

**LÉGÚTI- ÉS GASZTROINTESTINÁLIS GYULLADÁS
RÁGCSÁLÓMODELLJEINEK LÉTREHOZÁSA ÉS
KARAKTERIZÁLÁSA A SZENZOROS-IMMUN
INTERAKCIÓK VIZSGÁLATA CÉLJÁBÓL**

Doktori (PhD) értekezés tézisei



Dr. Csekő Kata

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Neurofarmakológiai program

A doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezető: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécsi Tudományegyetem, Orvostudományi Kar

Pécs

2022

1 BEVEZETÉS, HÁTTÉR

1.1 Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1) és Ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatornák és szerepük neurogén gyulladásban

A tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatornák 28 szerkezetileg rokon ioncsatornát foglalnak magukban, amelyeket szekvencia-homológiájuk alapján a TRPC (kanonikus), a TRPV (vanilloid), a TRPM (melasztatin), a TRPP (policisztin), a TRPML (mucolipin), a TRPA (ankyrin) és a TRPN (NOMPC) alcsoportokra oszthatunk. (1). Többségük nem szelektív kationcsatorna, azonban permeabilitásuk és szelektivitásuk tekintetében eltéréseket mutatnak. Szerkezetüket tekintve hat transzmembrán domémből álló tetramerek, amelyek pórúsát az ötödik és hatodik szegmens közötti hidrofób régió alkotja. Homo- vagy heterotetramerekként alkotnak funkcionális egységet. (2).

A család gasztrointesztinális és légúti gyulladással kapcsolatban legtöbbet vizsgált tagjai a vanilloid 1 (TRPV1), az ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatornák. Ezek túlnyomórészt a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronokon helyezkednek el, és gyakran, főként ezeken az érző rostokon koexpresszálódnak. A közelmúltban azonban több nem neurális kifejeződést is leírtak, amely miatt nagy figyelem fordult erre a kutatási területre (3). Általánosságban elmondható, hogy számos exogén kémiai ágens és endogén mediátor aktiválja őket, így fontos szabályozó struktúrák a gyulladós és fájdalomfolyamatokban.

A TRPV1 és a TRPA1 polimodális nociceptorok, amelyek fontos funkciót töltenek be a hő-, mechanikai- és kemo-érzékelésben, valamint komplex szerepet játszanak a hiperalgégiában és a neurogén gyulladásban. (4). A kapszaicin-érzékeny afferenseken történő aktiválásuk hatására proinflammatorikus szenzoros neuropeptidek, pl. substance P (SP) és calcitonin gén-rokon peptid (CGRP) szabadulnak fel, ami neurogén gyulladáshoz vezet (értágulat, plazmafehérje extravazáció és gyulladós sejtek aktivációja). (4,5). A gyulladáskeltő mediátorokkal egyidejűleg ugyanezen végződésekből gyulladásgátló neuropeptidek, elsősorban szomatosztatin és hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) is felszabadulnak, amelyek lokálisan és szisztémásan is ellensúlyozzák a gyulladós folyamatot és a szöveti károsodást. (6,7).

A TRPV1 és a TRPA1 csatornákat a gyulladás során keletkező endogén mediátorok, pl. lipoxigenáz termékek, reaktív oxigéngyökök (ROS), bradikinin, prosztanoidok és a gyulladt szövet savas pH-ja is képesek aktiválni. (8). A gasztrointesztinális nyálkahártya gyakran ki van téve az élelmiszerekben található TRPV1 exogén agonistáknak, mint a kapszaicin és a piperin (a chilipaprika, illetve a fekete bors csípősségét adó ágensek), valamint TRPA1 aktivátoroknak, mint

fahéjaldehid, allil-izotiocianát (mustárolaj), allicin (fokhagyma), és mentol, stb. (8,9). Másrészt a légutak különböző TRPA1-agonistáknak, például bakteriális endotoxinnak, környezeti irritánsoknak, a cigarettafüstben, fafüstben, dízel kipufogógázban és a könnygázban található akroleinnek, a krotonaldehidnek, izocianátoknak és nikotinnak lehetnek kitéve (10).

A TRPV1 és TRPA1 képes funkcionális kölcsönhatásra, például heterológ deszenzibilizációra, mivel a TRPA1-et expresszáló idegrostok többsége ko-expresszálja a TRPV1-et (11). Mindkét ioncsatornát számos más mechanizmus, például prosztaglandinok, bradikinin és proteázok is szenzibilizálhatják. (12).

A TRPV1 a gasztrointesztinális traktus számos nem neuronális struktúráján is kifejeződik, mint például a gasztrint szekretáló parietális és gyomor epitél sejteken, valamint a nyelőcső-, vékonybél- és vastagbél epitél sejtein. (13,14). A TRPA1-et a gyomor-bél traktusban kevésbé vizsgálták, de expresszióját leírták a vastagbél izolált kriptáin és epitél sejtjein, valamint a vékonybél neuroendokrin sejtjein is (14,15). A légutakban a TRPA1 a fibroblasztokon, a légcső-, hörgő- és alveoláris epitél sejteken, a hörgő simaizomsejteken, valamint a limfocitákon expresszálódik (16). Ezenkívül mindkét receptor leírták a CD4+ T-sejteken is, ami hangsúlyozza a szenzoros-immun interakciókban betöltött szerepüket (17,18).

Ezért ezeket az ioncsatornákat új gyulladáscsökkentő, fájdalomcsillapító és gastroprotektív célpontokként azonosították (10).

1.2 A TRPA1 szerepe a légzőrendszerben

Polimodális kemoszenzor funkciója és széles expressziós mintázata miatt a TRPA1-nek kulcsszerepet tulajdonítanak élettani és kórélettani folyamatokban, különösen neuro-immun interakciókban (10). Különösen fontos kémiai szenzorként tekintenek rá a légzőrendszerben, amely szerepet játszik a fiziológiás (védőreflexek, köhögés és tüsszentés) és patofiziológiai válaszokban (gyulladás, bronchiális hiperreaktivitás). (8). Bár egyre több bizonyíték utal arra, hogy a TRPA1 szerepet játszik a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), az asztma, a krónikus köhögés, a cisztás fibrózis stb. patogenezisében, ami a TRPA1 fontos terápiás potenciáljára utal a krónikus tüdőbetegségek farmakológiai kezelésében (16,19), kevés *in vivo* adat áll rendelkezésre a légúti gyulladásban betöltött funkciójáról. Ezért az eredmények messze nem meggyőzőek, és több információra van szükség ahhoz, hogy meghatározzuk a TRPA1, mint lehetséges farmakológiai célpont jelentőségét a gyulladásos tüdőbetegségekben, a tüdőgyulladásban és a COPD-ben.

1.3 Krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD)

A COPD egy jelentős globális egészségügyi probléma, amelyet a légutak és/vagy az alveolusok rendellenességei miatt kialakuló tartósan fennálló légúti tünetek és légáramlás-korlátozottság jellemez. Hátterében általában káros részecskéknek vagy gázoknak való jelentős expozíció áll. Általában progresszív lefolyású, és a légutak és a tüdő fokozott krónikus gyulladással jár együtt. A funkcionális légzési zavarok a kis légutakat szűkítő krónikus obstruktív bronchiolitis és a tüdőparenchima pusztulása miatt kialakuló emphysema következményei. A COPD leggyakoribb oka az esetek mintegy 95%-ban a dohányzás, de a légszennyező anyagok és a munkahelyi expozíció is hozzájárulhat a kialakulásához (20).

Nincs oki terápia, a rendelkezésre álló kezelés a kortikoszteroidokra, az adrenerg β 2-receptor-agonistákra és az acetilkolin-muszkarin receptor antagonistákra korlátozódik, amelyek csak lassítják a progressziót és a tüneteket enyhítik (20). Ezért sürgősen szükség van új terápiás célpontok azonosítására COPD-ben.

A kutatási terület iránti nagyfokú érdeklődésnek köszönhetően a háttérben húzódó mechanizmusokról szerzett ismereteink jelentősen bővültek. A cigarettafüst és más légúti irritánsok nagyfokú gyulladást indukálnak a CD8+ limfociták, neutrofilek és makrofágok bevonásával. Ezek az immunsejtek kemotaktikus faktorokat, kolóniastimuláló faktorokat és proinflammatorikus citokineket szabadítanak fel fenntartva és fokozva a gyulladást és az immunsejtek toborzását. Továbbá a proteázok, mint a neutrofil elasztáz, kathepszinek és mátrix metalloproteinázok (MMP-k) elasztin pusztulást és következményes emphysemát idéznek elő (21). A komplex patofiziológiai mechanizmus, a gyulladást okozó kaszkádok és az immunsejtek, az érzőidegek és a neuro-immun kölcsönhatások szerepének megismerése, valamint a kulcsfontosságú mediátorok azonosítása azonban még szükséges potenciális új terápiás célpontok azonosítása érdekében.

1.4 A krónikus légúti gyulladás állatmodelljei

A humán vizsgálatokban végzett szövettani analízis mellett a transzlációs állatmodellek különösen fontosak a patofiziológiai folyamatokban résztvevő molekuláris útvonalak meghatározásához.

Számos tanulmány fókuszál a proteáz-antiproteáz egyensúly zavarára, és csak rövid protokollokat alkalmaznak különböző elasztázok, mint a pancreas-elasztáz, neutrofil elasztáz, proteináz-3 (22), vagy lipopoliszacharidok (LPS) felhasználásával az emphysema kialakulásában játszott szerepük

vizsgálatára. Ezek a modellek hasznosnak bizonyultak, azonban csak egy, a patofiziológiai kaszkád köztes szereplőjére fókuszálnak. A cigarettafüst (cigarette smoke: CS) azonban, amely a leggyakoribb kiváltó tényező az emberi betegségben, számos más, upstream útvonalat és mechanizmust kapcsol be (23). A TRPA1 lehetséges szerepének és a krónikus gyulladással járó folyamat komplexitásának vizsgálatához a COPD egyetlen hiteles transzlációs modellje a krónikus cigarettafüst-expozíció (CSE) (22). Ezt a modellt eddig több csoport is használta, de széleskörű meggyőző potenciáljukat korlátozza, hogy 1) különböző protokollokat, kísérleti paradigmákat, expozíciós időtartamokat és intenzitásokat alkalmaztak, 2) nem longitudinális, követéses, önkontrollos elrendezést alkalmaztak, 3) nem vizsgálták a betegség komplexitását integratív módszertani megközelítéssel, csak bizonyos specifikus paraméterekre összpontosítottak, és 4) különböző törzseket használtak. Mivel a C57Bl/6 egereket a leggyakrabban alkalmazott génmódosított törzs, és érzékenyek is a cigarettafüstre, célunk egy transzlációs modell létrehozása, karakterizálása és optimalizálása volt ebben a törzsben.

1.5 A TRPV1 és TRPA1 expressziója a gyomor-bél traktusban

A gasztrointesztinális traktusban a TRPV1 és a TRPA1 expresszióját és szerepét leginkább colitisben állatmodelljeiben vizsgálták. A TRPV1-expresszálok rostok sűrűsége egerekben a vastagbél proximális régiójától a disztális felé haladva növekszik (24). Továbbá, dextrán-szulfát (DSS) colitis során a TRPV1-expresszálok DRG neuronok aránya és *Trpv1* mRNS-szintjük növekszik, következményes CGRP és SP emelkedéssel (25). Egyre több a bizonyíték a TRPV1 és a TRPA1 expressziójára a myentericus és a submucosus plexus intrinsic szenzoros neuronjaiban, valamint a vastagbélnyálkahártya felszíni epithelsejtjein (14,15). A szenzoros-immun kölcsönhatások fontosságát colitisben a gyulladással járó sejtek TRPV1 és a TRPA1 expressziója is alátámasztja makrofágokon, valamint a CD4⁺ T-sejteken. (14,17,18).

A gyomorban a gyomornyálkahártyát innerváló kapszaicin-érzékeny peptiderg szenzoros neuronok gasztroprotektív hatását kutatócsoportunk már régóta vizsgálja (26). A TRPV1-el ellentétben azonban a TRPA1 gyomorban történő expressziós változásairól és szerepéről keveset tudunk (27), ezért célunk volt a TRPA1 lehetséges szerepének tisztázása a gyomor nyálkahártya sérülés állatmodelljében.

1.6 A gyomor nyálkahártya károsodás állatmodelljei

A gyomor nyálkahártya károsodás a makroszkópos és szövettani elváltozások különböző formáiban nyilvánulhat meg, mint diffúz hiperémia, gyulladás, erózió vagy akár vérzéses fekély.

A gold standard kezelés gyakran a savszekréció gátló szerekre, mint protonpumpa-gátlókra vagy hisztamin H₂ receptor antagonistákra korlátozódik, mivel a citoprotektív mechanizmusok fokozása kihívást jelent (28).

Az állatmodellek fontosak a gyomorsérülés molekuláris vizsgálatára, mivel ezek a modellek nagyon korai biokémiai és molekuláris változásokat mutathatnak ki, sokkal a mikroszkópos vagy makroszkópos elváltozások észlelése előtt. A jó modellek transzlációs jelentőséggel rendelkeznek. Azonban a gyomorsérülés gyakorlatilag minden állatmodelljében (pl. NSAID-, stressz-indukált) az elváltozások jól körülírtak (azaz felszíni eróziók és/vagy mély fekélyek). Ezzel szemben az emberben a gastritis diffúz gyulladás, amely a gyomor egészét vagy nagyobb részét érinti (29).

A jódacetamid (IAA) egy vízben oldódó szulfhidril-alkiláló ágens, amely a gyomornyálkahártyában lévő szulfhidrilcsoportok, köztük a védő antioxidáns glutation (GSH) depletálásával elősegíti a ROS-termelést és az oxidatív szövetkárosodást (30). A redukált GSH alapvető szerepet játszik a nyálkahártya integritásának fenntartásában (31). A ROS reakcióba lép különböző sejtkomponensekkel, beleértve a sejtmembránt, a mitokondriumokat és a DNS-t, ami potenciálisan sejthalálhoz/necrosishoz vezethet, ami a neutrofilek toborzását indukálja (32).

2 CÉLKITŰZÉSEK

Munkám elsődleges célja a tüdő- és gyomor-bélrendszeri gyulladás rágcáslómodelljeinek létrehozása és karakterizálása volt a szenzoros-immun kölcsönhatások, valamint a TRPA1 expressziójának és potenciális szerepének vizsgálata céljából.

1) Krónikus légúti gyulladás egérmodelljének létrehozása és jellemzése

A COPD-re nincs hatékony gyógymód. A komplex patofiziológiai mechanizmusok, a gyulladással kaszkádok és az immunsejtek szerepe, így az érzőidegek és a neuro-immun kölcsönhatások, valamint a kulcsfontosságú mediátorok azonosítása elengedhetetlen új terápiás célpontok azonosításához. A cigarettafüst által kiváltott gyulladással kaszkádok és a következményes szövetkárosodás a COPD fő okai, ezért a krónikus CSE az egyetlen transzlációs szempontból releváns állatmodell. Célunk egy transzlációs egérmodell létrehozása volt a COPD-re jellemző

krónikus pulmonális patofiziológiai változások komplex funkcionális, morfológiai, immunológiai és biokémiai vizsgálatára. Ez segít a betegség különböző stádiumaiban lejátszódó mechanizmusok elemzésében és a farmakológiai kutatásokban kulcsfontosságú célpontok azonosításában.

2) A TRPA1 szerepének vizsgálata a CSE-indukált COPD egérmódelben

Egyre több bizonyíték utal a TRPA1 szerepére a COPD, asztma, krónikus köhögés és a cisztás fibrózis patogenezisében, ami a TRPA1 fontos terápiás potenciáljára utal krónikus tüdőbetegségek kezelésében. Azonban kevés és ellentmondásos *in vivo* adat áll rendelkezésre a légúti gyulladásban betöltött funkciójáról. A TRPA1 lehetséges szerepét vizsgáltuk egy CSE-indukált COPD egérmódelben *in vivo*, *Trpa1* génhányos egerek segítségével.

3) A TRPA1 és TRPV1 expressziójának vizsgálata jódacetamid (IAA)-indukálta diffúz gyomor nyálkahártya sérülés modelljében

Bár a gyomornyálkahártyát beidegző kapszaicin-érzékeny peptiderg szenzoros neuronok gastroprotektív hatását már régóta vizsgálják, a TRPV1-el ellentétben a TRPA1 expressziós változásairól és szerepéről a gyomorban keveset tudunk. Ezért célunk egy transzlációs gastritis modell jellemzése volt az irreverzibilis szulfhidrilcsoport-blokkoló IAA segítségével, valamint az expressziós változások vizsgálata, különös tekintettel a TRPA1-re.

3 KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

3.1 CIGARETTAFÜST-INDUKÁLT KRÓNIKUS LÉGÚTI GYULLADÁS MODELL

3.1.1 Kísérleti állatok

A kísérleteket 8-10 hetes, a kísérlet kezdetén 20-25 g súlyú C57Bl/6, valamint TRPA1 vad típusú (*Trpa1*^{+/+}) és génhányos (*Trpa1*^{-/-}) egereken végeztük (6 egér/csoport). A vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérleti Etikai Bizottsága (Pécs, Magyarország) az Állatkísérletek Etikai Kódexe szerint engedélyezte (engedélyszám: BA02/2000-5/2011, BA02/2000-35/2016).

3.1.2. Kísérleti protokoll a cigarettafüst-indukált COPD egérmódel jellemzésére

A hím C57Bl/6 egereket 6 hónapon keresztül naponta kétszer, 10 alkalommal/hét teljes test dohányfüst expozíciós kamrában cigarettafüstnek tettük ki. Kontrollként azonos körülmények között tartott, életkoruknak megfelelő nemdohányzó egerek szolgáltak. A légúti válaszkészséget

teljes test pletizmográfiával (WBP) határoztuk meg éber, szabadon mozgó egereken, míg a tüdő strukturális változásait minden hónap végén mikrotomográffal képeztük le. A kezelési időszak előtt és minden hónap végén 6 dohányzó és 6 intakt állatot ketamin és xilazin altatásban termináltunk. A bronchoalveoláris mosófolyadék (BALF) limfocita, monocita és granulocita sejtszámát áramlási citométerrel elemeztük. Az MMP-2/-9 aktivitás mérést zselatin-zimográfiával végeztük az 1. és 6. hónap végén, míg a citokinkoncentrációkat a Mouse Cytokine Array Panel A segítségével mértük tüdő homogenátumból minden hónap végén. A tüdőszövet egy részét 6%-os formaldehid-oldatba helyeztük az emphysema kvantitatív és a tüdőgyulladás szemikvantitatív szövettani kiértékeléséhez. A 6. hónap végén a korlátozott WBP-t invazív módszerrel végeztük altatott, tracheotomizált és lélegeztetett egereken, majd vérmintákat gyűjtöttünk.

3.1.3 Kísérleti protokoll a TRPA1 szerepének vizsgálatára a cigarettafüst-indukált COPD egérmódelben

A 6 hónapos CSE egérmódel eredményei alapján a TRPA1 lehetséges szerepét egy 4 hónapos kísérleti elrendezésben vizsgáltuk a krónikus légúti gyulladás módelben a légúti gyulladás csúcspontjára összpontosítva. A *Trpa1*^{-/-} egereket és *Trpa1*^{+/+} alomtársait 4 hónapon keresztül naponta kétszer, 10 alkalommal/hét tettünk ki CSE-nek. Kontrollként azonos körülmények között tartott, életkorban azonos, nemdohányzó egerek szolgáltak. A légúti funkciót minden hónap végén WBP-vel határoztuk meg éber, szabadon mozgó egerekben, míg a pulmonális strukturális és morfológiai változásokat mikroCT-vel és szövettani értékeléssel elemeztük ki 2 és 4 hónap után. A BALF-ot áramlási citometriával elemeztük a 2. és a 3. hónap végén.

3.1.4 Cigarettafüst (CS) által kiváltott krónikus légúti gyulladás

A krónikus bronchitist teljes test CSE-vel (3R4F Kentucky Research Cigarette; University of Kentucky, USA) idéztük elő egy kétcsatornás TE-2 teljes test dohányoztató kamrában (Teague Enterprise, USA) naponta kétszer, 10 alkalommal/hét, 6 vagy 4 hónapon keresztül, a kísérleti elrendezéstől függően.

3.1.5 Légzésfunkció mérése teljes testes pletizmográfiával éber, spontán lélegző állaton

A légúti válaszkészséget Buxco műszerrel (PLY3211, Buxco Europe Ltd., Winchester, Egyesült Királyság) végzett WBP-vel határoztuk meg éber, spontán lélegző, szabadon mozgó állatokon,

követéses, önkontrollos elrendezésben. Meghatároztuk a relaxációs időt (RT), légzési frekvenciát (f), légzési térfogatot (TV), percventillációt (MV), belégzési időt (Ti), kilégzési időt (Te), belégzési csúcsáramlást (PIF), kilégzési csúcsáramlást (PEF), valamint a légúti reaktivitással korreláló Penh (enhanced pause) értéket (33).

3.1.6 Invazív légzésfunkció mérés

A 6 hónapos protokoll végén a C57Bl/6 egereket elaltattuk, és invazív módszerrel WBP vizsgálatot végeztünk. Az egereket tracheotomizáltuk, és az invazív egésztest-pletizmográfba (PLY4111, Buxco Europe Ltd., Winchester, Egyesült Királyság) helyeztük légzési ellenállás és compliance mérés céljából. A COPD-re/emphysemára jellemző légzési paramétereket, mint a légúti ellenállást (Rl), a kilégzés végi munkát (EEW), a közép-kilégzési áramlást (EF50), a kilégzés végi szünetet (EEP), Te és Ti értékeket 10 másodpercenként mértük, és átlagoltuk 10 perces alaplégzési időszakra.

3.1.7 *In vivo* mikro-komputertomográfias (mikro-CT) elemzés emphysema meghatározására

A tüdő szerkezeti változásait légzés kapuzott tomográfiával, Skyscan 1176 nagy felbontású mikrotomográfal (Skyscan, Kontich, Belgium), önkontrollosan végeztük. Az egereket i.p. pentobarbitállal (70 mg/kg) érzéstelenítettük, és hanyattfekvő helyzetben a szkener ágyára helyeztük. A mellkasra egy nagy kontrasztú jelet tartalmazó papírlapot helyeztünk a légzésmozgások videokapuzására a mozgás általi melléktermékek kiküszöbölése érdekében. Az emphysemát a low attenuation area (LAA, -750 és -1000 Hounsfield-egység között, légtartó területek) és a teljes tüdőterfogat (total lung volume: TLV) arányával számoltuk ki, és százalékban fejeztük ki (34).

3.1.8 Bronchoalveoláris mosófolyadék (BALF)

Az egereket ketaminnal és xilazinnal (100 mg/kg, illetve 5 mg/kg, s.c.) altattuk, a tüdőt légső kanül segítségével hideg PBS-sel (5x1 ml) átöblítettük. A BAL folyadékot szobahőmérsékleten 1000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk, majd megfestettük és fixáltuk áramlási citometriához. A sejteket CyFlow Space áramlási citométerrel (Sysmex Partec, Münster, Németország) elemeztük. A teljes sejtszámot és a limfociták, monociták és granulociták arányát az előre/oldalra szórt fényjel (forward/side scatter: FSC/SSC) alapján számoltuk ki (35).

3.1.9 A tüdőgyulladás és az emphysema szövettani értékelése

A tüdőmetszetek szemikvantitatív szövettani elemzése során a perivaszkuláris/peribronchiális ödéma, az akut és krónikus gyulladás, az intersticiális akut és krónikus gyulladás, az epiteliális sérülés kiterjedését, valamint a goblet sejtek mennyiségét vizsgáltuk. Az emphysema mértékének meghatározása céljából a mean linear intercept (L_m) hosszal kiértékeljük az acináris átmérőket a Case Viewer szoftver (3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország) segítségével (36).

3.1.10. MMP-2 és MMP-9 aktivitás mérése tüdőből zselatin-zimográfiával

A pulmonális MMP-2 (64 és 72 kDa) és MMP-9 (86 és 92 kDa) fő izoformáinak aktivitásának mérését zselatin-zimográfiát végeztünk (37). A tüdőmintákat 20 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on zimogram-előhívó pufferben (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). A géleket ezután 0,05%-os Coomassie briliáns kékkel festettük meg, majd vizes 4%-os metanol-8%-os ecetsavban (térfogot/vol) öblítettük. A sávok intenzitását a standardhoz viszonyított arányban fejeztük ki, és önkényes egységben adtuk meg.

3.1.11 Citokin profil elemzése

A tüdőszöveteket kiolvasztottuk, megmértük, majd azonnal homogenizáltuk 1% proteáz inhibitor fenilmetil-szulfonil fluoridot (PMSF, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) tartalmazó PBS-ben, és 5 percig 10 000 g-n centrifugáltuk a sejtörmelék eltávolítása érdekében. Triton X-100-at adtunk hozzá 1%-os végső koncentrációig. A 6 hónapos dohányoztatott és intakt állatokból származó vérmintákat szobahőmérsékleten 30 percig hagytuk alvadni, majd 20 percig 2000 g-en centrifugáltuk. A homogenátumok és a szérumminták teljes fehérjetartalmát a citokinmérés előtt a BioRad DC protein assay kit segítségével meghatároztuk. Negyven különböző gyulladásos citokint mértünk meg egyidejűleg a Mouse Cytokine Array Panel A (R&D Systems) segítségével a gyártó utasítása szerint. A citokin hőtérképet a Matrix2png 1.2.1 online freeware segítségével generáltuk.

3.1.12 Statisztikai elemzés

A mérések statisztikai kiértékelését $n=6$ egér/csoport adataiból végeztük, az eredményeket átlag \pm SEM értéként fejeztük ki, kivéve az invazív WBP-t ($n=5$ /csoport) és a tüdő homogenizátumok citokin meghatározását ($n=3$ / csoport). Az éber WBP és a mikro-CT eredmények értékelését ismételt mérések varianciaanalízissel és Bonferroni módosított t-teszttel végeztük a különböző csoportok közötti, majd az egyes csoportokban időben fellépő statisztikai különbségek

megállapítása érdekében. A BALF áramlási citometriából gyűjtött adatokat és a mean linear intercept értékeket (80-100 mérés/metszet) kétszemponos varianciaanalízissel és Sidak többszörös összehasonlító teszttel értékeltük. A negyven különböző citokin szintjének statisztikailag elemzését kétszemponos varianciaanalízissel, majd Bonferroni poszt-teszttel végeztük. Az invazív WBP eredményeket párosítatlan Student-féle t-próbával elemeztük. A szemikvantitatív szövettani pontozás értékelését Kruskal-Wallis, majd Dunn-féle többszörös összehasonlító teszttel elemeztük a csoporton belüli különbségek időbeli megfigyelésére, míg a Mann-Whitney-tesztet a csoportok közötti különbségek elemzésére végeztük az adott időpontokban.

3.2 KRÓNIKUS GASTRITIS MODELL

3.2.1 Kísérleti állatok

A vizsgálatokat 8 hetes hím CD1 és C57Bl/6 egereken végeztük, amelyek súlya a vizsgálat kezdetén 18-25 g volt, valamint Wistar patkányokon (180-220 g); csoportonként 6 állattal. A kísérletet a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérleti Etikai Bizottsága az Állatkísérletek Etikai Kódexe alapján jóváhagyta (BA02/2000-20/2019).

3.2.2 Jódacetamid (IAA) által kiváltott gastritis-modell

Az IAA-tartalmú ivóvizet naponta frissen készítettük 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 vagy 1 g IAA 200 ml csapvízben történő feloldásával (0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3% és 0,5% koncentrációban) 7 vagy 14 napon keresztül, a kísérleti elrendezéstől függően. A folyadékbevitelt és a testsúlyt naponta mértük. A vizsgálat végén az állatokat ketamin (120 mg/kg ip.; Calypsol, Gedeon Richter Nyrt., Budapest, Magyarország) és xilazin (6 mg/kg ip.; Sedaxylan, Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Hollandia) altatásban termináltuk. A gyomrot kimetszettük, a nagyobb görbület mentén felnyitották és szobahőmérsékletű sóoldattal leöblítettük. A makroszkópos elváltozások fotódokumentálása után a gyomrot négy részre vágtuk: az antrum és a corpus mintákat 6%-os formalinban rögzítettük, és az 5 µm-es metszeteket készítettünk szövettani és immunhisztokémiai kiértékeléshez. A többi antrum- és corpusmintát lefagyasztottuk molekuláris biológiai értékeléshez.

3.2.3 Kísérleti protokoll az IAA-indukált gyomor nyálkahártya sérülés patkánymodelljére

A patkányokat 8, egyenként 6 állatból álló csoportba randomizáltuk, és 0,05%-os, 0,1%-os vagy 0,2%-os IAA-oldatot kaptak 7 vagy 14 napon keresztül. Az IAA-mentes csapvizet ivó alomtestvérek szolgálták kontrollállatként.

3.2.4 Kísérleti protokoll az IAA-indukált gyomor nyálkahártya sérülés egérmodelljére

Az első vizsgálatban CD1 egereket randomizáltunk 4 csoportba: a 7 és 14 napig 0,1%-os IAA-t kapó egerek és a megfelelő kontrollcsoportok. E vizsgálat negatív eredményei alapján a CD1 egereket 3 csoportba randomizáltuk; 1-1 csoport 7 napig 0,3% illetve 0,5% IAA-t kapott; a kontrollcsoport csapvizet ivott. A törzsek közötti különbségek vizsgálatára C57Bl/6 egereket randomizáltunk 4 csoportba, amelyek 1) 0,3% IAA-t tartalmazó ivóvizet, 2) 0,3% IAA-t és 2% szacharózt tartalmazó ivóvizet, 3) csapvizet, és 4) csapvízben oldott 2% szacharózt kaptak.

3.2.5 A gastritis szemikvantitatív makroszkópos és kvalitatív szövettani értékelése

A makroszkópos elváltozások kiterjedését és súlyosságát a hiperémia mértékén és az eróziók/fekélyek számán alapuló szemikvantitatív pontozási rendszerrel értékeltük. A gyomormintákat paraformaldehiddel fixáltuk (4%) és paraffinba ágyasztuk, 5 µm-es metszeteket készítettünk és HE-al festettük további kvalitatív szövettani elemzés céljából.

3.2.6 Teljes glutation koncentráció mérése

A gyomor nyálkahártya minták teljes GSH (tGSH) és teljes γ -glutamil-cisztein (tGluCys) koncentrációját egy specifikus nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel, RP 18 NUCLEOSHELL HPLC oszlopokkal (Macherey-Nagel, Düren, Németország), N-acetil-cisztein-etilészterrel történő inkubációt követően mértük le.

3.2.7 TRPV1 és TRPA1 immunhisztokémia és pontozás

A paraformaldehiddel fixált és paraffinba ágyazott szövetmintákat deparaffináltuk, rehidráltuk és savas citrát-pufferben (pH 6) mikrohullámú sütőben inkubáltuk. Az endogén peroxidáz-aktivitást 3%-os hidrogén-peroxiddal oltottuk ki. A metszeteket mosást követően és blokkoló oldatban inkubáltuk, majd 1:1000 hígított nyúl poliklonális anti-TRPA1 (ab68848; Abcam, Cambridge, UK) és anti-TRPV1 (GP14100; Neuromics, Edina, MN, USA) antitestekkel inkubáltuk. A tárgylemezeket tormaperoxidázzal (HRP) konjugált anti-nyúl másodlagos antitesttel

(DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) inkubáltuk az EnVision rendszerrel. A reakciót 0,01% hidrogén-peroxidot tartalmazó 3,3-diaminobenzidin-tetrakloriddal vizualizáltuk, és szövettani festést végeztünk hematoxilinnel (38). A TRPA1 és TRPV1 immunpozitivitás kvantitatív kiértékelését az immunpozitív sejtek %-os aránya alapján, a vizsgálati elrendezésre vakon végezte el egy patológus szakorvos 10 látómezőn/metszet/állat.

3.2.8 *Trpv1* és *Trpa1* mRNS szint meghatározása valós idejű qPCR méréssel

A teljes RNS-t TRI Reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA) segítségével tisztítottuk a Direct-Zol RNA MiniPrep izoláló készlettel (Zymo Research, Irvine, CA) a gyártó utasításait követve. Az RNS mennyiségét és tisztaságát NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE) értékeltük, majd a mintákat dezoxiribonukleáz I enzimmal (Zymo Research, Irvine, CA, USA) kezeltük. A megtisztított teljes RNS-ből (100 ng) cDNS-t szintetizáltunk reverz transzkripció PCR-ral, a Maxima First Strand cDNS Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével. A valós idejű qPCR-t Stratagene M×3000P qPCRSytem (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) készülékkel végeztük Luminaris HiGreen LowROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), és a gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz (*Gapdh*) (NM_017008.4), *Trpv1* (NM_031982.1), és *Trpa1* (NM_207608.1) primerek használatával. A relatív mRNS-expresszió szintek meghatározását az DDCT-módszerrel végeztük, kalibrátorként kontroll állatok mintáit használva.

3.2.9 Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzést a GraphPad Prism v6 szoftver segítségével végeztük. A kiértékelést n=6 egér/csoport adataiból végeztük, az eredményeket átlag \pm SEM értéként fejeztük ki. A testsúlyváltozás és a folyadékbevitel kiértékelését ismételt méréses varianciaanalízissel és Bonferroni módosított t-teszttel végeztük. A szemikvantitatív makroszkópos pontozást nem-parametrikus Kruskal-Wallis módszerrel és Dunn-féle többszörös összehasonlító teszttel elemeztük a csoportok közötti különbségek vizsgálatára adott időpontokban, míg a Mann-Whitney-teszttel a csoporton belüli különbségeket elemeztük az egyes időpontok között. A GSH-méréseket egyszempontos varianciaanalízissel elemeztük, míg a TRPA1 és TRPV1 immunpozitivitást kétszempontos varianciaanalízissel, és Dunn-féle többszörös összehasonlítás teszttel értékeltük. A qPCR-méréseket Student-féle párosítatlan t-próbával értékeltük.

4 EREDMÉNYEK

4.1 A CSE-INDUKÁLT KRÓNIKUS LÉGÚTI GYULLADÁS MODELL JELLEMZÉSE

4.1.1 A légzésfunkciós paraméterek követése nem-invazív WBP méréssel

Az éber állatban nem-invazív WBP technikával meghatározott légzésfunkciós paraméterek (RT, f, TV, MV, Ti, Te, PIF, PEF) a 6 hónapos időszak során egyik időpontban sem mutattak különbséget a dohányzó és a nemdohányzó csoportok között.

4.1.2 Invazív légzésfunkciós paraméterek a 6 hónapos protokoll végén

A 6. hónap végén az RI, EEW, EEP, Te, valamint az EF50 és a $Ti/(Ti+Te)$ arány jelentős csökkenése volt megfigyelhető, míg a dinamikus compliance nem változott krónikus dohányfüst-expozíció hatására a nemdohányzó csoporthoz képest.

4.1.3 A tüdőtagulat értékelése mikro-CT-vel és mean linear intercept meghatározással

Az *in vivo* mikro-CT-vel értékelt rekonstruált 3D képeken egyértelműen megfigyelhető volt a tüdőtagulat kialakulása. Morfometriai elemzésünk szerint az LAA/TLV%, az emphysema mennyiségi mutatója az 5. hónap végére jelentős növekedést mutatott, amely a 6. hónap végére tovább nőtt. A HE festett tüdőmetszeteken a CSE már 1 hónap után jelentős alveoláris átmérő (L_m) növekedést okozott a nemdohányzó csoporthoz képest, és a mikro-CT-eredményeinkkel párhuzamosan fokozatosan növekedett. Az 5. hónap végére a disztális légtér jelentősen kitágult a dohányzó egerekben, összehasonlítva az 1. hónap utáni L_m értékkel.

4.1.4 Hisztopatológiai elemzés

Egy hónap CSE minimális peribronchiális és mérsékelt perivaszkuláris ödéma kialakulását, valamint a tüdőparenchimában a granulociták és makrofágok számának enyhe növekedését idézte elő. Két hónapos dohányoztatás után kiterjedt perivaszkuláris és peribronchiális ödéma alakult ki, nagyszámú granulocita, makrofág és limfociták beszűrődésével ezekbe a régiókba. A gyulladás mind az intersticiális, mind a peribronchiális területekre jellemző volt, emellett a bronchiolusok epitel rétege szabálytalanná vált, a bronchioláris és alveoláris epitel károsodás jeleit mutatta, és az interepithelialis nyáktermelő sejtek száma megnőtt. A masszív gyulladáshoz vezető reakció a 3 hónapos

időponttól csökkenő tendenciát mutatott, a peribronchiális ödéma még mindig jelen volt, de kevésbé kiterjedt, az immunsejtek, többnyire limfociták száma csökkent, amelyek a peribronchiális terekből az intersticiális régiókba vándoroltak. Eközben a hörgőhám pusztulása feltűnően kiterjedtebbé vált. 4 hónap CSE-t követően a hörgőhám szabálytalansága és károsodása tovább súlyosbodott. A szöveti sérülés mértéke súlyosabbá vált, enyhe emphysema (légterek megnagyobbodása a parenchimában) és atelectasis alakult ki, különösen a perifériás régiókban. Az enyhe ödéma azonban a perivaszkuláris terekre korlátozódott, és a gyulladásos sejtek száma jelentősen csökkent. 5-6 hónap elteltével a szövettani képet az emphysema uralta, először főként a perifériás területeken, majd a tüdő centrális részein is. A gyulladásos reakció ebben a stádiumban minimális volt, makrofág és limfocita csak kis számban volt jelen a megmaradt parenchimában, míg a hörgőhám szabálytalansága és a nyáktermelő sejtek hiperpláziája volt megfigyelhető.

4.1.5 Gyulladásos sejtek száma a BAL folyadékban

Az 1. hónap végén az áramlási citometriai elemzés nem mutatott különbséget a dohányfüstnek kitett és az intakt egerekből nyert BALF-minták granulocita-, makrofág- és limfocita-számában. Ezzel szemben a 2 hónapos CSE mindezen sejtek számának óriási növekedését idézte elő a BALF-ban, amely ezt követően fokozatosan csökkent. A BALF-sejtek teljes száma és összetétele nem különbözött a nem dohányzó kontroll egerek értékeitől a 3. hónap után.

4.1.6 A krónikus dohányfüst növeli az MMP-2 és MMP-9 aktivitást a tüdőben

A zselatin-zimográfia az MMP-2 és az MMP-9 pulmonális aktivitásának szignifikáns növekedését mutatta ki a 6 hónapos CSE-nek kitett egerek tüdőmintáiban, mind az 1 hónapos dohányos, mind a nem dohányzó, korban megegyező kontroll egerekhez képest.

4.1.7 Citokin expresszió a tüdőben és a sérumban

A 40 vizsgált gyulladásos citokin és kemokin közül 26 fehérje volt kimutatható a tüdő homogenizátumokból a 6 hónapos kísérlet során. Az 1. hónap végén az interleukin-1 β (IL-1 β), az IL-10 és a monocita kemoattraktáns protein-5 (MCP-5) jelentősen megnőtt, de később egyikük sem volt kimutatható. A myeloid sejteken expresszálandó triggering receptor-1 (TREM-1) ebben az időpontban mutatta az expressziós csúcsot. A C5a complement komponens, a számos immunsejt és epitél sejt által termelt interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), interleukin-16 (IL-16),

interferon-gamma indukálható protein-10 (IP-10), keratinocita kemoattraktáns (KC), makrofág kolónia stimuláló faktor (M-CSF), a monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1 vagy JE), a gamma interferon által indukált monokin (monokine induced by gamma interferon: MIG), a RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), valamint a metalloproteináz-1 szöveti inhibitora (tissue inhibitor of metalloproteinase-1: TIMP-1) citokinek és kemokinek a 2. hónapban érték el maximális expressziójukat. Eközben a szolubilis intercelluláris adhéziós molekula-1 (sICAM-1) koncentrációja magas volt az intakt tüdő homogenátumában, és hasonlóan magas szinten maradt a teljes 6 hónapos dohányzási időszak alatt. A nemdohányzó egerek szérumban kimutatható volt a B-limfocita kemoattraktáns (BLC), a stromasejtekből származó 1-es faktor (SDF-1), a C5a, az interleukin-1 alfa (IL-1 α , IL-1ra, IL-16, JE, M-CSF, TIMP-1, TNF- α és TREM-1. Az első kettő nem volt jelen az ép tüdőben, és a 6 hónapos dohányzási időszak végére az IL-16-hoz hasonlóan csökkentek. A KC jelentősen, az MCP-1 enyhén emelkedett erre az időpontra, míg a többi citokin expressziója változatlan maradt a szérumban.

4.2 A TRPA1 SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A CSE-INDUKÁLT KRÓNIKUS LÉGÚTI GYULLADÁSBAN

4.2.1 A *Trpa1* génhiányos és vad típusú egerek alap légzésfunkciójának összehasonlítása

Intakt körülmények között az f, MV, PIF és PEF szignifikánsan nagyobb, a TV, Ti, Te és RT szignifikánsan kisebb volt, míg a *Trpa1*^{-/-} egerek Penh értékében nem mutatkozott különbség a vad típusú társaikhoz képest, nem-invazív WBP-vel mérve.

4.2.2 *Trpa1*^{-/-} és *Trpa1*^{+/+} egerek légzésfunkcióinak változásai 4 hónap CSE hatására

A légzésfunkciós vizsgálatokat a 4 hónapos dohányfüst expozíciós protokoll kezdetén és minden hónap végén elvégeztük követéses módon. A CSE a TV, MV, PIF és PEF fokozatos és szignifikáns csökkenését idézte elő a *Trpa1*^{+/+} egerekben, 3 hónapos csúcsertéssel, amely a *Trpa1*^{-/-} állatokban nem volt jelen. A *Trpa1*^{-/-} egerekben mért jelentős f, Ti, Te és RT különbségek már az intakt állapotban, a CSE előtt megfigyelt jelentős törzsbeli különbségeknek voltak tulajdoníthatók.

4.2.3 Hisztopatológiai kiértékelés

Egy hónap CSE után jelentős perivaszkuláris ödéma alakult ki, amely az idő múlásával mindkét törzsben szignifikánsan csökkent, és a 4. hónap végére szinte teljesen megszűnt. A perivascularis és peribronchialis, valamint az interstitialis neutrofil granulociták, makrofágok és limfociták akkumulációja azonban a protokoll során mérsékelten emelkedett maradt. A 3. hónap végén már kialakult az emphysemára jellemző strukturális destrukció.

4.2.4 A tüdőágulat kiértékelése mikro-CT-vel és a mean linear intercept meghatározásával

Az emphysemát *in vivo* mikro-CT-vel kvantifikáltuk az LAA / TLV arány meghatározásával CSE előtt, valamint 2 és 4 hónap után. A légtartó területek kiterjedésével korreláló arányszám nem mutatott változást sem a CSE-kezelés, sem az idő függvényében. Az L_m mérés azonban kimutatta, hogy a $Trpa1^{+/+}$ egerekben az emphysema már korábbi időpontban elkezdett kialakulni, mint a génhiányos társaikban; az L_m szignifikánsan megnőtt a vad típusú egerekben 2 hónap CSE után, a $Trpa1^{-/-}$ egerekben azonban nem. A 4. hónapra az L_m mindkét CSE kezelt törzsben emelkedett.

4.2.5 Gyulladásos sejtek száma a BALF-ben

CSE hatására mind a $Trpa1^{+/+}$ és a $Trpa1^{-/-}$ egerek BALF-jában nagy mértékű granulocita, makrofág és limfocita felhalmozódást mértünk. Korábbi eredményeinkkel összhangban (39) a gyulladásos sejtek száma a 3. hónap végére csökkent. A vad típusú és a génhiányos egerek között nem volt biológiailag releváns különbség egyik gyulladásos sejtkomponensben sem.

4.3 IAA-INDUKÁLT KRÓNIKUS GASTRITIS

4.3.1 Súlyváltozás és folyadékfogyasztás

Wistar patkányokban az IAA koncentrációfüggő súlyváltozást idézett elő. A vivőanyaggal kezelt állatokhoz hasonlóan az alacsony koncentrációjú (0,05%) IAA a 14 napos kísérlet végére ~15%-os súlygyarapodást eredményezett, míg a 0,1%-os és 0,2%-os IAA oldat koncentrációfüggő, fokozatos súlycsökkenést idézett elő. A 0,05%-os és a 0,1%-os IAA-val kezelt csoportok teljes vízfogyasztása a felére csökkent a kontrollcsoportéhoz képest, a 0,2%-os koncentráció esetében pedig a csökkenés kifejezettebb volt.

4.3.2 Az IAA által okozott gyomorelváltozások makroszkópos értékelése

Mindhárom vizsgált koncentrációban mindkét időpontban kiterjedt hiperémia, nyálkahártya-vérzés és számos erózió vagy felületi fekély volt megfigyelhető a Wistar patkányok gyomor nyálkahártyáján. A szemikvantitatív elemzés a 7. napon mind a 0,05%-os, mind a 0,2%-os IAA-val kezelt csoportokban szignifikáns hiperémiát és eróziót mutatott a kontrollokhöz képest. A 14. napon az elváltozások, különösen a hyperaemiás terület kiterjedése a 0,1%-os és 0,2%-os IAA-val kezelt csoportokban szignifikánsan nagyobb mértékű volt. A makroszkópos változások nem mutattak szignifikáns különbséget sem a bevitt IAA koncentrációja, sem az idő függvényében; a fekélyek azonban kifejezettebbek voltak 14 napos IAA kezelés után.

4.3.3 A gyomornyálkahártya kvalitatív szövettani értékelése

A hétnapos IAA-kezelés szubmukóza kiszélesedését mutatta, mely a masszív nyálkahártya ödémának volt tulajdonítható. Magasabb IAA koncentráció hatására kiterjedt gyulladással sejtinfiltráció is megfigyelhető volt. 14 nap elteltével a nyálkahártyán és a szubmukózában egyaránt akut és krónikus gyulladással sejtekkel kevert, fokális epitel sejt sérülések/ epiteliális eróziók, és egyes területeken a muscularis mucosae-t is érintő, szinte teljes nyálkahártya-nekrózis volt megfigyelhető.

4.3.4 A patkány gyomornyálkahártya teljes glutation koncentrációja

A patkányok gyomornyálkahártyájának GSH-tartalmában nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a 14. napon 0,1%-os IAA-t kapó csoportok között. Az IAA-kezelés nem növelte a tGSH-t észrevehetően, míg a tGluCys jelentős növekedést mutatott.

4.3.5 A TRPA1 és TRPV1 immunhisztokémiai kvantitatív elemzése

Az intakt kontrollmintákban enyhe TRPA1 és erős TRPV1 immunpozitivitás volt megfigyelhető az epitelsejteken. A TRPA1 immunpozitív sejtek aránya a 14. napra mind a 0,05%-os, mind a 0,2%-os IAA adagolását követően mind az antrumban, mind a corpusban a jelentősen megnőtt. Bár a TRPV1 immunpozitivitás a corpusban is megnőtt, valamint az antrumban nem változott a 0,05%-os IAA esetében, a 0,2%-os IAA-kezelés után mindkét lokalizációban szignifikánsan csökkent.

4.3.6 *Trpa1* és *Trpv1* relatív génexpresszió változása a gyulladt nyálkahártyában

A TRPA1 fehérje expressziójával összhangban a *Trpa1* mRNS szignifikánsan upregulálódott mind a 0,05%-os, mind a 0,2%-os IAA-val kezelt csoportokban 7 és 14 nap után is, azonban a *Trpv1* relatív génexpressziójában nem volt kimutatható változás sem idő, sem dózis, sem lokalizáció függvényében.

4.3.7 IAA által kiváltott változások egerekben

A CD1 egerekben az IAA dózistól függő, folyamatos, fokozatos súlycsökkenést figyeltünk meg; a 0,3%-os és 0,5%-os IAA-val kezelt csoportokban a súlycsökkenés olyan súlyos volt a 7 napos protokoll végére, hogy a 14 napos protokollt etikai megfontolások miatt nem lehetett elvégezni. Bár a folyadékfogyasztás minden IAA-val kezelt csoportban jelentősen csökkent, ez nem mutatott koncentrációfüggést, és nem magyarázta ezen állatok jelentős dóziszfüggő súlycsökkenését. A C57Bl/6 egerek ellenállóbbrak bizonyultak a 0,3%-os IAA-val szemben, amely 7 nap után ~14%-os súlycsökkenést idézett elő, feleannyit, mint ugyanezen koncentráció a CD1 egereknél (~28%). Érdekes módon a 0,3% IAA-hoz 2% szacharóz hozzáadása jelentősen csökkentette mind a folyadékbevitelt, mind a C57Bl/6 egerek testsúlyát (~21%) a 0,3% IAA-t ivó csoporthoz képest. Meglepő módon, ellentétben a Wistar patkányokkal, ahol hasonló testsúlyváltozást és csökkent folyadékfogyasztást figyeltünk meg, az IAA-t ivó egércsoportok egyikében sem volt megfigyelhető makroszkópos vagy mikroszkópos elváltozás.

5 MEGBESZÉLÉS

Munkánk első részében elsőként igazoltuk krónikus egérmodellben, hogy a cigarettafüst jellegzetes tüdőgyulladást, tüdőtágulást és atelektázist idéz elő. Funkcionális, morfológiai és immunológiai technikákkal bizonyítottuk, hogy ezek a jól definiált patofiziológiai változások a gyulladással reakcióktól a szöveti destrukcióig a dohányfüst-expozíció időtartamától függenek, és a COPD-szerű strukturális és funkcionális változások a negyedik hónap után alakulnak ki.

Az invazív WBP-vel meghatározott légzésfunkció alacsony, tracheotomizált és mechanikusan lélegeztetett egerekben a légúti ellenállás jelentős csökkenését mutatta, érdekes módon a kilégzési paraméterek, mint a bronchokonstriktóra jellemző EF50, EEW, EEP és Te csökkenésével párhuzamosan (40).

A szövettani kiértékelés során megfigyelt gyulladásos elváltozások egyértelműen a dohányzás időtartamától függtek. Az első két hónapban peribronchiális/perivaszkuláris ödéma, neutrofil és makrofág infiltráció volt jellemző, a harmadik és negyedik hónaptól a makrofágok és limfociták túlnyomórészt az interstitialis területeken halmozódtak fel, és hámegetlenség és hiperplázia alakult ki. Az 5. hónaptól a gyulladásos reakció mértéke csökkent, a szöveti destrukció dominált, amit a jelentős mértékű emphysema és atelectasis igazolt. A 6 hónapos kísérlet végére a vaszkuláris endotél sejtek proliferációja, destruált hörgők deszkvamált epitél sejtekkel, fibrózis és az alveoláris szerkezet károsodása volt jellemző. A szövettanilag megfigyelt peribronchiális gyulladás csúcspontját a dohányzás 2. hónapjában a granulociták, makrofágok és limfociták drasztikusan megnövekedett száma a BALF-ban erőteljesen alátámasztotta. A későbbi időpontokban a BALF-ban a sejtek száma nem mutatott változást a kontroll csoporthoz képest, ami nem meglepő, mivel ebben a szakaszban szövettanilag a gyulladás intersticiális terjedése (a 3. hónapban) és a hörgőhám pusztulása (a 4. hónaptól) volt megfigyelhető. Az emphysema kialakulását 5-6 hónap dohányfüst-expozíció után a mikro-CT is egyértelműen kimutatta, teljes összhangban a szövettani képpel. Ezért vizsgálatunk egyik fő üzenete az, hogy a dohányzás időtartama erősen meghatározza a patofiziológiai elváltozásokat, amelyek a tüdőben a különböző típusú gyulladásos folyamatoktól a szöveti pusztulásig egymás után alakulnak ki. A megfelelő kísérleti elrendezés megválasztása alapvető fontosságú annak függvényében, hogy a krónikus betegségmodell mely mechanizmusait és fázisát kívánjuk vizsgálni (41).

Tekintettel az MMP-k COPD patogenezisben betöltött jól ismert szerepére (42), az egértüdőben megmértük az MMP-2 és MMP-9 aktivitását, és 6 hónapos dohányzás után szignifikáns növekedést találtunk, ami rámutatott az egérmodell és a humán betegség mechanizmusai közötti hasonlóságra, alátámasztva a modell transzlációs jelentőségét.

A tüdőhomogenátumokból mért citokinpanel 2-fázisú mintázatot mutatott a 6 hónapos dohányfüst-expozíció során. A 2. hónap gyulladásos csúcsa egyértelműen egy IL-1 által vezérelt kaszkádra utal, a C5a, IL-1 α , IL-1ra, IL-16, IP-10, M-CSF, KC, MIG, RANTES, és TIMP-1 emelkedéssel (43). A szöveti destrukció fázisában az 5-6. hónapban a C5a, IFN- γ , IL-4, IL-7, IL-13, IL-17, IL-27, tumor nekrosis faktor- α (TNF- α), makrofág gyulladásos protein-1 α (MIP-1 α), JE, TIMP-1, interferon-indukálható T-sejt kemoattraktáns (I-TAC) és TREM-1 citokinek szintje emelkedett.

A krónikus, mérsékelt cigarettafüst-expozíció által kiváltott légúti gyulladás egérmodellje ezért alkalmas a dohányzás okozta időfüggő jellegzetes változások és mechanizmusok vizsgálatára a

tüdőben. Az itt leírt patofiziológiai változások hasonlóak a klinikumban megfigyeltekhez, ami kiemeli modellünk transzlációs jelentőségét a COPD-ben megfigyelhető humán morbiditással kapcsolatban.

Munkánk második részében a TRPA1 szerepét vizsgáltuk ebben a karakterizált és optimalizált krónikus légúti gyulladás modellben. Elsőként igazoltuk, hogy a TRPA1 csatorna komplex szerepet játszik az alap légzésfunkció szabályozásában és a gyulladásos mechanizmusokban, hozzájárulva a krónikus CSE-indukált emphysemához és légzésfunkció romlásához, mint az MV, TV, PIF és PEF csökkenéshez, amelynek csúcspontja 3 hónapnál jelentkezik.

A TRPA1-nek a CS által kiváltott légúti gyulladásban betöltött szerepéről többnyire cigarettafüst-kivonatot használó *in vitro* adatok állnak rendelkezésre. A TRPA1 részt vesz a CS-kivonat által kiváltott alveoláris és bronchiális epitel károsodásban (44). A nikotin közvetlenül aktiválja a TRPA1 receptort (45,46), ami közvetítheti a hörgőszűkületet. (47). Hasonlóképpen, a ROS és számos lipidperoxidációs termék is stimulálja a TRPA1-et, ami valószínűleg hozzájárul a CSE-indukált oxidatív stressz által kiváltott légúti elváltozásokhoz (8,48,49), mint az emphysema, amelyre vonatkozóan itt szolgáltatottuk az első adatokat.

A perivaszkuláris/peribronchiális ödéma mértéke 1 hónap után volt a legsúlyosabb, majd fokozatosan csökkent, és a gyulladásos sejtinfiltráció mindkét törzsben 2 hónap CSE után érte el a maximumot, ami összhangban van az ugyanezen modellben korábban végzett vizsgálatainkkal. (39). A TRPA1 génhány nem eredményezett jelentős változásokat a krónikus gyulladásos folyamatok sejtkomponenseiben, amint azt mind a szövettani eredmények, mind a BALF-elemzés mutatta.

A receptor genetikai deléciója nem jelzi előre közvetlenül a TRPA1 agonisták vagy antagonisták profilaktikus vagy terápiás potenciálját. Ezért további kutatásokra van szükség a TRPA1 farmakológiai célpontként való potenciáljának meghatározásához a tüdőben.

Munkánk harmadik részében a TRPA1 és TRPV1 gastritisben betöltött lehetséges szerepét vizsgáltuk diffúz gyomor nyálkahártya károsodás transzlációs jelentőségű modelljében. Ez volt az első átfogó és összehasonlító akut és krónikus diffúz gastritis modell vizsgálat, amelyben az IAA-indukált koncentráció- és időtartamfüggő változásokat írtuk le Wistar patkányokban. Az IAA által kiváltott koncentrációfüggő súlycsökkenés és gyomorerózió már az ivóvízben oldott IAA már 7

napos bevételét követően kialakult, amelyet masszív szubmukózus ödéma, akut és krónikus gyulladással sejtek kiterjedt infiltrációja, majd vérzéses erózió kísért. 14 nap elteltével a fekélyek a muscularis mucosae-t érintő mély nekrotizáltsággal jelentek meg, amely súlyosabb és kiterjedtebb volt azoknál a patkányoknál, amelyek ivóvizében magas (0,2%-os) IAA-koncentráció volt.

Az IAA egy szulfhidril alkiláló ágens, amely a redukált GSH depletálásával gátolja a szabadgyökök mentesítését, és így gyomorkárosodást idéz elő (30). Jelen vizsgálatunkban nem figyeltünk meg GSH-csökkenést IAA kezelésre. Ennek oka az lehet, hogy az IAA bevételét követő 7, illetve 14 nap után mértük, amikor az elváltozások már teljesen kifejlődtek vagy gyógyulni kezdtek. A tGluCys kis mértékű, de szignifikáns növekedése is alátámasztja a gyógyulási fázis kezdetét az oxidatív stressz és/vagy a GSH szintézis enzimaktivitás emelkedésével, ami arra utal, hogy a lézió kialakulásának idején a finom szabályozás is aktiválódik az agresszív/defenzív faktorok egyensúly felbomlásának ellensúlyozására.

Nem figyeltünk meg jelentős változásokat az elváltozások súlyosságában a hiperémia és az erózió tekintetében a 7 és 14 nap közötti alkalmazás során, összhangban a szakirodalommal (50), bár a fekélyek kialakulása 14 nap után kifejezettebb volt.

Ebben a jól karakterizált gyomoreróziós/ fekélyes gyulladással modellben a legfontosabb eredményünk az, hogy mind a 0,05%-os, mind a 0,2%-os IAA bevétel 7 nap után *Trpa1*, de nem *Trpv1* mRNS upregulációt indukált a patkány antrumában és corpusban, ami a 14 napos kísérleti periódus végén is emelkedett maradt.

Az IAA, amely egy cisztein-modifikáló alkiláló vegyület, képes kovalensen kötődni a citoplazmatikus cisztein oldalláncokhoz, így aktiválni képes a TRPA1-t (51). Az IAA által indukált TRPA1-expresszió fokozódás a gyomorban azonban inkább a gyulladással kaszkádnak tulajdonítható, amit alátámaszt a vízbe merítéses, illetve stressz által kiváltott akut gyomornyálkahártya-fekélyes modelljében megfigyelt upregulációja is patkányokban (52).

A TRPV1/A1 expressziója a kapszaicin-érzékeny peptiderg idegvégződéseken és nem-neuronális sejteken, mint a gyomor epithelialis és gyulladással sejtein (14,15,17,18), melyet a jelenlegi eredményeink is alátámasztanak, sokkal összetettebbé teszik lehetséges szerepük értelmezését. Az IAA által kiváltott gyulladással reakció során számos endogén, TRPV1-et aktiváló gyulladással mediátor (proton, lipoxigenáz termék) szabadul fel, amelyek szintén befolyásolhatják a TRPA1 működését és expresszióját, mivel ismert a csatorna funkcionális kölcsönhatása (3,11,17).

Meglepő módon az egerek (mind a CD1, mind a C57Bl/6 törzsek) ellenállónak bizonyultak az IAA minden alkalmazott koncentrációjával szemben, még a patkányoknál alkalmazott legkárosabbnál magasabb koncentrációval szemben is. Bár egerekben is a patkányhoz hasonló koncentrációfüggő súlycsökkenés volt tapasztalható, a gyomorban nem volt megfigyelhető makroszkópos vagy mikroszkópos elváltozás. Egy kutatócsoporttól származó néhány tanulmány rámutat az IAA által kiváltott makroszkópos elváltozások hiányára egerekben, ami alátámasztja jelen eredményeinket, de enyhe gastritisre jellemző vegyes gyulladásos infiltrációt írnak le (53). Érdekes módon a legtöbb ilyen vizsgálat azt mutatta, hogy a kezdeti súlycsökkenés a kezelés harmadik napjára helyreállt, bár a folyadék fogyasztásuk a vizsgálat során körülbelül 50%-kal csökkent (54). Ez szintén összhangban van a mi megfigyelésünkkel, miszerint a testsúlycsökkenés nem magyarázható kizárólag az IAA-val kezelt állatok kevesebb ivásával. A folyadékfogyasztás koncentrációfüggő csökkenése orális averzióra utal, amely a színtelen, szagtalan IAA-oldat potenciális gyomorirritáló hatásának tudható be.

A rezisztenciamechanizmusok meghatározása meghaladta vizsgálatunk kereteit, azonban értékes információkkal szolgálhat a még nem teljesen ismert gasztroprotektív mechanizmusokról.

A TRPV1 és TRPA1 expresszió, és a colitisben betöltött szerepükre vonatkozó kísérleti adatok ellentmondásosnak tűnnek (55). Ezeknek a receptoroknak az érzőideg végződéseken történő aktiválása neurogén gyulladást közvetít az SP és a CGRP felszabadulásán keresztül, ami fokozott érpermeabilitást, plazmafehérje extravazációt és gyulladásos sejtaktivációt eredményez. Eközben a gyulladáscsökkentő szenzoros neuropeptidek, például a szomatosztatin és az ugyanazon idegvégződésekből egyidejűleg felszabaduló opioid peptidok gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatást fejtenek ki mind lokálisan, mind szisztémásan a keringésbe jutva. Továbbá, ezek az ioncsatornák az érrendszeri simaizomzaton és a gyulladásos sejteken, például a makrofágokon és a T-helper sejteken pro- és anti-inflammatorikus funkciókat egyaránt közvetítenek. Ezért a TRPV1 és a TRPA1 kísérletes vastagbélgyulladásban betöltött általános szerepe függ 1) ezen ioncsatornák expressziójának sokféleségétől az érzőidegeken, immunsejteken, hámsejteken és érrendszeri simaizomsejteken (3), 2) a pro- és anti-inflammatorikus mediátorok széles skálájától, köztük a szenzoros neuropeptideknek és a különböző mechanizmusokat kifejtő citokineknek a csatornaaktiváció által kiváltott felszabadulásától, 3) a ko-expresszált TRPV1 és TRPA1 receptorok összetett kölcsönhatásaitól,

4) a kísérleti modellek és protokollok különbözőségétől (faj, törzs, a kémiai ágensek koncentrációja és összetétele, időtartam, intenzitás, a sérülés komplex mechanizmusai), valamint a modellek számos korlátjától.

6 AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK

1) Funkcionális, morfológiai és immunológiai módszerekkel igazoltuk, hogy a krónikus mérsékelt cigarettafüst jellegzetes tüdőgyulladást, tüdőtágulatot és atelektázist okoz krónikus egérmodellben. Ezek a jól meghatározott patofiziológiai változások a gyulladásos reakcióktól a szöveti károsodásig a dohányfüst-expozíció időtartamától függenek. A COPD-szerű strukturális és funkcionális változások a negyedik hónap után alakulnak ki, és hasonlóak a klinikumban megfigyeltekhez, ami kiemeli modellünk transzlációs jelentőségét a COPD-ben megfigyelhető humán morbiditással kapcsolatban. Ezért ez az egérmodell alkalmas a dohányzás által kiváltott időfüggő jellegzetes változások és mechanizmusok vizsgálatára a tüdőben.

2) Mi igazoltuk elsőként, hogy a TRPA1 csatorna komplex szerepet játszik az alap légzésfunkció szabályozásában és a gyulladásos mechanizmusokban azáltal, hogy serkenti a krónikus CSE által kiváltott emphysema kialakulását és a légzésromlást, mint az MV, TV, PIF és PEF csökkenését, amelynek csúcspontja 3 hónappal figyelhető meg.

3) Mi igazoltuk elsőként a TRPA1 ioncsatorna upregulációját egy jól karakterizált, transzlációs jelentőségű gyomor nyálkahártya sérülés modelljében az IAA által indukált koncentráció- és időtartamfüggő makroszkópos és mikroszkópos elváltozásokkal összefüggésben. Ezek az adatok jó alapot nyújtanak a TRPA1-et célzó farmakológiai beavatkozások hatásának értékeléséhez a gyomorsérülés különböző összetevőire.

7 HIVATKOZÁSOK

1. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: an overview. *Cell Calcium*. 2005;38(3–4):233–52.
2. Latorre R, Zaelzer C, Brauchi S. Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. *Q Rev Biophys*. 2009;42(3):201–46.
3. Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: Moving away from sensory nerves. *British Journal of Pharmacology*. 2012;166(2):510–21.
4. Geppetti P, Nassini R, Materazzi S, Benemei S. The concept of neurogenic inflammation. *BJU International*. 2008;101(Suppl 3):2–6.
5. Szolcsányi J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides*. 2004;38(6):377–84.
6. Szolcsányi J. Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. *Progress in Brain Research*. 1996;113:343–59.
7. Helyes Z, Pintér E, Sándor K, Elekes K, Bánvölgyi Á, Keszthelyi D, et al. Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *PNAS*. 2009;106(31):13088–93.
8. Viana F. TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue damage. *J Physiol*. 2016;594(15):4151–69.
9. Caterina MJ, Park U. TRPV1: A Polymodal Sensor in the Nociceptor Terminal. *Current Topics in Membranes*. 2006;57(06):113–50.
10. Talavera K, Startek JB, Alvarez-Collazo J, Boonen B, Alpizar YA, Sanchez A, et al. Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: from Structure to Disease. *Physiological Reviews* [Internet]. 2020;100(2):725–803. Available from: www.physiology.org/journal/physrev
11. Ruparel NB, Patwardhan AM, Akopian AN, Hargreaves KM. Homologous and Heterologous Desensitization of Capsaicin and Mustard Oil Responses Utilize Different Cellular Pathways in Nociceptors. *Pain*. 2008;135(3):271–9.
12. Gouin O, L’Herondelle K, Lebonvallet N, le Gall-Ianotto C, Sakka M, Buhé V, et al. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. Vol. 8, *Protein and Cell*. Higher Education Press; 2017. p. 644–61.
13. Fausson-Pellegrini MS, Taddei A, Bizzoco E, Lazzeri M, Vannucchi MG, Bechi P. Distribution of the vanilloid (capsaicin) receptor type 1 in the human stomach. *Histochemistry and Cell Biology*. 2005;124(1):61–8.
14. Kun J, Szitter I, Kemény Á, Perkecz A, Kereskai L, Pohóczky K, et al. Upregulation of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Ion Channel in the Inflamed Human and Mouse Colon and Its Protective Roles. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e108164.
15. Poole DP, Pelayo JC, Cattaruzza F, Kuo Y, Gai G, Chiu J v., et al. Transient receptor potential ankyrin 1 is expressed by inhibitory motoneurons of the mouse intestine. *Gastroenterology*. 2011;141:565–75.
16. Mukhopadhyay I, Kulkarni A, Khairatkar-Joshi N. Blocking TRPA1 in Respiratory Disorders: Does It Hold a Promise? *Pharmaceuticals*. 2016;9(4):E70.

17. Bertin S, Aoki-Nonaka Y, Lee J, de Jong PR, Kim P, Han T, et al. The TRPA1 ion channel is expressed in CD4+ T cells and restrains T cell-mediated colitis through inhibition of TRPV1. *Gut*. 2017;66(9):1584–96.
18. Bertin S, Aoki-Nonaka Y, de Jong PR, Nohara LL, Xu H, Stanwood SR, et al. The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4+ T cells. *Nature Immunology*. 2014;15(11):1055–63.
19. Dietrich A. Modulators of Transient Receptor Potential (TRP) Channels as Therapeutic Options in Lung Disease. *Pharmaceuticals*. 2019;12(23).
20. Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease GOLD executive summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2013;187(4):347–65.
21. Yao H, Hwang J woong, Sundar IK, Friedman AE, McBurney MW, Guarente L, et al. SIRT1 redresses the imbalance of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9 in the development of mouse emphysema and human COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;305(9):L615-24.
22. Fricker M, Deane A, Hansbro PM. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Drug Discov*. 2014 Jun;9(6):629–45.
23. Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton a M, Kobayashi DK, Kelley D, Belaaouaj A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Pathol*. 2003;163(6):2329–35.
24. Matsumoto K, Kurosawa E, Terui H, Hosoya T, Tashima K, Murayama T, et al. Localization of TRPV1 and contractile effect of capsaicin in mouse large intestine: high abundance and sensitivity in rectum and distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2009;297:348–60. Available from: <http://www.ajpgi.org>
25. Engel MA, Khalil M, Mueller-Tribbensee SM, Becker C, Neuhuber WL, Neurath MF, et al. The proximodistal aggravation of colitis depends on substance P released from TRPV1-expressing sensory neurons. *Journal of Gastroenterology*. 2012 Mar;47(3):256–65.
26. Szolcsanyi J, Barthó L. Impaired defense mechanism to peptic ulcer in the capsaicin-desensitized rat. In: Mózsik G, Hanninen O, Jávör T, editors. *Advances in Physiological Science*. Oxford: Akadémiai Kiadó-Pergamon Press, Budapest; 1981. p. 39–51.
27. Yu X, Yu M, Liu Y, Yu S. TRP channel functions in the gastrointestinal tract. *Seminars in Immunopathology*. 2015;38(3):385–96.
28. Kavitt RT, Lipowska AM, Anyane-Yeboah A, Gralnek IM. Diagnosis and Treatment of Peptic Ulcer Disease. *American Journal of Medicine* [Internet]. 2019;132(4):447–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.12.009>
29. Szabo IL, Cseko K, Czimmer J, Mozsik G. Diagnosis of Gastritis – Review from Early Pathological Evaluation to Present Day Management. In: Mozsik G, editor. *InTech Open Access Publisher*. Rijeka; 2013. p. 3–20.
30. Szabo S, Trier JS, Brown A, Schnoor J. Sulfhydryl blockers induce severe inflammatory gastritis in the rat. *Gastroenterology*. 1984;86:1271.
31. Szabo S, Trier JS, Frankel PW. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science* (1979). 1981;214(October):200–2.
32. Lee SE, Song HJ, Park SY, Nam Y, Min CH, Lee DY, et al. Effect of ECQ on iodoacetamide-induced chronic gastritis in rats. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. 2013;17(5):469–77.

33. Elekes K, Helyes Z, Kereskai L, Sándor K, Pintér E, Pozsgai G, et al. Inhibitory effects of synthetic somatostatin receptor subtype 4 agonists on acute and chronic airway inflammation and hyperreactivity in the mouse. *European Journal of Pharmacology*. 2008;578(2–3):313–22.
34. Kobayashi S, Fujinawa R, Ota F, Kobayashi S, Angata T, Ueno M, et al. A single dose of lipopolysaccharide into mice with emphysema mimics human Chronic obstructive pulmonary disease exacerbation as assessed by micro-computed tomography. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2013;49(6):971–7.
35. Ma W, Cui W, Lin Q. Improved immunophenotyping of lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) by flow cytometry. *Clinica Chimica Acta*. 2001;313(1–2):133–8.
36. Knudsen L, Weibel ER, Gundersen HJG, Weinstein F v, Ochs M. Assessment of air space size characteristics by intercept (chord) measurement: an accurate and efficient stereological approach. *J Appl Physiol (1985)*. 2010;108(2):412–21.
37. Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2010;61(2):205–9.
38. Kun J, Helyes Z, Perkecz A, Ban A, Polgar B, Szolcsanyi J, et al. Effect of surgical and chemical sensory denervation on non-neural expression of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptors in the rat. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2012;48(3):795–803.
39. Kemény Á, Csekő K, Szitter I, Varga Z v, Bencsik P, Kiss K, et al. Integrative characterization of chronic cigarette smoke-induced cardiopulmonary comorbidities in a mouse model. *Environmental Pollution*. 2017;229:746–59.
40. Hoymann HG. Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2007;55(1):16–26.
41. Leberl M, Kratzer A, Taraseviciene-Stewart L. Tobacco smoke induced COPD/emphysema in the animal model-are we all on the same page? *Frontiers in Physiology*. 2013;4 MAY(May):1–23.
42. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol*. 2006;533(1–3):133–44.
43. Dinarello C a. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *European Journal of Immunology*. 2011;41(5):1203–17.
44. Wang M, Zhang Y, Xu M, Zhang H, Chen Y, Fan K, et al. Free Radical Biology and Medicine Roles of TRPA1 and TRPV1 in cigarette smoke -induced airway epithelial cell injury model. *Free Radical Biology and Medicine* [Internet]. 2019;134(January):229–38. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.004>
45. Chung S, Baumlin N, Dennis JS, Moore R, Salathe SF, Whitney PL, et al. Electronic cigarette vapor with nicotine causes airway mucociliary dysfunction preferentially via TRPA1 receptors. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2019;200(9):1134–45.
46. Talavera K, Gees M, Karashima Y, Meseguer VM, Vanoirbeek JAJ, Damann N, et al. Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nature Neuroscience* [Internet]. 2009;12(10):1293–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2379>
47. Nassini R, Pedretti P, Moretto N, Fusi C, Carnini C, Facchinetti F, et al. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Localized to Non-Neuronal Airway Cells Promotes Non-Neurogenic Inflammation. *PLoS ONE*. 2012;7(8):e42454.

48. Bessac BF, Jordt SE. Breathtaking TRP Channels: TRPA1 and TRPV1 in Airway Chemoreception and Reflex Control. *Physiology*. 2008;23:360–70.
49. Lin AH, Liu MH, Ko HK, Perng DW, Lee TS, Kou YR. Lung Epithelial TRPA1 Transduces the Extracellular ROS into Transcriptional Regulation of Lung Inflammation Induced by Cigarette Smoke: The Role of Influxed Ca²⁺. *Mediators of Inflammation*. 2015;2015(148367).
50. Karmeli F, Okon E, Rachmilewitz D. Sulphydryl blocker induced gastric damage is ameliorated by scavenging of free radicals. *Gut*. 1996;38(6):826–31.
51. Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF, et al. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*. 2007;445(7127):541–5.
52. Xu Y, Jia J, Xie C, Wu Y, Tu W. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 and Substance P Mediate the Development of Gastric Mucosal Lesions in a Water Immersion Restraint Stress Rat Model. *Digestion*. 2018;97(3):228–39.
53. Piqueras L, Corpa JM, Martínez J, Martínez V. Gastric hypersecretion associated to iodoacetamide-induced mild gastritis in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2003;367(2):140–50.
54. Holzer P, Wulsch T, Edelsbrunner M, Mitrovic M, Shahbazian A, Painsipp E, et al. Increase in Gastric Acid-Induced Afferent Input to the Brainstem in Mice with Gastritis. *Neuroscience*. 2007;145(3):1108–19.
55. Csekő K, Beckers B, Keszthelyi D, Helyes Z. Role of TRPV1 and TRPA1 ion channels in inflammatory bowel diseases: Potential therapeutic targets? *Pharmaceuticals*. 2019;12(2):1–19.

8 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának az útmutatásáért, kitartásáért és pozitív hozzáállásáért, amellyel szüntelenül inspirál mind a mai napig. Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Pintér Erikának, a Neurofarmakológiai doktori program, valamint a Farmakológia Intézet vezetőjének, hogy lehetőséget adott, hogy az iskolájában dolgozhassak és tanulhassak, valamint támogató és elismerő munkahelyet biztosított számomra. Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Szolcsányi Jánosnak, a kutatócsoport alapítójának, aki szakmai elhivatottságával mindannyiunk számára példát mutatott.

Külön köszönetet szeretnék mondani a Richter Gedeon Talentum Alapítványnak a doktori kutatásomhoz nyújtott jelentős támogatásáért.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Szabó Sándornak és Dr. Keszthelyi Dánielnek a PhD kutatásom során nyújtott jelentős segítségükért, valamint a jelentős támogatásukért, hogy aktívan részt tudtam venni a nemzetközi kollaborációkban. Szeretném megköszönni Dr. Szabó Imrének, TDK témavezetőmnek az útmutatásait és tanácsait, meghatározó szerepe volt abban, hogy ezt a pályát választottam, amiért örökké hálás leszek.

Nem győzők elégszer köszönetet mondani a legsegítőkésebb kollégáimnak és barátaimnak, Dr. Szőke Évának, Dr. Pohóczky Krisztinának, Dr. Payrits Majának, Dr. Aczél Tímeának és Bence Noéminek, akikre szakmai téren mindig számíhattam, és akik mindig mellettem álltak.

Hálás vagyok Dr. Kemény Ágnesnek, Dr. Hajna Zsófiának, Dr. Pécsi Dánielnek és Dr. Bram Beckersnek a kéziratok megírásában nyújtott jelentős segítségükért.

Köszönöm kollaborátoraink, Prof. Dr. Ferdinandy Péter, Dr. Bencsik Péter, Dr. Kereskai László, Dr. Kajtár Béla, Dr. Dimitrios Tsikas, Dr. Alexander Bollenbach, Dr. Hegedűs Ivett fontos hozzájárulásait és értékes kritikai észrevételeiket.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Bölcskei Katának, Dr. Pethő Gábornak és Dr. Szalontai Bálintnak, akikhez mindig fordulhattam szakmai segítségért. Köszönöm továbbá Ömböli Gyuláné Dóra, Kiss Tamás, Perkecz Anikó, Draskóczi Lilla és Zöldhegyi Józsefné értékes technikai segítségét a kísérletekben.

Szeretnék köszönetet mondani az Intézet minden tagjának a változatos, de nélkülözhetetlen segítségért.

Végül szeretném megköszönni férjemnek és családomnak a szeretetüket, támogatásukat és türelmüket mindezen évek alatt.

9 PUBLIKÁCIÓS LISTA

9.1 Az értekezés alapját képező közlemények:

K. Csekő, D. Pécsi, B. Kajtár, I. Hegedűs, A. Bollenbach, D. Tsikas, I. L. Szabó, S. Szabó, Z. Helyes. Upregulation of the TRPA1 Ion Channel in the Gastric Mucosa after Iodoacetamide-Induced Gastritis in Rats: A Potential New Therapeutic Target. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(16):5591. **IF: 5.924**

Z. Hajna*, **K. Csekő** *, Á. Kemény, L. Kereskai, T. Kiss, A. Perkecz, I. Szitter, B. Kocsis, E. Pintér, Z. Helyes. Complex Regulatory Role of the TRPA1 Receptor in Acute and Chronic Airway Inflammation Mouse Models. *Int J Mol Sci.* 2020. 21(11):4109. *co-first authors, **IF: 5.924**

K. Csekő*, B. Beckers*, D. Keszthelyi, Z. Helyes. Role of TRPV1 and TRPA1 ion channels in inflammatory bowel diseases: Potential Therapeutic Targets? *Pharmaceuticals (Basel)* 2019. 12(2):48. *co-first authors, **IF: 4.46**

Á. Kemény*, **K. Csekő***, I. Szitter, Z. V. Varga, P. Bencsik, K. Kiss, R. Halmosi, L. Deres, K. Erős, A. Perkecz, L. Kereskai, T. Kiss, P. Ferdinandy, Z. Helyes. Integrative characterization of chronic cigarette smoke-induced cardiopulmonary comorbidities in a mouse model. *Environ Pollut.* 2017; 229:746-759. *co-first authors, **IF: 4.39**

9.2 Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó közlemények:

K. Csekő, D. Hargitai, L. Draskóczi, A. Kéri, P. Jaikumpun, B. Kerémi, Z. Helyes, Á. Zsembery. Safety of chronic hypertonic bicarbonate inhalation in a cigarette smoke-induced airway irritation guinea pig model. *BMC Pulmonary Medicine* 2022; 22:131 **IF: 3.154***

A. M. E. Alleleyn, D. Keszthelyi, N. F. Rinsma, **K. Csekő**, B. Kajtár, Z. Helyes, B. Winkens, A. A. Masclee, J. M. Conchillo. The potential role for impaired mucosal integrity in the generation of esophageal pain using capsaicin in humans: an explorative study. *Clin Transl Gastroenterol.* 2022; 10.14309/ctg.0000000000000488 **IF: 4.488***

K. Csekő*, P. Maróti*, Z. Helyes, R. Told, F. Riegler, J. Szalma, Z. Gurdán. The effect of extrinsic factors on the mechanical behaviour and structure of elastic dental ligatures and chains. *Polymers* 2022; 14(11):38 *co-first authors, **IF: 4.493***

A. B. Beckers, E. Wilms, Z. Mujagic, B. Kajtár, **K. Csekő**, Z. Z. R. M. Weerts, L. Vork, F. J. Troost, J. W. Kruijmel, J. M. Conchillo, Z. Helyes, A. A. M. Masclee, D. Keszthelyi, D. M. A. E. Jonkers. Age-related decrease in abdominal pain and associated structural- and Functional Mechanism: An exploratory study in healthy individuals and irritable bowel syndrome patients. *Front Pharmacol.* 2021; 12:806002. **IF: 5.422***

E. Becsekeházi, M. M. Korsós, E. Gál, L. Tizlavicz, Z. Hoyk, M. A. Deli, Z. M. Köhler, A. Keller-Pintér, A. Horváth, **K. Csekő**, Z. Helyes, P. Hegyi, V. Venglovecz. Inhibition of NHE-1 increases smoke-induced proliferative activity of Barrett's esophageal cell line. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(19):10581. **IF: 6.132***

V. Tékus, Á. I. Horváth, **K. Csekő**, K. Szabadfi, A. Kovács-Valasek, B. Dányádi, L. Deres, R. Halmosi, É. Sággy, Z. V. Varga, E. Adeghate, T. Kőszegi, P. Mátyus, R. Gábrriel, P. Ferdinandy, E. Pintér, Z. Helyes. Protective effects of the novel amine-oxidase inhibitor multi-target drug SZV 1287 on streptozotocin-induced beta cell damage and diabetic complications in rats. *Biomed Pharmacother.* 2021; 134:111105. **IF: 5.979***

E. Csikós*, **K. Csekő***, A. R. Ashraf, Á. Kemény, L. Kereskai, B. Kocsis, A. Böszörményi, Z. Helyes, G. Horváth. Effects of *Thymus vulgaris L.*, *Cinnamomum verum J,Presl* and *Cymbopogon nardus (L.)* Rendle Essential Oils in the Endotoxin-induced Acute Airway Inflammation Mouse Model. *Molecules* 2020; 25(15):3553. *co-first authors, **IF: 4.412**

Á. Horváth, B. Botz, T. Kiss, **K. Csekő**, I. Kiss, A. Felinger, T. Szabados, É. Kenyeres, P. Bencsik, A. Mócsai, P. Ferdinandy, Z. Helyes. Subantimicrobial Dose Doxycycline Worsens Chronic Arthritis-Induced Bone Microarchitectural Alterations in a Mouse Model: Role of Matrix Metalloproteinases? *Front Pharmacol.* 2019; 10:233 **IF: 4.26**

K. Rusznák*, **K. Csekő***, Z. Varga, D. Csabai, Á. Bóna, M. Mayer, Z. Kozma, Z. Helyes, B. Czéh. Long-term stress and concomitant marijuana smoke exposure affect physiology, behavior and adult hippocampal neurogenesis *Front Pharmacol.* 2018; 9:786 *co-first authors, **IF: 3.80**

B. Scheich, **K. Csekő**, É. Borbély, I. Ábrahám, V. Csernus, B. Gaszner, Z. Helyes. Higher susceptibility of male somatostatin 4 receptor gene-deleted mice to chronic stress-induced behavioural and neuroendocrine alterations. *Neuroscience* 2017; 346:320-336. **IF: 3.382**

Z. Helyes, Á. Kemény, **K. Csekő**, É. Szőke, K. Elekes, M. Mester, K. Sándor, A. Perkecz, L. Kereskai, L. Márk, Á. Bóna, A. Benkő, E. Pintér, J. Szolcsányi, C. Ledent, B. Sperlágh, F. T. Molnár. Marijuana smoke induces pulmonary hyperresponsiveness, inflammation and emphysema in a predictive mouse model not via CB1 receptor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017; 313(2):L267-L277. **IF: 4.17**

M. Payrits, É. Sággy, J. Szolcsányi, K. Pohóczky, **K. Csekő**, K. Bölcskei, K. Barabás, D. Ernst, I. Ábrahám, Z. Helyes, É. Szőke. Evidence for the role of estradiol on gating of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 channels. *Endocrinology* 2017; 158(10):3249-3258. **IF: 3.961**

I. L. Szabó, R. Mátics, P. Hegyi, A. Garami, A. Illés, P. Sarlós, J. Bajor, Á. Szűcs, D. Mosztbacher, K. Márta, K. Szemes, **K. Csekő**, B. Kővári, Z. Rumbus, Á. Vincze. PPIs Prevent Aspirin-Induced Gastrointestinal Bleeding better than H2RAs. A Systemic review and Meta-analysis. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2017; 26(4):395-402. **IF: 2.033**

D. Csabai, **K. Csekő**, L. Szaiff, Z. Varga, A. Miseta, Z. Helyes, B. Czéh. Low intensity, long term exposure to tobacco smoke inhibits hippocampal neurogenesis in adult mice. *Behav Brain Res.* 2016; 302: pp. 44-52. **IF:3.002**

E. Laczkó, P. Riba, Z. Giricz, A. Váradi, L. Cornic, M. Balogh, K. Király, **K. Csekő**, S. A. Mousa, S. Hosztafi, M. Schäfer, Z. Zádori, Z. Helyes, P. Ferdinandy, Z. Fürst, M. Al-Khrasani. New morphine analogues produce peripheral antinociception after systemic administration. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016; 359(1):171-81. **IF: 3.867**

I. L. Szabó, **K. Csekő**, J. Czimmer, G. Mózsik. Diagnosis of gastritis: review from early pathological evaluation to present day management. In: M. Gyula (editor) Current Topics in Gastritis 2012. Rijeka: *InTech Open Access Publisher*, 2013. pp. 3-18. ISBN: 978-953-51-0907-5

(* 5 éves impakt faktor)

Kumulatív impakt faktor (idézhető absztraktok nélkül): 83.253

Idézettség (MTMT): 188

Független idézetek (MTMT): 161

Idézettség (Google Scholar): 263

H-index: 9