic Pain. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 6245.
70. Sándor, K.; Elekes, K.; Szabó, Á.; Pintér, E.; Engström, M.; Wurster, S.; Szolcsányi, J.; Helyes, Z. Analgesic Effects of the Somatostatin Sst4 Receptor Selective Agonist J-2156 in Acute and Chronic Pain Models. *European Journal of Pharmacology* **2006**, *539*, 71–75.
71. Christensen, A.D.; Haase, C.; Cook, A.D.; Hamilton, J.A. K/BxN Serum-Transfer Arthritis as a Model for Human Inflammatory Arthritis. *Front. Immunol.* **2016**, *7*.

72. Kiss, L.; Bocsik, A.; Walter, F.R.; Ross, J.; Brown, D.; Mendenhall, B.A.; Crews, S.R.; Lowry, J.; Coronado, V.; Thompson, D.E.; et al. From the Cover: In Vitro and In Vivo Blood-Brain Barrier Penetration Studies with the Novel Cyanide Antidote Candidate Dimethyl Trisulfide in Mice. *Toxicol Sci* **2017**, *160*, 398–407.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

Az értekezés alapját képező eredeti közlemények

Dombi, Ágnes; Sánta, Csenge; Bártai, István Z.; Kormos, Viktória; Kecskés, Angéla; Tékus, Valéria; Pohóczky, Krisztina; Bölcskei, Kata; Pintér, Erika; Pozsgai, Gábor

Dimethyl Trisulfide Diminishes Traumatic Neuropathic Pain Acting on TRPA1 Receptors in Mice. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 7 Paper: 3363, 16 p. (2021) **(IF: 6,208)**

Bártai, István Z; **Dombi, Ágnes**; Borbély, Éva; Fehér, Ádám; Papp, Ferenc; Varga, Zoltan; Mócsai, Attila; Helyes, Zsuzsanna; Pintér, Erika; Pozsgai, Gábor

Investigation of the Role of the TRPA1 Ion Channel in Conveying the Effect of Dimethyl Trisulfide on Vascular and Histological Changes in Serum-Transfer Arthritis. *Pharmaceuticals* 15: 6 Paper: 671, 15 p. (2022) **(IF: 5,215)**

Egyéb teljes közlemény

Balázs, Orsolya ; **Dombi, Ágnes** ; Zsidó, Balázs Z ; Hetényi, Csaba ; Valentová, Kateřina ; Vida, Róbert G ; Poór, Miklós

Inhibition of xanthine oxidase-catalyzed xanthine and 6-mercaptopurine oxidation by luteolin, naringenin, myricetin, ampelopsin and their conjugated metabolites. *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY* 167 Paper: 115548 , 10 p. (2023)

(IF: 7,5)

Balázs, Orsolya ; **Dombi, Ágnes** ; Zsidó, Balázs Zoltán ; Hetényi, Csaba ; Vida, Róbert György ; Poór, Miklós

Probing the Interactions of 31 Mycotoxins with Xanthine Oxidase: Alternariol, Alternariol-3-Sulfate, and α -Zearalenol Are Allosteric Inhibitors of the Enzyme *TOXINS* 15 : 4 Paper: 250 , 14 p. (2023) **(IF: 4,2)**

Fliszár-Nyúl, Eszter ; Ungvári, Orsolya ; **Dombi, Ágnes** ; Özvegy-Laczka, Csilla ; Poór, Miklós
Interactions of Mycotoxin Alternariol with Cytochrome P450 Enzymes and OATP Transporters *METABOLITES* 13 : 1 Paper: 45 , 11 p. (2023) **(IF: 4,1)**

Orján, Erik Márk ; Kormányos, Eszter Sára ; Fűr, Gabriella Mihalekné ; **Dombi, Ágnes** ; Bálint, Emese Réka ; Balla, Zsolt ; Balog, Beáta Adél ; Dágó, Ágnes ; Totonji, Ahmad ; Bártai, Zoárd István et al.

The anti-inflammatory effect of dimethyl trisulfide in experimental acute pancreatitis
SCIENTIFIC REPORTS 13 : 1 Paper: 16813 (2023) **(IF: 4,6)**

Poór, Miklós ; Lemli, Beáta ; Vilmányi, Péter ; **Dombi, Ágnes** ; Nagymihály, Zoltán ; Both, Eszter Borbála ; Lambert, Nándor ; Czömpöly, Tamás ; Szenté, Lajos

Probing Serum Albumins and Cyclodextrins as Binders of the Mycotoxin Metabolites Alternariol-3-Glucoside, Alternariol-9-Monomethylether-3-Glucoside, and Zearalenone-14-Glucuronide METABOLITES 13 : 3 Paper: 446 , 15 p. (2023)

(IF: 4,1)

László, Szabolcs ; Bártai, István Z ; Berkó, Szilvia ; Csányi, Erzsébet ; **Dombi, Ágnes** ; Pozsgai, Gábor ; Bölcskei, Kata ; Botz, Lajos ; Wagner, Ödön ; Pintér, Erika Development of Capsaicin-Containing Analgesic Silicone-Based Transdermal Patches PHARMACEUTICALS 15 : 10 Paper: 1279 , 17 p. (2022) **(IF: 4,6)**

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Pozsgai Gábornak a munkám során nyújtott magas szintű szakmai segítségéért és a tudományos életben való iránymutatásáért.

Köszönöm Prof. Dr. Pintér Erikának, hogy helyet és lehetőséget biztosított kutatásom elvégzéséhez. Köszönöm neki továbbá kivételes emberi hozzáállását és személyes támogatását.

Köszönettel tartozok Dr. Bárti István Zoárdnak, hogy bevezetett az állatkísérletek világába, türelmével és támogatásával segített elsajátítani a munkánk során alkalmazott laboratóriumi módszereket.

Köszönöm családomnak és barátaimnak a sok bátorítást és ösztönzést, amikkel az egész folyamat során kitartásra sarkalltak.

Köszönöm a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden dolgozójának az odaadó segítséget, külön köszönet Bagoly Teréznek és Sánta Csengének az állatkísérletek során nyújtott pótolhatatlan munkájukért és baráti támogatásukért.