

**A HIDROGÉN-SZULFID ÉS POLISZULFID VEGYÜLETEK
TRPA1 MEDIÁLTA HATÁSAI
AKUT ÉS KRÓNIKUS GYULLADÁS ÁLLATMODELLJEIBEN**

DR. BÁTAI ISTVÁN ZOÁRD

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Neurofarmakológiai Program

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

Témavezetők: Prof. Dr. Pintér Erika, Dr. Pozsgai Gábor



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs, 2020

BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. H₂S, mint gazotranszmitter

Az 1990-es években az, NO és CO mellett felfedeztek egy harmadik gazotranszmittert, a H₂S-t. A korábban csak toxikus gáznak tartott molekuláról hamar kiderült, hogy pleiotróp biológiai hatásokkal rendelkezik, többek között részt vesz a nocicepció, inflammáció és vaszkuláris tónus szabályozásában is. Kapcsolatát a kapszaicin szenzitív idegrostokkal legelőször Prior et al. vetették fel a patkányokban H₂S-sel kiváltott tüdőszérülés modelljében ¹. A H₂S és a kapszaicin érzékeny idegek kapcsolatának újabb részleteire urológiai vonatkozásban derült fény ^{2,3}. Igaz, hogy *in vitro* TRPA1 receptort expresszáló CHO sejteken már folytattak vizsgálatokat, ugyanakkor Myamoto kutató csoportja vizsgálta először natívan TRPA1 receptort expresszáló DRG neuronokon a H₂S hatásait. ⁴ H₂S hatására TRPA1 KO egerekben, illetve HC030031 adását követően csökken a vazodilatáció mértéke és kisebb mennyiségben szabadul fel a vazodilatátor hatással bíró calcitonin gén-rokon peptid (calcitonin gene-related peptide, CGRP) ⁵⁻⁷.

1.2. H₂S, NO és a poliszulfid kémiai és biológiai interakciói

Murad és Ignarro úttörő munkásságának köszönhetően született az a döbbenetet kiváltó felismerés, miszerint az NO fizikai és kémiai tulajdonságai ellenére endogénen szintetizálódik és jelátviteli funkciót tölt be biológiai rendszerekben ^{8,9}. Ezt követően robbanásszerű fejlődés következett a gazotranszmitterek kutatásában. Kimura kutatócsoportja azt fedezte fel, hogy az NO és H₂S interakcióban állnak egymással, amikor izolált mellkasi aorta szegmenseken az egymásra gyakorolt kölcsönösen szinergista vazodilatatív hatásukat figyelték meg ¹⁰. A felfedezés óta komoly erőfeszítések zajlanak az NO és H₂S szignalizáció kapcsolódási pontjainak feltérképezésére ¹¹. Azonban a kérdés tanulmányozását bonyolítja a tény, hogy a két gazotranszmitter farmakodinámiai kölcsönhatásai mellett kémiai reakcióba is képes lépni egymással ¹². A H₂S és NO között létrejövő kémiai reakciók termékei szövevényes hálózatot alkotnak, amely feltérképezése komoly nehézségeket okoz, és amelynek következményeként számos egymásnak ellentmondó publikáció született ¹². A reakciók gyors kinetikája és reverzibilitása miatt sokszor nem egyértelmű, hogy a keletkező anyagok csak intermediér termékek vagy esetleg biológiai hatással is rendelkeznek. A reakciók során keletkező anyagok közé tartozik a legegyszerűbb kén-nitrogénmonoxid vegyület, a nitrozo-szulfid (HSNO), a nitrozo-perszulfid (SSNO), poliszulfidok (H₂S_N), nitrátok, szulfitok, szulfátok, dinitrozo-szulfid (SULFI/NO) és a nitroxil (HNO) ¹².

1.3. A neuronális TRPA1 csatornák szerepe a gyulladásban.

A szomatikus és viscerális primér szenzoros neuronok TRPA1 expressziója jól ismert. A peptiderg, kapszaicin szenzitív neuronok egy szubpopulációja a TRPV1 mellett TRPA1-t is koexpresszál¹³. A TRPV1 és a TRPA1 egyaránt nem szelektív kation csatornák, amelyeknek aktivációja az idegvégződésekből Na^+ és Ca^{2+} beáramláshoz vezet. A Na^+ influx hatására akcióspotenciál jön létre, a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció proinflammatorikus mediátorok (CGRP, substance P neurokinin A) felszabadulásához vezet¹⁴. A felszabaduló proinflammatorikus mediátorok neurogén gyulladást váltanak ki. A neurogén gyulladás kísérőjelenségei a vazodilatáció, a megnövekedett vaszkuláris permeabilitás és a gyulladásos sejtek toborzása. Ezen változások felelnek meg a kapszaicin szenzitív idegvégzések lokális efferens funkciójának^{15,16}. A TRPA1 aktiváció hatására a proinflammatorikus mediátorok mellett antiinflammatorikus peptidek is felszabadulnak a kapszaicin szenzitív idegvégzésekéből és szisztémás efferens hatással rendelkezhetnek. Az egyik ilyen peptid a szomatosztatin¹⁷. A szomatosztatin egy ciklikus peptid, amely egyaránt megtalálható a központi idegrendszerben és a perifériás szövetekben is. A neuronális eredetű szomatosztatin fájdalom- és gyulladásgátló hatásokkal rendelkezik, amelyeket elsősorban az sst4 receptor közvetít¹⁵. Ezen megfigyelésekkel összhangban a DMTS TRPA1 és sst4 receptor jelenlétében képes volt csökkenteni a hősérülést követő gyulladást és hiperalgézia mértékét egerekben¹⁷.

1.4. A kénvegyületek TRPA1 mediálta hatásai

A hidrogén-szulfid TRPA1-hez köthető hatásainak verifikálása leggyakrabban specifikus antagonisták (AP18, HC030031) és TRPA1 KO egerek felhasználásával történt.^{4,5,18}. Továbbá beazonosításra kerültek a TRPA1 receptort alkotó és aktivációjához szükséges cisztein aminosavak is¹⁹.

A poliszulfiddal kiváltott TRPA1 aktiváció hatásait figyelték meg RIN14B sejteken, gallus domesticus mellkasi aorta kemoszenzitív epitheloid sejtjein és egér DRG neuronokon^{18,20,21}. A poliszulfid hatására keletkező Ca^{2+} jelek gátolhatók voltak TRPA1 antagonista alkalmazásával. Intraplantárisan beadott nátrium-poliszulfid a TRPA1 receptoron keresztül hatva ödémát és hiperalgéziát váltott ki²¹.

Összességében elmondható, hogy számos publikáció született a TRPV1- és TRPA1 receptorok funkciójáról, a fájdalomérzékelésben és gyulladásban betöltött szerepükről, továbbá a TRPA1 és a hidrogén-szulfid kapcsolatáról, ennek ellenére, mégis a mai napig

számtalan megválaszolatlan kérdés áll fenn a témával kapcsolatban, amelyek további részletes vizsgálatokra adnak lehetőséget.

CÉLKITŰZÉS

Amióta ismert, hogy a H_2S endogén úton is termelődik a szervezetünkben és gáztranszmitterként funkcionál, élénk kutatások folynak biológiai hatásainak feltérképezésére. Azonban hamar kiderült, hogy a H_2S komplex szerepet játszik a redox rendszerekben és számos további mediátor keletkezhet belőle. Jelenleg egy olyan látszólag egyszerű kérdés, mint a hidrogén-szulfid pontos kvantitatív meghatározása a biológiai rendszerekben is heves vitákat tud kelteni tudományos körökben. Kísérleteink során három különböző hidrogén-szulfid donor vegyület hatásait kívántuk vizsgálni két különböző jellegű, egy akut- és egy krónikus gyulladásos modellt alkalmazva.

A K/BxN szérum transzfer artritisz modell során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. A GYY4137 H_2S donor befolyásolja-e az egerekben kifejlődő artritisz súlyosságát?
2. A TRPA1 illetve sst4 génkiütött egerekben megfigyelhető-e különbség az artritisz lefolyásában?
3. A GYY4137 képes-e aktiválni a TRPA1 receptort *in vitro*, ha igen, milyen mechanizmuson keresztül?
4. A GYY4137 hatására felszabadulnak-e gyulladásgátló neuropeptidek a bőr idegvégződéseiből *ex vivo*?

A karrageninnel kiváltott akut gyulladás modelljében a szervetlen polisulfid és a szerves polisulfid, a dimetil-triszulfid fájdalomcsillapító és gyulladásgátló hatásait terveztük vizsgálni az alábbi paraméterek mentén:

1. Megfigyelhető-e a mechanikai fájdalomküszöb emelkedése a DMTS illetve POLY hatására?
2. Befolyásolja-e a DMTS és a POLY az ödéma képződés nagyságát?
3. Hatással van-e a DMTS és a POLY kezelés az *in vivo* képkeltő módszerekkel meghatározott neutrofil specifikus mieloperoxidáz aktivitásra és az extravazáció mértékére?

4. A TRPA1 és az sst4 génhiányos egerekben változnak-e a DMTS és a POLY kezelés hatásai?

KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

Állatkísérleteinket 2-4 hónapos korú, 20-25 grammos funkcionális TRPA1 (TRPA1^{-/-}) és sst4 (^{-/-}) génhiányos hím egereken, illetve vad típusú párjaikon végeztük (TRPA1^{+/+} és sst4^{+/+}) Mindkét génmódosított egértörzs C57BL/6 alapú. Az általunk használt egértörzsek közforgalomban nem kaphatóak,, a TRPA1 génhiányos törzset Bautista munkacsoportja hozta létre ²². Az első TRPA1 heterozigóta tenyészőpárokat Pierangelo Geppetti (Firenzei Egyetem, Firenze, Olasz ország) ajándékozta intézetünknek. Az sst4 egereket eredetileg Jeremy P. Allen és Prof. Dr. Pierce C. Empson generálta, bocsátotta rendelkezésünkre ²³. A TRPA1- illetve a sst4 WT és KO törzseket heterozigóta szülők pároztatásával hoztuk létre. Az utódok genotipizálást követően lettek szétválasztva vad és génhiányos csoportokra. Az egereket a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének Állatházában tenyésztettük. Tartásuk 24-25°C-os szobahőmérsékleten 12 órás világos-sötét ciklus mellett faforgáccsal ellátott 330 cm²-es és 12 cm magas polikarbonát ketrecekben, a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének Állatházában és a Szentágotthai János Kutatóközpont Központi Állatházában történt. Az állatok számára ad libium standard egértáp és csapvíz állt rendelkezésre. A szociális depriváció és a túlszűfoeltság elkerülése végett ketrecenként 5-10 egyedet tartottunk együtt.

3.2. Etikai engedélyek

Kísérleteink során eleget tettünk a hazai, 1998. évi XXVIII. az állatok védelméről és kíméletéről szóló törvénynek és az állatkísérletek végzéséről szóló 40/2013 (II. 14.) számú kormányrendeletnek, továbbá az Európai Parlament és Tanács 2010/63/EU irányelvének és a Nemzetközi Fájdalom Társaság (IASP) ajánlásait is követtük. Kísérleteinket a Pécsi Tudományegyetem Állat Etikai Bizottság engedélyével végeztük (BA02/2000-47/2017 és PE/EA/3895-6/2016)

3.3. Kísérleti modellek

3.3.1. Karragenin indukálta akut lábgyulladás

Az akut gyulladást intraplantárisan injektált karragenin (20 µl 3% fiziológiás sóoldatban) beadásával váltottuk ki. A modell során randomizáltan csak az egyik oldali lábat kezeltük

karrageninnel, az ellenkező oldalt azonos térfogatú fiziológiás sóoldattal kezeltük ²⁴. A POLY (17 $\mu\text{mol/ttkg}$) és DMTS (250 $\mu\text{mol/ttkg}$) kezeléseket intraperitoneálisan (i.p.) végeztük. A kezeléseket a gyulladás kiváltása előtt 30 perccel kezdtük el, és ezt követően óránként ismételtük, összesen hét alkalommal kezeltük az állatokat. A DMTS-t naponta-, a POLY-t minden egyes kezelés előtt frissen készítettük el.

3.3.2. K/BxN szérumsztransfer artritisz modell

Kouskoff et al. 1996-ban kitenyésztette a spontán artritiszes K/BxN egértörzset. Megfigyeléseik során fény derült az egerek patológiai elváltozásai és a humán reumatoid artritisz között fennálló nagymértékű hasonlóságra ²⁵. A K/BxN szérumsztransfer artritisz paradigma előnyei közé tartozik, hogy K/BxN egerek szérumját, egy másik egértörzsbe beoltva ki lehet váltani a spontán artritiszes egerekkel megegyező tünetegyüttest. Christensen et al. összefoglalójában részletesen tárgyalja a K/BxN szérumsztransfer artritisz jellemzőit ²⁶. Kísérleti elrendezésünkben az alábbi paradigmát választottuk: az egerek ízületi gyulladásának kiváltásához egyszeri i.p. K/BxN (300 μl szérumot PBS-ben felhígítva 1 ml-re) szérumsztransfer beadásával váltottuk ki. Az egereket a szérumsztransfer beadását megelőzően, i.p. GYY4137 (50 mg ttkg^{-1}) kezeltük és a kezelést naponta ismételtük. Kontroll csoportoknál, BxN egerekből nyert nem aritrogén szérumot és PBS-t alkalmaztunk. A kísérleteinkben felhasznált TRPA1 WT és KO egerek két fő csoportra bontottuk. Az egerek egyik csoportját a gyulladás harmadik napján feláldoztuk, és a lábaikból citokin méréseket végeztünk. A másik főcsoportban lévő egereken képalkotó, funkcionális és szövettani analíziseket hajtottunk végre. Az sst4 egerek esetében nem végeztünk citokin meghatározásokat.

3.4. Vizsgálati módszerek

3.4.1. A szervetlen poliszulfid és a dimetil-triszulfid oldatok elkészítése

Nagy et al. által publikált metodika alapján állítottuk elő a poliszulfid oldatot ²⁷. Az oldatok exogén eredetű oxidációja elleni védekezésneként N_2 gázzal kifűjtött polipropilén csövekkel dolgoztunk. A reagenseket jégen, fénytől védetten tartottuk, ezáltal csökkentve a bomlásukat. A hipoklórossav törzsoldatunk koncentrációját 292 nm-en mért fényelnyelésével határoztuk meg ($E_{292} = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A H_2S törzsoldatot desztillált vízben feloldott nátrium-szulfid-nonahidrátból állítottuk elő és koncentrációját 230 nm-en ($E_{230} = 7700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) és 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoesav) (DTNB) hozzáadását követően 412 nm ($E_{412} = 28200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)-en mért abszorbancia értékekkel határoztuk meg. A két mérési mód eredményének átlagát tekintettük a hidrogén-szulfid valós koncentrációjának. A törzsoldatokat minden nap frissen készítettük el. A törzsoldatokból 60 mmol L^{-1} hidrogén-szulfid- és 20 mmol L^{-1} hipoklórossav oldatokat készítettünk. A poliszulfid előállításához a hidrogén-szulfidhoz

folyamatos rázás mellett cseppenként adagoltuk a hipoklóros savat azonos térfogatban. Az így kapott POLY oldatot desztillált víz, PBS és sósav hozzáadásával alakítottuk izotóniássá és izohidriássá. A DMTS vízben nehezen oldódik, ezért több lépésben kellett előállítanunk az állatok kezelésére szolgáló oldatot. A végső oldat DMTS koncentrációja 25 mmol L^{-1} volt, továbbá 2.24% v/v-ban DMSO-t és 0.45% v/v-ban Tween 80-t is tartalmazott. A kontroll oldat készítése során az 1 M DMTS helyett DMSO-t adtunk az oldathoz.

3.4.2. A poliszulfid kvantitatív meghatározása hideg cianolízissel

A karragenin által kiváltott gyulladásos modellben használt izotóniás és izohidriás POLY és a GYY4137 felhasználásával nyert poliszulfid pontos koncentrációját hideg cianolízissel határoztuk meg²⁸.

3.4.3. Ca^{2+} beáramlás mérése áramlási citométerrel TRPA1 expresszálo CHO sejteken.

A Ca^{2+} beáramlási méréseket natív- és humán TRPA1-et expresszálo kínai hörcsög ovárium sejteken (chinese hamster ovary, CHO) végeztük. Az egyes mérési pontokhoz megközelítőleg 10^4 sejtet $100 \mu\text{l}$ ECS-ben reszuszpendáltuk és Fluo-4 AM (Invitrogen, $0.4 \mu\text{L}$, $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ DMSO-ban oldva) festékkel 37°C -on 30 percen keresztül inkubáltuk. A sejtek zöld fluoreszcens jelét, kontroll csak Fluo-4 festett sejtek jelére normalizáltuk. Bizonyos mérések esetén 5 perces preinkubációt végeztünk a TRPA1 antagonist HC030031 ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ECS-ben oldva). Vizsgáltuk a hidrogén-szulfid, az inorganikus poliszulfid és a GYY4317-ből előállított poliszulfid TRPA1 aktivációs képességét. A kontroll mérések elvégzéséhez, az adott hatóanyagoknak megfelelő vehikulum oldatokat használtunk.

3.4.4. Szomatosztatin felszabadulás mérése radioimmunoassay (RIA) módszerrel izolált egér lábbőr idegvégződésekből.

A TRPA1 WT és KO egereket nyakcsigolya diszlokációval áldoztuk fel, majd a hátsóvégtagokat finom nyírógéppel szörtelenítettük. A lábbőröket preparálást követően azonnal oxigenizált, szobahőmérsékletű szintetikus intersticiális folyadékba (SIF) helyeztük. A bőrmintákat egyesével kifordítva akril rudakra rögzítettük sebészi fonal segítségével és 37°C oxigenizált SIF-et tartalmazó rázófürdőbe helyeztük át és 30 percen keresztül inkubáltuk benne. Ezt követően radioimmunoassay (RIA) módszerrel határoztuk meg a felszabadult szomatosztatin, bazális, stimulált és poszt stimulált szintjeit a mintákból¹⁷. Az egyes mérési fázisok 5 perces inkubációs időket öleltek fel, a stimulációt $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ POLY-val vagy vehikulummal végeztük önmagában és $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ HC030031 HC jelenlétében.

3.4.5. Gyulladásos markerek detektálása a K/BxN modellben

A szérumsztransfer artritist indukcióját követően az egereket a 3. napon ketamin/xylazin (100/10 mg ttkg⁻¹) altatás alatt nyaki diszlokációval termináltuk. Az egerek talpait 1 ml jéghideg mosófolyadékkal átöblítettük, a mintákat folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk, végül -80 °C-on tároltuk. A (IL-1 β , KC, MIP-1 α és MIP-2) méréseket egyetlen mintából mágneses gyöngyökhöz kötött antitesteket használó Milliplex MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel – Immunology Multiplex Assay (Merck Millipore, Billerica, MA, Amerikai Egyesült Államok) segítségével végeztük Luminex 100 műszer és Luminex 100 IS szoftver felhasználásával ²⁹.

3.4.6. Mechanikai fájdalomküszöb meghatározása

A különböző kísérleti modellek során kialakuló gyulladás hatására bekövetkező hiperalgészia kvantitatív mérését dinamikus plantáris eszteziométerrel (DPA, Ugo Basile 37400, Comerio, Olaszország) végeztük ¹⁷.

3.4.7. Hátsó végtagok térfogatának mérése

Az egerek hátsó lábain a gyulladás okozta térfogattöbbleket pletizmómméterrel (Ugo Basile Plethysmometer 7140, Comerio, Olaszország) határoztuk meg ²⁴.

3.4.8. Függeszkesztési teszt

A függeszkesztési teszt során az állatokat egy fémrácsra helyezük, amelyet felemelve és tengelye körül 180°-kal elforgatva kényszerítjük az egereket függeszkesztési pozícióba a gravitációval szemben. A vizsgálat során a függeszkesztéssel töltött idő hosszát mérjük meg.

3.4.9. Az ízületi gyulladás pontozása

A K/BxN szérumsztransfer artritises egerek ízületi érintettségét szemikvantitatív pontozással is értékeltük. A pontozás során mind a négy végtag érintettségét figyelembe vettük. A pontrendszer alapját a gyulladás és ízületi funkció általános jelei alkották (hiperémia, ödéma, az ízületi passzív mozgástartomány beszűkülése). Az egyes végtagok állapotát 0-10-ig terjedő skálán értékeltük és egyenként a hátsó lábak értékeit átlagoltuk ³⁰.

3.4.10. *In vivo* lumineszcens neutrofil mieloperoxidáz aktivitás képző mérés

Az egereket a neutrofil mieloperoxidáz által termelt reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségével szorosan korreláló, kemilumineszcens festékkel, luminollal kezeltük i.p. (150 mg ttkg⁻¹) ³¹. A felvételeket a hátsóvégtagokról IVIS Lumina II (PerkinElmer, Waltham, Amerikai Egyesült Államok) készülékkel készítettük a luminol beadását követően a 10. percben.

3.4.11. A plazmaextravazáció *in vivo* fluoreszcens képalkotó mérése.

A plazmafehérje extravazáció meghatározása során a neutrofil mieloperoxidáz méréséhez szükséges eszközparkot használtuk (IVIS II és Living Image), ebből kifolyólag lehetőségünk volt a méréseket egybekötve végezni. A megnövekedett vaszkuláris permeabilitást a retrobulbárisan beadott IR-676 fluoreszcens festékkel (0.5 mg tkg⁻¹) kvantifikáltuk a hátsóvégtagokról a 20. percben készített felvételek kiértékelése által ³¹.

3.4.12. Szövettani vizsgálat

A krónikus modellben felhasznált egereket a kísérlet 7. napján feláldoztuk, a tibiotarzális ízületeiket eltávolítottuk és 4%-os pufferelt paraformaldehiddel fixáltuk. A fixált ízületeket dekalifikáló oldatba helyeztük át 2-3 hétre és ezt követően axiális síkban 3-5 µm vastag paraffinos hematoxin-eozin festett metszetek készítettünk belőlük. A metszeteket hisztopatológiai elváltozások alapján (porckárosodás, infiltráló mononukleáris sejtek mennyisége, szinoviális hiperplázia és fibroblaszt aktivitás és kollagén lerakódás) 0-3-ig terjedő skálán pontoztuk. Az egyes paraméterek részpontjainak összegzésével alkotott 0-12-ig terjedő kompozit pontrendszer segítségével hasonlítottuk össze az egyes csoportokat ^{30,31}.

3.4.13. Statisztika

Az eredményeink prezentációja során az egyes csoportok átlagát, a standard hibával feltüntetve ábrázoltuk, kivéve a szövettani eredmények esetében. Utóbbi ábra esetén a dobozok a medián és 25-75 percentilis érték tartományt, a bajuszok a legnagyobb és legkisebb értékeket ábrázolják. A K/BxN modell esetén statisztikai analíziseinkhez egy- és két utas variancia analízist használtunk, Turkey-, Dunnett- vagy Bonferroni poszt hoc tesztel kiegészítve. A szomatosztatin felszabadulás elemzése során az adataink nem tanúsítottak normál eloszlást, ezért Kruskal–Wallis tesztet alkalmaztunk. A szövettani eredmények vizsgálata során alkalmazott Kruskal–Wallis tesztet Dunn tesztel egészítettük ki. Az akut gyulladás modelljében a képalkotó vizsgálat elemzéséhez egy utas ANOVA-t használtunk, a többi eredmény analízisét két utas ANOVA-val Bonferroni post tesztel kiegészítve végeztünk. Az összes statisztikai analízist és az ábrák szerkesztését GraphPad Prism 5 szoftver segítségével végeztük. Szignifikánsnak tekintettük az eltérést két csoport között amennyiben az adott p értékre igaz volt a következő: $p < 0.05$.

EREDMÉNYEK

5.1. Az GYY4137 lassú felszabadulású hidrogén-szulfid donor hatásai a K/BxN szérum transzfer artritisz modelljében TRPA1 és sst4 KO egerekben.

5.1.1. A GYY4137-ből felszabaduló hidrogén-szulfid hipoklórossavval reagálva poliszulfidot hoz létre és Ca^{2+} beáramlást vált ki a TRPA1-et expresszáló CHO sejteken.

A GYY4137-hez a 90 perces acidifikált citrát pufferben való inkubációt követően, azonos térfogatú 100 μmol hipoklórossavat hozzáadva hideg cianolízissel mérve $77.15 \pm 15.29 \mu\text{mol}$ poliszulfid keletkezett. A poliszulfid 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentrációban TRPA1 expresszáló sejteken Ca^{2+} beáramlást váltott ki. A poliszulfid hatása gátolható volt a TRPA1 specifikus antagonistá HC030031 (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) jelenlétében és hiányzott a natív, TRPA1 expresszióval nem rendelkező sejteken. A GYY4137-ből előállított poliszulfid allil-izotiocianáthoz mérhető Ca^{2+} influxot váltott ki a TRPA1 receptor jelenlétében a CHO sejteken. A GYY4137 illetve a poliszulfid előállításához felhasznált reagensek nem okoztak Ca^{2+} influxot. A hidrogén-szulfid csak extrém magas koncentrációkban váltott ki a Ca^{2+} beáramlást, ami a TRPA1 hiányában is megfigyelhető volt.

5.1.2. *Ex vivo* bőrlebenyekben TRPA1 közvetíti a poliszulfid ingerlést követő szomatosztain felszabadulást

Az izolált szervfürdőkbe helyezett bőrlebenyekből 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ poliszulfid hatására $0.1407 \pm 0.044 \text{ fmol mg}^{-1}$ szomatosztatinszerű (SOM-LI) immunreaktív vegyület szabadult fel. A felszabadulás mértéke a TRPA1 antagonistá, HC030031 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ jelenlétében szignifikánsan lecsökkent. A SOM-LI felszabadulásának mértéke ugyancsak kisebb volt TRPA1 KO egerekből származó minták esetében

5.1.3. A GYY4137 ellentétes hatása a mechanikai hiperalgéziára TRPA1 jelenlétében és hiányában.

A 3. napon a GYY4137 kezelt artritiszes TRPA1 KO egerek mechanikai fájdalomküszöbe szignifikánsan kisebb volt a vehikulummal kezelt KO társaikhoz, illetve a WT GYY4137 kezelésben részesülő egyedekhez képest. A 7. napon a GYY4137 kezelés hatására csökkent a hiperalgézia mértéke a TRPA1 WT egerekben az ugyancsak GYY4137 kezelésben részesülő TRPA1 KO egerekhez képest.

5.1.4. A GYY4137 TRPA1 WT egerekben csökkentette az artritisz score-t

Az 5. napon a GYY4137 mérsékelte az artritisz külsőleg megfigyelhető jeleit a TRPA1 WT egerekben a vehikulummal kezelt WT és a GYY4137 kezelt KO artritiszes társaikhoz képest

5.1.5. A nem arthritiszes egerek függeszkedési képessége romlott a TRPA1 gén hiányában.

Az arthritiszes TRPA1 WT és KO egerek kezeléstől függetlenül szignifikánsan rosszabbul teljesítettek a függeszkedési tesztek során a BxN szérum kezelt társaikhoz képest. Ez a különbség 5. napon még csak a WT egereknél jelentkezett, ellenben 7. napra már mindkét törzsnél megfigyelhető volt.

5.1.6. A GYY4137 és a TRPA1 gén nincs hatással a pletizmográfiával mért lábtérfogatokra és az egerek testsúlyváltozására.

A K/BxN kezelést követően a 3. naptól a kísérlet végéig szignifikánsan megduzzadt az érintett egerek lábai a kontroll, inaktív BxN szérumot kapott társaikhoz képest. Az arthritiszes egerek állapotromlása nyomon követhető volt a testsúlyuk csökkenésével is, azonban a GYY kezelés, illetve a genotípus nem befolyásolta e változásokat.

5.1.7. A GYY4137 protektív hatásait nem az sst4 receptor közvetíti

A fenti kísérleteket elvégeztük sst4 WT és KO egerekkel is, azonban sem az sst4 gén, sem a GYY kezelés nem produkált szignifikáns különbséget a mechanikai fájdalomküszöbre, az arthritisz súlyosságára, a függeszkedési időre és a lábtérfogatra vonatkozólag.

5.1.8. GYY4137 kezelés hatására fokozódott a neutrofil granulocita specifikus MPO aktivitás és a plazmafehérje extravazáció mértéke arthritiszes TRPA1 KO egerekben

A GYY4137 kezelés hatására a 2. napon fokozódott az MPO aktivitás az arthritiszes TRPA1 KO egerek tibiotarzális ízületeiben, a WT típusú egerekhez és a vehikulummal kezelt KO társaikhoz képest is. A GYY4137 a KO egerekben a 2. és a 6. napokon szignifikánsan fokozta a plazmaextravazáció mértékét a hasonló kezelésben részesülő WT és a vehikulumban részesült KO egerekkel összehasonlítva.

5.1.9. Az sst4 gén nincs hatással az arthritiszes egerekben mért MPO aktivitásra és extravazációra.

A kemilumineszcens MPO aktivitásra specifikus- és az extravazációt jellemző fluoreszcens képalkotó vizsgálatokat elvégeztük sst4 WT és KO arthritiszes egereken is. Megfigyeléseink alapján nem találtunk szignifikáns különbséget az MPO aktivitásban és az extravazációban a vizsgált csoportok között

5.1.10. Emelkedett a MIP 2 szintje a GYY4137 kezelés hatására az arthritisz TRPA1 KO egerek hátsóvégtagjaiban.

A szérum transzfer arthritisz egerek lábainak átmosása által nyert ízületi folyadék mintákban nem találtunk szignifikáns különbséget az IL-1 β , KC és MIP-1 α koncentrációját illetően. A GYY4137 kezelt TRPA1 KO egerekből származó minták esetén a MIP-2 szignifikánsan magasabbnak mutatkozott a WT párjaikhoz képest.

5.2. Az inorganikus poliszulfid és a DMTS hatásai a karragenin indukálta akut gyulladás modelljében TRPA1 és sst4 KO egerekben

Eredmények

5.2.1 Akut gyulladásban a POLY mechanikai fájdalmat csökkentő hatását a TRPA1 és sst4 közvetíti

A vehikulummal kezelt TRPA1 WT és KO illetve az sst4 WT és KO egerekben karragenin hatására egyaránt szignifikánsan csökkent a mechanikai fájdalomküszöb nagysága a kontralaterális, fiziológiás sóoldattal kezelt lábhoz képest. A POLY kezelés TRPA1 WT és a sst4 WT egerekben szignifikánsan csökkentette a karragenin okozta mechanikai hiperalgémia nagyságát a vehikulummal kezelt egerekhez képest. A POLY fájdalomcsillapító hatása hiányzott a KO egerek esetén.

5.2.2. A DMTS fájdalomcsillapító hatásában a TRPA1 csatorna nem tölt be kizárólagos szerepet, ellenben sst4 jelenléte nélkülözhetetlen a hatás kialakulásához

A DMTS kezelés TRPA1 WT egerekben a karragenin okozta hiperalgéziát nagymértékben csökkentette. A DMTS fájdalomcsillapító hatása jelentősen kisebb mértékben érvényesült a TRPA1 KO egerekben összehasonlítva vad típusú párjaikkal. Ezzel összhangban a DMTS kezelés TRPA1 KO egerekben is hatékonynak bizonyult a 2. és 4. órában a vehikulummal kezelt csoporttal összehasonlítva. Sst4 WT egerekben karrageninnel kezelt oldal esetén a DMTS kezelés a vehikulummal szemben kicsi, de szignifikáns mértékben emelte a fájdalomküszöb értékét. A DMTS fájdalomcsillapító hatása nem volt megfigyelhető a sst4 KO egereknél.

5.2.3. A POLY nincs hatással a karragenin okozta akut gyulladással járó lábtérfogati növekedésre

Mind a TRPA1 WT és KO valamint az sst4 WT és KO egerekben a vehikulum illetve a POLY kezelés ellenére is szignifikáns lábduzzadás fejlődött ki a karragenin intraplantáris beadását követően az összes mérési időpontban.

5.2.4. A DMTS TRPA1 független és sst4 függő módon képes csökkenteni az ödémaképződést.

TRPA1 WT egerekben a DMTS hatására a vehikulum kezeléssel szemben csökkent ödémaképződés volt megfigyelhető a 6. órára. Ez a hatás TRPA1 KO egerekben még kifejezettebben érvényesült, szignifikánsan kisebb értékeket mértünk a DMTS kezelés hatására, már a 4. és 6. órában is. Tovább erősíti ezen megfigyelést a DMTS kezelt TRPA1 KO egereknél a 4. órában regisztrált jelentősen kisebb lábtérfogat WT társaikkal szemben. Sst4 WT egerekben a DMTS mérsékelte a lábduzzadás mértékét a vehikulum kezeléshez képest. A DMTS nem befolyásolta a pletizmográfiás eredményeket sst4 KO egerekben.

5.2.5. A POLY nem volt hatással a neutrofil specifikus MPO aktivásra karrageninnel kiváltott akut gyulladás során

Az MPO aktivitás egyaránt fokozódott a karrageninnel kezelt TRPA1 WT és KO illetve a sst4 WT és KO egerek hátsó végtagjaiban. A POLY ezen értékekre nem volt lényeges hatással.

5.2.6. A DMTS sst4 WT és KO egerekben egyaránt csökkentette a neutrofil granulociták MPO aktivitását a karrageninnel kezelt lábakban

Minden vizsgált egértörzs esetében megfigyelhető volt a DMTS MPO aktivitást csökkentő hatása, azonban csak a sst4 egér törzsek esetében bizonyult szignifikánsnak a gátlás mértéke.

MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

A K/BxN szérumsztransfer arthritisz modellel végzett kísérleteink során számos új eredményhez jutottunk. Sikeresen kimutattuk, hogy a választott állatmodellben a GYY4137 kettős, egymással ellentétes hatást fejthet ki a TRPA1 receptor meglététől vagy hiányától függően. Arthritiszos TRPA1 WT egereknél a GYY4137 kezelés mellett az antinociceptív és antiinflammatorikus hatás dominált, ezzel szemben TRPA1 KO egerekben pronociceptív és proinflammatorikus hatásokat fejtett ki a lassú leadású H₂S donor. Részletesebben megvizsgálva, a TRPA1 WT egerekben mérséklődött a hiperalgéria, csökkent a gyulladás külső jeleit értékelő pontszám és mérséklődött a porcdestrukció mértéke az ízületek felszíne mentén. Ezzel szemben a TRPA1 KO egerekben fokozódott a hiperalgéria, emelkedett az

MPO aktivitás és extravazáció mértéke, továbbá emelkedett a MIP-2 proinflammatorikus citokin koncentrációja az arthritises hátsó végtagokban. Mérési eredményeink alapján erős bizonyítékot találtunk arra vonatkozólag, hogy paradigmánk során nem a közvetlenül felszabaduló H₂S a felelős a megfigyelt biológiai jelenségekért, hanem a belőle *in vivo* képződő poliszulfid.

A TRPA1 receptor döntő fontosságú szerepe a GYY4137 hatásainak meghatározásában legtisztábban a mechanikai fájdalomküszöb mérések során kristályosodott ki. Azonos mérési paraméteren keresztül (mechanikai fájdalomküszöb), figyelhetjük meg a GYY4137 nocicepcióra kifejtett enyhítő (TRPA1 WT) és súlyosbító (TRPA1 KO) hatásait. A K/BxN szérum transzfer arthritisz az összes vizsgálati törzsben kialakult, és a TRPA1 WT egerekben GYY4137 kezelés mellett csökkent a betegség külsőleg megítélhető manifesztációja az 5. napon értékelve.

Régebbi kísérletek már korábban felvetették a GYY4137 gyulladáscsökkentő potenciálját. A GYY4137 *in vitro* lényegesen csökkentette a proinflammatorikus mediátorok termelődését stimulált humán szinoviális- és kondrocita sejtek esetén ³². *In vivo*, egerek térd ízületébe CFA beadásával kiváltott akut gyulladás modelljében is igazolódott a GYY4137 protektív hatása ³³. Ezen korábbi publikációkkal összhangban, a TRPA1 WT egerektől származó eredményeink (csökkent mechanikai hiperalgésia, enyhébb betegség prezentáció, megkíméltebb porc felszínek) is alátámasztották a GYY4137 előnyös profilját. Első ránézésre éles kontrasztban állnak egymással a pletizmográfiával mért ödéma képződés és a fluoreszcens IR-676-tal meghatározott extravazáció eredményei. Az arthritises TRPA1 KO egerek lábtérfogataiban nem okozott eltérést a GYY4137 kezelés, ellenben markánsan emelte a képalkotó vizsgálatok során az extravazáció mértékét. A jelenség háttérében több lehetséges magyarázat állhat. Egyrészt a méréseket nem azonos időpontokban végeztük (pletizmográfia: 3., 5. és 7. napokon, extravazáció: 2. és 6. napokon), ezért közvetlen összehasonlításuk bizonyos szempontból önkényesnek bizonyulhat. Továbbá a két módszer, egymással összefüggő, azonban semmi esetre sem megegyező paramétert határoz meg. Az extravazáció kvantifikálásra tett törekvés során egy rövid időegységre vonatkozólag (a festék beadása és a felvételek elkészítéséig eltelt idő, 20 perc) határozzuk meg az érpályából kilépő festék fluoreszcens jelét. A lábtérfogat mérése ezzel ellentétben az ödéma képződésének és oldódásának kumulatív mértékéről ad tájékoztatást. Hasonlóan szemlátomást provokatív eredménynek tűnhet az MPO aktivitás, MIP-2α koncentráció és a szövettanilag értékelt mononukleáris sejt infiltráció között fennálló látszólagos diszkrépancia. Ismételten,

figyelembe kell vennünk az egyes mérések temporális eloszlását, miszerint a neutrofil granulocita MPO aktivitására specifikus méréseinket a 2. nap végeztük, a gyulladt lábak átmosásából származó minták citokin meghatározását az artritogén K/BxN szérumbeadását követő 3. napon értékeltük és a szövettani analízis a 7. napon terminált állatok tibiotarzáris ízületéből származik. A K/BxN szérumbeadás transzfer modell több fázisra osztható és a kezdeti napokban jelentkező neutrofil akkumulációt az idő előrehaladásával egyre inkább mononukleáris sejtek infiltrációja váltja fel.

Hogyan lehetséges, hogy egy nocicepcióért felelős receptor aktiválódása gyulladás- és fájdalomcsillapító hatással is bírjon? Az egyik lehetséges magyarázat szerint, a nociceptorokból aktiváció során a fájdalmas inger közvetítése mellett, gátló neuropeptidok is felszabadulnak (szomatosztatin, endogén opioid agonisták). Korábbi kutatások kimutatták, hogy a nociceptorokon expresszálandó TRPV1 illetve TRPA1 receptorok aktivációja során a Ca^{2+} influx hatására szomatosztatin szabadul fel az idegvégződésekből ¹⁷. A jelenségről, miszerint fájdalmas ingerek hatására megemelkedik a keringésben a szomatosztatin szintje, állatkísérletek mellett humán adatok is rendelkezésre állnak ³⁴. A szomatosztatin fájdalom- és gyulladáscsökkentő hatást fejt ki a sst4 receptoron keresztül. Számos helyen expresszálandó az sst4 receptor, többek között neuronokon, limfocitákon és vaszkuláris endotél sejteken ¹⁵. Jelen kísérletsorozatban a sst4 WT és KO egerek nem reprodukáltak GYY4137 kezelés hatására a TRPA1 egértörzsekhez fogható eredményeket. Feltételezzük, hogy az sst4 KO egerekben működő, a kiűtött génre irányuló kompenzációs mechanizmusok esetleg gátolhatták, a GYY4137 kezelés mellett kialakuló TRPA1 KO egerekben korábban megfigyelt negatív következményeket. Továbbá a sst4 és a TRPA1 törzsek között számos egyéb genetikai különbség is létezhet, amelyről nem rendelkezünk adatokkal.

Számos mechanizmus állhat a GYY4137 gyulladást és fájdalmat fokozó hatása hátterében. A hidrogén-szulfid illetve, poliszulfid nem specifikus aktivátora a TRPA1 csatornának, számos más szignalizációs útvonalon is képes potens változásokat kiváltani ³⁵. Különböző gyulladással járó állatmodellben súlyosbodott a betegség hidrogén-szulfid kezelés hatására, illetve az endogén hidrogén-szulfid termelés gátlása előnyösnek bizonyult. Jelen kísérleteinkben a megfigyelt alapján a TRPA1 mediálta antiinflammatorikus hatások domináltak a proinflammatorikus hatásokkal szemben ^{36,37}. Ellenben a TRPA1 receptor hiányában előtérbe kerülhettek a hidrogén-szulfid mediálta proinflammatorikus elváltozások is.

A GYY4137-tel kezelt TRPA1 KO egerek lábából származó minták MIP-2 koncentrációja szignifikánsan magasabb volt a 3. napon. Az emelkedett MIP-2-vel összhangban, ugyanebben a kezelési csoportban a 2. napon mért neutrofil granulocita akkumulációval korreláló MPO aktivitás is szignifikánsan magasabb volt a TRPA1 WT egerekhez képest. A MIP-2 kemokin, egy potens kemoattraktáns neutrofil granulociták számára, amely gyulladás hatására elsősorban monociták, makrofágok, vaszkuláris endoteliális sejtek, hepatociták és aktivált neutrofilek termelnek ³⁸.

A K/BxN szérumsztransfer artritisz modellen végzett kísérleteink során világossá vált, hogy a hidrogén-szulfidból keletkező poliszulfid, nagyságrendekkel potensebb aktivátora a TRPA1 receptornak. Továbbá más kutatócsoportok is felvetették, hogy a hidrogén-szulfid számos hatásáért esetleg a belőle keletkező vagy szennyeződésként jelenlévő poliszulfid tehető felelőssé ^{27,39}. Ezen adatok fényében indokoltnak tűnt számunkra a poliszulfid gyulladásban betöltött szerepének további vizsgálata. Korábban Pozsgai et al. már igazolták a DMTS TRPA1 függő és sst4 mediálta fájdalomcsökkentő hatását az egerek enyhe forrázás által kiváltott sérülést követően ¹⁷. Jelen kísérleteinkben bővíteni szándékoztuk a rendelkezésre álló tudásunkat, ezért a DMTS mellett vizsgáltuk a szervetlen poliszulfid nocicepcióra és gyulladásra gyakorolt hatásait is.

Megfigyeléseink alapján a karragenin beadását követően a DMTS antinociceptív és ödéma képződésre kifejtett hatását nem kizárólag a TRPA1 receptor közvetíti, ellenben feltétlen szükséges a sst4 receptor jelenléte, ami a DMTS által kiváltott, azonban nem TRPA1 függő szomatosztatin felszabadulásra enged következtetni. A POLY a TRPA1 KO egerekben következetesen enyhítette az ödéma-képződés mértékét, amely jelenség hátterében szintén a neuro-szomatosztatin tengely alternatív, TRPA1 független aktivációja állhat. Számos lehetséges magyarázat létezhet a nem TRPA1 mediálta neuronális eredetű szomatosztatin felszabadulásra. A H₂S koncentrációtól függően ellentétes hatást fejt ki a nociceptorokon található T típusú feszültségfüggő Ca_{3.2} csatornákra. Alacsonyabb koncentrációkban gátló, szuprafiziológias koncentrációkban serkentő hatását írták le ⁴⁰⁻⁴². Továbbá ismert, hogy a H₂S gátolni képes a feszültségfüggő K_{v4.2} csatornákat, amely hatásáért a csatorna kritikus ciszteinein bekövetkező perszulfidációja tehető felelőssé ⁴³. Jelen eredményeink értékelése során fontos figyelembe venni, hogy a K_{v4.3} csatorna is expresszálódik a DRG neuronokon, ezért potenciálisan hozzájárulhatott a szenzoros neuronokból történő szomatosztatin felszabaduláshoz ⁴⁴. Az előbb említett publikációkban H₂S-t alkalmaztak, ellenben nem kizárható, hogy a hatásokat valójában a poliszulfid hozta létre az ioncsatornákon.

A POLY és a DMTS közötti farmakokinetikai különbségek is hozzájárulhattak az eredményeik között fennálló diszkrepancia kialakításához. Az inorganikus POLY vizes oldatokban könnyedén deprotonálódik és anionként van jelen ⁴⁵. A szerves triszulfidok (többek között a DMTS is) erősen lipofil vegyületek és képesek penetrálni a vér agy gáton. A DMTS esetében facilitált diffúzió vagy esetleg aktív transzport is hozzájárulhat a KIR-be való bejutáshoz ⁴⁶. A DMTS a gerincvelőben és az agyban is létrehozhat protein perszulfidációt és ezen keresztül az antinociceptív és antiinflammatorikus hatásainak központi idegrendszeri komponensei is lehetnek, ellenben a POLY esetében elsősorban csak perifériás mechanizmusokat feltételezünk.

A DMTS hatására csökkent a neutrofil specifikus MPO aktivitás, amely az sst4 törzsek esetében hangsúlyosabb volt és a szignifikáns mértéket is elérte. Erre a lehetséges és legegyszerűbb magyarázat, hogy a DMTS-ből származó H₂S közvetlen gátló hatást fejtett ki az MPO enzimre ⁴⁷. Ugyanakkor számos publikációban leírásra került a H₂S neutrofil sejtekre kifejtett gátló hatása is ^{48,49}. A POLY és a DMTS antinociceptív hatásainak közvetítésében meghatározó szerepet tölt be a peptiderg szenzoros neuronokból felszabaduló szomatosztatin. A DMTS a POLY-hoz képest antiinflammatorikus hatással is bír, mivel sst4 receptor jelenlétében csökkent az ödéma képződés mértéke. A DMTS ezt a hatást TRPA1 receptortól függetlenül fejtette ki, ami arra enged következtetni, hogy egyéb molekuláris célpontokon is hatva képes volt szomatosztatin felszabadulást előidézni. A DMTS „dirty drug” jellegét tovább bizonyítja, hogy a TRPA1-szomatosztatin tengelytől függetlenül gátolta a mért MPO aktivitást. Összességében a DMTS előnyösebb jelöltnek tűnik gyógyszerfejlesztés céljából, mivel a hatásai kifejezettebbek a POLY-hoz képest, kémiaiilag stabilabb, számos élelmiszerben kis mennyiségben fellelhető, továbbá jelentős törekvések folynak, hogy hivatalosan is forgalomba kerüljön, mint antidótum cián mérgezés esetére.

1.2. Új eredmények összefoglalása

In vitro igazoltuk, hogy a GYY4137-ből felszabaduló H₂S poliszulfiddá konvertálható. Az így keletkezett poliszulfid képes aktiválni a CHO sejtek felszínén expresszált TRPA1 receptort. Továbbá *ex vivo* a poliszulfid hatására a TRPA1 receptoron hatva szomatosztatin szabadult fel bőrlebeny preparátumokból. A GYY4137 protektív vagy károsító hatását a TRPA1 receptor megléte vagy hiánya határozza meg. A TRPA1 WT egerekben antinociceptív és antiinflammatorikus hatással bírt. Ezzel szemben a TRPA1 KO egerekben súlyosbította az

arthritis tüneteit. Vizsgálataink fényt derítettek a TRPA1 kiemelt szerepére a hidrogén-szulfid és szerves poliszulfid biológiai hatásait illetően. Az sst4 receptor szerepét azonban nem sikerült igazolnunk a GYY4137 hatásainak közvetítésében gén kiűtött egerek segítségével (**1. táblázat**).

	GY4137			
	TRPA1 WT	TRPA1 KO	sst4 WT	sst4 KO
Mechanikai hiperalgézia	↓	↑	—	—
Lábduzzadás	—	—	—	—
F�ggeszked�si idő	—	—	—	—
Artritisz score	↓	—	—	—
Neutrofil MPO aktivitás	—	↑	—	—
Plazmafehérje extravazáció	—	↑	—	—
MIP2�	—	↑	n.v.	n.v.
S�v�tani elváltozások	↓	—	↑	—

1. táblázat A TRPA1 és az sst4 gén szerepe a GY4137 kezelés mellett a K/BxN szérum transzfer artritisz modell vizsgált paramétereire. Jelmagy razat: ↓: szignifikánsan csökkent s vehikulummal kezelt csoporthoz képest; —: nem változott vehikulummal kezelt csoporthoz képest; ↑: szignifikánsan emelkedett vehikulummal kezelt csoporthoz képest; n.v.: nem vizsgált paraméter.

2.2.  j eredmények összefoglalása

A poliszulfid antinociceptív hatása a TRPA1-szomatosztatin- sst4 jelátviteli úton keresztül érvényesül. A poliszulfid aktiválja a peptiderg szenzoros receptorok TRPA1 receptorait, amelynek hatására szomatosztatin szabadul fel. A szomatosztatin sst4 receptorokon hatva fájdalomcsillapító hatással b r. A jelenséget igazolja, hogy TRPA1 KO és sst4 KO egerekben nem volt kimutatható a poliszulfid hiperalgézia csökkentő hatása.

A DMTS fájdalomcsillapító hatásait részben TRPA1 és sst4 receptorok közvetítik, mivel TRPA1 KO egerekben is kimutatható volt egy csekélyebb, de szignifikáns antinociceptív hatás. Azonban a DMTS sst4 KO egerekben nem emelte a fájdalomküszöböt, ezért

feltételezzük, hogy a DMTS TRPA1 független módon is képes a peptiderg neuronokból szomatosztatin felszabadulást kiváltani.

A poliszulfid nem volt hatással a karragenin beadását követő ödéma-képződés mértékére. Ellenben a DMTS csökkentette a gyulladt végtagok térfogat-növekedését TRPA1 WT és KO, illetve sst4 WT egerekben is. A megfigyeltek arra engednek következtetni, hogy a DMTS antiinflammatorikus hatásához nem feltétlen szükséges a TRPA1 receptor. Ugyanakkor a sst4 receptor jelenléte elengedhetetlen, ezért feltételezzük, hogy a DMTS a TRPA1 receptoron kívül más molekuláris célpontokkal is rendelkezik, amin keresztül hatva szomatosztatin felszabadulást vált ki.

A poliszulfid nem volt hatással a neutrofil granulocita specifikus MPO aktivitásra. A DMTS csökkentette az MPO aktivitást az összes egértörzsben, amelynek mértéke sst4 WT és KO egerek esetében statisztikailag szignifikánsnak bizonyult. Az eredményekből arra következtetünk, hogy a DMTS MPO aktivitást csökkentő hatásának hátterében eltérő mechanizmusok állhatnak, mint amelyek felelősek a fájdalom- és gyulladáscsökkentő hatásaiért (2. táblázat).

	TRPA1 WT		TRPA1 KO		sst4 WT		sst4 KO	
	DMTS	POLY	DMTS	POLY	DMTS	POLY	DMTS	POLY
Mechanikai hiperalgészia	↓	↓	↓	—	↓	↓	—	—
Lábduzzadás	↓	—	↓	—	↓	—	—	—
Neutrofil MPO aktivitás	(↓)	—	(↓)	—	↓	—	↓	—

2. táblázat A TRPA1 és az sst4 gén szerepe a DMTS és a POLY kezelés mellett a karrageninnel kiváltott akut gyulladás vizsgált paramétereire. Jelmagyarázat: ↓: szignifikánsan csökkent a vad típusú vehikulummal kezelt csoporthoz képest; — : nem változott.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Prior M, Green F, Lopez A, Balu A, DeSanctis GT, Fick G. Capsaicin Pretreatment Modifies Hydrogen Sulphide-Induced Pulmonary Injury in Rats. *Toxicol Pathol.* 1990;18(2):279-288. doi:10.1177/019262339001800206
2. Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S, Maggi CA. Hydrogen sulfide (H₂S) stimulates capsaicin-sensitive primary afferent neurons in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol.* 2004;142(1):31-34. doi:10.1038/sj.bjp.0705764
3. Streng T, Axelsson HE, Hedlund P, et al. Distribution and Function of the Hydrogen Sulfide–Sensitive TRPA1 Ion Channel in Rat Urinary Bladder. *Eur Urol.* 2008;53(2):391-400. doi:10.1016/j.eururo.2007.10.024
4. Miyamoto R, Otsuguro K, Ito S. Time- and concentration-dependent activation of TRPA1 by hydrogen sulfide in rat DRG neurons. *Neurosci Lett.* 2011;499(2):137-142. doi:10.1016/j.neulet.2011.05.057
5. Hajna Z, Sághy É, Payrits M, et al. Capsaicin-Sensitive Sensory Nerves Mediate the Cellular and Microvascular Effects of H₂S via TRPA1 Receptor Activation and Neuropeptide Release. *J Mol Neurosci.* 2016;60(2):157-170. doi:10.1007/s12031-016-0802-z
6. Pozsgai G, Hajna Z, Bagoly T, et al. The role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor activation in hydrogen-sulphide-induced CGRP-release and vasodilation. *Eur J Pharmacol.* 2012;689(1-3):56-64. doi:10.1016/j.ejphar.2012.05.053
7. Eberhardt M, Dux M, Namer B, et al. H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO–TRPA1–CGRP signalling pathway. *Nat Commun.* 2014;5:4381. doi:10.1038/ncomms5381
8. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci.* 1977;74(8):3203-3207. doi:10.1073/pnas.74.8.3203
9. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci.* 1987;84(24):9265-9269. doi:10.1073/pnas.84.24.9265

10. Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237(3):527-531. doi:10.1006/bbrc.1997.6878
11. Takahashi N, Kozai D, Mori Y. TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals. *Front Physiol.* 2012;3:324. doi:10.3389/fphys.2012.00324
12. Cortese-Krott MM, Kuhnle GGC, Dyson A, et al. Key bioactive reaction products of the NO/H₂S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(34):E4651-60. doi:10.1073/pnas.1509277112
13. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, et al. ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell.* 2003;112(6):819-829. doi:10.1016/S0092-8674(03)00158-2
14. Kádková A, Synytsya V, Krusek J, Zímová L, Vlachová V. Molecular basis of TRPA1 regulation in nociceptive neurons. A review. *Physiol Res.* 2017;66(3):425-439. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28730837>. Accessed March 3, 2018.
15. Pintér E, Helyes Z, Szolcsányi J. Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther.* 2006;112(2):440-456. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.04.010
16. Szolcsányi J. Capsaicin and sensory neurones: a historical perspective. *Prog Drug Res.* 2014;68:1-37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24941663>. Accessed September 9, 2019.
17. Pozsgai G, Payrits M, Sághy É, et al. Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst4 receptors. *Nitric Oxide.* 2017;65:10-21. doi:10.1016/J.NIOX.2017.01.012
18. Ujike A, Otsuguro K, Miyamoto R, Yamaguchi S, Ito S. Bidirectional effects of hydrogen sulfide via ATP-sensitive K⁺ channels and transient receptor potential A1 channels in RIN14B cells. *Eur J Pharmacol.* 2015;764:463-470. doi:10.1016/J.EJPHAR.2015.07.029
19. Ogawa H, Takahashi K, Miura S, et al. H₂S functions as a nociceptive messenger through transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation. *Neuroscience.* 2012;218:335-343. doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2012.05.044

20. Delgermurun D, Yamaguchi S, Ichii O, Kon Y, Ito S, Otsuguro K. Hydrogen sulfide activates TRPA1 and releases 5-HT from epithelioid cells of the chicken thoracic aorta. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol*. 2016;187:43-49. doi:10.1016/J.CBPC.2016.05.004
21. Hatakeyama Y, Takahashi K, Tominaga M, Kimura H, Ohta T. Polysulfide Evokes Acute Pain through the Activation of Nociceptive TRPA1 in Mouse Sensory Neurons. *Mol Pain*. 2015;11:s12990-015-0023. doi:10.1186/s12990-015-0023-4
22. Bautista DM, Jordt S-E, Nikai T, et al. TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. *Cell*. 2006;124(6):1269-1282. doi:10.1016/j.cell.2006.02.023
23. Helyes Z, Pintér E, Sándor K, et al. Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(31):13088-13093. doi:10.1073/pnas.0900681106
24. Horváth Á, Tékus V, Boros M, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: in vivo study using TRPA1-deficient mice. *Arthritis Res Ther*. 2016;18(1):6. doi:10.1186/s13075-015-0904-y
25. Kouskoff V, Korganow A-S, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-Specific Disease Provoked by Systemic Autoimmunity. *Cell*. 1996;87(5):811-822. doi:10.1016/S0092-8674(00)81989-3
26. Christensen AD, Haase C, Cook AD, Hamilton JA. K/BxN Serum-Transfer Arthritis as a Model for Human Inflammatory Arthritis. *Front Immunol*. 2016;7(JUN):213. doi:10.3389/fimmu.2016.00213
27. Nagy P, Winterbourn CC. Rapid Reaction of Hydrogen Sulfide with the Neutrophil Oxidant Hypochlorous Acid to Generate Polysulfides. *Chem Res Toxicol*. 2010;23(10):1541-1543. doi:10.1021/tx100266a
28. Wood JL. Sulfane sulfur. *Methods Enzymol*. 1987;143:25-29. doi:10.1016/0076-6879(87)43009-7
29. Kovács M, Németh T, Jakus Z, et al. The Src family kinases Hck, Fgr, and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory environment without a direct role in leukocyte recruitment. *J Exp Med*. 2014;211(10):1993-2011.

doi:10.1084/jem.20132496

30. Horváth Á, Menghis A, Botz B, et al. Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of the Novel Semicarbazide-Sensitive Amine-Oxidase Inhibitor SzV-1287 in Chronic Arthritis Models of the Mouse. *Sci Rep*. 2017;7. doi:10.1038/srep39863
31. Botz B, Bölcskei K, Kereskai L, et al. Differential regulatory role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the serum-transfer arthritis model. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)*. 2014;66(10):2739-2750. doi:10.1002/art.38772
32. Fox B, Schantz J-T, Haigh R, et al. Inducible hydrogen sulfide synthesis in chondrocytes and mesenchymal progenitor cells: is H₂S a novel cytoprotective mediator in the inflamed joint? *J Cell Mol Med*. 2012;16(4):896-910. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01357.x
33. Li L, Fox B, Keeble J, et al. The complex effects of the slow-releasing hydrogen sulfide donor GYY4137 in a model of acute joint inflammation and in human cartilage cells. *J Cell Mol Med*. 2013;17(3):365-376. doi:10.1111/jcmm.12016
34. Suto B, Bagoly T, Borzsei R, et al. Surgery and sepsis increase somatostatin-like immunoreactivity in the human plasma. *Peptides*. 2010;31(6):1208-1212. doi:10.1016/j.peptides.2010.03.018
35. Sulen A, Gullaksen S-E, Bader L, et al. Signaling effects of sodium hydrosulfide in healthy donor peripheral blood mononuclear cells. *Pharmacol Res*. 2016;113:216-227. doi:10.1016/j.phrs.2016.08.018
36. Irie Y, Tsubota M, Ishikura H, et al. Macrophage-derived HMGB1 as a Pain Mediator in the Early Stage of Acute Pancreatitis in Mice: Targeting RAGE and CXCL12/CXCR4 Axis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2017;12(4):693-707. doi:10.1007/s11481-017-9757-2
37. Ahmad A, Druzhyna N, Szabo C. Cystathionine-gamma-lyase deficient mice are protected against the development of multiorgan failure and exhibit reduced inflammatory response during burn. *Burns*. 2017;43(5):1021-1033. doi:10.1016/j.burns.2017.02.011
38. Qin C-C, Liu Y-N, Hu Y, Yang Y, Chen Z. Macrophage inflammatory protein-2 as mediator of inflammation in acute liver injury. *World J Gastroenterol*.

2017;23(17):3043-3052. doi:10.3748/wjg.v23.i17.3043

39. Miyamoto R, Koike S, Takano Y, et al. Polysulfides (H₂Sn) produced from the interaction of hydrogen sulfide (H₂S) and nitric oxide (NO) activate TRPA1 channels. *Sci Rep*. 2017;7:45995. doi:10.1038/srep45995
40. Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V. T-type voltage-gated calcium channels as targets for the development of novel pain therapies. *Br J Pharmacol*. 2011;163(3):484-495. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01256.x
41. Elies J, Scragg JL, Boyle JP, Gamper N, Peers C. Regulation of the T-type Ca(2+) channel Cav3.2 by hydrogen sulfide: emerging controversies concerning the role of H₂S in nociception. *J Physiol*. 2016;594(15):4119-4129. doi:10.1113/JP270963
42. Fukami K, Sekiguchi F, Kawabata A. Hydrogen Sulfide and T-Type Ca²⁺ Channels in Pain Processing, Neuronal Differentiation and Neuroendocrine Secretion. *Pharmacology*. 2017;99(3-4):196-203. doi:10.1159/000449449
43. Liu DH, Huang X, Meng XM, et al. Exogenous H₂S enhances mice gastric smooth muscle tension through S-sulphydration of K_v4.3, mediating the inhibition of the voltage-dependent potassium current. *Neurogastroenterol Motil*. 2014;26(12):1705-1716. doi:10.1111/nmo.12451
44. Yunoki T, Takimoto K, Kita K, et al. Differential contribution of Kv4-containing channels to A-type, voltage-gated potassium currents in somatic and visceral dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol*. 2014;112(10):2492-2504. doi:10.1152/jn.00054.2014
45. Greiner R, Pálincás Z, Bäsell K, et al. Polysulfides link H₂S to protein thiol oxidation. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(15):1749-1765. doi:10.1089/ars.2012.5041
46. Kiss L, Bocsik A, Walter FR, 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(2):398-407. doi:10.1093/toxsci/kfx190
47. Pálincás Z, Furtmüller PG, Nagy A, et al. Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase. *Br J Pharmacol*. 2015;172(6):1516-1532. doi:10.1111/bph.12769
48. Spassov SG, Donus R, Ihle PM, Engelstaedter H, Hoetzel A, Faller S. Hydrogen Sulfide Prevents Formation of Reactive Oxygen Species through PI3K/Akt Signaling

and Limits Ventilator-Induced Lung Injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1-14. doi:10.1155/2017/3715037

49. Ball CJ, Reiffel AJ, Chintalapani S, Kim M, Spector JA, King MR. Hydrogen Sulfide Reduces Neutrophil Recruitment in Hind-Limb Ischemia-Reperfusion Injury in an L-Selectin and ADAM-17–Dependent Manner. *Plast Reconstr Surg*. 2013;131(3):487-497. doi:10.1097/PRS.0b013e31827c6e9c

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

1. Az értekezés alapját képező eredeti közlemények:

Bátai, I. Z., Horváth, Á., Pintér, E., Helyes, Z., & Pozsgai, G. (2018). 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. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00055> (IF:3.634)

Bátai, I. Z., Sár, C. P., Horváth, Á., Borbély, É., Bölskei, K., Kemény, Á., Sándor, Z., Nemes, B., Helyes, Zs., Pozsgai, G., & Pintér, E. (2019). TRPA1 Ion Channel Determines Beneficial and Detrimental Effects of GYY4137 in Murine Serum-Transfer Arthritis. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 964. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00964> (IF 2018-ban: 3.845)

2. Egyéb teljes közlemény:

Hajna, Z., Sággy, É., Payrits, M., Aubdool, A. A., Szőke, É., Pozsgai, G., **Bátai I.Z.**, Nagy, L., Filótás, D., Helyes, Zs., Brain, S.D., & Pintér, E. (2016). Capsaicin-Sensitive Sensory Nerves Mediate the Cellular and Microvascular Effects of H₂S via TRPA1 Receptor Activation and Neuropeptide Release. *Journal of Molecular Neuroscience*, 60(2), 157–170. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0802-z> (IF: 2.229)

Ittzes, B., Weiling, Z., **Bátai, I. Z.**, Kerenyi, M., & Batai, I. (2016). Atropine and glycopyrrolate do not support bacterial growth—safety and economic considerations. *Journal of Clinical Anesthesia*, 35, 560–563. <https://doi.org/10.1016/j.jclinane.2016.09.011> (IF:

1.677)

Filotás, D., **Báta**i, I. Z., Pozsgai, G., Nagy, L., Pintér, E., & Nagy, G. (2017). Highly sensitive potentiometric measuring method for measurement of free H₂S in physiologic samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 243, 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.11.102> (IF: 5.667)

Pozsgai, G., **Báta**i, I. Z., & Pintér, E. (2019). Effects of sulfide and polysulfides transmitted by direct or signal transduction-mediated activation of TRPA1 channels. *British Journal of Pharmacology*, 176(4), 628–645. <https://doi.org/10.1111/bph.14514> (IF: 6.583)

Az értekezés alapját képező eredeti közlemények kumulatív impakt faktora: 7.47

Az összes publikáció kumulatív impakt faktora: 23.632

Hivatkozások száma: 19

Független hivatkozások száma: 6

3. Konferencia szóbeli előadások:

Bátai I. Ex-vivo modelling of vasoactive effects of subarachnoidale hemorrhage on isolated cerebral arteries / Subarachnoidalis vérzés vazokatív hatásának ex-vivo modellezése izolált cerebrális artériákon. Hungarian Medical Association of America Summer Conference, Balatonfüred, Magyarország, 2012.

Bátai I. Hemolysed blood constrict cerebral arteries. II. Pécs-Oklahoma Symposium (II. POS), Pécs, Magyarország, 2013.

Bátai I. Z., Török O. A nebulol dilatációt okoz izolált arteria basilarison XXXI. OTDK, Budapest, Magyarország, 2013.

Török O., **Báta**i I. Z., Az intracellularis Ca²⁺ ion szerepe a perivaszkuláris hemolizált vér-indukált cerebrovaszkuláris konstriktó kialakulásában XXXI. OTDK, Budapest, Magyarország, 2013.

Bátai I. Z., Pintér E., Sándor Z., Bölskei K., Szőke É., Helyes Zs., Pozsgai G. A dimetil triszulfid egerekben TRPA1- és sst4 receptoron keresztül csökkenti a neuropathiás fájdalmat Seltzer modellben III. Pécsi Tudományegyetem Idegtudományi Centrum PhD és TDK konferencia, Pécs, Magyarország, 2018.

4. Konferencia poszter prezentációk:

Batai I.Z., Ittzes B., Szabo Z., Batai I., Kerenyi M. Intravenous dexmedetomidine supports bacterial growth. Euroanaesthesia 2016 The European Anaesthesiology Congress London, Egyesült Királyság, 2016.

Batai I.Z., Szabo A., Gyorffy O., Barkoczy R., Kerenyi M., Batai I. Amiodarone and tetracyclines has synergistic antibacterial effect. Euroanaesthesia 2016 The European Anaesthesiology Congress London, Egyesült Királyság, 2016.

Bátai I. Z., Pozsgai G., Pintér E. A dimetil-triszulfid hatásai a nocicepció és gyulladás karragén indukálta egérmodelljében. Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája, Pécs, Magyarország, 2016.

Bátai I. Z., Horváth Á., Kiss T., Pozsgai G., Pintér E. A GYY-4137 hatásai K/BxN szérum arthritis modelben TRPA1 WT és KO egerekben. A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság közös Vándorgyűlése, Debrecen, Magyarország, 2017.

Bátai I. Z., Horváth Á., Kiss T., Pozsgai G., Pintér E. Effects of GYY-4137 on K/BxN serum transfer induced arthritic TRPA1 WT and KO mice. 13th World Congress on Inflammation, London, Egyesült Királyság, 2017.

Bátai I. Z., Horváth Á., Kiss T., Pozsgai G., Pintér E. A GYY-4137 hatásai K/BXN szérum transzfer arthritis modellben TRPA1 WT és KO egerekben. Magyarországi Fájdalom Társaság 2017. évi Konferenciája, Szeged, Magyarország, 2018.

Bátai I. Z., Horváth Á., Kiss T., Pozsgai G., Pintér E. A TRPA1 receptor és a GYY-4137 szerepe a K/BxN szérum transzfer artritisz modellben. Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Szeged, Magyarország, 2018.

Bátai I. Z., Horváth Á., Kiss T., Pozsgai G., Pintér E. Effects of GYY-4137 on K/BxN serum transfer induced arthritic TRPA1 WT and KO mice. 5th World Congress on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine, Toronto, Kanada, 2018.

Bátai I. Z., Pintér E., Ömböli D., Sándor Z., Nemes B., Pozsgai G. Poliszulfid vegyületek TRPA1 és sst4 dependens fájdalomcsillapító hatásai mononeuropáthiában. A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság közös Vándorgyűlése, Budapest, Magyarország, 2019.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek, Pintér Erika Professzorasszonynak és Pozsgai Gábor Tanár Úrnak, a mérhetetlen támogatást és szakmai útmutatást, amellyel támogatták tudományos munkásságomat. Továbbá köszönetemet szeretném nyilvánítani, dr. Horváth Ádámnak és dr. Bölcskei Katának a képalkotó vizsgálatokban nyújtott segítségükért. Továbbá Hírné Perkecz Anikónak, Fábíán Ildikónak és Borbély Évának a szövettani metszetek feldolgozásában végzett munkájukért. Kemény Ágnesnek és Németh Tamásnak, köszönöm a munkáját, amellyel hozzájárult a citokin mérés megvalósulásához. Kiemelt köszönettel tartozom Bagoly Teréz munkatársnőmnek, az évek során nyújtott kitartó támogatásért és a RIA mérések elvégzéséért. Kitűnő munkatársaimnak, Sándor Zoltánnak, Nemes Balázsnak és Disztl Ceciliának kifejezett hálával tartozom a rengeteg munkájukért, amellyel a sejtes vizsgálatokhoz hozzájárultak. Köszönettel tartozom a szakmai tanácsokért, és vegyszerekért, amelyeket Schweibert Istvántól és Poór Miklóstól kaptam. Kollaborátoraink közül köszönet illeti Csepregi Jankát és Prof. Dr. Mócsai Attilát a BxN és K/BxN szérumok biztosításáért, Pápayné Dr. Sár Cecília és kollégáit a GYY4137 szintéziséért. Továbbá ki szeretném emelni Nagy Péter Professzorúrtól és Bogdándi Virágtól kapott útmutatást és segítséget a hidrogén-szulfid kémiai hátterének megértésben, a poliszulfid előállításában és a cianolízis megtanításában. Hálás vagyok segítségért, amit Zöldhegyi Józsefnétől és Ömböli Gyulánétól kaptam az állatkísérletek végzése során. Kiss Tamás, mindig készen állt segíteni a képalkotó vizsgálatokban. Meg szeretném, köszöni az állatház munkatársainak, kiemelten Rajnai Tündének, Deák Gergőnek, Bortelekiné Hrebik Szilviának és Kiefer Evelinnek, a fáradtságos háttér munkájukat, amely által meg valósulhattak az állatkísérletek. Köszönettel tartozom Draskoczi Lillának, az egerek tipizálásában végzett munkájáért. Továbbá mérhetetlen hálával és köszönettel tartozom a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet összes munkatársának.

Köszönöm családomnak a támogatást, amellyel mellettem álltak tanulmányaim során.

A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával a GINOP-2.3.3.-15-2016-00050 azonosító számú „PEPSYS-A peptiderg szignalizáció komplexitása és szerepe szisztémás betegségekben”, OTKA PD 112171, OTKA NN 114458, EFOP-3.6.1-16-2016-00004, GINOP-2.3.2-15-2016-00048 STAY ALIVE és EFOP-3.6.2-16-2017-00006 LIVE LONGER című projektek keretei között valósulhatott meg