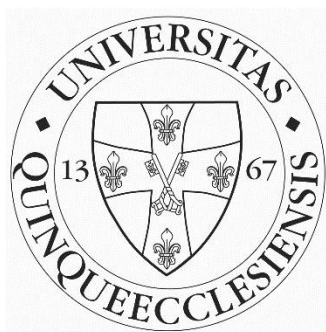


**SZENZOROS-IMMUN INTERAKCIÓK VIZSGÁLATA
VASZKULÁRIS, RESPIRATORIKUS ÉS METABOLIKUS
MECHANIZMUSOKBAN**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei



DR. HAJNA ZSÓFIA RÉKA

**Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Neurofarmakológia Program**

A Doktori Iskola vezetője és programvezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezetők: Prof. Dr. Pintér Erika, Prof. Dr. Biró Zsolt

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

2017

BEVEZETÉS

1. A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés és a neurogén gyulladás

A kapszaicin-érzékeny érzőidegek csoportját a hátsó gyöki és trigeminus ganglionok olyan neuronjai alkotják, amelyek expresszálják a Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1) receptort. Ezek a polimodális nociceptorok egyedülálló módon „hármasként” rendelkeznek (Szolcsányi, 1996). *Klasszikus afferens* funkciójuk a nociceptív ingerek továbbítása a központi idegrendszer felé, melynek eredményeként létrejön a fájdalomérzet. A *lokális efferens* hatásként kialakuló **neurogén gyulladás** során az idegvégződésekből felszabaduló proinflammatorikus neuropeptidok (kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), tachykininek) hatására értágulat, plazmafehérje kiáramlás és gyulladásos sejtaktiváció jön létre (Szolcsányi, 1988). A *szisztémás efferens* funkciónak köszönhetően az idegvégződésekből antiinflammatorikus neuropeptidok (pl. szomatosztatin, PACAP) is felszabadulnak, melyek a vérkeringéssel a test távolabbi pontjaira eljutva gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatásokat fejtenek ki (Szolcsányi és mtsai., 1998). A TRPV1 egy polimodális kationcsatorna, amelyet mind a fájdalmas hőinger ($>43^{\circ}\text{C}$), mind az alacsony szöveti pH-t előidéző proton-koncentráció ($\text{pH}<6$) képes megnyitni (Tominaga és mtsai., 1998). Ezen kívül növényi vanilloidok (pl. kapszaicin, reziniferatoxin), ill. a szervezetben endogén módon képződő vegyületek is aktiválhatják az ioncsatornát (pl. anandamid, ill. arachidonsav metabolitok) (Yoo és mtsai., 2014). Más vegyületek (pl. bradykinin, prosztaglandinok) a saját receptoraikon hatva érzékenyíteni képesek a TRPV1-t (Szallasi és mtsai., 2007). A receptor aktivációja nyomán létrejövő Na^+ -beáramlás membrándepolarizációhoz és akciós potenciál kialakulásához vezet, a Ca^{2+} -influx pedig az idegvégződésből történő szenzoros neuropeptid felszabadulást idéz elő.

2. A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) receptor

Szintén a kapszaicin-szenzitív szenzoros neuronokon expresszálódik a TRP receptorcsalád másik tagja, a Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) (Jaquemar és mtsai., 1999). A TRPA1 jelentős mértékben koexpresszálódik a TRPV1 receptorral, a CGRP-vel és a P-anyaggal (SP) (Julius, 2013; Chen és mtsai., 2012). Az utóbbi években a TRPA1 nem neurális expresszióját is leírták, így megtalálható pl. fibroblasztokon, keratinocitákon, makrofágokon és az agyi artériák endotélsejtjein is (Fernandes és mtsai., 2012). A TRPA1 exogén aktivátorai részben növényi eredetű vegyületek, pl. a mustárolaj csípős anyaga, az allilizotiocianát (AITC), és a fahéjaldehid (Jordt és mtsai., 2004; Macpherson és mtsai., 2006), részben mérgező gázok, pl. a dohányfüstben megtalálható krotonaldehid és akrolein (Bautista és mtsai., 2006; André és mtsai., 2008). Ezen kívül számos olyan, a szervezetben endogén úton képződő vegyületet is ismerünk, amelyek aktiválják a TRPA1-t, pl. reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) és különböző lipidperoxidációs termékek (pl. 4-hidroxinonenal (HNE), 4-oxo-2-nonenal (4-ONE); Trevisani és mtsai., 2007; Graepel és mtsai., 2011). A receptor fizikai aktivátorai között felvetődött egyrészt a mechanikai stimulusk, másrészt a fájdalmas hideg

(<17°C) szerepe is (Story és mtsai., 2003; Jordt és mtsai., 2004; Brierley és mtsai., 2011). A TRPA1 egy ligand-függő nem-szelektív kationcsatorna, melynek aktivációja során az N-terminális régió cisztein oldalláncaihoz kötődő vegyületek a receptor konformációváltozását és a csatorna nyílását okozzák, melyet a sejtmembrán depolarizációja és az intracelluláris Ca²⁺-szint megemelkedése követ (Macpherson és mtsai., 2007; Chen és Hackos, 2015). A TRPA1 aktiváció nyomán felszabaduló SP és CGRP neurogén gyulladást hoznak létre (Trevisani és mtsai., 2007). A TRPA1 agonistái közül a fahéjaldehid és az akrolein, ill. a 4-ONE is képes vazodilatációt előidézni (Pozsgai és mtsai., 2010; Kunkler és mtsai., 2011; Graepel és mtsai., 2011), sőt, a TRPA1 kulcsszerepet játszik a hideg-indukálta vaszkuláris válaszreakció kialakulásában is (Aubdool és mtsai., 2014). Mindezek ellenére a TRPA1 aktiváció vazodilatátor hatásának részletes mechanizmusai még pontosan nem ismertek (Earley, 2012). A TRPA1 ezen kívül fontos szerepet játszik a légúti irritánsokra adott élettani válaszreakciók kialakulásában (Bessac és Jordt, 2008). A toxikus vegyületek akut inhalációja protektív légúti reflexeket vált ki (pl. köhögés), azonban a jellemzően gyulladással járó folyamatok során termelődő endogén ágensek a receptor aktivációja révén neurotranszmittereket és citokineket szabadítanak fel (Chen és mtsai., 2012). A TRPA1 közvetítő szerepét ezen kívül bakteriális endotoxinok által kiváltott hatásokban is leírták (Meseguer és mtsai., 2014). Mindezek alapján a TRPA1 receptor szerepének vizsgálata indokolt nem csak a lokális mikrocirkulációban, de a légzőrendszer akut és krónikus gyulladással járó folyamataiban egyaránt.

3. A kapszaicin-érzékeny rostokból felszabaduló neuropeptidek: a CGRP és a tachykininek

A **CGRP** egy 37 aminosavból álló peptid, amelynek két izoformája létezik: a perifériás és a központi idegrendszerben előforduló α -CGRP, valamint az enterális idegrendszerben megtalálható β -CGRP, de expresszióját nem neuronális sejtekben, így például immun- és endotélsejtekben is leírták (Russell és mtsai., 2014). A CGRP receptorát két peptid molekula heterodimer komplexe alkotja (CLR-RAMP1) (Barwell és mtsai., 2012). A hátsó gyöki ganglionsejtek ill. trigeminális neuronok perifériás végződéseiből stimuláció hatására felszabaduló CGRP elsősorban a mikrocirkuláció szabályozásában vesz részt. A CGRP extrémén potens vazodilatátor molekula, mely hatásának fő anatómiai célpontjai a bőr és a trigeminovaszkuláris rendszer érhálózat (Brain and Cox, 2006).

A **tachykininek** családjába tartozik a Tac1 gén által kódolt SP és neurokinin A (NKA), a Tac3 által kódolt neurokinin B (NKB), ill. a Tac4 által kódolt hemokininek és endokininek (Steinhoff és mtsai., 2014). A tachykininek hatásait három G-protein-kötött receptor közvetíti: a neurokinin 1 (NK₁), a neurokinin 2 (NK₂) és a neurokinin 3 (NK₃) receptorok. Ezek közül az SP legnagyobb affinitással az NK₁, az NKA főként az NK₂, míg az NKB leginkább az NK₃ receptorokhoz kapcsolódik (Maggi, 1995). A főként a kapszaicin-érzékeny primer afferenseken expresszálandó, de különböző immunsejtekben is megtalálható SP legismertebb centrális hatása a fájdalomérzet modulációja (Zubrzycka és Janecka, 2000). Perifériás hatásai közül legfontosabb a neurogén gyulladás során kialakuló plazmaprotein extravazáció, leukocita infiltráció és hízósejt degranuláció (Grant, 2002),

ami az endotél-, ill. gyulladásozó sejteken expresszáló NK₁ receptorok aktivációján keresztül valósul meg (Cao és mtsai., 1999). Az NKA plazmafehérje extravazációt, simaizomkontrakciót és gyulladásozó sejtaktivációt okoz (de Swert és Joos, 2006). A 2000-ben klónozóó Tac4 gén a különböző fajokban több, egymással rokon peptidet kódol: egérben és patkányban a hemokinin-1-et (HK-1), emberben pedig a humán HK-1-et (hHK-1) és az endokinineket (EKA, EKB, EKC, EKD) (Zhang és mtsai., 2000, Page, 2004). A HK-1 legnagyobb affinitással az NK₁ receptorhoz kapcsolódik (Bellucci és mtsai., 2002), ráadásul szerkezetileg is nagyon hasonló a SP-hoz. Ez utóbbi eredménye, hogy erős immunológiai keresztreakcióba lép különböző SP ellenes antitestekkel (Page, 2004). Mindezek ellenére a HK-1 hatásai sok esetben eltérőek a SP-étől, melynek magyarázatául szolgálhat az a feltételezés, mely szerint a HK-1 hatásainak egy részéért valószínűleg nem az NK₁ receptor felelős (Endo és mtsai., 2006). A klasszikus tachykininokkal ellentétben a HK-1 elsősorban nem neurális szövetekben expresszálóó (Duffy és mtsai., 2003), így megtalálható pl. B- és T-sejtekben, makrofágokban és dendritikus sejtekben is, melynek alapján feltételezhető, hogy fontos szerepet játszik különböző gyulladásozó folyamatokban. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint a SP és az NKA fontos szerepet játszanak az akut légúti gyulladás kialakulásában (Helyes és mtsai, 2010), ugyanakkor ismert, hogy a Tac4 gén sokkal nagyobb mértékben expresszálóó a tüdőben, mint a Tac1 (Duffy és mtsai., 2003). Mivel a SP és a HK-1 közötti strukturális és immunológiai hasonlóság nagymértékben megnehezíti az egyes peptidok saját funkciójának elkülönítését, joggal merül fel annak lehetősége, hogy a tachykininok által a légutakban kifejtett gyulladásozó hatások kórélettani mechanizmusában a hemokininok és endokininok alkotják a hiányzó láncszemet.

4. A hidrogén-szulfid és a kapszaicin-érzékeeny érzőideg-végződések kapcsolata

A hidrogén-szulfid (H₂S) az emlős szervezetben megtalálható harmadik ismert gázmediátor a nitrogén-monoxid (NO) és a szén-monoxid (CO) mellett (Wang R, 2012). Az utóbbi években egyre több adat jelent meg a H₂S biológiai szerepeit illetően, így kiderült, hogy szabályozó funkcióval rendelkezik többek között a kardiovaszkuláris rendszerben, valamint gyulladásozó folyamatokban is (Kimura, 2014). Ugyan a H₂S molekuláris célpontjai még nem teljesen tisztázottak, az általa kiváltott vazodilatáció feltételezett mechanizmusai között felmerült a különböző ioncsatornák (pl. K⁺_{ATP}-csatornák) szerepe (Liang és mtsai., 2011). A H₂S és a kapszaicin-szenzitív szenzoros neuronok kapcsolatát először tüdőben mutatták ki (Prior és mtsai, 1990). Később kiderült, hogy peptiderg primer afferensek a H₂S simaizomszövetben kifejtett hatásaiban is szerepet játszanak, melyet egyrészt a vizeletelvezető rendszerben (Patacchini és mtsai., 2004), másrészt izolált patkány mezenterialis artériákban írtak le (White és mtsai., 2013). Mivel *in vitro* kísérletek során a TRPA1-t expresszáló CHO sejtekben H₂S-stimulusra Ca²⁺-jelet tudtak kimutatni (Streng és mtsai, 2008), ill. hátsó gyöki ganglion (DRG) sejtekben a [Ca²⁺]_i emelkedése elmaradt a szelektív TRPA1 receptor antagonista alkalmazása esetén (Miyamoto és mtsai, 2011), ezért felvetődött, hogy a kapszaicin-érzékeeny szenzoros rostok és az azokon kifejezőó TRPA1 ioncsatorna a H₂S hatásainak lehetséges mediátorai.

5. A diabétesz mellitusz krónikus szövődményei és a peptiderg primer afferensek kapcsolata, valamint a komplikációk megfelelő modellezésének problémái

2015-ben kb. 415 millió ember szenvedett diabétesz mellituszban a világon. A páciensek kb. egyharmadában alakul ki diabéteszes neuropátia (DN), ill. diabéteszes nefropátia (DNP), ez utóbbi a krónikus vesebetegség vezető oka (Reutens és Atkins, 2011). A diabéteszes retinopátia (DR) a betegek 50-75%-ában fordul elő, és kialakulása szoros összefüggésben áll mind a diabétesz fennállásának időtartamával, mind a rossz glikémiás kontrollal (Yau és mtsai., 2012). A kapszaicin-szenzitív primer afferenseken expresszáldó TRPV1 és TRPA1, ill. az idegvégződésekből felszabaduló SP és NKA fontos szerepet játsznak a diabéteszt kísérő neuropatiás fájdalom szindrómákban (Coudoré-Civiale és mtsai., 2000; Bölcskei és mtsai., 2005; Koivisto és mtsai., 2012). Ezen kívül bizonyos TRP ioncsatornák, ill. az idegvégződésekből felszabaduló PACAP jelentőségét a DNP kórélettani mechanizmusában is leírták (Colsoul és mtsai., 2013; Bánki és mtsai., 2013). A DR kialakulása során feltehetően mind a SP és a CGRP, mind a szomatosztatin és a PACAP fontos szereppel bír (Yang és mtsai., 2013a,b; Szabadfi és mtsai., 2014). A diabétesz krónikus szövődményeinek kezelésére szolgáló gyógyszerek preklinikai fejlesztése során nagy szükség van olyan megbízható állatmodellekre, amelyek korrelálnak a humán betegségben észlelhető elváltozásokkal. Az irodalomban leggyakrabban használt kísérleti modellek legfőbb hátránya, hogy az antidiabetikus terápia teljes hiányában a kísérleti állatok rendkívül gyenge fizikális státusza igen gyors állapotromláshoz, valamint ebből következően nagyon rövid túlélési időhöz vezet (Chen és mtsai., 2005). Ahhoz, hogy funkcionálisan és morfológiailag észlelhető diabétesz-függő szövődmények kialakuljanak, olyan kísérleti elrendezés szükséges, amely az állatok tolerálható fizikális állapota mellett kellő ideig fenntartható. A diabétesz krónikus szövődmények kialakulásának másik rizikófaktora a hiperglikémia súlyossága (Calcutt, 2004). A bőr alá beültethető, folyamatos adagolást biztosító inzulinpumpák alkalmazása lehetővé teszi, hogy glikémiás állapotok egész skáláját létrehozva vizsgáljuk a krónikus hiperglikémia-függő elváltozásokat.

6. A szenzoros-immun interakciók jelentősége különböző szervrendszerek megbetegedéseiben

Az ideg- és immunrendszer működése közötti interakciók rendellenességeit eddig főként neurológiai és autoimmun betegségekben vizsgálták, így pl. ismert, hogy a neurogén gyulladás számos betegség kialakulásában fontos szerepet játszik (migrén, reumatoid arthritisz, allergiás kontakt dermatitisz, ill. gyulladásoos bélbetegségek; Pintér és mtsai., 2014). Egyre több adat szól ugyanakkor amellet, hogy a szenzoros-immun interakciók a bőr lokális vaszkuláris betegségei (Aubdool és Brain, 2011), a légzőrendszer akut és krónikus megbetegedései (Otmishi és mtsai, 2008), ill. a diabéteszes neuropátia és retinopátia (Bennett, 1999; Yu és mtsai., 2015) kialakulásához is hozzájárulnak.

CÉLKITŰZÉSEK

Tekintettel arra, hogy a kapszaicin-érzékeny primer afferensek, továbbá a neuronális és nem-neuronális struktúrákon megtalálható TRP ioncsatornák és neuropeptidek fontos szerepet játszhatnak a különböző keringési, légúti és metabolikus megbetegedésekben, illetve ezáltal potenciális farmakológiai célpontokként szolgálhatnak, fontosnak tartottuk ezen mechanizmusok állatkísérletes modellezését és *in vivo* vizsgálatát.

PhD-munkám célkitűzései ezért a következők voltak:

- I. A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés szerepének meghatározása a H₂S által kiváltott vazodilatációs válaszban egérbőrben.
- II. A TRPA1 receptor szerepének analízise akut és krónikus légúti gyulladásos mechanizmusokban.
- III. A Tac4 gén által kódolt hemokinin-1 szerepének vizsgálata endotoxinnal kiváltott akut pneumonitisz modellben.
- IV. A diabétesz mikrovaskuláris és szenzoros szövődményeinek vizsgálatára alkalmas krónikus patkánymodell beállítása és optimalizálása.

KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok

A mikrocirkulációs vizsgálatokat Balb/c, C57Bl/6 (Charles-River, Magyarország) vad típusú, TRPA1 receptor génhiányos (TRPA1^{-/-}), TRPV1 receptor génhiányos (TRPV1^{-/-}, Jackson Laboratories, USA) és NK₁ receptor génhiányos (Tacr1^{-/-}), valamint α -CGRP vad típusú (α -CGRP^{+/+}) és α -CGRP génhiányos (α -CGRP^{-/-}) egereken végeztük. Az akut és krónikus légúti gyulladásmodellekben C57Bl/6, TRPA1^{+/+} vad típusú, illetve TRPA1^{-/-} és Tac4 génhiányos (Tac4^{-/-}) egereket használtunk. Munkacsoportunkkal történő kollaboráció keretén belül az eredeti TRPA1^{+/+} heterozigóta tenyészpárokot Prof. Pierangelo Geppetti (Firenze), míg a Tacr1^{-/-} egereket Prof. John Quinn (Liverpool), a Tac4^{-/-} egereket pedig Alexandra Berger (Toronto) bocsátotta rendelkezésünkre. A diabétesz indukciója Sprague-Dawley CFY patkányokon történt. Az állatok tenyésztése és tartása a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet Állatházában, a PTE ÁOK Központi Állatházában és a londoni King's College Állatházában történt 24-25°C-os állandó hőmérsékleten, 12 órás megvilágítás mellett, normál étellel és vízzel korlátlanul ellátva.

2. A mikrocirkuláció vizsgálata során alkalmazott protokollok és módszerek

2.1. RTX-deszenzibilizáció

A C57Bl/6 típusú egerek egy csoportját reziniferatoxinnal (RTX) kezeltük elő. Ennek során az állatok 5 egymást követő napon keresztül emelkedő dózisu (10, 20, 30, 70 és 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c.) RTX-t kaptak, mellyel a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződéseket testszerte működés-képtelenné tettük (deszenzibilizáció). Az RTX-deszenzibilizáció eredményességét 14 nappal később 50 μl 0.1%-os kapszaicin oldat szembe cseppentésével ellenőriztük ("wiping test").

2.2. A H₂S hatásaiban részt vevő molekuláris mediátorok vizsgálata genetikai és farmakológiai módszerekkel

A TRPA1^{-/-}, TRPV1^{-/-}, α -CGRP^{-/-}, illetve NK₁ receptorral nem rendelkező Tacr1^{-/-} egerek eredményeit vad típusú társaikkal hasonlítottuk össze. A szelektív TRPA1 receptor antagonistá HC-030031-et (30-100 mg/kg, i.p.), a CGRP receptor antagonistá BIBN4096-ot (0.1-10 mg/kg, i.p.), az NK₁ receptor antagonistá CP99994-et (10-50 mg/kg, i.p.), az utóbbi kettő kombinációját, ill. a K⁺ATP-csatorna blokkoló glibenklamidot (50 mg/kg, i.p.) Balb/c egereknek adtuk be 30 perccel a NaHS lokális alkalmazása előtt, a kezelésekek eredményeit a vehiculummal kezelt csoportéhoz hasonlítottuk.

2.3. A bőr véráramlásának vizsgálata egérfülön

A mikrocirkuláció *in vivo* vizsgálatát lézer Doppler képalkotó technika segítségével végeztük (Periscan PIM-II; FLPI). A ketamin-xilazinnal (100 mg/kg, 5 mg/kg, s.c.) elaltatott állatról készült perfúziós felvételeken a különböző véráramlású területeket eltérő színkódok jelölik. A három kontroll felvételek készítése után a jobb fület NaHS-dal, AITC-tal, NaOH-dal, NaSO₃-tal vagy NaCl-dal, míg a bal fület vehiculummal kentük be. Ezután a perfúzió mérését 50 perccel keresztül végeztük a NaHS, NaOH, NaSO₃ és NaCl esetében, ill. 30 perccel át az AITC esetében. A szkennelt területen belül kijelöltük a két fület („regions of interest”, ROIs), melyeken a kvantitatív méréseket végeztük: a mikrocirkuláció változását a kontroll véráramlás érték százalékában adtuk meg. A vizsgált bőrterület által a teljes mérési idő alatt adott érválasz meghatározásakor az időfüggést ábrázoló grafikonok görbe alatti területeit (area under the blood flow curves, AUCs) kvantifikáltuk.

2.4. A bőr vazodilatációjának kiváltása egérfülön

A vazodilatáció kiváltásához a jobb fül dorzális felszínét NaHS-dal (15 μl , 5%, pH=12.61, 1.25% metilcellulózban oldva) vagy AITC-tal (15 μl , 2%, folyékony paraffinban oldva) kezeltük. A pH és az ozmotikus hatások, mint esetleges befolyásoló tényezők kizárása érdekében a Balb/c egerek egy csoportjában a NaHS-oldat pH-jával megegyező pH-jú NaOH-oldattal (15 μl , 0.16%, pH=12.61), ill. a NaHS-oldat koncentrációjával megegyező sókoncentrációjú NaSO₃- (15 μl , 5%) és NaCl-oldatokkal (15 μl , 5%) kentük be az állatok jobb fület. Mindhárom anyagot 1.25% metilcellulózt tartalmazó fiziológiás sóoldatban oldottuk fel. A kezelésekeknek megfelelő vehiculummal bekent ellenoldali fülek kontrollként szolgáltak.

3. Az akut és krónikus légúti gyulladásmodellekben alkalmazott módszerek

3.1. Endotoxinnal kiváltott akut légúti gyulladásmodell

Az akut intersticiális pneumonitist 60 µl, 167 µg/ml koncentrációjú *Escherichia coli* (O83 szerotípus) endotoxin (lipopoliszacharid, LPS) intranazális (i.n.) alkalmazásával váltottuk ki éteres altatásban, míg az intakt egerek azonos mennyiségű steril foszfátpufferrel kiegészített fiziológiás sóoldatot (PBS) kaptak.

3.2. Dohányfüst expozícióval kiváltott krónikus légúti gyulladásmodell

A krónikus légúti gyulladást három hónapig tartó dohányoztatással váltottuk ki, melynek során az egereket naponta kétszer, hetente összesen tízszer Teague Enterprises dohányoztató kamrába helyeztük. A dohányoztatás egy-egy alkalommal a kutatási célokra kifejlesztett „3R4F Kentucky” cigaretta teljes leégése (10 perc) során képződő összes füst a dohányoztató kamrába áramlott, ahol az állatok 30 percet töltöttek a dohányfüstben (teljes test expozíció).

3.3. A légúti válaszkészség funkcionális vizsgálata

A légúti hiperreaktivitást éber állatokon mértük Buxco teljes test pletizmográfia. A muszkarin receptor agonista carbachol belélegeztetésével kiváltott légúti válaszkészség vizsgálata az endotoxin modellben 24 h-val a PBS/LPS alkalmazása után történt: a bronchokonstrikcióval és a következményes légúti ellenállással egyenesen arányos Penh (enhanced pause) értéket, ill. a légzésfrekvenciát (f) mértük. A dohányfüst expozíciós modellben havonta mértük a légzésfunkció változásait, melynek során a légzésfrekvenciát, a légzési térfogatot (tidal volume, TV), a kilégzés alatt elérhető maximális áramlási sebességet (peak expiratory flow, PEF) és a Penh-t határoztuk meg.

3.4. Bronchoalveoláris mosás

A dohányfüst expozíciós modellben a ketamin-xilazinnal elaltatott egerek tüdejét tracheakanülön keresztül adagolt 5x1 ml PBS oldattal átöblítettük. A visszanyert bronchoalveoláris mosófolyadék (BALF) minták sejtprofilját CyFlow Space flow citométerrel (Partec) határoztuk meg.

3.5. A tüdők fénymikroszkópos szövettani vizsgálata

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott tüdőmintákból készített metszeteket hematoxilin-eozinnal (HE) ill. perjódsvav-Schiff (PAS) reagenssel festettük. A gyulladásos elváltozások szemikvantitatív értékelését független patológus végezte előre meghatározott paraméterek alapján. Az egyes hisztopatológiai szempontokra adott értékeket összeadva kaptuk az összetett szövettani pontszámot.

3.6. Mieloperoxidáz (MPO) aktivitás meghatározása tüdőhomogenizátumból

A tüdőhomogenizátumoknak a neutrofil granulociták és a makrofágok mennyiségével korreláló MPO aktivitását spektrofotometriás módszer segítségével mértük.

3.7. *In vivo* mieloperoxidáz aktivitás mérés

A luminol analóg L-012-nek a pneumonitisz során kialakuló ROS/RNS termeléssel arányos biolumineszcenciáját IVIS Lumina II (PerkinElmer) műszerrel mértük 24 h-val a PBS/LPS beadása után. A kiértékelés során a ROI-kon belül mért lumineszcens jelintenzitást teljes radianciaként (foton flux/s) fejeztük ki.

3.8. A tüdők citokin koncentrációinak mérése

A -80°C-on tárolt tüdőmintákat homogenizáltuk, a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek koncentrációját Luminex xMAP technológia segítségével mértük, az eredményeket pedig pg/g nedves szövetben adtuk meg.

4. A diabétesz hosszú távú modellezése során alkalmazott protokollok és módszerek

4.1. A különböző súlyosságú diabéteszes állapotok beállítására szolgáló kezelési sémák

A diabéteszes állapotot 60 mg/kg streptozotocinnal (STZ, i.p.) váltottuk ki. A vércukor szinteket 48 h-val a STZ-injekció beadása után ellenőriztük, és a 14 mmol/l feletti vércukor szinttel rendelkező állatokat vontuk be a vizsgálatba. A diabéteszes állatokat négy csoportra osztottuk, melyek közül az (I)-(III) csoportok s.c. beültethető inzulin implantátumot (Linplant 2 NE/24 h, LinShin) kaptak. Az (I) csoport 1 + 1 db, a (II) csoport 1 + 0.5 db, míg a (III) csoport 0.5 + 0.5 db implantátumot kapott a kísérlet 1. és 9. hetében. A (IV) csoport állatainak másnaponta 2 NE Humulin N (i.p.) intermediér inzulint adtunk. A Kontroll állatok a vizsgálat kezdetén vehiculumot, azaz citrát puffert kaptak i.p., a továbbiakban pedig inzulint nem tartalmazó, placebo implantátumot (Palmitic Acid Micro Crystal) ültettünk be. A (IV) csoport állatainak vizsgálatát a diabétesz indukció után 12 hétig, a többi csoportét pedig 16 héten át tudtuk folytatni.

4.2. A vércukor szint és a testsúly, illetve a folyadék- és táplálékfogyasztás monitorozása

A vércukor szinteket a diabéteszes csoportokban hetente kétszer, a kontroll állatok esetében pedig havonta egyszer ellenőriztük. A farokvénából vett vérmintából Accu-Check Active vércukormérő segítségével határoztuk meg a vércukor értékét. A testsúlyváltozást a diabéteszes állatoknál hetente kétszer, míg a kontroll csoportban heti egyszer mértük. A testsúlyra vonatkoztatott táplálékfogyasztást hetente, a folyadékfogyasztást pedig naponta kontrolláltuk. Ezeket az *in vivo* adatokat a kísérleti periódus megkezdése előtt mért értékekhez hasonlítottuk.

4.3. Szemvizsgálat és oftalmoszkópia

A szemek ketamin-diazepam (30 mg/kg ill. 3 mg/kg) altatásban végzett *in vivo* vizsgálatához a pupillákat 5 mg/ml tropikamiddal tágítottuk ki. Az anterior szegmensről fényképfelvételeket készítettünk, a neovaszularizáció által érintett terület nagyságát pedig az elülső szegmens teljes területéhez viszonyítva számítottuk ki. A cornea szövettani vizsgálatához az eltávolított szemgolyót fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, a metszeteket pedig HE-nal festettük. A szem hátsó szegmensét egy számítógéphez csatlakoztatott indirekt binokuláris oftalmoszkóppal (IBO) vizsgáltuk (Optibrand Clear View, USA), a retina állapotának értékelését pedig egy szemikvantitatív skála (Total Retinal Score, TRS) segítségével végeztük el előre meghatározott paraméterek alapján. A TRS értékét az egyes paraméterek értékeinek összeadásával kaptuk meg.

4.4. A retina fénymikroszkópos szövettani és immunhisztokémiai vizsgálata

A paraformaldehidben fixált szemminták egy részéből műgyantába történő beágyazás után félvékony (2 µm) metszeteket készítettünk. A toluidinkékkel festett metszeteken a retina morfológiai analízisét végeztük el. A minták másik részén immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk, melyhez

anti-tirozin-hidroxiláz (TH), anti-gliális fibrilláris savas protein (GFAP) és anti-Brn3a ellenes antitesteket, illetve FITC-konjugált peanut agglutinint (PNA) használtunk. A mikroszkópos vizsgálat során készült felvételeket kvalitatíven és kvantitatíven értékeltük. A minták harmadik részén az apoptotikus sejtek arányát TUNEL-módszerrel határoztuk meg.

4.5. Vizeletvizsgálat

A vizeletminták gyűjtése során az állatokat metabolikus ketrecbe helyeztük. A mintavétel időtartama 16 h volt, melynek során táplálék nem, viszont ivóvíz korlátlan mennyiségben állt a vizsgált egyedek rendelkezésére. A mintákat szobahőmérsékleten centrifugáltuk (6000 rpm, 5 min), a felülúszókból pedig -20°C-on történt tárolás után a kreatinin és az összfehérje koncentrációját határoztuk meg.

4.6. A vesék fénymikroszkópos szövettani vizsgálata

A veseminták egy részét formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. A 3 µm vékony metszeteket HE-nal ill. PAS-reakcióval festettük meg. A mikroszkópos vizsgálatot követően a PAS-pozitív glomeruláris területnek a teljes glomeruláris területre vonatkoztatott arányát számítottuk ki. A minták másik részét abszolút alkoholban fixáltuk, és PAS-, majd emésztett PAS-reakcióval festettük a metszeteket. Ezzel a módszerrel a vesetubulusokban akkumulálódott glikogén mennyiségét (Armani-Ebstein jelenség) határoztuk meg.

4.7. A szemek és a vesék elektronmikroszkópos vizsgálata

A szem- és vesemintákat glutáraldehiddel kiegészített paraformaldehidben fixáltuk. Az OsO₄-ban történt utófixálást és a dehidrációt követően a mintákat műgyantába ágyasztuk, majd ultravékony (70 nm) metszeteket készítettünk, és Reynold-féle ólom-citráttal kontrasztoltuk. A elektronmikroszkóppal vizsgált metszetekről fényképfelvételeket készítettünk.

4.8. A mechanoszenzitivitás és a hidegérzékenység vizsgálata

A talp érintési érzékenységét Ugo Basile dinamikus plantáris eszteziométerrel határoztuk meg. Mivel ez a mechanikai hatás patkányokban alapvetően nem számít fájdalmas ingernek, ezért a mechanonociceptív küszöb csökkenésének ezt a fajtáját allodíniának nevezzük. A hátsó végtag nyomásérzékenységét Ugo Basile analgeziméterrel állapítottuk meg (Randall-Selitto teszt). Mivel ez a mechanikai hatás alapvetően is fájdalmas ingernek számít, ezért ebben az esetben a mechanonociceptív küszöb csökkenését hiperalgéziának tekintjük. A hidegérzékenység vizsgálata során jeget tartalmazó 0°C-os vízbe merítettük az állat hátsó végtagját vagy farkát, az allodínia mértékét pedig az elhárító reakció latenciaidejében fejeztük ki (ha az állat egyáltalán nem húzta el a lábát/farkát, a vizsgálatot maximum 180 mp-ig végeztük).

Statisztikai értékelés

A mikrocirkulációs vizsgálatok eredményeit párosítatlan t-próbával, ill. egyutas ANOVA-t követő Bonferroni poszt tesztel hasonlítottuk össze. A légzésfunkciós paraméterek, az MPO aktivitás, a totál flux értékek és a citokin koncentrációk értékelését egy- ill. kétutas ANOVA módszerrel, majd Bonferroni poszt tesztel végeztük. Az összetett szövettani pontszámokat Kruskal-Wallis próbával,

majd Dunn-féle poszt tesztel összehasonlítottuk össze. A diabéteszes állatok eredményeinek értékelését Bonferroni poszt tesztel kiegészített egyutas ANOVA módszerrel végeztük. Minden esetben a $p < 0.05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Etikai vonatkozások

Minden kísérleti eljárás megfelelt az állatok védelmére és kíméletére vonatkozó 1998/XXVIII. törvény, a 243/1998. számú kormányrendelet, ill. az Európai Parlament 2010/63/EU irányelveinek. A kísérleti eljárásokat a PTE Etikai Bizottsága, ill. a londoni King's College Állatvédelmi és Etikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszámok: BA 02/2000-2/2012, PPL No. 70/7959).

EREDMÉNYEK, MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

I. A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés, valamint az azokból felszabaduló szenzoros neuropeptidok szerepének vizsgálata H₂S-indukálta vazodilatációban

Eredmények

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés fontos szerepet játszanak a H₂S-, ill. az AITC-indukálta vazodilatációban

C57Bl/6 egerekben a NaHS folyamatosan fokozta a fülbőr vérátáramlását a vizsgálat teljes időtartama alatt (42%-os perfúzió fokozódás a 48. percben). Az RTX-deszenzibilizáció szignifikánsan csökkentette a NaHS vazodilatátor hatását: a teljes mérési periódus alatt adott érválasz 41.5%-al volt alacsonyabb. Az RTX-előkezelés az AITC-indukálta vazodilatációt is szignifikánsan csökkentette.

A TRPA1 és a TRPV1 receptorok eltérő szerepe a NaHS-dal, ill. az AITC-tal kiváltott vazodilatációban

A TRPA1^{-/-} egerekben a NaHS-dal kiváltott mikrocirkuláció fokozódás szignifikánsan alacsonyabb volt a C57Bl/6 csoporthoz képest: a teljes érválasz 47%-kal csökkent. Ezzel ellentétben a TRPV1^{-/-} és a C57Bl/6 egerek véráramlás változásai között nem volt különbség. Az AITC-tal kiváltott vazodilatáció a TRPA1^{-/-} csoportban teljes mértékben elmaradt, a TRPV1^{-/-} egerekben azonban gyakorlatilag megegyezett a C57Bl/6 csoportban tapasztaltakkal.

A TRPA1 receptor antagonistá gátolja a NaHS-dal ill. AITC-tal kiváltott vazorelaxációt

A NaHS a Balb/c egerekben nagyobb mértékű vazodilatációt eredményezett (67% a 48. percben), mint a C57Bl/6 csoportban. A HC-030031 szignifikánsan, koncentráció-függő módon csökkentette a véráramlás emelkedését. Az antagonistá két különböző dózisa 24.6%, ill. 51.4%-kal csökkentette a teljes érválaszt. A HC-030031 szignifikánsan csökkentette az AITC-indukálta vazodilatációt is.

A CGRP fontos szerepet játszik a H₂S-indukálta mikrocirkuláció fokozódásban

A NaHS-dal kiváltott perfúzió fokozódás az α -CGRP^{-/-} egerekben szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az α -CGRP^{+/+} állatoknál. A teljes érválasz 55.5%-al volt alacsonyabb az α -CGRP gén

hiányában. A BIBN4096 szignifikánsan, koncentráció-függő módon csökkentette a NaHS-dal kiváltott vazodilatációt: a 0.1 mg/kg-os dózisonál még csak tendenciaszerű, a magasabb dózisok (≥ 1 mg/kg) esetén viszont már szignifikáns mértékű volt a különbség.

Az NK₁ receptor aktivációja hozzájárul a H₂S által kiváltott vazodilatáció kialakulásához

A NaHS-dal kiváltott vazodilatáció szignifikánsan alacsonyabb volt a Tacr1^{-/-} egerekben, mint vad típusú társaiknál. A teljes érválasz 48.2%-al csökkent a Tacr1^{-/-} csoportban. A CP99994 szintén koncentráció-függő módon csökkentette a NaHS-dal kiváltott vazodilatációt: alacsonyabb dózisban (10 mg/kg) még nem, magasabb dózistartományban (≥ 25 mg/kg) azonban szignifikánsan csökkentette a vazodilatációt.

A CGRP és NK₁ receptorok egyidejű gátlásának hatása a H₂S-indukálta vazodilatációra

A BIBN4096-tal és a CP99994-el történő kombinált kezelés a NaHS-dal indukált vazodilatáció szignifikáns csökkenését eredményezte. A mikrocirkuláció fokozódás kezdeti szakasza az NK₁ receptor antagonistával történő gátlásnál tapasztaltakhoz volt hasonló, míg a reakció második szakasza inkább a CGRP antagonistával történő kezelés esetében látottakra hasonlított.

A K⁺_{ATP}-csatornák is szerepet játszanak a H₂S-indukálta vazodilatációban

A K⁺_{ATP}-csatorna blokkoló glibenklamid szignifikánsan csökkentette a NaHS-dal kiváltott véráramlás fokozódást. A vazodilatáció gátlásának kinetikája és mértéke hasonló volt a HC-030031-el kiváltott értágulat csökkenéshez.

A kémhatás és az ozmotikus nyomás nem befolyásolják a bőr mikrocirkulációját

A NaOH, a NaSO₃ és a NaCl mikrocirkulációra kifejtett hatása szignifikánsan kisebb volt a NaHS által kiváltott vazodilatációnál, és gyakorlatilag nem befolyásolta a fülbőr regionális véráramlását.

Megbeszélés és következtetés

Jelen kísérletsorozatunkkal egyértelmű *in vivo* bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a kapszaicin-szenzitív szenzoros neuronok kulcsszerepet játszanak a H₂S-indukálta vazodilatáció közvetítésében. A primer szenzoros rostoknak a H₂S által kiváltott vaszkuláris hatásokban betöltött szerepét White és mtsai. *in vitro* rendszerben vizsgálták (2013), izolált szerveken végzett kísérleteik pedig megerősítik az egér fülbőr mikrocirkulációs modellben kapott eredményeinket. Korábbi irodalmi adatok arra utaltak, hogy az idegvégződéseken expresszálandó TRPA1 receptor fontos szerepet játszik mind a neuronális vazodilatáció (Pozsgai és mtsai., 2010; Kunkler és mtsai., 2011; Aubdool és mtsai., 2014), mind az endotél-mediálta vazorelaxáció (Earley és mtsai., 2009) közvetítésében. Az, hogy a H₂S esetlegesen aktiválni képes a TRPA1-t, először *in vitro* kísérletek alapján merült fel (Streng és mtsai., 2008; Miyamoto és mtsai., 2011). Jelen eredményeinkkel *in vivo* igazoltuk, hogy a TRPA1 receptor fontos szerepet játszik az egér fülbőr mikrocirkulációjának H₂S által kiváltott fokozódásában, következésképpen a TRPA1 aktivációját a H₂S vazoaktív hatásainak fontos mediátoraként kell tekintenünk. A H₂S és a TRPA1 közötti kölcsönhatás molekuláris mechanizmusa lehet egyrészt az ioncsatorna cisztein oldalláncainak S-szulfhidrációja (Macpherson és mtsai., 2007; Mustafa és mtsai.,

2009), mely folyamat köztes mediátorai feltehetően a H₂S vizes oldataiban képződő poliszulfid vegyületek (Greiner és mtsai., 2013; Hatakeyama és mtsai., 2015). Másrészt a TRPA1 cisztein oldalláncai között kialakuló diszulfid-híd kötések, ill. az N-terminálison létrejövő konformációs változások feltehetően szintén hozzájárulnak a receptor aktiválódásához (Eberhardt és mtsai., 2014). A TRPV1 receptornak a H₂S-indukálta szenzoros neuron aktivációban betöltött szerepéről eddig ellentmondásos adatok álltak rendelkezésre (Trevisani és mtsai., 2005; Miyamoto és mtsai., 2011). Jelen kísérleteink szerint a vazodilatáció mértéke a TRPV1^{-/-} egerekben hasonló volt a vad típusú állatokban tapasztaltakhoz képest, mely alapján arra következtethetünk, hogy a TRPV1 receptor nem vesz részt a H₂S-dal kiváltott vazodilatáció közvetítésében. Ezeket az *in vivo* eredményeinket munkacsoportunk tagjai nemrég TRPA1 ill. TRPV1 receptort expresszáló CHO sejtvonalakon elvégzett radioaktív ⁴⁵Ca²⁺-felvétel vizsgálatok segítségével *in vitro* is megerősítették. Ismert továbbá, hogy a 4-ONE-lal kiváltott vazorelaxáció közvetítésében a TRPA1 mellett a CGRP is részt vesz (Graepel és mtsai., 2011), ill. *in vitro* adatok alapján felvetődött, hogy a CGRP érintett lehet a H₂S-indukálta simaizomrelaxáció és vazodilatáció közvetítésében is (Fernandes és mtsai., 2013; Eberhardt és mtsai., 2014). Sőt, mivel a H₂S egér tüdőben SP- és NK₁ receptor-függő módon neurogén gyulladást és akut pneumonitist vált ki (Bhatia és mtsai., 2006), ezért felmerült, hogy az NK₁ receptor által mediált útvonal is részt vehet a H₂S-dal kiváltott vazodilatáció közvetítésében. Kísérletsorozatunkkal *in vivo* bizonyítottuk, hogy mind a CGRP, mind a SP fontos mediátor szereppel rendelkeznek a H₂S által kiváltott dermális véráramlás fokozódásban. A CGRP és NK₁ receptor antagonisták egyidejű alkalmazása nem eredményezett additív hatást, ugyanakkor a H₂S-indukálta vazodilatáció csökkenése az első 10-15 percben főként az NK₁, a vizsgálat további részében pedig inkább a CGRP receptor gátlásához volt hasonló. Megfigyeléseinket magyarázhatja, hogy az NK₁-mediált szignalizáció hatása gyorsabban jön létre, de természetesen nem zárható ki a két antagonistafarmakokinetikai sajátosságai közötti esetleges eltérés sem. A K⁺_{ATP}-csatornáknak az erek és más simaizomszövetek relaxációs folyamataiban játszott szerepét illetően egymásnak ellentmondó eredményekről számol be az irodalom (Fernandes és mtsai., 2013; White és mtsai., 2013; Eberhardt és mtsai., 2014). *In vivo* kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az érfali simaizomsejteken található K⁺_{ATP}-csatornák aktivációja hozzájárul a H₂S-indukálta vazorelaxációhoz. Mivel az K⁺_{ATP}-csatornákról ismert, hogy a CGRP hatásainak közvetítésében szerepet játszanak (Santicioli és Maggi, 1994), feltehető, hogy a kapszaicin-érzékeny primer afferensek és a szenzoros neuropeptidek, ill. a K⁺_{ATP}-csatornák interakcióba lépnek a H₂S-indukálta vazodilatációt közvetítő molekuláris folyamatok során is. Annak ellenére, hogy irodalmi adatok szerint az alkalikus kémhatás képes aktiválni a TRPA1 receptort (Fujita és mtsai., 2008), a mikrocirkulációs modellben kapott eredményeink alapján sem a pH, sem az ozmotikus hatások nem befolyásolják a H₂S mikrocirkulációra kifejtett hatásait. Következésképpen elmondhatjuk, hogy a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok TRPA1 általi aktivációja, ill. a belőlük felszabaduló vazoaktív szenzoros neuropeptidek fontos szerepet játszanak a lokális mikrocirkuláció H₂S-indukálta fokozódásának közvetítésében.

II. A TRPA1 receptor szerepének vizsgálata akut és krónikus légúti gyulladásmodellekben

Eredmények

A TRPA1 protektív szerepet játszik az endotoxin-indukálta légúti hiperreaktivásban

A Penh mind a TRPA1^{+/+}, mind a TRPA1^{-/-} egerekben koncentráció-függő módon megemelkedett az LPS hatására, ami a gyulladásos légúti hiperreaktivitás kialakulására utal. A bronchiális hiperreaktivitás a TRPA1^{-/-} állatokban szignifikánsan nagyobb volt, mint vad típusú társaikban. Az endotoxin-kezelés hatására a légzésfrekvencia alapértéke a TRPA1^{+/+} és a TRPA1^{-/-} csoportokban is szignifikánsan csökkent. A carbachol a légzésfrekvencia koncentráció-függő csökkenését okozta a TRPA1^{-/-} egerekben, a TRPA1^{+/+} csoportban viszont nem okozott eltérést.

A TRPA1 fontos szerepet játszik a gyulladásos MPO aktivitás fokozódásában a tüdőben

Az MPO enzim alapaktivitása közel azonos volt a két kontroll egércsoportban. Az LPS alkalmazását követően jelentős mértékű MPO aktivitás növekedést tapasztaltunk, amely a TRPA1 génnel nem rendelkező egerekben szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint a vad típusú társaik esetében.

A TRPA1 nem befolyásolja a tüdő endotoxinnal kiváltott szöveti elváltozásait

LPS hatására a vad típusú egerekben szignifikáns mértékű perivaszkuláris/peribronchiális ödéma, gyulladásos sejt akkumuláció és kehelysejt hiperplázia alakult ki a PBS-kezelt csoportokhoz képest. A gyulladás mértéke a TRPA1^{-/-} egerekben hasonló mértékű volt, mint a TRPA1^{+/+} állatok esetében.

A TRPA1 nem befolyásolja a légzésfunkció dohányfüst expozíció által kiváltott változásait

A légzésfrekvencia a dohányzás első hónapjától kezdve mind a TRPA1^{+/+}, mind a TRPA1^{-/-} egerekben szignifikánsan lecsökkent, a két állatscsoport frekvenciaértékei között ugyanakkor nem volt különbség egyik mérési időpontban sem. A TV, a PEF és a Penh nem változott szignifikáns mértékben a dohányzás 3 hónapja során.

A TRPA1 fontos szerepet játszik a tüdő dohányfüst-indukálta gyulladásos elváltozásaiban

A dohányoztatás első hónapjában mindkét vizsgált egércsoportban jelentős mértékű perivaszkuláris ödéma alakult ki, amely a második és a harmadik hónapban fokozatosan és szignifikánsan csökkent. A TRPA1^{-/-} és a vad típusú egerek között nem volt különbség ebben a paraméterben. Ugyanakkor az akkumulálódó neutrofil granulociták száma az első hónap végén magasabb volt, a makrofág infiltráció, illetve az alveoláris-intersticiális ödéma mértéke viszont a második hónapban alacsonyabb volt a TRPA1^{-/-} csoportban, mint vad típusú társaikban.

A TRPA1 receptor hiányában a limfocita sejtek fokozott akkumulációja észlelhető

A bronchoalveoláris mosófolyadékban a limfociták mennyisége a második hónap végén tendenciaszerűen, a harmadik hónap végére pedig szignifikánsan magasabb volt a TRPA1^{-/-} egerekben a vad típusú állatokhoz képest. A neutrofil granulociták és a makrofágok mennyiségében nem találtunk eltérést a két egércsoport között.

Megbeszélés és következtetés

A TRPA1 receptor fontos szerepet tölt be különböző légúti megbetegedések (pl. asztma, COPD) kialakulásában (Grace és mtsai, 2014), azonban a receptor aktivációs mechanizmusairól és pontos kórélettani szerepéről kevés és ellentmondásos adat áll rendelkezésre. Jelen eredményeink alapján a TRPA1 egyértelműen védő hatásúnak bizonyult az endotoxin-indukálta pneumonitist kísérő légúti hiperreaktivásban, ill. a granulocita- és makrofág-eredetű MPO termelésben egyaránt. Bár különböző asztma modellekben a TRPA1 bronchokonstriktiót közvetítő szerepére utaló adatok jelentek meg (Jha és mtsai, 2015; Devos és mtsai., 2016), az akut gyulladás során a TRPA1 általunk megfigyelt protektív hatását támasztják alá munkacsoportunk korábbi vizsgálatai is, melyek szerint a peptiderg primer afferensek TRPV1 receptoron keresztüli aktivációja védő hatással bír az endotoxinnal kiváltott légúti gyulladás és a következményes bronchiális hiperreaktivitás kialakulásában (Elekes és mtsai., 2007; Helyes és mtsai., 2007). A két ioncsatorna hasonló funkciója nem meglepő annak fényében, hogy koexpresszálódnak a szenzoros idegvégződéseken, és feltételezhetően fizikai és funkcionális interakcióba is lépnek egymással (Lee és mtsai., 2015). A TRPA1 által közvetített protektív folyamatokat a primer afferensekből felszabaduló antiinflammatorikus neuropeptidok (pl. szomatosztatin) magyarázhatják (Helyes és mtsai., 2009). *In vitro* adatok szerint a cigarettafüst kivonat (CSE) CGRP- és SP-felszabadulást okoz a peptiderg primer afferensekből, ill. a TRPA1 fontos szerepet játszik a CSE- ill. nikotin-indukálta plazma extravazáció és bronchokonstriktió kialakulásában (André és mtsai., 2008; Talavera és mtsai., 2009). Ezen kívül a COPD-t kísérő oxidatív stressz során képződő ROS és lipidperoxidációs is képesek aktiválni ezeket az ioncsatornákat (Bessac és Jordt, 2008). A krónikus dohányfüst expozíció általunk vizsgált *in vivo* modelljében a dohányzás első hónapjában (akut fázis) a peribronchiális és perivaszkuláris ödéma által dominált szövettani képet a második hónapban (átmeneti fázis) gyulladással sejt-infiltráció váltotta fel, amely összhangban áll munkacsoportunk legfrissebb adataival (Kemény és mtsai., közlésre beküldve). Kísérleteink során a TRPA1^{-/-} egerekben a granulocita akkumuláció szignifikánsan magasabb volt az első, a makrofág-dominálta sejt-infiltráció, ill. az alveoláris-intersticiális ödéma mértéke pedig szignifikánsan alacsonyabb volt a második hónap végén. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a TRPA1 aktiváció a dohányzással kiváltott légúti gyulladás akut fázisában védő hatású, míg a folyamat előrehaladtával a proinflammatorikus kaszkád tagjaként hozzájárul a szöveti gyulladás kialakulásához. A jelenséget magyarázhatja, hogy a dohányfüstben megtalálható toxikus vegyületek a TRPA1 tranziens aktivációján keresztül jellemzően védekező reakciókat váltanak ki, a gyulladás krónikussá válása során termelődő endogén ágensek ugyanakkor az ioncsatorna permanens stimulálásával folyamatosan fenntartják a neurogén gyulladás állapotát (Chen és mtsai., 2012). Másrészt figyelembe kell vennünk, hogy a légzőrendszert gazdagon innerváló kapszaicin-érzékeny szenzoros rostok mellett extraneurálisan, pl. a makrofágokon is megtalálható (Kun és mtsai., 2017) TRPA1 aktivációja eltérő jelátviteli mechanizmusok beindításával eltérő hatásokat hozhat létre a krónikus gyulladás egyes fázisaiban. Mivel a dohányzás

harmadik hónapjában (limfociták által dominált krónikus fázis) a TRPA1 gén hiánya a limfocita sejtek fokozott akkumulációjához vezetett, és mivel ismert, hogy az ioncsatorna limfocita sejteken is expresszálódik (Stokes és mtsai., 2006) valószínűsíthető, hogy a TRPA1 receptor szabályozó szerepet játszik a limfociták működésében is. A légzésfunkciós paraméterek komplex vizsgálata kimutatta, hogy azokat a TRPA1 aktiváció nem befolyásolja, így eredményeink nem igazolják azt a korábbi, *in vitro* adatokon alapuló feltételezést, mely szerint a receptor közvetítő szerepet játszik a tüdőfunkció dohányfüst okozta változásaiban. Megjegyzendő, hogy krónikus dohányzás esetén az endogén H₂S antiinflammatorikus és bronchodilatátor hatásokat képes kiváltani (Chen és mtsai., 2011). Mivel nem csak a dohányfüstben megtalálható toxikus anyagok, hanem a H₂S is képes aktiválni a TRPA1-et (l. Eredmények, megbeszélés és következtetések/I. fejezet), ezért feltehető, hogy a különböző szignalizációs útvonalak ezen a ponton interakcióba léphetnek egymással. Mindezek alapján pedig valószínűsíthető, hogy a TRPA1 krónikus bronchitis kialakulásában betöltött szerepe sokkal összetettebb, mint azt korábban gondoltuk. Sőt, mivel kísérleteink segítségével az endotoxin-indukálta akut pneumonitisben az ioncsatorna protektív szerepét igazoltuk, joggal valószínűsíthető, hogy a kapszaicin-érzékeny érzőidegek és gyulladásosejtek TRPA1 receptor általi aktivációja komplex modulátor hatásokat eredményez a tüdő akut és krónikus gyulladásosejtek folyamataiban.

III. A HK-1 szerepének vizsgálata endotoxinnal kiváltott akut légúti gyulladásmo­dellben

Eredmények

A HK-1 nem befolyásolja az endotoxinnal kiváltott légúti hiperreaktivitást

A Penh szignifikáns, koncentráció-függő emelkedést mutatott az LPS beadása után 24 h-val a PBS-kezelte állatok értékeihez képest. Az LPS-indukálta légúti hiperreaktivitás a Tac4^{-/-} egerekben hasonló mértékű volt, mint a vad típusú társaikban. A légzésfrekvencia mindkét LPS-kezelte csoportban koncentráció-függő módon csökkent, a vad típusú és a Tac4^{-/-} egerek között nem volt különbség.

A HK-1 gyulladáskeltő szereppel bír a tüdő endotoxin-indukálta szöveti elváltozásaiban

Az LPS-kezelés peribronchiális/perivaszkuláris ödémát, neutrofil granulocita akkumulációt, mononukleáris sejt-infiltrációt és kehelysejt hiperpláziát okozott a vad típusú egerekben. A gyulladás mértéke a Tac4^{-/-} egerekben szignifikánsan alacsonyabb volt. Az LPS-kezelte Tac4^{-/-} egerek tüdejében ezen kívül peribronchiálisan és perivaszkulárisan elhelyezkedő nagyméretű és igen denz, tüszőszerű limfoid struktúrákat észleltünk a tüdőben. Ez a jelenség sem a vad típusban, sem a munkacsoportunk által már korábban vizsgált többi egértörzsben nem volt látható.

A HK-1 fontos szerepet játszik a neutrofil MPO aktivitás növekedésében a tüdőben

Az endotoxinnal kezelte csoportokban a tüdők biolumineszcens jelintenzitása szignifikánsan megemelkedett a PBS-kezelte egerekhez képest. A Tac4^{-/-} egerek tüdejében szignifikánsan alacsonyabb biolumineszcens jelet mértünk a vad típusú állatokéhoz képest.

A HK-1 fokozza a tüdőben mérhető mieloperoxidáz aktivitást

Az LPS beadása után 24 órával a vad típusú egértüdőkben szignifikánsan magasabb MPO aktivitást detektáltunk. A Tac4^{-/-} egerekben az MPO aktivitás emelkedése szignifikánsan kisebb volt a vad típusú társaikhoz képest.

A HK-1 fokozza a gyulladással citokinek termelődését a tüdőben

A vad típusú egerekben az LPS beadása után egy nappal az összes vizsgált citokin szintje jelentősen megemelkedett. A Tac4^{-/-} egerek tüdejében az IL-1 β , IL-6, KC, TNF α és MCP-1 koncentrációk szignifikánsan, a MIP-1 α pedig tendenciaszerűen alacsonyabb volt a vad típusú állatokéhoz képest.

Megbeszélés és következtetés

Kísérletsorozatunkkal elsőként bizonyítottuk, hogy a HK-1 fontos szerepet játszik az endotoxinnal kiváltott intersticiális pneumonitisz kialakulásában. Eredményeink szerint a HK-1 hiánya esetén szignifikánsan csökkent az ödéma és a gyulladással sejt-akkumuláció mértéke, sőt a neutrofil granulociták és a makrofágok aktivációjának köszönhető MPO aktivitás is. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint ugyanakkor az NK₁ receptor hiánya nem okozott különbséget ezekben a paraméterekben (Helyes és mtsai., 2010). Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a HK-1 fontos szerepet játszik a tüdő akut gyulladással folyamataiban, de ezt a hatását nem az NK₁ receptor közvetíti. Jelen eredményeink összhangban állnak munkacsoportunk korábbi, krónikus eger artritiszben kapott adataival, melyek szerint az ízületi gyulladással az NK₁ receptor aktivációtól függetlenül megy végbe (Borbély és mtsai., 2013), és alátámasztják azt a feltevést, hogy a HK-1 feltehetően rendelkezik egy specifikus saját receptorral, amely a perifériás gyulladással keltő hatások közvetítéséért felelős. Mivel az általunk vizsgált modellben az MPO aktivitás mérése, ill. a ROS biolumineszcens képalkotással történő vizsgálata során kapott eredményeink jól korreláltak egymással, valószínűsíthető, hogy a tüdőben mért lumineszcens jelintenzitás az MPO aktivitás eredményeképpen jött létre. A LPS-kiváltotta gyulladással reakció során számos proinflammatorikus citokin szabadul fel (pl. TNF α , IL-1 β , IL-6, KC). A HK-1 és a citokin rendszer között létező kapcsolat *in vitro* kísérletek alapján már korábban felvetődött (Berger és mtsai., 2007). *In vivo* kísérleteink segítségével kimutattuk, hogy Tac4^{-/-} egerekben a gyulladással citokin szintek LPS-indukálta emelkedése szignifikánsan alacsonyabb volt, tovább erősítve azt a megfigyelést, mely szerint a HK-1 kulcsszerepet játszik a tüdő gyulladással folyamataiban során létrejövő citokin termelésben és a következményes immunsejt aktivációban. Az LPS-kezelte Tac4^{-/-} egerek tüdejében észlelt, erekhez és bronchusokhoz asszociált, nagyméretű, denz, tüszőszerű struktúrák, melyek más génhányos egértörzsekben nem voltak megfigyelhetők, arra enged következtetni, hogy az endotoxinnal kiváltott pneumonitisz során a HK-1 feltehetően részt vesz a limfocita aktiváció szabályozásában is. Ezen eredményünk összhangban áll a HK-1 korábban leírt, B-limfocita fejlődést serkentő funkciójával (Berger és mtsai., 2010). A perifériás gyulladással reakció közvetítésében betöltött szerepe ellenére, ill. a SP és NKA korábban leírt hatásaival ellentétben a HK-1 nem befolyásolja a légúti

hiperreaktivitást. Ugyan a hHK-1-ről leírták, hogy képes bronchokonstriktiót kiváltani (Grassin-Delye és mtsai., 2010), a HK-1 esetében ez a hatás nem igazolódott az általunk használt egérmodellben. Ennek oka valószínűleg az, hogy a hemokininek és endokininek emberben bonyolultabb rendszert alkotnak: a humán TAC4 gén négy különböző splice variánsal rendelkezik, melyek szekvenciája különbözik az egérben található megfelelőiktől, sőt, az expressziós mintázatuk is eltérő (Page, 2004). Másrészt a gyulladásos eredetű bronchokonstriktiót elsősorban az NK₂ receptor közvetíti (Elekes és mtsai., 2007; Helyes és mtsai., 2010), a HK-1 azonban sokkal kisebb affinitással kötődik az NK₂ receptorhoz, mint az NK₁-hez (Bellucci és mtsai., 2002). Következésképpen elmondhatjuk, hogy a HK-1 az endotoxinnal kiváltott akut légúti gyulladás fontos mediátora, ill. hogy a HK-1 feltehetően szabályozó szerepet játszik a limfocita funkciókban gyulladásos körülmények között, melynek pontos mechanizmusa egyelőre még nem ismert.

IV. Patkány diabétesz mellitusz modell kifejlesztése a krónikus szövődmények komplex vizsgálatára

Eredmények

A vércukor szint, a testsúly, valamint a víz- és táplálékfogyasztás változásai

A Kontroll állatok vércukor szintje 5-7 mmol/l volt a teljes vizsgálati periódus során. Az (I) csoport átlagos vércukor értéke 8-10 mmol/l volt, a (II) csoporté 16-18 mmol/l, a (III) csoporté 22-25 mmol/l, a (IV) csoporté pedig 30-33 mmol/l. Az (I)-(III) csoportok állatainak súlygyarapodása alig maradt el a Kontroll állatokétól, a (IV) csoportban azonban a fiziológias súlygyarapodás helyett egy 13.4 %-os súlyvesztést észleltünk az STZ-kezelést megelőző kontroll méréshez képest. A relatív víz- és táplálékfogyasztás a (III)-(IV) csoportokban jelentős mértékben megemelkedett. Ez utóbbi csoportok eredményei minden paraméter esetében szignifikáns eltérést mutattak a Kontrollhoz képest.

Az anterior szegmens neovaszkuarizációja és a hátsó pólus patológiás elváltozásai

A (III) és (IV) csoport állatainál szignifikáns mértékű neovaszkuarizáció alakult ki a szem elülső szegmensén. A (IV) csoportban észlelt neovaszkuarizáció mértéke szignifikánsan magasabb volt, mint a (II)-(III) csoportok esetén mért értékek. A TRS a (II)-(IV) csoportokban szignifikánsan megemelkedett a Kontroll és az (I) csoporthoz képest, sőt, a (III)-(IV) csoportok TRS értékei szignifikánsan magasabbak voltak a (II) csoportnál is.

A diabéteszes retinopátiában észlelt hisztológiai elváltozások

A diabéteszes retinákban az OLM-ILM távolság, ill. az OPL és IPL vastagságának csökkenését észleltük a Kontroll állatokhoz képest. Ezen kívül a GCL 100 µm-ére számított összejszám ill. a ganglionsejszám is szignifikánsan alacsonyabb volt a diabéteszes állatokban. A GFAP-jel minden diabéteszes csoportban jelentős mértékben megemelkedett. Az OPL-ben található csap terminálisok száma szignifikánsan alacsonyabb volt a (II)-(IV) csoportokban, mint a Kontroll állatokban. A dopaminerg amakrin sejtek nyúlványai a (III)-(IV) csoportokban súlyosan elvékonyodtak, ill. a (IV)

csoport esetében sok esetben teljesen el is tűntek. A TUNEL-pozitív sejtek száma a (III) és (IV) csoportokban szignifikánsan magasabb volt a Kontroll retinához képest, az apoptózis mértéke az ONL-ben volt a legsúlyosabb. Ezen kívül a pigment epitelsejtek degenerációját, ill. a choroideából a retinába betüremkedő érgomolyagokat észleltünk. A (III) csoport retináinak ILM rétegében jól látható, hogy a „tight junction” struktúrákat alkotó gliasejt membránok elváltak egymástól, ill. az IPL réteg degenerációja is ebben a csoportban jelentkezett legnagyobb mértékben. A (III)-(IV) csoportok retináiban makrofágokat találtunk az OPL, INL és IPL rétegekben, ill. mikroglia sejteket az IPL-ben.

A diabéteszes nefropátiában észlelt hisztológiai elváltozások

A PAS-pozitív glomeruláris terület százalékos aránya mindegyik diabéteszes állatcsoportban szignifikánsan megemelkedett a Kontrollhoz képest, a (IV) csoport értéke pedig szignifikánsan magasabb volt az összes többi vizsgált csoportnál. Az Armani-Ebstein jelenség a (II)-(IV) csoportok mintáiban volt kimutatható, a Kontroll és az (I) csoportban viszont nem. Ezen kívül igazoltuk a glomeruláris bazálmembrán szegmentális megvastagodását, a podocita lábnyúlványok multifokális fúzióját, ill. a mezangiális mátrix expanszióját is.

A diabéteszes nefropátia laboranalitikai értékelése

A kísérleti periódus végén a (II)-(III) csoportokban a kiválasztott vizelet mennyisége szignifikánsan magasabb volt a Kontroll és az (I) csoport értékeinél (poliuria). A (IV) csoportban egy poliuriás fázist követően, a vizsgálati végére nagymértékben lecsökkent a kiválasztott vizelet mennyisége (fenyegető anuria). A vizelet totál protein/kreatinin az (I) és (II) csoportokban enyhén megemelkedett. A (III) és (IV) csoportokban ez az arányszám az előzőektől eltérő módon változott: a kísérlet első felében nagymértékű emelkedést, a vizsgálati időszak végére azonban jelentős csökkenést tapasztaltunk.

Mechanikai hiperalgéria és hideg allodínia

A hátsó végtag mechanonociceptív küszöbe, ill. jeges vízből történő visszahúzási latenciáideje is szignifikánsan alacsonyabb volt a diabéteszes csoportok mindegyikében. Míg a fenti változások mértéke hasonló volt az (I)-(III) állatcsoportokban, addig a 0°C-os vízből történő farkvisszahúzási latenciáidő egyértelmű hiperglikémia-függést mutatott.

Megbeszélés és következtetések

Jelen tanulmányunkban különböző inzulin kezelési protokollokat alkalmaztunk annak érdekében, hogy az állatok viszonylagosan jó általános állapotban tartása mellett hosszú ideig fenntarthassuk a hiperglikémiás állapot különböző súlyossági fokait. Ehhez a folyamatos adagolást biztosító inzulin implantátumok (Havel és mtsai., 2000) segítségével célzott glikémiás kontrollt hoztunk létre. Kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy az anterior szegmens neovaszularizációja, ill. a TRS-ben foglalt retinális elváltozások egyértelműen hiperglikémia-függő módon viselkednek. A DR kialakulása során sérül a belső vér-retina gát, melynek eredményeképpen mikroaneurizmák és intraretinális bevérzések jönnek létre, az elülső és hátsó szegmenst egyaránt érintő neovaszularizációban pedig feltehetően a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF)

fokozott termelődésének van szerepe (Klaassen és mtsai., 2013). A fiziológias körülmények között nem, vagy a Müller glia sejtek végtalpában nagyon kis mértékben expresszáldó GFAP fokozott, az ideghártya teljes vastagságában megjelenő immunoreaktivitása a teljes retinát érintő súlyos metabolikus károsodás egyértelmű jele (Chang és mtsai., 2007). A károsodott sejtmetabolizmus a retina neuronjainak apoptózisához vezet (Szabadfi és mtsai., 2014). Kísérletsorozatunk segítségével kimutattuk, hogy a fotoreceptorok csap terminálisain kívül a diabétesz okozta anyagcsere változásokra leginkább érzékeny sejtípus, a dopaminerg amakrin sejtek is jelentős mértékben degenerálódtak a (III) csoport állataiban, a TUNEL-pozitív apoptotikus sejtek mennyisége pedig a hiperglikémia súlyosságával egyenesen arányosnak bizonyult. A szinaptikus kapcsolatok elváltozásainak és az ILM gliasejtek közötti „tight junction” struktúrák felnyílásának eredményeként a retinális struktúrák könnyen hozzáférhetővé válnak bizonyos beáramló immunsejtek számára. Az ideghártya sejtjeinek apoptózisa és degenerációja a retina elvékonyodását idézte elő, mely a humán diabéteszes folyamatok késői fázisának modelljeként tekinthető (Takahashi és Chihara, 2008). Jelen vizsgálataink során a (III) csoport állataiból származó vesemintákban jelentős mértékű glomeruláris PAS pozitívítás, a vesetubulusok glikogéntartalmának fokozódása, a mezangiális mátrix állományának expanziója, a glomeruláris bazálmembrán szegmentális megvastagodása, ill. a podocita lábnyúlványok összeolvadása voltak láthatók, mely elváltozások jellemzően a humán **DNP**-ban is megfigyelhetők (Dronavalli és mtsai., 2008). Az, hogy az állatok vizelet összfehérje/kreatinin aránya a vizsgálat első szakaszában megemelkedett, majd a késői fázisban jelentős mértékben lecsökkent, összhangban van a végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő diabéteszes betegekkel szerzett tapasztalatokkal. A proteinuria eme látszólagos javulása alátámasztja a glomerulusok súlyos károsodásának és elzáródásának tényét. Az általunk vizsgált paraméterek közül mind a glomeruláris PAS-pozitívítás, mind a vizelet totál protein/kreatinin arány hiperglikémia-függést mutatott. A humán **DN** leggyakrabban disztális szimmetrikus polineuropátia formájában jelentkezik, amely gyakran okoz érzészavarokat, így pl. hiperalgéziát és allodíniát (Sun és mtsai., 2012). A DN kialakulásáért felelős tényezők között vezető helyen a hiperglikémia áll, de a rágsálókkal végzett kísérletek során felmerült, hogy az inzulin molekulák direkt szignalizációjának károsodása, ill. a STZ-nak a szenzoros neuronokra esetlegesen kifejtett közvetlen hatása is hozzájárulhat a tünetek kialakulásához (Brussee és mtsai., 2004; Pabbidi és mtsai., 2008). Mivel a patkányfarkon mért hideg allodínia teljes mértékben hiperglikémia-függő módon viselkedett, így annak vizsgálata megbízható lehetőséget nyújt a krónikusan fennálló, folyamatos vagy változó mértékű hiperglikémiás állapotokkal kísért diabéteszes neuropátia elemzésére. Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy az implantátumok különböző „dózisainak” alkalmazása lehetővé tette a hiperglikémia eltérő súlyossági fokainak beállítását, következésképpen a hiperglikémia-függő patológiai állapotok vizsgálatát. Komplex vizsgálatsorozatunk során a diabéteszes állatok (III) csoportja bizonyult a krónikus szövődmények leginkább alkalmas modelljének, ahol a szem, a vesék és a perifériás idegrendszer elváltozásait a diabétesz kiváltását követően 16 héten át tudtuk vizsgálni.

ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

I. Elsőként szolgáltatunk *in vivo* bizonyítékot, hogy a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések fontos mediátor szerepet játszanak a H₂S-dal kiváltott vazodilatációban a bőrben. Igazoltuk, hogy a H₂S vazodilatátor hatása a szenzoros rostokon található TRPA1 receptor aktivációján keresztül jön létre, míg a TRPV1 receptor nem vesz részt ebben a folyamatban. A H₂S által kiváltott véráramlás fokozódásában az aktivált peptiderg primer afferensekből felszabaduló CGRP és SP kulcsszerepet játszanak. A K⁺_{ATP}-csatornák aktivációja hozzájárul a H₂S által kiváltott vazodilatáció létrejöttéhez, míg a pH és az ozmotikus hatások nem befolyásolják ezt az érválaszt.

II. Elsőként bizonyítottuk, hogy a TRPA1 receptor komplex szabályozó hatásokat közvetít a tüdő akut és krónikus gyulladásos folyamataiban. A TRPA1 protektív szerepet játszik az akut bronchiális hiperreaktivitás kialakulásában, valamint a neutrofil granulociták és a mononuklális sejtek aktiválásában a TRPV1 korábban leírt szerepéhez hasonlóan. Ezen kívül kimutattuk, hogy a dohányfüst expozícióval kiváltott légúti gyulladás progressziója során a TRPA1 összetett szereppel bír a granulociták, makrofágok és limfociták működésének szabályozásában, ill. az alveoláris-intersticiális ödéma kialakulásában. A receptor aktivációja a légzésfunkcióra nincs hatással.

III. Elsőként bizonyítottuk, hogy a HK-1 gyulladáskeltő hatásokat közvetít akut intersticiális pneumonitiszben. A HK-1 fokozza a neutrofil granulociták és a makrofágok akkumulációját és aktivációját, ill. a proinflammatorikus citokinek termelődését a tüdőben. Valószínűsíthető, hogy a HK-1 fontos szerepet játszik a limfocita funkciók szabályozásában is, de ennek mechanizmusa egyelőre még nem tisztázott. A HK-1 nem befolyásolja a gyulladásos légúti válaszkészséget.

IV. Kísérleteink segítségével egy olyan preklinikai modellt karakterizáltunk, amely lehetővé teszi a diabéteszes szemelváltozások, a nefropátia és a neuropátia hosszú távú és párhuzamos értékelését. Az anterior szegmens neovaszkularizációja, a retina állapotát komplexen értékelő TRS paraméter, az ideghártyában megtalálható apoptotikus sejtek mennyisége, a glomeruláris PAS-pozitivitás, a vizelet összfehérje/kreatinin aránya, ill. a hideg allodínia olyan hiperglikémia-függő paraméterek, amelyek összetett kvantitatív analízise esszenciális elemként szolgálhat a diabéteszes komplikációk megelőzésére szolgáló gyógyszerek preklinikai fejlesztése során.

Az ideg- és immunrendszer között létrejövő interakciók, ill. azok rendellenességei keringési, légúti és metabolikus megbetegedések kialakulásához is hozzájárulnak. Az általunk vizsgált folyamatok hatásmechanizmusának részletes feltérképezése nagymértékben elősegítheti azoknak az új típusú gyógyszereknek a fejlesztését, amelyek támadáspontja az ideg- és immunrendszer kölcsönhatásában rejlik.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- Andrè és mtsai. (2008) *J Clin Invest.* 118: 2574-82.
- Aubdool és Brain (2011) *J Investig Dermatol Symp Proc.* 15: 33-9.
- Aubdool és mtsai. (2014) *Nat Commun.* 5: 5732.
- Bánki és mtsai. (2013). *Peptides.* 42: 125-130.
- Barwell és mtsai. (2012) *Adv Exp Med Biol.* 744: 13–24.
- Bautista és mtsai. (2006) *Cell.* 124, 1269-1282.
- Bellucci és mtsai. (2002) *Br J Pharmacol.* 135: 266–74
- Bennett (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 7737-8.
- Berger és mtsai. (2010) *Blood.* 116: 3792–801.
- Berger és mtsai. (2007) *J Neuroimmunol.* 187: 83–93.
- Bessac és Jordt. (2008) *Physiology (Bethesda).* 23: 360-70.
- Bhatia és mtsai. (2006) *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 291: L896-L904.
- Borbély és mtsai. (2013) *PLoS One* 8: e61684.
- Bölcskei és mtsai. (2005) *Pain.* 117: 368-376.
- Brain és Cox (2006) *Br J Pharmacol* 147 (Suppl. 1): S202–11.
- Brierley és mtsai. (2011) *J Physiol.* 589: 3575-93.
- Brussee és mtsai. (2004) *Diabetes.* 53: 1824-1830.
- Calcutt (2004) *J Neurol Sci.* 220: 137-139.
- Cao és mtsai. (1999) *Am J Physiol.* 277(2 Pt 2): R476-81.
- Chang és mtsai. (2007). *J Anat.* 210: 54-65.
- Chen és mtsai. (2005) *Cardiovasc Diabetol.* 4: 3.
- Chen és Hackos (2015) *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 388: 451–463.
- Chen és mtsai. (2012) *In: TRP channels in drug discovery.* Vol. 1. p. 43-59. online ISBN: 978-1-62703-077-9
- Chen és mtsai. (2011) *Cytokine.* 53: 334-41.
- Colsoul és mtsai. (2013) *Curr Top Med Chem.* 13: 258-69.
- Coudoré-Civiale és mtsai. (2000) *Eur J Pharmacol.* 401: 47-53.
- De Swert és Joos (2006) *Eur. J. Pharmacol.* 533: 171-181.
- Devos és mtsai. (2016) *Eur Respir J.* 48: 380-92.
- Dronavalli és mtsai. (2008) *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 4: 444–452.
- Duffy és mtsai. (2003) *Neuropharmacology.* 45: 242–50.
- Earley és mtsai. (2009) *Circ. Res.* 104: 987-994.
- Earley (2012) *Br J Pharmacol.* 167: 13-22.
- Eberhardt és mtsai. (2014) *Nat Commun.* 5: 4381.
- Elekes és mtsai. (2007) *Regul Pept.* 141: 44-54.
- Endo és mtsai. (2006) *Neurosci Lett.* 392: 114–7.
- Fernandes és mtsai. (2012) *Br J Pharmacol.* 166: 510-21.
- Fernandes és mtsai. (2013) *J Urol.* 190: 746-56.
- Fujita és mtsai. (2008) *J. Clin. Invest.* 118: 4049-4057.
- Grace és mtsai. (2014) *Br J Pharmacol.* 171: 2593-607.
- Graepel és mtsai. (2011) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 337: 117-124.
- Grant (2002) *Inflammopharmacology* 9: 403-420.
- Grassin-Delyle és mtsai. (2010) *Respir Res.* 11: 139.
- Greiner és mtsai. (2013) *Antioxid Redox Signal.* 19: 1749-65.
- Hatakeyama és mtsai. (2015) *Mol Pain.* 11: 24.
- Havel és mtsai. (2000). *Diabetes.* 49: 244-252.
- Helyes és mtsai. (2007) *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 292: L1173-81.
- Helyes és mtsai. (2010) *Neuropeptides.* 44: 399–406.
- Helyes és mtsai. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 13088–93.
- Jaquemar és mtsai. (1999) *J Biol Chem.* 274: 7325-33.
- Jha és mtsai. (2015) *Can J Physiol Pharmacol.* 93: 171-6.
- Jordt és mtsai. (2004) *Nature.* 427: 260-265.
- Julius (2013) *Annu Rev Cell Dev Biol.* 29: 355-84.

Kemény és mtsai. Chronic cigarette smoke-induced pulmonary and cardiac co-morbidities in a COPD mouse model. (*közlésre beküldve*)

Kimura (2014) *Nitric Oxide*. 41: 4-10.

Klaassen és mtsai. (2013) *Prog Retin Eye Res*. 34: 19-48.

Koivisto és mtsai. (2012) *Pharmacol Res*. 65: 149-58.

Kun és mtsai. (2017) *Oral Dis*. 23: 189-198.

Kunkler és mtsai. (2011) *Pain*. 152: 38-44.

Lee és mtsai. (2015) *Pulm Pharmacol Ther*. 35: 87-93.

Liang és mtsai. (2011) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 300: H2088-H2095.

Macpherson és mtsai. (2006) *Mol Cell Neurosci*. 32: 335-43.

Macpherson és mtsai. (2007) *Nature*. 445: 541-5.

Maggi (1995) *Prog Neurobiol*. 45: 1-98.

Meseguer és mtsai. (2014) *Nat Commun*. 5: 3125.

Miyamoto és mtsai. (2011) *Neurosci. Lett*. 499: 137-142.

Mustafa és mtsai. (2009) *Sci. Signal*. 2: ra72.

Otmishi és mtsai. (2008) *Clin Med Circ Respirat Pulm Med*. 2: 35-44.

Pabbidi és mtsai. (2008) *Mol Pharmacol*. 73: 995-1004.

Page (2004) *Cell Mol Life Sci*. 61: 1652-1663.

Patacchini és mtsai. (2004) *Br J Pharmacol*. 142: 31-4.

Pintér és mtsai. (2014) *Br J Clin Pharmacol*. 77: 5-20.

Pozsgai és mtsai. (2010) *Cardiovasc. Res*. 87: 760-8.

Prior és mtsai. (1990) *Toxicol Pathol*. 18: 279-88.

Reutens és Atkins (2011) *Contrib Nephrol*. 170: 1-7.

Russell és mtsai. (2014) *Physiol Rev*. 94: 1099-142.

Santicioli és Maggi (1994) *Br J Pharmacol*. 113: 588-92.

Steinhoff és mtsai. (2014) *Physiol Rev*. 94: 265-301.

Story és mtsai. (2003) *Cell*. 112: 819-829.

Streng és mtsai. (2008) *Eur. Urol*. 53: 391-399.

Stokes és mtsai. (2006) *Cell Signal*. 18: 1584-1594.

Sun és mtsai. (2012). *PLoS One*. 7: e39647.

Szabadfi és mtsai. (2014) *Int Rev Cell Mol Biol*. 311: 1-121.

Szallasi és mtsai. (2007) *Nat. Rev. Drug Discov*. 6: 357-72.

Szolcsányi (1988) *Agents Actions*. 23: 4-11.

Szolcsányi és mtsai. (1998) *Br J Pharmacol*. 125: 916-922.

Szolcsányi (1996) *Prog Brain Res*. 113: 343-359.

Takahashi és Chihara (2008) *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 49: 687-92.

Talavera és mtsai. (2009) *Nat Neurosci*. 12: 1293-9.

Tominaga és mtsai. (1998) *Neuron*. 21: 531-543.

Trevisani és mtsai. (2005) *Br J Pharmacol*. 145: 1123-1131.

Trevisani és mtsai. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 104: 13519-13524.

Wang (2012) *Physiol Rev*. 92: 791-896.

White és mtsai. (2013) *Br J Pharmacol*. 168: 785-93.

Yang és mtsai. (2013a) *Regul Pept*. 187: 12-6.

Yang és mtsai. (2013b) *J Diabetes Complications*. 27: 531-7.

Yau és mtsai. (2012) *Diabetes Care*. 35: 556-564.

Yoo és mtsai. (2014) *Molecules*. 19: 4708-44.

Yu és mtsai. (2015) *J Neuroinflammation*. 12: 141.

Zhang és mtsai. (2000) *Nat Immunol*. 1: 392-7.

Zubrzycka és Janecka (2000) *Endocr Regul*. 34: 195-201.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés alapját képező publikációk

Hajna Z, Sággy É, Payrits M, Aubdool AA, Szőke É, Pozsgai G, Bártai IZ, Nagy L, Filotás D, Helyes Z, Brain SD, Pintér E. Capsaicin-sensitive sensory nerves mediate the cellular and microvascular effects of H₂S via TRPA1 receptor activation and neuropeptide release. *J Mol Neurosci.* 60: 157-70. (2016) **IF: 2.376*** (A közlemény fele részben alapja a jelen munkának.)

Hajna Z, Szabadfi K, Balla Z, Biró Z, Degrell P, Molnár GA, Kőszegi T, Tékus V, Helyes Z, Dobos A, Farkas S, Szűcs G, Gábrriel R, Pintér E. Modeling long-term diabetes and related complications in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 78: 1-12. (2016) **IF: 2.171***

Hajna Z, Borbély É, Kemény Á, Botz B, Kereskai L, Szolcsányi J, Pintér E, Paige CJ, Berger A, Helyes Z. Hemokinin-1 is an important mediator of endotoxin-induced acute airway inflammation in the mouse. *Peptides.* 64: 1-7. (2015) **IF: 2.535**

Pozsgai G, **Hajna Z**, Bagoly T, Boros M, Kemény Á, Materazzi S, Nassini R, Helyes Z, Szolcsányi J, Pintér E. The role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor activation in hydrogen-sulphide-induced CGRP-release and vasodilation. *Eur J Pharmacol.* 689: 56-64. (2012) **IF: 2.592, megosztott első szerző**

Helyes Z, **Hajna Z**. Endotoxin-induced airway inflammation and asthma models. (könyvfejezet) In: *Arpad Szallasi, Tamás Biró: TRP channels in drug discovery. Methods in Pharmacology and Toxicology.* Vol.1, pp. 301-342. (2012) online ISBN: 978-1-62703-077-9

Az értekezés alapját képező publikációk kumulatív impakt faktora: 9.674

Független hivatkozások száma: 23

Egyéb eredeti közlemények

Borbély É, **Hajna Z**, Nabi L, Scheich B, Tékus V, László K, Ollmann T, Kormos V, Gaszner B, Karádi Z, Lénárd L, Paige CJ, Quinn JP, Szolcsányi J, Pintér E, Keeble J, Berger A, Helyes Z. Hemokinin-1 mediates anxiolytic and anti-depressant-like actions in mice. *Brain Behav Immun.* 59: 219-232. (2017) **IF: 6.020***, **megosztott első szerző**

Tékus V, Horváth Á, **Hajna Z**, Borbély É, Bölcskei K, Boros M, Pintér E, Helyes Z, Pethő G, Szolcsányi J. Noxious heat threshold temperature and pronociceptive effects of allyl isothiocyanate (mustard oil) in TRPV1 or TRPA1 gene-deleted mice. *Life Sci.* 154: 66-74. (2016) **IF: 2.627***

Scheich B, Gaszner B, Kormos V, László K, Ádori C, Borbély É, **Hajna Z**, Tékus V, Bölcskei K, Ábrahám I, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. Somatostatin receptor subtype 4 activation is involved in anxiety and depression-like behavior in mouse models. *Neuropharmacology.* 101: 204-15. (2016) **IF: 4.709***

Bánki E, **Hajna Z**, Kemény Á, Botz B, Nagy P, Bölcskei K, Tóth G, Reglődi D, Helyes Z. The selective PAC1 receptor agonist maxadilan inhibits neurogenic vasodilation and edema formation in the mouse skin. *Neuropharmacology.* 85: 538-47. (2014) **IF: 5.106**

Tékus V, **Hajna Z**, Borbély É, Markovics A, Bagoly T, Szolcsányi J, Thompson V, Kemény Á, Helyes Z, Goebel A. A CRPS-IgG-transfer-trauma model reproducing inflammatory and positive sensory signs associated with Complex Regional Pain Syndrome. *Pain.* 155: 299-308. (2014) **IF: 5.213, megosztott első szerző**

Pintér E, Pozsgai G, **Hajna Z**, Helyes Z, Szolcsányi J: Neuropeptide receptors as potential drug targets in the treatment of inflammatory conditions. *Br J Clin Pharmacol*. 77: 5-20. (2014) **IF: 3.878**

Borbély É, **Hajna Z**, Sándor K, Kereskai L, Tóth I, Pintér E, Nagy P, Szolcsányi J, Quinn J, Zimmer A, Stewart J, Paige C, Berger A, Helyes Z. Role of tachykinin 1 and 4 gene-derived neuropeptides and the neurokinin 1 receptor in adjuvant-induced chronic arthritis of the mouse. *PLoS One*. 8: e61684. (2013) **IF: 3.534**

(*5-year impact factor)

Az összes közlemény kumulatív impakt faktora: 40.761

Összes független hivatkozások száma: 59

Idézhető absztraktok

Borbély É, Tékus V, **Hajna Z**, Hunyady Á, Berger A, Paige CJ, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z. Nociceptive role of hemokinin-1, the newest member of the tachykinin family, in chronic traumatic neuropathy model of the mouse. *Digestive Diseases and Sciences*, 59: 1649. (2014)

Kemény Á, **Hajna Z**, Szitter I, Kun J, Pintér E, Helyes Z. Role of TRPV1 and TRPA1 ion channels in cigarette smoke-induced chronic airway inflammation model of the mouse. *J Mol Neurosci*. 53 (Suppl 1): S174. (2014)

Reglődi D, Bánki E, **Hajna Z**, Kemény Á, Nagy P, Bölskei K, Tóth G, Helyes Z. Receptorial mechanisms of the inhibitory action of PACAP on the vascular changes in neurogenic inflammation. *J Mol Neurosci*. 53 (Suppl 1): S181. (2014)

Kun J, Feller D, Szitter I, **Hajna Z**, Kemény Á, Perkecz A, Csöngéi V, Ernszt D, Kovács T, Pongrácz J, Helyes Z. Cigarette smoke-induced upregulation of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 ion channel in the mouse lung and in a human pulmonary tissue 3-dimensional model. *Acta Physiol*. 211 (Suppl. 697): 107. (2014)

Pintér E, **Hajna Z**, Pozsgai G, Bagoly T, Helyes Z, Szolcsányi J. Characterization of TRPA1-mediated and TRPA1-independent microcirculatory responses to hydrogen sulfide in mice. *Nitric Oxide*, 31 (Suppl 2): S29-S30. (2013)

Szabadfi K, **Hajna ZR**, Gábrriel R, Pintér E. Comparative histological investigation of the retina in wild type and somatostatin 4 receptor knockout mice. *J Neurochem*, 125 (Suppl 1): 272. (2013)

Helyes Z, Scheich B, Kormos V, Tékus V, **Hajna Z**, Gaszner B, Pintér E, Szolcsányi J. Activation of somatostatin receptor subtype 4 (sst4) inhibits anxiety and depression-like behaviours in mouse models. *J Neurochem*, 125 (Suppl 1): 230. (2013)

Borbély É, **Hajna Z**, Nabi L, Tékus V, László K, Ollmann T, Karádi Z, Lénárd L, Quinn JP, Berger A, Paige CJ, Keeble J, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z. Role of hemokinin-1 and NK1 receptors in anxiety, stress and depression-like behaviour in mice. In: Csillag András (szerk.) *XIV. Conference of the Hungarian Neuroscience Society*. p. 282. (ISBN: 978-963-88224-2-0) (2013)

Borbély É, **Hajna Z**, Berger A, Sándor K, Tóth I, Kereskai L, Pintér E, Szolcsányi J, Paige CJ, Quinn JP, Zimmer A, Helyes Z. Hemokinin-1 plays an important role in adjuvant-induced joint and lung inflammation of the mouse. *Eur J Clin Invest*. 42 (Suppl 1): 66. (2012)

Hajna Z, Pozsgai G, Boros M, Kemény Á, Helyes Z, Szolcsányi J, Pintér E. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptors play a role in hydrogen sulphide-induced vasodilation of the mouse ear. *Clinical Neuroscience*, 65:1 p. 26. (2012)

Tékus V, **Hajna Z**, Horváth Á, Kun J, Bölskei K, Szolcsányi J, Helyes Z. Role of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Ankyrin 1 (TRPV1 and TRPA1) ion channels in thermnociception in mice. *Clinical Neuroscience*, 65:1 p. 68. (2012)

Scheich B, Kormos V, Tékus V, **Hajna Z**, Gaszner B, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. Somatostatin receptor subtype 4 (sst4) plays an inhibitory role in anxiety and depression-like behaviours of mice. *Clinical Neuroscience*, 65:1 p. 57. (2012)

Szabadfi K, **Hajna Z**, Gábrriel R, Pintér E. Analysis of retinal histology in wild type and somatostatin 4 receptor deficient mice. *J Mol Neurosci*. 48 (Suppl 1): S191. (2012)

Kemény Á, Boros M, Borbély É, **Hajna Z**, Sétáló G, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. Cytokine profiling of inflamed mouse tissues obtained from different in vivo models. *J Mol Neurosci*. 48 (Suppl 1): S199. (2012)

Hajna Z, Móricz A, Elekes K, Kemény Á, Kereskai L, Berger A, Paige C J, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs: Role of Hemokinin-1 in a mouse model of acute airway inflammation. *Acta Physiol*. 202 (Suppl. 684): 39. (2011)

Kemény Á, Boros M, Borbély É, **Hajna Z**, Sétáló G, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. Cytokine profiling in different inflammatory in vivo mice models. *Acta Physiol*. 202 (Suppl. 684): 53-54. (2011)

Pozsgai G, Bagoly T, **Hajna Z**, Boros M, Helyes Z, Szolcsányi J, Pintér E. Role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptors in hydrogen sulphide-evoked calcitonin gene-related peptide (CGRP) release from isolated rat tracheae. *Acta Physiol*. 202 (Suppl. 684): 98-99. (2011)

Hajna Z, Borbély É, Quinn JP, Zimmer A, Pintér E, Szolcsányi J and Helyes Z. Role of preprotachykinin A (TAC1) gene-derived peptides and the neurokinin 1 (NK1) receptor in acute nocifensive behaviours and hyperalgesia. *Front. Neurosci*. Conference Abstract: 13th Conference of the Hungarian Neuroscience Society (MITT). doi: 10.3389/conf.fnins.2011.84.00131 (2011)

Borbély É, **Hajna Z**, Simon G, Berger A, Paige C, Quinn J, Pintér E, Szolcsányi J and Helyes Z Investigation of the role of preprotachykinin A and C (TAC1 and TAC4) gene-derived peptides in anxiety, stress and depression-like behaviour in mice. *Front. Neurosci*. Conference Abstract: 13th Conference of the Hungarian Neuroscience Society (MITT). doi: 10.3389/conf.fnins.2011.84.00099 (2011)

Pozsgai G, Bagoly T, **Hajna Z**, Boros M, Helyes Z, Szolcsányi J and Pintér E. The role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptors in the H₂S-evoked calcitonin gene-related peptide (CGRP) release from isolated rat trachea. *Front. Neurosci*. Conference Abstract: 13th Conference of the Hungarian Neuroscience Society (MITT). doi: 10.3389/conf.fnins.2011.84.00022 (2011)

Kongresszusi szóbeli előadások jegyzéke

Hajna Zsófia: Mikrocirkuláció vizsgálatára alkalmas képalkotó módszerek a gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító gyógyszerek fejlesztésében. *Gyógyszerésztudományok Fóruma, Pécs, 2014*

Helyes Z, **Hajna Z**, Botz B: Kisállat-képalkotó módszerek jelentősége és alkalmazási lehetőségei a gyulladás- és fájdalomkutatásban. *IX. Szentágotthai Szeminárium, Pécs, 2014*

Zs Hajna, G Pozsgai, T Bagoly, L Boros, Á Kemény, Zs Helyes, J Szolcsányi, E Pintér: Transient Receptor Potential Ankyrin 1 receptors mediate hydrogen-sulphide-induced calcitonin-gene-related-peptide-release and cutaneous vasodilatation. *37th International Congress of Physiological Sciences (IUPS 2013), Birmingham, UK, 2013*

Helyes Zs, Borbély É, Botz B, Tékus V, **Hajna Zs**, Sándor K, Markovics A, Szolcsányi J, Quinn JP, Berger A and McDougall JJ: Role of capsaicin-sensitive afferents and sensory-immune interactions in arthritis. *Neuroinflammation – A satellite symposium to the FENS Featured Regional Meeting, Prague, Czech Republic, 2013*

E Pintér, **Z Hajna**, G Pozsgai, T Bagoly, Z Helyes, J Szolcsányi: Characterization of TRPA1-mediated and TRPA1-independent microcirculatory responses to hydrogen sulfide in mice. *2nd European Conference on the Biology of Hydrogen Sulfide, Exeter, UK, 2013*

Pintér E., **Hajna Z.**, Pozsgai G., Bagoly T., Helyes Zs., Szolcsányi J. The role of CGRP in the TRPA1 receptor mediated effects. *10th Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference, Gdynia, Poland, 2013*

Pintér E, **Hajna Z**, Szabadfi K, Gábrriel R, Balla Z, Biró Z, Degrell P, Kőszegi T, Tékus V, Helyes Z, Dobos A, Farkas S, Szűcs Gy. Az 1-es típusú diabetes mellitus modellezése diabeteses neuropathia, nephropathia és szemelváltozások vizsgálatára patkányban. *Magyar Élettani, Farmakológiai és Mikrocirkulációs Társaságok 2013. évi közös tudományos Kongresszusa, Budapest, 2013*

Zs Hajna, G Pozsgai, T Bagoly, L Boros, Á Kemény, Zs Helyes, J Szolcsányi, E Pintér: Hydrogen-sulphide (H₂S)-induced CGRP-release and cutaneous vasodilatation are mediated by Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) receptors. *I. International Doctoral Workshop of Natural Sciences, Pécs, 2012 (III. helyezés)*

E Pinter, **Zs Hajna**, G Pozsgai, T Bagoly, M Boros, A Kemeny, Zs Helyes, J Szolcsányi: The role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor activation in hydrogen-sulphide-induced CGRP-release and vasodilation. *6th European Congress of Pharmacology, Granada, Spain, 2012*

Z Helyes, I Szitter, **Z Hajna**, K Elekes, Á Kemény, L Kereskai, J Quinn, K Sándor, E Pintér, J Szolcsányi: Role of the TRPV1 ion channel and sensory neuropeptides in cigarette-smoke-induced chronic airway inflammation model of the mouse. *9th Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference, London, UK, 2012*

Helyes Z, Dezső-Tékus V, **Hajna Z**, Borbély É, Kormos V, Botz B, Gaszner B, Nagy P, Bölcskei K, Szolcsányi J: Neuropátiás állapotok állatkísérletes modellezése szenzoros, motoros és vaszkuláris működések vizsgálati lehetőségei. *A Magyar Élettani, Anatómusok, Biofizikai, Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa, Debrecen, 2012*

Pozsgai G, **Hajna Z**, Bagoly T, Szolcsányi J, Helyes Z, Pintér E. A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 receptor szerepe a hidrogén-szulfiddal kiváltott vazodilatációban. *A Magyar Élettani, Anatómusok Biofizikai, Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa, Debrecen, 2012*

É. Borbély, **Z. Hajna**, A. Berger, K. Sándor, I. Tóth, L. Kereskai, E. Pintér, J. Szolcsányi, C.J. Paige, J.P. Quinn, A. Zimmer & Z. Helyes: Hemokinin-1 plays an important role in adjuvant-induced joint and lung inflammation of the mouse. *46th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, Budapest, 2012*

Hajna Zsófia: Endotoxinnal kiváltott légúti gyulladás és hiperreaktivitás preprotachykinin C (TAC4) génhiányos egerekben. *XVI. Korányi Frigyes Tudományos Fórum, Budapest, 2011*

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Pintér Erika professzor asszonynak, aki lehetőséget biztosított számomra a kutatócsoporthoz való csatlakozásra, és azóta szakmailag és emberileg is mindig mellettem áll. Hálásan köszönöm neki, hogy kiváló útmutatásai révén megismerhettem a farmakológia tudományának szépségét, hogy elsajátíthattam a precíz és szisztematikus kutatómunkához szükséges tulajdonságokat, és hogy nagyszerű szervezőképességének köszönhetően új perspektívák nyíltak számomra ezen a területen. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Biró Zsolt témavezetőmnek, hogy medikus korom óta támogatta munkámat, és mindvégig példát mutatott az orvostudomány iránti tiszteletből és alázatból. Hálával tartozom „tiszteletbeli témavezetőmnek”, Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának, akihez mindig bátran fordulhattam, és akinek szakmai tanácsaira mindig számíthattam. Köszönöm neki, hogy páratlan lelkesedésével, valamint a kutatómunka iránti szenvedélyes és állhatatos elkötelezettségével mindig új lendületet és hatékony segítséget tudott adni. Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Barthó Loránd és Dr. Pethő Gábor professzor uraknak, akik biztosították számomra annak lehetőségét, hogy az Intézet oktatójaként dolgozhassam, ill. Prof. Dr. Szolcsányi Jánosnak, akinek szakma iránti elhivatottsága példaértékű mindannyiunk számára. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Borbély Évának és Dr. Tékus Valériának azért a rengeteg segítségért, tanácsért, türelemért és jókedvéért, amellyel támogatták munkámat, mindenek előtt pedig őszinte barátságukért, amellyel a mindennapi életben is mindig segíthettük egymást. Hálásan köszönöm Dr. Kemény Ágnesnek, Dr. Pozsgai Gábornak, Dr. Szőke Évának és Dr. Bölcskei Katának a kutatás során nyújtott nélkülözhetetlen munkájukat és magas színvonalú szakmai tanácsaikat. Köszönettel tartozom Dr. Botz Bálintnak, Dr. Sággy Évának, Payrits Majának, Dr. Scheich Bálintnak, Dr. Csekő Katának, Dr. Szitter Istvánnak és Dr. Kun Józsefnek mindazért a sok segítségért, amelyet a kísérletek elvégzése során nyújtottak, ill. diákköröseimnek, Gubányi Tímeának és Móricz Andrásnak a lelkes és szorgalmas munkájukért. Szeretnék köszönetet mondani Hírné Perkecz Anikónak a kiváló szövettani metszetek elkészítéséért, valamint Önböli Gyulánának, Fábíán Ildikónak, Szentes Nikolettnek, Olasz Istvánnának és Gógl Csabánának az *in vivo*, Bagoly Teréznek pedig az *in vitro* kísérletekben nyújtott szakszerű és precíz munkájukért. Köszönöm az Intézet valamennyi volt és jelenlegi munkatársának, hogy egy olyan közösségben dolgozhatom, amelyhez jó érzés tartozni. Köszönetemet szeretném kifejezni azoknak az Intézetünkön kívüli kollégáknak is, akikkel a tudományos munkám során együtt dolgozhattam. Nagy hálával tartozom a tragikusan fiatalon elhunyt Dr. Szabadfi Krisztinának, akinek a szakma iránti szeretete és a kutatómunkához való lelkiismeretes hozzáállása örök példa marad számomra. Ezúton szeretném neki és Dr. Gábrriel Róbert professzor úrnak is megköszönni a retina hisztológiai vizsgálatait során végzett professzionális munkájukat. Köszönettel tartozom Dr. Kereskai Lászlónak és Prof. Dr. Degrell Péternek a szövettani metszetek értékeléséért, valamint köszönöm Dr. Bánki Eszternek, Dr. Balla Zsoltnak, Dr. Kőszegi Tamásnak, Dr. Farkas Sándornak és Dr. Dobos Andrásnak a közösen végzett kísérletek során nyújtott együttműködésüket. Külföldi kollaborációs partnereink közül köszönettel tartozom Prof. Pierangelo Geppettinek, Prof. John Quinn-nek, Alexandra Bergernek, Prof. Susan D. Brain-nek, Aisah Aubdool-nak és Fiona Russell-nek, hogy a génihiányos egerek heterozigóta tenyészpárjait rendelkezésünkre bocsátották, valamint hogy a kísérletek végzése és a közlemények írása során is segítették munkánkat. Végezetül szeretnék köszönetet mondani Családomnak, akikre mindig számíthattam tanulmányaim és kutatói pályám során is, és akik nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Különösen is hálás vagyok Férjemnek az odaadó szeretetért és végtelen türelméért, amivel mindig mellettem áll, illetve Édesanyámnak az áldozatkész segítségéért, amellyel mindvégig támogatott.