

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

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

**DR. BÁTAI ISTVÁN ZOÁRD**

**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**

# TARTALOM JEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	3
BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	5
1. H <sub>2</sub> S, mint gázotranszmitter .....	5
2. TRPA1 csatorna szerkezete és funkciója .....	6
3. H <sub>2</sub> S, NO és a poliszulfid kémiai és biológiai interakciói.....	6
4. Neuronális és nem neuronális TRPA1 csatornák.....	10
5. TRPA1 csatorna aktivátorai.....	13
5.1. Exogén aktivátorok, növényi eredetű szerves, kéntartalmú agonisták .....	13
5.2. Exogén aktivátorok, légszennyeződés illetve cigaretta füst eredetű kémiai irritánsok..	14
5.3. Endogén agonisták .....	14
6. A kénvegyületek TRPA1 mediálta hatásai.....	15
CÉLKITŰZÉSK.....	19
KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK.....	20
1. Kísérleti állatok.....	20
2. Etikai engedélyek.....	21
3. Kísérleti modellek.....	21
3.1. Karragenin indukálta akut lábgyulladás .....	21
3.2. K/BxN szérum transzfer artritisz modell.....	21
4. Vizsgálati módszerek.....	22
4.1. Az inorganikus poliszulfid és a dimetil-triszulfid oldatok elkészítése.....	22
4.2. A poliszulfid kvantitatív meghatározása hideg cianolízissel.....	23
4.3. Ca <sup>2+</sup> beáramlás mérése áramlási citométerrel TRPA1 expresszázó CHO sejteken.....	24
4.4. Szomatosztatin felszabadulás mérése radioimmunoassay (RIA) módszerrel izolált egér lábbőr ideggyögződésekből. ....	25
4.5. Gyulladásos citokinek detektálása a K/BxN modellben.....	26
4.6. Mechanikai fájdalomküszöb meghatározása .....	27
4.7. Hátsó végtagok térfogatának mérése.....	27
4.8. Függeszkedési teszt.....	29
4.9. Az ízületi gyulladás pontozása.....	29
4.10. <i>In vivo</i> lumineszcens neutrofil mieloperoxidáz aktivitás képkalkotó mérése .....	29
4.11. A plazmaextrvazáció <i>in vivo</i> fluoreszcens képkalkotó mérése.....	30
4.12. Szövetteni vizsgálat .....	30
4.13. Felhasznált anyagok .....	31
4.14. Statisztika .....	31

<b>EREDMÉNYEK</b> .....	32
<b>1. Az GYY4137 lassú felszabadulású hidrogén-szulfid donor hatásai a K/BxN szérum transzfer artritisz modelljében TRPA1 és sst4 KO egerekben</b> .....	32
1.1. Eredmények .....	32
1.2. Új eredmények összefoglalása .....	46
<b>2. Az inorganikus poliszulfid és a DMTS hatásai a karragenin indukálta akut gyulladás modelljében TRPA1 és sst4 KO egerekben</b> .....	48
2.1. Eredmények .....	48
2.2. Új eredmények összefoglalása .....	58
<b>MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK</b> .....	60
<b>IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	68
<b>PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK</b> .....	83
1. Az értekezés alapját képező eredeti közlemények:.....	83
2. Egyéb teljes közlemény:.....	83
3. Konferencia szóbeli előadások: .....	84
4. Konferencia poszter prezentációk: .....	85
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	87

# RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5-HT: 5-hidroxi-triptamin

15d-PGJ2: 15d-PGJ2 [15-deoxy-delta (12,14)-Prostaglanin J(2)]

AA: arachidonic acid/arachidonsav

AITC: allil-izotiocianát

ATP: adenzin-trifoszfát

B2: bradikinin 2 receptor

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

CGRP: calcitonin gene-related peptide/kalcitonin gén-rokon peptid

COX: ciklooxigenáz

DMTS: dimetil-triszulfid

DRG: dorsal root ganglion/hátsó gyöki ganglion

DTNB: 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)/ 5,5' -ditio-bis(2-nitro-benzoát)

ECS: extracellular solution/ extracelluláris oldat

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

Erk1/2: extracellular signal-regulated kinase/extracelluláris szignál-regulált kináz

fura-4 AM: fura-4 acetoxi-metilészter

HEPES: 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav

HNO: nitroxil

IASP: International Association for the Study of Pain/Nemzetközi Fájdalom Társaság

IC: intracelluláris

ICAM-1: intracellular adhesion molecule-1/intracelluláris adhéziós molekula-1

IL: interleukin

i.p.: intraperitoneális

i.pl.: intraplantáris

i.v.: intravénás

KC: keratinocyte chemoattractant/keratinocita kemoattraktáns

KIR: központi idegrendszer

KO: knock out/ gén kiütött

MIP-2: macrophage inflammatory protein-2/makrofág gyulladásoos protein-2

MPO: mieloperoxidáz

NKA: neurokinin A

NO: nitrogén-monoxid

PACAP: pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide/hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid

PBS: phosphate buffered saline/foszfát pufferes sóoldat

PKC: protein-kináz C

PLC: foszfolipáz C

POLY: polysulfide/poliszulfid

RA: reumatoid artritisz

RIA: radioimmunoassay/ radioimmunoesszé

ROI: region of interest

ROS: reactive oxygen species/reaktív oxigén gyökök

S.E.M.: standard error of mean/átlag standard hibája

SSNO: nitrosopersulfide/nitrozopersulfid

SP: substance P/P-anyag

SOM-LI: szomatosztatinszerű immunreaktív vegyület

SST: somatostatin/szomatosztatin

sst4: somatostatin receptor 4/szomatosztatin receptor 4

Th: T-helper sejt

TNF- $\alpha$ : tumor nekrozis faktor- $\alpha$

TRP: tranziens receptor potenciál

TRPA1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1

TRPV1: tranziens receptor potenciál vanilloid 1

TXA<sub>2</sub>: tromboxán A<sub>2</sub>

VIP: vazoaktív intesztinális peptid

WT: wild type/vad típusú

# BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 1. H<sub>2</sub>S, mint gázotranszmitter

Az 1990-es években az, NO és CO mellett felfedeztek egy harmadik gázotranszmittert, a H<sub>2</sub>S-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 H<sub>2</sub>S-sel kiváltott tüdőszérülés modelljében (Prior et al., 1990). Érdekes módon a H<sub>2</sub>S és a kapszaicin érzékeny idegek kapcsolatának újabb részleteire urológiai vonatkozásban derült fény. Patachinni et al megfigyeléseit, miszerint a H<sub>2</sub>S aktiválja a hólyag szenzoros idegvégződéseinek TRPV1 vagy TRP-szerű receptorait Streng kutatásai követték, amely során leírták, hogy a H<sub>2</sub>S valójában TRPA1 receptorokon keresztül váltja ki a detruzor izomzat kontrakcióját (Patachini et al., 2004; Streng et al., 2008). Igaz, hogy *in vitro* TRPA1 receptort expresszáló CHO sejteken már folytattak vizsgálatokat, ugyanakkor Miyamoto kutató csoportja vizsgálta először natívan TRPA1 receptort expresszáló DRG neuronokon a H<sub>2</sub>S hatásait, amelynek során Ca<sup>2+</sup> jeleket regisztrálva megteremtették a kapcsolatot a H<sub>2</sub>S és a nociceptív pályák között. Kísérleteik során a TRPA1 szerepét Ca<sup>2+</sup> mentes extracelluláris oldat és a TRPA1 specifikus antagonistá HC030031 alkalmazásával bizonyították (Miyamoto et al., 2011). A H<sub>2</sub>S hatására keletkező Ca<sup>2+</sup> jeleket először asztrocitákon figyelték meg, viszont vizsgálataik során nem vetették fel, hogy a Ca<sup>2+</sup> beáramlásáért a TRPA1 receptor lehet felelős (Nagai et al., 2004). A H<sub>2</sub>S vaszkuláris hatásainak közvetítésében a K<sub>ATP</sub> csatornán kívül fontos szerepe van a TRPA1 csatornáknak is (Bhatia, 2005). TRPA1 KO egerekben, illetve HC030031 hatására csökken a vazodilatáció mértéke és kisebb mennyiségben szabadul fel a vazodilatátor hatással bíró calcitonin génrokon peptid (calcitonin gene-related peptide, CGRP) (Pozsgai et al., 2012; Eberhardt et al., 2014; Hajna et al., 2016).

## **2. H<sub>2</sub>S, NO és a poliszulfid kémiai és biológiai interakciói**

Murad és Ignarro úttörő munkásságának köszönhetően született a döbbenetet kiváltó felismerés, miszerint az NO fizikai és kémiai tulajdonságai ellenére endogéne szintetizálódik és jelátviteli funkciót tölt be biológiai rendszerekben (Arnold et al., 1977; Rapoport et al., 1983; Ignarro et al., 1987). Ezt követően kirobbanó fejlődést vett a gázotranszmitterek kutatása. Kimura kutatócsoportja fedezte fel, hogy az NO és H<sub>2</sub>S interakcióban állnak egymással, amikor izolált mellkasi aorta szegmenseken figyelték meg egymásra gyakorolt kölcsönösen szinergista vazodilatatív hatásukat (Hosoki et al., 1997). A felfedezés óta komoly erőfeszítések zajlanak az NO és H<sub>2</sub>S szignalizáció kapcsolódási pontjainak feltérképezésére (Takahashi et al., 2012). Azonban a kérdés tanulmányozását bonyolítja a tény, hogy a két gázotranszmitter farmakodinámiai kölcsönhatásai mellett kémiai reakcióba is képes lépni egymással (Cortese-Krott et al., 2015). A H<sub>2</sub>S és NO között létrejövő kémiai reakciók termékei szövevényes hálózatot alkotnak, amely feltérképezése komoly nehézségeket okoz, amelynek következményeként számos egymásnak ellentmondó publikáció született (Filipovic et al., 2013; Cortese-Krott et al., 2015). A reakciók gyors kinetikája és reverzibilitása miatt sokszor nem egyértelmű, hogy a keletkező anyagok csak intermedier 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 (H<sub>2</sub>S<sub>N</sub>), nitrátok, szulfitok, szulfátok, dinitrozo-szulfid (SULFI/NO) és a nitroxil (HNO) (Eberhardt et al., 2014; Cortese-Krott et al., 2015; Kimura, 2017; Miyamoto et al., 2017). Cortese kutatócsoportja a SSNO potenciális biológiai jelentőségét hangsúlyozza, ugyanis az SSNO ellenáll a poliszulfidokat bontó rendszereknek és a hideg cianolízisnek is, továbbá bomlása során NO és poliszulfid keletkezik. Filipovic és Eberhardt kutatócsoportja a HNO szerepét hangsúlyozza, és kísérleteikben bizonyították a vaszkuláris tónus szabályozásában betöltött szerepét (Filipovic et al., 2013; Eberhardt et al., 2014). Kimura et al. a megfigyelt hatások hátterében a H<sub>2</sub>S és NO reakciójából keletkező poliszulfidokat és nem pedig a HNO-t mutattak ki a biológiailag aktív vegyületekként. (Kimura, 2017; Miyamoto et al., 2017). Továbbá Kimura munkacsoportja leírta, hogy az endogén poliszulfid szintézisben közvetlenül részt vesz a 3-merkaptopiruvát-szulfurtraszferáz útvonal (Kimura et al., 2015; Kimura, 2017). A NO és H<sub>2</sub>S és reakciójából származó intermedier termékek számos célponttal rendelkeznek az ideg-, immun- és kardiovaszkuláris rendszerben, amelyről bár számos tanulmány született, még messze állunk a teljes feltérképezésétől.

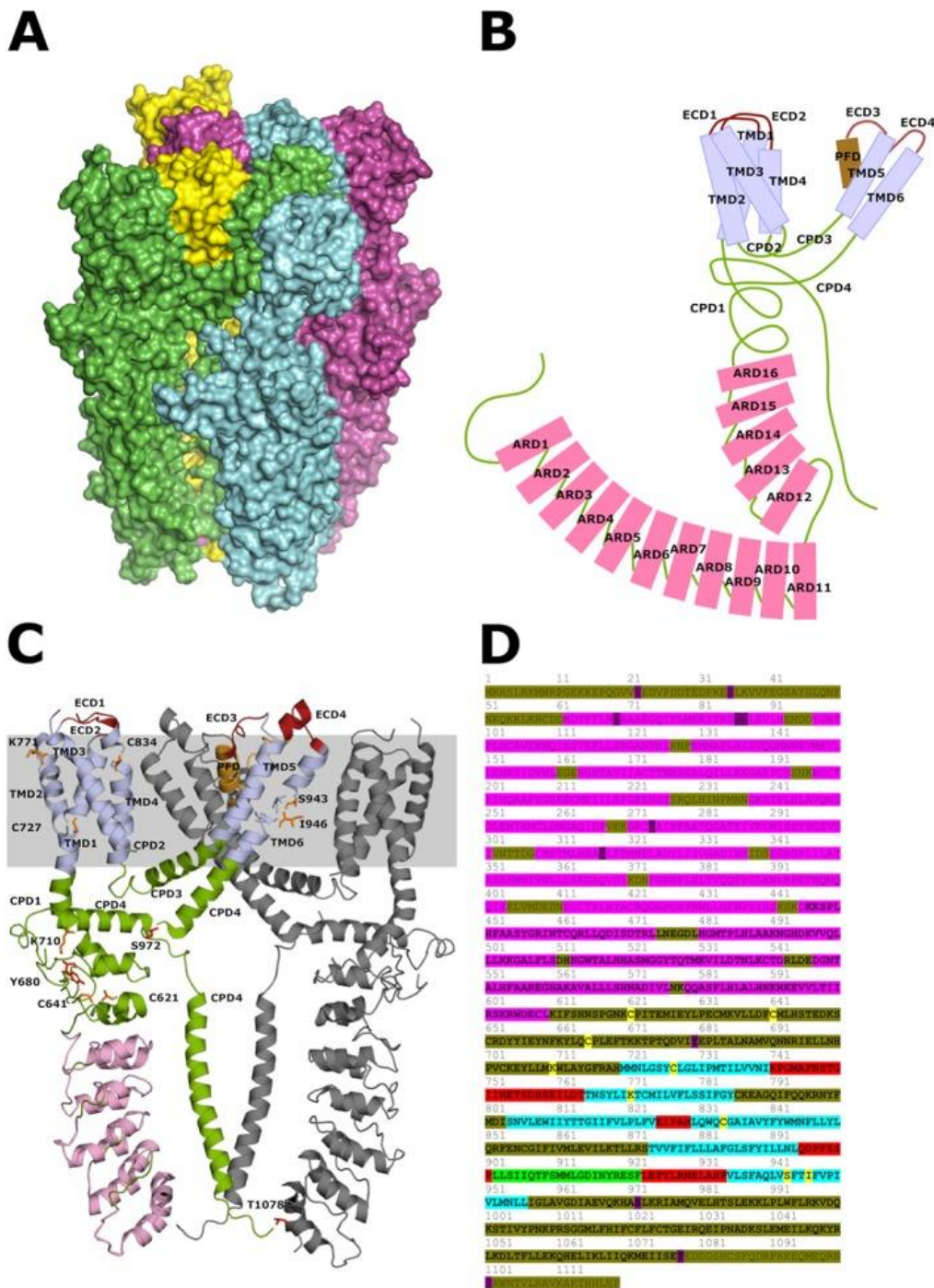
### **3. TRPA1 csatorna szerkezete és funkciója**

A TRPA1 csatorna története alig három évtizedre tekint vissza. Schenker és Trueb humán fibroblasztok és transzformált tumor sejtek mRNS profiljainak összehasonlítása során fedeztek fel, több addig ismeretlen mRNS-t, amelyek közt szerepelt a TRPA1 is. A TRPA1 mRNS expressziója csökkent volt az általuk vizsgált tumor sejtekben egy liposzarkóma sejtvonal kivételével. A szekvencia homológia alapján már ekkor kiderült a nagyfokú hasonlóság az ankyrin B szekvenciájával (Schenker and Trueb, 1998). Kutatásaik folytatása során további karakterizálásnak vetették alá az általuk felfedezett Ankyrin B szekvenciát tartalmazó mRNS-t. A vizsgálatok során egyértelművé vált, hogy a mRNS szekvenciát kódoló ANKTM1 gén a 8q13 lokuszon helyezkedik el, és mintegy 1119 aminosavból felépülő fehérjét kódol, amelynek N terminális végén helyezkedik el a 18 db ankyrin homológ ismétlődés, továbbá nagyfokú hasonlóság áll fenn más TRP csatornákkal (Jaquemar et al., 1999). Ezt követően a korábban csak ANKTM1-ként (az ankyrin ismétlődésekre utaló név) ismert gén által kódolt fehérje már elfoglalhatta helyét a TRP csatornák között. Saját alcsoportot is kapott, amely a mai napig csak egyetlen taggal (TRPA1) rendelkezik.

Az eddigi legrészletesebb 4 Å felbontású cryoelektronmikroszkopos felvételeket a TRPA1 csatornáról Paulsen kutatócsoportja publikálta 2015-ben (Paulsen et al., 2015). A TRPA1 csatorna a többi TRP csatornához hasonlóan 4 alegységből épül fel. Az egyes alegységeket 6 transzmembrán szegmens (S1-S6), extra- és intracelluláris linkerek és az intracellulárisan elhelyezkedő ankyrin ismétlődések alkotják. Az extracelluláris felszíntől intracelluláris irányba haladva a következő struktúráknak tulajdonítanak fontos szerepet a csatorna pórusának szabályozásában (Logashina et al., 2019). A S5 és S6 transzmembrán szegmensek összekötő negatíván töltött szakasz felelős a kation szelektivitásért. A pórus külső felszíne topológiai hasonlóságot mutat a feszültség függő K csatornákkal (Long et al., 2005). A pórus kapuzását egy felső és egy alsó régió valósítja meg. A felső régióban az Asp915 teremt egy 7 Å szűkületet, amely feltételezhetően kevésbé fontos a csatorna kapuzásában az alsó Ile957 és Val961 alkotta 6 Å szűkülethez képest (Voets et al., 2004). A TRPA1 csatorna szabályozásában fontos kiemelni az extracellulárisan elhelyezkedő S1 és S2 szegmenseket összekötő szakaszt, mivel fontos szerepe lehet a fajok közt fennálló eltérő szelektivitásért (Marsakova et al., 2017). Intracellulárisan a csatorna C-terminális vége felé az S6 szegmens után a TRP-szerű domént követően helyezkedik el egy kalmodulin kötő domén (Paulsen et al.,



2015). Brewster és Gaudet a C-terminális közelében leírt egy myoinozitol 1,2,3,4,5,6 hexakisfoszfát (IP6) ligand kötő domént, amely fontos szerepet tölthet be a csatorna szabályozásában. A fehérje intracellulárisan elhelyezkedő N terminális vége ad otthont a speciestől függő változó számú ankyrin ismétlődésnek, amely biztosítja az interakciót más fehérjékkel. Az S1 szegmens és az első ankyrin domén között elterülő szakaszban található Cys622, Cys642 és Lys711 aminosavak oldalláncai kitüntetett szerepet játszanak a TRPA1 elektrofil ligandok általi aktivációjában (Viana, 2016). Továbbá feltételezik, hogy az intracelluláris diszulfid hidak ugyancsak fontos szerepet játszhatnak a TRPA1 csatorna aktivációjában (Macpherson et al., 2007; Hatakeyama et al., 2015, **1. ábra**)



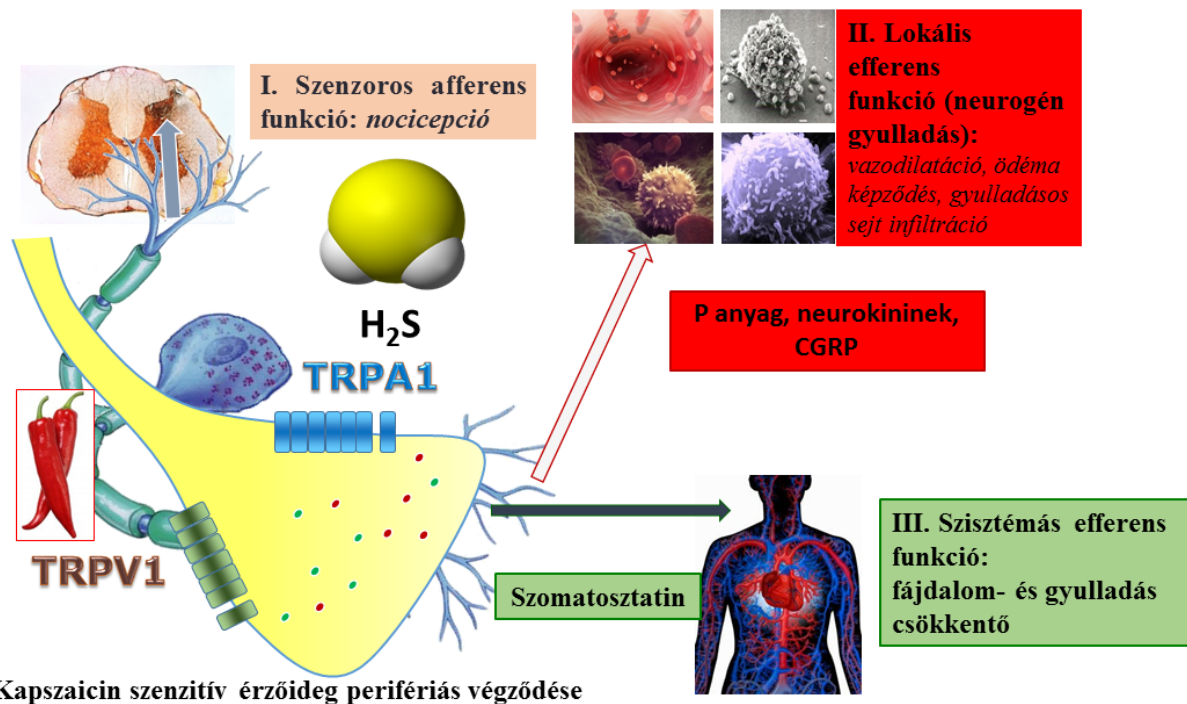
**1. ábra: A TRPA1 csatorna felépítése.** A TRPA1 receptor 4 alegységből felépülő három dimenziós rekonstrukciója (A). A TRPA1 csatorna egy alegységének vázlatos szerkezete (B). A TRPA1 csatorna keresztmetszeti képének rekonstrukciója (C). A TRPA1 csatorna szekvenciája (D). Forrás: Pozsgai G, Bártai IZ, Pintér E. Effects of sulfide and polysulfides transmitted by direct or signal transduction-mediated activation of TRPA1 channels. *Br J Pharmacol.* 2019;176(4):628–645.

A TRPA1 egy nem szelektív kation csatorna, amely meglehetősen nagy permeabilitással rendelkezik a  $\text{Ca}^{2+}$  ionokkal szemben. A pontos fiziológiai és pathofiziológiai folyamatokban betöltött szerepe számos kutatás tárgyát képezi. Struktúrájából adódóan számos stimulus aktiválhatja: alacsony hőmérséklet, mechanikai hatás, valamint számtalan elektrofil- és nem elektrofil kémiai ligand is. Eddig a legtöbb vitát a hőmérséklet érzékelésében betöltött funkciója keltette, számos ellentétes tanulmány született e tekintetben. Most már tudjuk, hogy a hüllőkben és kételtűekben a magasabb hőmérsékletek aktiválják, sőt a kígyók infravörös „látásáért” is a TRPA1 receptor felelős (Cordero-Morales et al., 2011; Laursen et al., 2014; Kang, 2016). Emlősök esetében csak rágcsőknél lehetett hideg hatására aktivációt kiváltani, főemlősökben ez az inger gátló hatással volt a TRPA1-re. Ezzel reciprokhatást figyeltek meg a mentolra adott válasz tekintetében. Mindkét jelenség hátterében egyetlen aminosav eltérés áll (Chen et al., 2013). Ugyanakkor a hőmérséklet csökkentése fokozza az agonistákra adott választ és fordítva, agonisták jelenlétében csökken az aktivációs küszöbhőmérséklet (del Camino et al., 2010). A kutatások eredményei alapján valószínűleg a TRPA1 nem közvetlenül a hidegérzékelésért felelős, ellenben fontos szerepet tölthet be a különböző betegségekhez társuló hideg allodínia kialakulásában. A TRPA1 mechanoszenzor szerepe a hőmérséklet érzékeléshez hasonlóan egy ellentmondásos területe a kutatásoknak. A TRPA1 csatorna intracellulárisan elhelyezkedő ankyrin ismétlődései tekercs/rugószerű struktúrát alkotnak, amely sejtetni enged bizonyos érzékenységet a mechanikai stimulusok iránt (Gaudet, 2008; Paulsen et al., 2015). A TRPA1 receptor megtalálható a belsőfül számos sejt típusán, azonban TRPA1 KO egerek hallása nem tér el a vad típusú egerektől (Kwan et al., 2006; García-Añoveros and Duggan, 2007; Wu et al., 2016). Több tanulmány született, amely eltérést talált egészséges TRPA1 WT és KO egerek mechanoszenzitivitását illetően, azonban saját törzseinknél ezt nem figyeltük meg (Kerstein et al., 2009; Kwan et al., 2009; Zappia et al., 2017). Ellenben TRPA1 KO egerek, illetve a specifikus antagonistáknak köszönhetően, – a hidegérzékeléshez hasonlóan – a TRPA1 bizonyosan szerepet játszhat a mechanikai hiperalgészia közvetítésében (McGaraughty et al., 2010; Lennertz et al., 2012; Horváth et al., 2016).

#### **4. Neuronális és nem neuronális TRPA1 csatornák.**

A szomatikus és viscerális primér szenzoros neuronok TRPA1 expressziója jól ismert. A peptiderg, kapszaicin szenzitív neuronok egy szubpopulációja a TRPV1 mellett TRPA1-t is

koexpresszál (Story et al., 2003). A TRPV1 és a TRPA1 egyaránt nem szelektív kation csatornák, amelyeknek aktivációja az idegvégződésekből  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  beáramláshoz vezet. A  $\text{Na}^+$  influx hatására akcióspotenciál jön létre, a megnövekedett intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  ion koncentráció proinflammatorikus mediátorok (CGRP, substance P neurokinin A) felszabadulásához vezet (Kádková et al., 2017). A felszabaduló proinflammatorikus mediátorok neurogén gyulladást váltanak ki. A neurogén gyulladás kísérőjelenségei a vazodilatáció, a megnövekedett vaszkuláris permeabilitás és a gyulladós sejtek toborzása. Ezen változások felelnek meg a kapszaicin szenzitív idegvégzések lokális efferens funkciójának (Pintér et al., 2006; Bodkin and Brain, 2011; Szolcsányi, 2014; López-Requena et al., 2017). A TRPA1 csatorna további mechanizmusok révén fontos szerepet tölt be számos gyulladással és krónikus fájdalommal járó kórképben. A sérült, illetve gyulladt szövetből felszabaduló proinflammatorikus és algogén mediátorok (prostaglandinok, szerotonin, bradykinin, proteázok) képesek szabályozni a TRPA1 csatorna működését GPCR és a foszfolipáz C jelátviteli útvonalakon keresztül. Továbbá lipidperoxidációs termékek (4-oxo-nonenal, 4-hidroxi-2-nonenal, 4 hidroxi-hexanal) és a 15-deoxi-12,14-prostaglandin  $\text{J}_2$  is stimulálja a PKA, PKC és foszfolipáz c útvonalakat, amelyek hatására a TRPA1 foszforiláción esik át (Chen and Hackos, 2015; Viana, 2016; Kádková et al., 2017). A PKA- és a foszfolipáz dependens szignalizációs útvonalaknak a TRPA1 csatornára gyakorolt hatásait két tanulmány is részletesen tárgyalja (Zygmunt and Högestätt, 2014; Viana, 2016). A TRPA1 aktiváció hatására a proinflammatorikus mediátorok mellett antiinflammatorikus peptid is felszabadul a kapszaicin szenzitív idegvégzésekéből és szisztémás efferens hatással rendelkezhetnek. Az egyik ilyen peptid a szomatosztatin (Pozsgai et al., 2017a). 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 közvetít (Helyes et al., 2000; Pintér et al., 2002, 2006). Ezen megfigyelésekkel összhangban a DMTS TRPA1 és sst4 receptor jelenlétében képes volt csökkenteni a hőérülést követő gyulladást és hiperalgészia mértékét egerekben (Pozsgai et al., 2017a, **2. ábra**).



**2. ábra: A kapszaicin szenzitív nociceptív érzőideg hármas funkciója.** (Forrás: Pintér Erika hozzájárulásával, módosítva.)

A TRPA1-et számos nem neuronális sejtípus is expresszálja. A humán, egér és patkány tüdőben leírták jelenlétét alveoláris epithél sejteken, fibroblasztokon és simaizom sejteken is. A bőrben sikerült kimutatni melanocitákon, keratinocitákon és fibroblasztokon is, illetve vizsgálták szerepét a bőr gyulladásos betegségeiben. Továbbá igazolt az expressziója az urothélium felszínén is, amely által szerepe lehet a húgyhólyag gyulladásos és kóros vizelet ürítéssel járó kórkepeiben. (Khalil et al., 2018). A hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjein található TRPA1 receptor aktivációja inzulinszekréciót vált ki (Cao et al., 2012). Asztrocitákon a TRPA1 fontos szerepet tölthet be a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis kialakításában, amelyen keresztül képes gátolni a GABA transzporter GAT3-t, ezáltal fokozódik az inhibíciós tónus patkányok hippocampusában (Shigetomi et al., 2012). A poliszulfid a hidrogén-szulfidnál kisebb koncentrációban képes volt aktiválni az asztrocitákon expresszálódó TRPA1-t (Kimura et al., 2013). Az immunsejtek TRPA1 expresszióját illetően lényegesen kevesebb publikáció látott napvilágot. ApoE<sup>-/-</sup> egerekből származó atherosclerotikus plakkokban sikeresen kimutatták a TRPA1 receptor jelenlétét a habos citoplazmájú makrofág sejteken. TRPA1 gén kiütése az ApoE<sup>-/-</sup> egerekben, illetve HC030031 hatására súlyosbodtak az atherosclerotikus elváltozások, romlott az egerek lipid profilja és fokozódott a szisztémás gyulladás mértéke (Zhao et al.,

2016). Humán mintákon TRPA1 pozitív makrofágokat mutattak ki az orális submucosa területén (Kun et al., 2017). Jurkat T sejteken és humán szplenocitákon is sikeresen kimutatták a TRPA1 receptor jelenlétét, amelyet Northern blottal, Western blottal és immunhisztokémiával is igazoltak. Továbbá rágcsálókból származó- és humán T sejteken is verifikálták a receptor jelenlétét az mRNS és a fehérje szintjén is. (Bertin et al., 2017). A TRPA1 proinflammatorikus hatásait dokumentáló publikációk mellett egyre nő azoknak a tanulmányoknak a száma, amelyek a gyulladásgátló szerepére hívják fel a figyelmünket. Számos kolitisz modell esetén erőteljesebb gyulladás figyelhető meg a TRPA1 KO egerekben. (Kun et al., 2014; Bertin et al., 2017). Az imiquimod által keltett pszoriáziform bőrgyulladás modelljében a TRPA1 gén hiánya, illetve az AP967079 TRPA1 specifikus antagonistá kezelés súlyosbította a patológiás elváltozások mértékét. Kemény et al. kísérleteik során immunhisztológiával igazolták a CD4+ T helper sejteken a TRPA1 jelenlétét a bőrben (Kemény et al., 2018). A nociceptív primér afferenseken expresszáldó TRPA1 receptorok szerepét és funkcióját részletesen vizsgálták, azonban amikor új TRPA1 agonisták, illetve antagonisták elsődlegesen fájdalom és gyulladásgátló hatásait vizsgáljuk, fontos szem előtt tartanunk az esetleges nem neuronális TRPA1 expresszióból adódó mellékhatásokat is.

## **5. TRPA1 csatorna aktivátorai**

Más kemoszenzor receptorokkal ellentétben a TRPA1 receptort számos egymástól nagyban különböző struktúrájú vegyületet képes aktiválni.

### **5.1. Exogén aktivátorok, növényi eredetű szerves, kéntartalmú agonisták**

Az *Allium sativum*, közismertebb nevén a fokhagyma, számos aktív, tioszulfinát vegyület forrása. Fő komponense az allicin, amely az alliinből keletkezik a fokhagyma összetörése során a vakuoláris alliináz enzim hatására. Az allicin egy instabil vegyület és belőle különböző diallil-szulfidok (DAS), diallil-diszulfidok (DADS) és diallil-triszulfidok (DATS) keletkeznek. Az alliin egy szagtalan vegyület, ellenben a belőle keletkező vegyületek felelősek a fokhagyma jellegzetes és átütő illat és íz világáért. A tioszulfinátok strukturálisan nagyban hasonlítanak az allil-izotiocianáthoz (AITC). Az AITC az aktív komponense többek között a wasabinak, a tormának és a mustárolajnak is. Ezen vegyületek a TRPA1 csatorna

aktivációja során a receptor cisztein oldalláncaival diszulfid hidakat hoznak létre (Baraldi et al., 2010). Az AITC-on kívül aktivációt váltanak ki egyéb erőteljesen reaktív izotiocianát vegyületek is (propargil-izotiocianát, benzil-izotiocianát, fenetil-izotiocianát) ellenben az experimentális felhasználásukat erősen korlátozza a toxicitásuk (Baraldi et al., 2010; Viana, 2016).

## **5.2. Exogén aktivátorok, légszennyeződés illetve cigaretta füst eredetű kémiai irritánsok**

A TRPA1-t majdnem az összes ipari elektrofil oxidálószer aktiválja, beleértve az aldehideket (formaldehid, acetaldehid) alkenálokat (akrolein és krotonaldehid), a hipokloritokat, toluéndiizocianátot is. Feltételezhetően a TRPA1 aktivációt Michael adduktot képezve cisztein oldalancok tiol csoportjához kovalensen kapcsolódva- váltják ki (Bessac and Jordt, 2008).

## **5.3. Endogén agonisták**

A szervezetben a TRPA1 csatorna képes érzékelni a kóros folyamatok és a celluláris stressz során keletkező káros mediátorokat, beleértve a reaktív oxigén szabadgyököket is. A sérült, illetve gyulladt szövetekből e mediátorok a TRPA1 receptoron keresztül fájdalomérzetet váltanak ki. A mediátorok egy csoportját alkotják a lipidperoxidációs termékek, mint a 4-oxo-2-nonenal, 4-hidroxi-2-nonenal, és a 4-hidroxi-hexenal, és az oxidált lipidek csoportjába tartozó cikloptenon-prostaglandinok (PGA1, PGA2, 8-isoPGA2, 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> és  $\Delta^{12}$ -PGJ<sub>2</sub>), amelyek közvetlen aktiválják a TRPA1 csatornát (Chen and Hackos, 2015). Az inflammoszóma alkotóelemei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-n keresztül közvetetten képesek aktiválni a csatornát (Trevisan et al., 2014).

A TRPA1 receptor széleskörű neuronális és nem neuronális expressziós mintázatának és bőséges aktivációs profiljának köszönhetően alkalmas a szervezetben lezajló sérülések és gyulladás detektálására. Az inflammáció során keletkező reaktív elektrofil mediátorok károsak a sejtre nézve, mivel Michael adduktot képezve számos struktúrát képesek károsítani. Azonban ugyanezzel a mechanizmussal képesek aktiválni a TRPA1 receptort is. Gyulladás során az NO és foszfolipidek kölcsönhatásából keletkező nitrált zsírsavak érzékelésére is alkalmas a TRPA1 receptor. Továbbá felmerült, hogy TRPA1 felelős a bradykinin által kiváltott fájdalom érzetért. A bradykinin B2 receptor aktivációja a PLA2 és PLC útvonalon

keresztül DAG és arachidonsav produkciójához vezet, amelyek ugyancsak a TRPA1 aktivációhoz vezethetnek (Brewster and Gaudet, 2015).

## **6. A kénvegyületek TRPA1 mediálta hatásai**

A TRPA1 expressziós mintázatának megfelelően számos tanulmány született a hidrogén-szulfid hatásairól neuronális sejteken vizsgálva (Kimura, 2013). *In vitro*, TRPA1-t expresszáló CHO, HEK293, *Xenopus* oociták és RINB14 sejtek felhasználásával végeztek kísérleteket a hidrogén-szulfid vegyületekkel. Továbbá kitűnő vizsgálati rendszereknek bizonyultak a TRPA1 receptort natívan is expresszáló TRG és DRG neuronok, illetve a vagus szenzoros afferensei. Kezdetben a vizsgálatok során NaHS és Na<sub>2</sub>S oldatok szolgálták hidrogén-szulfid donorként. A TRPA1 aktiváció kimutatására kalcium szenzitív fluoreszcens festékek, elektrofiziológiai mérések, patch-clamp vizsgálatok, illetve mediátorok (szerotonin) felszabadulása szolgálták. A hidrogén-szulfid TRPA1-hez köthető hatásainak verifikálása leggyakrabban specifikus antagonisták (AP18, HC030031) és TRPA1 KO egerek felhasználásával történt. (Miyamoto et al., 2011; Ujike et al., 2015; Hajna et al., 2016). Bizonyos tanulmányok alapján a savas pH fokozta a hidrogén-szulfid hatásait (Andersson et al., 2012; Ogawa et al., 2012; Takahashi and Ohta, 2013). Beazonosításra kerültek a TRPA1 receptor aktivációjához szükséges cisztein aminosavak is (Ogawa et al., 2012). Napvilágot látott egy publikáció, amely szerint a NaHS képes aktiválni a patkány TRG neuronokon található TRPV1 receptorokat is, azonban összességében más forrásokat is egybevetve kevés adat áll rendelkezésre, amely igazolná ezen állítást (Trevisani et al., 2005; Ang et al., 2010; Medeiros et al., 2012; Lu et al., 2014; Koroleva et al., 2017; Yu et al., 2017). Az izolált patkány vagus idegen nem váltott ki aktivációt a NaHS, azonban fokozta a kapszaicinre adott választ. *In vivo* a légzésre gyakorolt hatását viszont teljes egészében gátolhatók voltak HC030031 jelenlétében. *Ex vivo* patkány trachea preparátumon végzett kísérleteken az NaHS fokozta a CGRP felszabadulást, amely blokkolható volt TRPA1 antagonistá hozzáadásával (Pozsgai et al., 2012).

A hidrogén-szulfid TRPA1 receptoron keresztül hatva simaizomrelaxációt váltott ki patkány mesenterialis ereken, malac bronchiolusokon, az uréter intravezikális szakaszán, illetve humán uréter és prosztatata preparátumokon. A hidrogén-szulfid mesenterialis erekre gyakorolt hatását a konvencionális antagonisták és a peptiderg neuronok defunkcionálásán túl gátolni



lehetett CGRP receptor antagonistával és egy  $\text{Cl}^-$  ion csatorna blokkolóval is (White et al., 2013). Prekontrakciót követően a GYY4137 lassú felszabadulású hidrogén-szulfid donor effektíven relaxálta a kipreparált malac bronchiolus szegmenseket. A relaxáció mértéke csökkent az extracelluláris  $\text{K}^+$  koncentráció növelésével, illetve a  $\text{Ca}^{2+}$  függő  $\text{K}^+$  csatorna gátlásával. Ugyanebben a tanulmányban kimutatták, hogy az endogénean termelődő hidrogén-szulfid és a TRPA1 is szerepet játszik az elektromos stimulációval keltett simaizmom relaxációban (Fernandes et al., 2016). A GYY4137 relaxáló hatása szintén megfigyelhető volt a  $\text{TXA}_2$ -vel prekontrahált intravezikális uréter *ex vivo* vizsgálata során. A TRPA1, a PACAP és CGRP receptor antagonisták effektíven blokkolták a hidrogén-szulfid indukálta relaxációt. Érdekes, hogy a vizsgált rendszerben a TRPV1 blokkolása is hatásosnak bizonyult a relaxáció gátlásában (Fernandes et al., 2014). Humán uréter és prosztata preparátumokon végzett kísérletek tapasztalatai alapján az NaHS gátolta az elektromos stimulációval kiváltott relaxáció mértékét (Weinhold et al., 2017). Az *in vivo* végzett kísérletek elsősorban a hidrogén-szulfid vaszkuláris, szenzoros nociceptív és urológiai vonatkozásait vizsgálták. A NaHS vazodilatatív hatásait egérfülön tanulmányozták. A topikálisan alkalmazott NaHS vazodilatációt hozott létre, ami fokozta a fülek vérátáramlását. A peptiderg neuronok defunkcionalizálása resiniferatoxinnal hatásosan blokkolta a vérátáramlás fokozódását. A TRPA1 antagonistá HC030031 jelenlétében, illetve a TRPA1 gén hiányában nem jött létre vazodilatáció. A peptiderg neuronokból felszabaduló CGRP, illetve SP specifikus antagonistákkal kezelve az ereket ugyancsak hatásosan blokkolni lehetett a hidrogén-szulfid hatását. Végül a kísérletek során az ATP függő  $\text{K}^+$  csatorna blokkolása is gátolta a jelenséget (Pozsgai et al., 2012; Hajna et al., 2016). Az intraplantárisan beadott NaHS TRPA1 receptoron hatva mechanikai hiperalgéziát váltott ki (Okubo et al., 2012). Számos tanulmány felveti a T típusú feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák szerepét a hidrogén-szulfid nociceptív hatásainak közvetítésében hangsúlyozva  $\text{CaV}3.2$  fontosságát. Az egér talpába fecskendezett LPS-t követő hiperalgézia mértéke csökkenthető volt TRPA1 antagonistával és az endogén hidrogén-szulfid szintézis gátlásával. Továbbá megfigyelték, hogy az alacsony pH fokozza az NaHS által kiváltott nocifenzív viselkedési mintázatot (Andersson et al., 2012; Ogawa et al., 2012; Okubo et al., 2012). Az NaHS fokozta a viscerális nocicepciót, a cerulein indukálta akut pankreatitisz egérmódeljében, amely hatás gátolható volt TRPA1 és  $\text{Cav}3.2$  antagonisták beadásával (Terada et al., 2015). Ugyancsak hasonló megfigyeléseket végeztek a vastagbélbe intraluminálisan bejutatott NaHS oldattal (Tsubota-Matsunami et al., 2012). Anderson et al. azonban TRPA1 KO egerekben is algogénnek találták az intrakolonális NaHS-t (Andersson et al., 2012). Patkányokon az intravezikálisan alkalmazott NaHS más

TRPA1 agonistákhoz hasonlóan egyidejűleg fokozza a hólyagürítés gyakoriságát és csökkentette annak volumenét. Továbbá immunhisztokémiával sikeresen igazolták a TRPA1 jelenlétét az urothéliumon (Streng et al., 2008).

Ahogy már korábban tárgyaltuk, számos biológiailag aktív vegyület keletkezhet a H<sub>2</sub>S és NO reakciója során (Cortese-Krott et al., 2015). H<sub>2</sub>S és NO donor együttes alkalmazásának hatásait vizsgálták már patkány TRG és DRG neuronokon, asztrocitákon, agytörzs szeleteken és egér DRG neuronokon is. Az általuk kiváltott válaszok gátolhatók voltak TRPA1 receptor antagonistá jelenlétében, illetve csökkenthető volt a gáztranszmitterek endogén szintézisének gátlásával. A H<sub>2</sub>S/NO hatására keletkező niroxyl TRPA1 receptoron hatva CGRP felszabadulást követően vazodilatációt váltott ki a patkány dura ereiben. HNO hatására CGRP felszabadulást mértek, többek között a szív, a *n. ischiadicus* és mesenterialis erek esetében is (Eberhardt et al., 2014; Wild et al., 2015; Dux et al., 2016; Teicher et al., 2017). A poliszulfiddal kiváltott TRPA1 aktiváció hatásait figyelték meg RIN14B sejteken, gallus domesticus mellkasi aorta kemoszenzitív epitheloid sejtjein és egér DRG neuronokon (Hatakeyama et al., 2015; Ujike et al., 2015; Delgermurun et al., 2016). A poliszulfid hatására keletkező Ca<sup>2+</sup> jelek gátolhatók voltak TRPA1 antagonistá alkalmazásával. Bizonyos esetekben az N és L- típusú Ca<sup>2+</sup> csatornák és az endogéne termelődő NO is szerepet játszott a poliszulfid TRPA1 mediálta hatásainak közvetítésében. Pontmutációk kiváltásával sikeresen beazonosították azokat a cisztein aminosavakat, amelyek nélkülözhetetlenek a poliszulfid általi TRPA1 aktivációhoz (Hatakeyama et al., 2015; Delgermurun et al., 2016; Ujike et al., 2018). Intraplantárisan beadott nátrium poliszulfid a TRPA1 receptoron keresztül hatva ödémát és hiperalgéziát váltott ki (Hatakeyama et al., 2015).

Számos növényi eredetű szulfid vegyület hatását vizsgálták a TRPA1 receptoron. Az asadisulfid Ca<sup>2+</sup> jeleket váltott ki TRPA1 expresszázó HEK293 sejtekben. A fokhagymából izolálható ajoén önmagában nem aktiválta a TRPA1 receptort, azonban képes volt fokozni az agonisták hatását *Xenopus oocita* expressziós rendszerben (Yassaka et al., 2010). A fokhagymából származó DAS, DADS, DATS és DMTS mind agonistának bizonyult a TRPA1 expresszázó CHO sejtek vizsgálata során (Koizumi et al., 2009; Pozsgai et al., 2017b). A diallil vegyületeket hatását TRPA1 specifikus antagonistákon túl gátolni lehetett kapszazepinnel is. A TRPA1 receptort natívan is expresszázó patkány TRG neuronokon igazolni lehetett az allicin és a DADS aktiváló képességét. Az allicin és a DADS kapszaicinnel végzett deszenzitizációt követően illetve CGRP antagonistá jelenlétében kisebb mértékben dilatálta a patkány mesenterialis ereket. (Bautista et al., 2005). A DMTS

specifikusan aktiválta a TRPA1 receptort kifejező egér TRG neuronokat, továbbá izolált bőrlebenszövetből szomatosztatint szabadított fel, ami gátlható volt HC030031-gyel, illetve elmaradt TRPA1 KO egerekből származó minták esetén. *In vivo* a DMTS csökkentette a hőérülést követő hiperalgéziát. A DMTS antinociceptív hatása nem volt megfigyelhető TRPA1- illetve sst4 KO egerekben (Pozsgai et al., 2017a).

Összességében elmondható, hogy számos publikáció született a TRPV1- és TRPA1 receptorok funkciójáról és 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.

# CÉLKITŰZÉSK

Amióta ismert, hogy a H<sub>2</sub>S endogén úton is termelődik a szervezetünkben és gáztranszmitterként funkcionál élénk kutatások folynak biológiai hatásainak feltérképezésére. Azonban hamar kiderült, hogy a H<sub>2</sub>S komplex szereppel bír 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 szérumsztransfer artritisz modell során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. A GYY4137 H<sub>2</sub>S 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 gyulladás gátló neuropeptidok a bőr idegvégződéseiből *ex vivo*?

A karrageninnel kiváltott akut gyulladás modelljében az inorganikus poliszulfid és az organikus poliszulfid, 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* képzőmódszerrel 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

## 1. Kísérleti állatok

Állatkísérleteinket 2-4 hónapos korú, 20-25 grammos funkcionális TRPA1 (TRPA1<sup>-/-</sup>) és SST4 (<sup>-/-</sup>) génhíányos hím egereken illetve vad típusú párjaikon végeztük (TRPA1<sup>+/+</sup> és sst4<sup>+/+</sup>) Mindkét génmódosított egértörzs C57BL/6 alapú. Az általunk használt egértörzsek közforgalomban nem kaphatók, a TRPA1 génhíányos törzset Bautista munkacsoportja hozta létre (Bautista et al., 2006). 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. Emson generálta illetve bocsátotta rendelkezésünkre (Helyes et al., 2009). A TRPA1- illetve a sst4 WT és KO törzseket heterozigóta szülők pároztatásával hoztuk létre. Az utódok genotipizálást követően lettek szétválasztva vad illetve génhíányos csoportokra. Ezekből az utódokból lettek összeállítva a WT és KO tenyészcsoportok amelyeket további öt generáción keresztül szaporítottunk és minden egyedét genotipizáltuk. Az ötödik generációt követően nyert utódokat „tisztán” WT illetve KO egereknek tekintettük és ezeket vontuk be vizsgálatainkba. Ezt követően a genotipizálásokat csak szűrőpróba szerűen végeztük el tenyészetünk ellenőrzése végett. 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 cm<sup>2</sup>-es és 12 cm magas polikarbonát ketrecekben, a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének Állatházában és a Szentágothai János Kutatóközpont Központi Állatházában történt. Az állatok számára *ad libitum* standard egér táp és csapvíz állt rendelkezésre. A szociális depriváció illetve a túlsúlyosság elkerülése végett ketrecenként 5-10 egyedét tartottunk együtt. A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének Állatházának és a Szentágothai János Kutatóközpont Központi Állatházának működési azonosító számai: ZOHU0104L09 és ZOHU0104L03.

## **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. Kísérleti modellek**

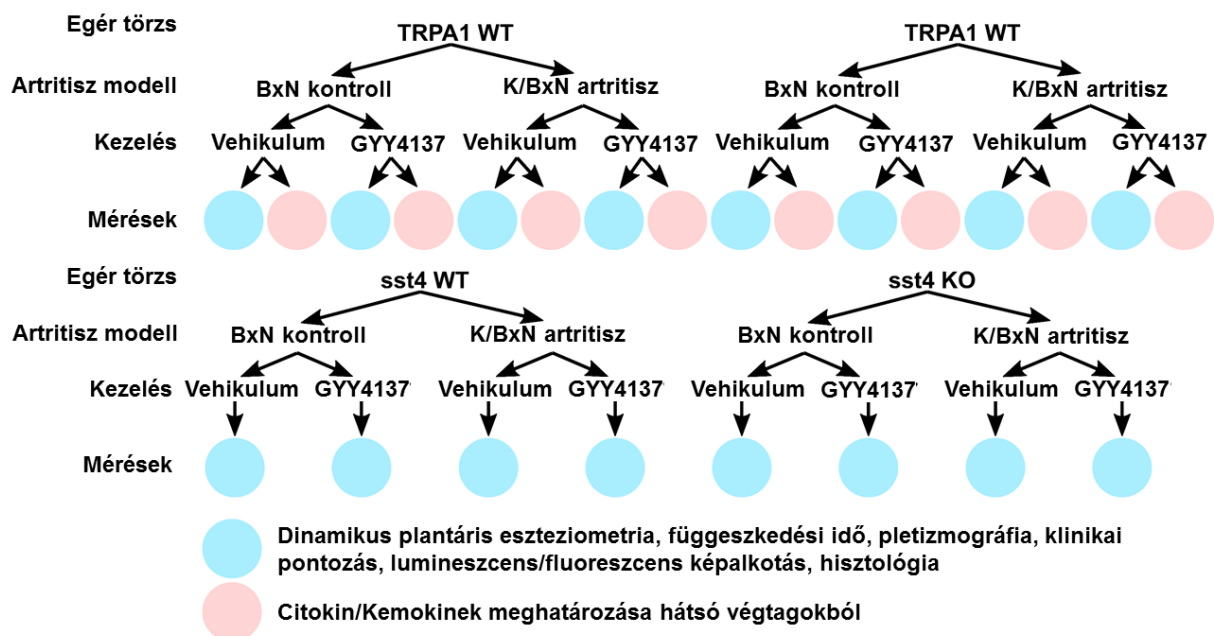
### **3.1. Karragenin indukálta akut lábgyulladás**

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 (Horváth et al., 2016). A POLY (17 µmol/ttkg) és DMTS (250 µmol/ttkg) kezeléseket intraperitoneálisan (i.p.) végeztük. A kezeléseket a gyulladás kiváltása előtt 30 perccel megelőzően 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.

### **3.2. K/BxN szérumsztransfer artritisz modell**

Kouskoff et al. 1996-ban kitenyésztette a spontán artritisz K/BxN egértörzset. Megfigyeléseik során fény derült az egerek patológiai elváltozásai és a humán reumatoid artritisz között fennálló nagymértékű hasonlóságra (Kouskoff et al., 1996). A K/BxN szérumsztransfer artritisz paradigma előnyei közé tartozik, hogy K/BxN egerek szérumját, egy másik egértörzshez beoltva ki lehet váltani a spontán artritisz egerekkel megegyező tünetegyüttest. Christensen et al. összefoglalójában részletesen tárgyalja a K/BxN szérumsztransfer artritisz jellemzőit (Christensen et al., 2016). Kísérleti elrendezésünkben az alábbi paradigmát választottuk: az egerek ízületi gyulladásának kiváltásához egyszeri i.p K/BxN (300 µl szérumsztransfer)

1 ml-re PBS-ben felhígítva) szérumbeladással váltottuk ki. Az egereket a szérumbeladást megelőzően, i.p. GYY4137 (50 mg ttkg<sup>-1</sup>) kezeltük és a kezelést naponta ismételtük. Kontroll csoportok során, BxN egerekből nem artritogén szérumbeladást és PBS-t alkalmaztunk. A kísérleteinkben felhasznált TRPA1 WT és KO egereket két fő csoportra bontottuk. Az egereket egyik csoportját a gyulladás harmadik napján feláldoztuk, és a lábaikból citokin méréseket végeztünk. A másik fő csoportban lévő egereken képpalkotó, funkcionális és szövettani analíziseket hajtottunk végre. Az sst4 egerek esetében nem végeztünk citokin meghatározásokat (3. ábra).



**3. ábra:** A K/BxN szérumbeladást transzfer artritisz modell során felhasznált egerek csoportosítása

## 4. Vizsgálati módszerek

### 4.1. Az inorganikus poliszulfid és a dimetil-triszulfid oldatok elkészítése

Nagy et al. által publikált metodika alapján állítottuk elő a poliszulfid oldatot (Nagy and Winterbourn, 2010). Az oldatok exogén eredetű oxidációja elleni védekezéséppen N<sub>2</sub> gázzal kifűjatott polipropilén csövekkel dolgoztunk. A reagenseket jég, 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  $\text{H}_2\text{S}$  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-nitrobenzooesav) (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  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  hidrogén-szulfid- és  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  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 és 4.17% v/v 10-szeres töménységű PBS (pH 7.4) hozzáadásával kétszeresére hígítottuk. Utolsó lépésben az oldatunkhoz megközelítőleg 25-30  $\mu\text{l}$  tömény sósavat adtunk. Az így keletkezett POLY oldat izotóniás és izohidriás volt. A DMTS vízben nehezen oldódik, ezért több lépésben kellett előállítanunk az állatok kezelésére szolgáló oldatot. Először a tömény gyári DMTS-t (Sigma Aldrich) DMSO-ban  $1 \text{ mol L}^{-1}$ -re hígítottuk. Ezt az oldatot tízszeresére hígítottuk 2% v/v Tween 80-t tartalmazó fiziológiás sóoldattal. Végül egy lépésben négyszeresére tovább hígítottuk az oldatot fiziológiás sóoldattal. A végső oldat DMTS koncentrációja  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  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 következőképpen a vehikulum DMSO tartalma némileg magasabb volt (2.5% v/v).

#### **4.2. A poliszulfid kvantitatív meghatározása hideg cianolízissel**

A karragenin által kiváltott gyulladáshoz használt izotóniás és izohidriás POLY és a GYY4137 felhasználásával nyert poliszulfid pontos koncentrációját hideg cianolízissel határoztuk meg. A GYY4137 elkészítése esetén az áramlási citométeres mérésektől némileg eltérő módon jártunk el. Sósav helyett citrát pufferrel ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 3) 1:1 térfogat arányban kevertük össze a GYY4137-t ( $3 \text{ mg ml}^{-1}$ ,  $7.95 \text{ mmol L}^{-1}$ ) és az inkubációs idő 90 perc volt. Az inkubációt követően azonos térfogatban hipoklóros savat ( $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) adtunk az oldathoz. A hideg cianolízis során a mintákat először  $\text{NH}_4\text{OH}$ -val alkalizáltuk, majd 25 percen keresztül KCN-dal szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mintákhoz ezt követően formalint és Goldberg reagenst ( $\text{FeCl}_3$  18.38%-os  $\text{HNO}_3$ -ban  $\text{FeCl}_3$  feloldva) adtunk és további 15 percig állni hagytuk végül 460 nm hullámhosszon megmértük a fényelnyelését



spektrofotométerrel. A standard görbét ismét koncentrációjú KSCN oldatok hideg cianolízisével alkottuk meg (Wood, 1987).

#### **4.3. Ca<sup>2+</sup> beáramlás mérése áramlási citométerrel TRPA1 expresszálo CHO sejteken.**

A Ca<sup>2+</sup> beáramlási méréseket natív- és humán TRPA1-et expresszálo kínai hörcsög ovárium sejteken (chinese hamster ovary, CHO) végeztük. A transzfekció végrehajtásához humán TRPA1 cDNS-t (Life Technologies CloneRanger, clone ID: 100016279) és neomycin rezisztencia gént is tartalmazó pT3CMV- (Addgene, ID: 26556) és pCMVSB100x (prof. Ivics Zoltán ajándéka) transzpozáztt tartalmazó plazmid vektort használtunk. A plazmidon a TRPA1 cDNS inszerciós helyét a cytomegalovírus (CMV) promoter és a szarvasmarha növekedés hormon polyA régiója határolta. A sikeresen transzfektált klónokat tenyésztéssel, G418 (500 µg mL<sup>-1</sup>) tartalmú médiumban szelektáltuk ki. Ezt követően a TRPA1<sup>+</sup> CHO sejt tenyészetekről óvatosan eltávolítottuk a tápmédiumot (500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium, (DMEM) 50 ml fetális marha szérum, 10 ml L-glutamin (200 mmol L<sup>-1</sup>) 10 ml MEM nem esszenciális aminosavak, 500 µl penicillin és sztreptomycin) és a letapadt sejteket tripszinnel (250 µl, 0.1% PBS-ben oldva) szabadítottuk fel. Az egyes mérési pontokhoz megközelítőleg 10<sup>4</sup> sejtet 100 µl ECS-ben reszuszpendáltuk (összetétel mmol L<sup>-1</sup>-ben megadva: NaCl, 160; KCl, 2,5; CaCl<sub>2</sub> 1; MgCl<sub>2</sub>, 2; HEPES, 10; glükóz, 10; pH 7.3) és Fluo-4 AM (Invitrogen, 0.4 µL, 1 µg µL<sup>-1</sup> DMSO-ban oldva; excitációs hullámhossz 488 nm; fluoreszcens emissziós hullámhossz 504 nm ) festékkel 37 °C-on 30 percen keresztül inkubáltuk. Ezt követően további 400 µl ECS adtunk a sejtekhez. A sejt szuszpenzió térfogatát 1000 µl egészítettük ki az adott csoportoknak megfelelő és koncentrációjú ECS-ben oldott vizsgált anyagokkal. A sejtek zöld fluoreszcens jelét, kontroll csak Fluo-4 festett sejtek jelére normalizáltuk. Bizonyos mérések esetén 5 perces preinkubációt végeztünk a TRPA1 antagonistá HC030031 (50 µmol L<sup>-1</sup> ECS-ben oldva). A H<sub>2</sub>S dózis hatás görbe felvételéhez a nátrium-szulfid-nonahidrát (Na<sub>2</sub>S·9 H<sub>2</sub>O) kristályokat desztillált vízzel mostunk, majd N<sub>2</sub> gázzal kifújatott centrifuga csőben desztillált vízzel oldottuk. A hidrogén-szulfid törzs oldat koncentrációjának meghatározását spektrofotométerrel végeztük. A törzsoldatból vett mintákat empirikusan kihígítottuk és megmértük az abszorbanciáját 230 nm hullámhosszon (extinkciós koefficiens 230 nm-en, E<sub>230</sub> = 7.7000 mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup>), és 412 nm-en (E<sub>412</sub> = 28200 mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup>) 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoésav) hozzáadását követően (Báta et al., 2018). A két abszorbancia értékéből számított koncentráció átlagát tekintettük a törzsoldatunk valós

hidrogén-szulfid koncentrációjának. A GYY4137 először desztillált vízben oldottuk fel (3 mg ml<sup>-1</sup>, 7.95 mmol L<sup>-1</sup>), a további hígítási sorozatot a dózis-hatás görbéhez ECS-ben végeztük. A POLY-t a fentebb leírt metodika alapján készítettük el (10 μmol L<sup>-1</sup> ECS-ben) Vizsgáltuk, a GYY4137 felszabaduló H<sub>2</sub>S és hipoklórossav (OCL<sup>-</sup>) reakciójából keletkező poliszulfid TRPA1 aktivációs képességét. Azonos térfogatban egymáshoz adtunk GYY4137 (3mg ml<sup>-1</sup>, 7.95 mmol L<sup>-1</sup>) és sósav (1 mmol L<sup>-1</sup>) oldatokat és ezt követően 120 percen keresztül fénytől védetten szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubációs idő lejárta után meghatároztuk az oldat hidrogén-szulfid koncentrációját spektrofotométer segítségével a fent említett módszer szerint és a poliszulfid előállítása végett az oldat hidrogén-szulfid tartalmának megfelelő arányban hipoklórossavat adtunk hozzá. Az így kapott oldatban a hipoklóros sav végkoncentrációja nem haladta meg 616 μmol L<sup>-1</sup>-t. Az egyes összetevők aktivációs képességét önmagukban is vizsgáltuk a végoldattal megegyező koncentrációkban. Kontrollként és a specificitás igazolásának céljából a méréseket natív, humán TRPA1-t nem expresszáló CHO sejteken is megismételtük.

#### **4.4. Szomatosztatin felszabadulás mérése radioimmunoassay (RIA) módszerrel izolált egér lábőr idegvégződésekből.**

A TRPA1 WT és KO egereket nyakcsigolya diszlokációval feláldoztuk, majd a hátsóvégtagokat finom nyírógéppel szörtelenítettük. A lábőröket preparálást követően azonnal oxigenizált, szobahőmérsékletű szintetikus intersticiális folyadékba (SIF; összetétele mmol L<sup>-1</sup> megadva: NaCl 107.8, NaHCO<sub>3</sub> 26.2, nátrium-glükonát 9.64, szukróz 7.6g, glükóz 5.05, KCl 3.48, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.67., CaCl<sub>2</sub> 1.53, MgSO<sub>4</sub> 0.69) helyeztük. Az bőrmintákat egyesével kifordítva akril rudakra rögzítettük sebészi fonal segítségével és 37 °C oxigenizált SIF-et tartalmazó rázó fürdőbe helyeztük át és 30 percen keresztül inkubáltuk benne. Ezt követően a mintáinkat a rázófürdőben egyesével üveg kémcsövekbe helyeztük át amely 800 μl SIF-oxigenizált SIF-t tartalmazott és 5 percig inkubáltuk. Az inkubáció lejártaival a mintákat a következő sorozat üveg kémcsőbe helyeztük, amely a 800 μl oxigenizált SIF-t mellett további 10 μmol L<sup>-1</sup> POLY-t vagy vehikulumot tartalmazott és ismételten 5 perces inkubációs időt alkalmaztunk. A következő fázisban ismételten egy új sorozat oxigenizált SIF-t tartalmazó kémcsőbe helyeztük át és 5 percen keresztül inkubáltuk a mintáinkat. Az első 5 perces inkubációból származó oldatok szolgáltak a bazális-, a második 5 perces inkubáció oldatait a stimulált- és a harmadik 5 perces inkubáció oldatait poszt stimulált szomatosztatin

felszabadulás meghatározására. A megfelelő csoportok esetén a SIF 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  HC030031 is tartalmazott (Pozsgai et al., 2017a). Ezt követően meghatároztuk a minták nedves tömegét. A szomatosztatin felszabadulás kvantifikálását radioimmunoassay (RIA) módszerrel végeztük (Pozsgai et al., 2017a). Az assay során felhasznált PBS (pH 7.4 50  $\text{mmol L}^{-1}$ ) hozzáadott NaCl-t (100  $\text{mmol L}^{-1}$ ) nátrium-azidot (0.05% w/v) és marha szérum albumint (0.25% w/v) tartalmazott. Az assay kivitelezéséhez az ismeretlen szomatosztatin tartalmú mintánkat, standard szomatosztatin-14 peptidet, jelölt (Tyr1)-szomatosztatin-14-t, és antiszérumot használtunk. A szomatosztatin radioaktív jelölésé Na<sup>125</sup>I-dal történt katalizátor jelenlétében (1,3,4,6-tetrakloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -difenil-glikouril) történt. Az antiszérum bárányból származó, szarvasmarha eredetű szomatosztatin-14 thyroglobulin ellentermelt antitestek képezték, amelyet 1:260000 hígításban alkalmaztunk. A szabad- és immunkomplexben jelenlevő peptid szeparálásához a desztillált vízben oldott Norit-A (10% w/v), dexrán (molekulasúly: 65-73kDa, 1% w/v) és zsírmentes tejpor (0.2% w/v) szolgált. A folyamat során egyaránt meghatároztuk a kötött- és szabad peptidok radioaktivitását (Gamma NZ-310, Magyarország). A standard görbét ismert szomatosztatin tartalmú minták üledékének és felülúszójának radioaktív sugárzásának összehasonlításával alkottuk meg. Eredményeinket immunreaktív szomatosztatinszerű peptid (fmol SOM-LI) és a bőrminták milligrammban kifejezett nedves tömegének hányadosával fejeztük ki.

#### **4.5. Gyulladásos markerek detektálása a K/BxN modellben**

A szérum transzfer artritisz indukcióját követően az egereket a 3. napon ketamin/xylazin (100/10 mg  $\text{ttkg}^{-1}$ ) altatás alatt nyaki diszlokációval termináltuk. Az egerek talpait 1 ml jéghideg mosófolyadékkal (PBS pH 7,5; EDTA, 10  $\text{mmol L}^{-1}$ ; HEPES, 20  $\text{mmol L}^{-1}$ ) átöblítettük, a mintákat folyékony nitrogénben gyors fagyasztottuk, végül -80 °C-on tároltuk. Mócsai et al. korábbi eredményei alapján egy citokint és három kemokint választottunk ki (IL-1 $\beta$ , KC, MIP-1 $\alpha$  és MIP-2) és vetettük alá kvantitatív analízisnek (Kovács et al., 2014). A méréseket egyetlen mintából mágneses gyöngyökhöz kötött antitesteket utilizáló 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.

#### **4.6. Mechanikai fájdalomküszöb meghatározása**

A különböző kísérleti modellek során kialakuló gyulladás hatására bekövetkező hiperalgéria kvantitatív mérését dinamikus plantáris eszteziométerrel (DPA, Ugo Basile 37400, Comerio, Olaszország) végeztük. A mérések során az egerek külön erre a célra kifejlesztett 15x15 cm-es plexi cellákban foglaltak helyet és a cellák maguk egy magasított fém rácsra voltak helyezve. Ez az elrendezés lehetővé tette, hogy a vizsgált állatok alá helyezük a mérőapparátus stimulátorát, amelyet egy tompa végű, függőleges állású fém szonda alkot. A DPA fő karakterisztikája, hogy a szonda által az egerek hátsó lábának talpi felszínére kifejtett nyomóerő maximális értéke és az erő növekedésének lineáris gradiense szabályozható. Kísérleteink során az előbbi értékek 10 grammnak megfelelő súly volt, amelyet fokozatosan, 4 szekundom alatt ért el. Az egerek a cellák által lehatárolt terek keretein belül szabadon mozoghattak, ezáltal amikor az inger nagysága elérte a mechanikus fájdalomküszöb határát, az nocifenzív reakciót váltott ki az állatból és elemelte az aktuálisan ingerelt végtagját a szondáról, miközben a stimulus nagyságát a DPA automatikusan rögzítette. Az ingerlés megkezdése előtt az egerek 15 perc szoktatási időt töltöttek a cellákban, továbbá a mérések során egyaránt a szenzitizáció és a deszenzitizáció prevenciója végett a hátsó végtagok stimulálását felváltva végeztük minimum 5-5 szekundum nyugalmi intervallumot alkalmazva. Az összes kísérleti modellben az inzultus kiváltása előtt három különböző napon mindkét végtagon három-három mérés átlagolásával meghatároztuk a mechanikai fájdalomküszöb kontroll értékét, majd az inzultust követően az egyes mérési időpontokban 5-5 mérés átlaga szolgált a hiperalgéria mértékének megállapítására (Bölcskei et al., 2005; Pozsgai et al., 2017a).

#### **4.7. Hátsó végtagok térfogatának mérése**

Az egerek hátsó lábain a gyulladás okozta térfogatnövekedést pletizmométerrel (Ugo Basile Plethysmometer 7140, Comerio, Olaszország) határoztuk meg. A pletizmométer alkotórésze egy „u” alakú elektrolittal töltött edény. A két tartály között az elektrolit akadálytalanul képes közlekedni: a „minta” tartályba mártott láb Archimédész törvényének megfelelően megemeli a folyadékoszlop magasságát a detektort tartalmazó tartályban is. A láb térfogatát század köbcentiméter pontossággal határoztuk meg. A lábtérfogat mérése során az állatok fokozott

stressznek vannak kitéve, ezért a méréseket kizárólag a fájdalomküszöb meghatározása után hajtottuk végre. A fájdalomküszöb meghatározásához hasonlóan, a lábtérfogatok esetén is három különböző napon mért eredmények átlaga képezte a kontroll értékeket (Horváth et al., 2016).

#### **4.8. Függeszkedési teszt**

A függeszkedési teszt során az állatokat egy fémrácsra helyezük, amelyet felemelve és tengelye körül 180°-kal elforgatva kényszerítjük az egereket függeszkedési pozícióba a gravitációval szemben. A vizsgálat során a függeszkedéssel töltött idő hosszát mérjük meg. Az egerek testi épségét a rács alá helyezett vastag vattaágy biztosítja. A függeszkedési idő információt szolgáltat az állatok erőnlétéről és a végtagok általános állapotáról. Egy egészséges egér függeszkedési ideje meghaladja a 20 szekundumot ezért a méréseket, amennyiben elérték a 60 másodpercet, felfüggesztettük. A méréseket a fájdalomküszöb és a lábtérfogát meghatározásával azonos napokon hajtottuk végre (Borbély et al., 2018).

#### **4.9. Az ízületi gyulladás pontozása**

A K/BxN szérum-transzfer artritiszes 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 (0-1.5, egészséges; 1.5-2.5: kezdődő gyulladás jelei; 2.5-4 enyhe gyulladás, 4-7, közepesen súlyos gyulladás; 8-10 súlyos gyulladás, az ízület passzív mozgatással szemben való elmeredése) és egyedenként a hátsó lábak értékeit átlagoltuk. A méréseket a 3, 5 és 7 napon végeztük (Jakus et al., 2010; Horváth et al., 2017).

#### **4.10. *In vivo* lumineszcens neutrofil mieloperoxidáz aktivitás képalkotó mérése**

A képalkotó vizsgálatokat ketamin és xylazin (Calypsol/Sedaxylan, 120/12 mg ttkg<sup>-1</sup>, i.p.) narkózis alatt végeztük. Az egereket a neutrofil mieloperoxidáz által termelt reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségével szorosán korreláló, kemilumineszcens festékkal, steril foszfát pufferes sóoldatban oldott (20mg ml<sup>-1</sup>) luminollal (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftálazidindion) kezeltük i.p. (150 mg ttkg<sup>-1</sup>) (Botz et al., 2014a). A felvételeket IVIS Lumina II (PerkinElmer, Waltham, Amerikai Egyesült Államok; 120 s akvizíciós idő, F/stop = 1, Binning = 8) készüléssel készítettük a luminol beadását követően a 10. percben. A kiértékelés során Living Image® szoftver II (PerkinElmer, Waltham, Amerikai Egyesült Államok) segítségével,

kijelöltük az egerek hátsó végtagjain a tibiotarzális ízület magasságáig az identikus kiértékelendő mezőket (ROI: Regions of interest) és a kemilumineszcens jelet a teljes sugárzás mértékegységében adtuk meg (total radiance/s = total flux/s)

#### **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. Az IR-676 fluoreszcens festék (5% v/v Kolliphor HS 15) oldat 0.5 mg  $\text{ttkg}^{-1}$  dózisban 5% v/v alkalmas volt az extravazáció vizualizálására és kvantifikálásra kísérleteink során. További előnyei, hogy a luminollal ellentétben *i.v.* alkalmaztuk, a felvételeket a beadást követő 20. percben készítettük el, és abszorpciós és emissziós spektrumaik csúcsai nem voltak fedésben, ezáltal egyetlen altatás alatt mindkét paraméter mérését el tudtuk végezni. A kiértékelés során ugyancsak a hátsó végtagokra fókuszáltunk és az identikus kijelölt mezők nem haladták meg proximálisan a tibiotarzális ízületet. A regisztrált jel nagyságát a teljes sugárzó hatékonysággként fejeztük ki. (total radiant efficiency =  $[\text{photons/s/cm}^2/\text{sr}]/[\mu\text{W/cm}^2]$ ) (Borbély et al., 2015).

#### **4.12. Szövetteni vizsgálat**

A krónikus modellben felhasznált egereket a kísérlet 7. napján feláldoztuk, a tibiotarzális ízületeiket eltávolítottuk és 4%-os puffertelt paraformaldehiddel fixáltuk. A fixált ízületeket dekalifikáló oldatba helyeztük át 2-3 hétre és ezt követően axiális síkban 3-5  $\mu\text{m}$  vastag paraffinos hematoxilin-eozin festett metszetek készítettünk belőlük. A szövetteni preparátumokat értékelő független szakértő vak kísérleti elrendezésben dolgozott, mert nem kapott információt a preparátumokat jelölő számokokról. A hisztopatológiai elváltozások alapján (porckárosodás, infiltráló mononukleáris sejtek mennyisége, szinoviális hiperplázia és fibroblaszt aktivitás és kollagén lerakódás) 0-3-ig terjedő skálán pontozott. Az egyes paraméterek részpontjainak összegzésével alkotott 0-12-ig terjedő kompozit pontrendszer segítségével hasonlítottuk össze az egyes csoportokat (Szabo et al., 2005; Botz et al., 2014b; Horváth et al., 2017).

#### **4.13. Felhasznált anyagok**

A ketamint (Calypsol, Richter Gedeon Nyrt., Budapest, Magyarország), a xylazint (Sedaxylan, Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Hollandia), a formalint (Formaldehydum solutum 37%; Ph. Hg. VII.), a PTE Klinikai Központi Gyógyszertárából szereztük be. a képalkotó vizsgálatokhoz felhasznált festékeket, a nátrium-luminolt a Gold Biotechnology-tól (Olivette, MO, Egyesült Amerikai Államok) és az IR-676-ot a Spectrum-Info-tól (Kijev, Ukrajna) rendeltük. A DMTS, NaHS · 9H<sub>2</sub>O, hipoklórossav, DTNB, karragenin Tween 80 és Kolliphor HS 15 a Sigma Aldrich-tól (St. Louis, MO, Egyesült Államok) vásároltuk. A citokin méréshez szükséges MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel—Immunology Multiplex Assay Merck Millipore-tól rendeltük (Billerica, MA, Egyesült Amerikai Államok).

#### **4.14. Statisztika**

Az eredményeink prezentációja során az egyes csoportok átlagát, a standard hibával feltüntetve ábrázoltuk, kivéve a szövetségi 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 post hoc teszttel kiegészítve. A szomatosztatin felszabadulás elemzése során az adataink nem tanúsítottak normál eloszlást, ezért Kruskal–Wallis tesztet alkalmaztunk. A szövetségi eredmények vizsgálata során alkalmazott Kruskal–Wallis tesztet Dunn teszttel 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 teszttel 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

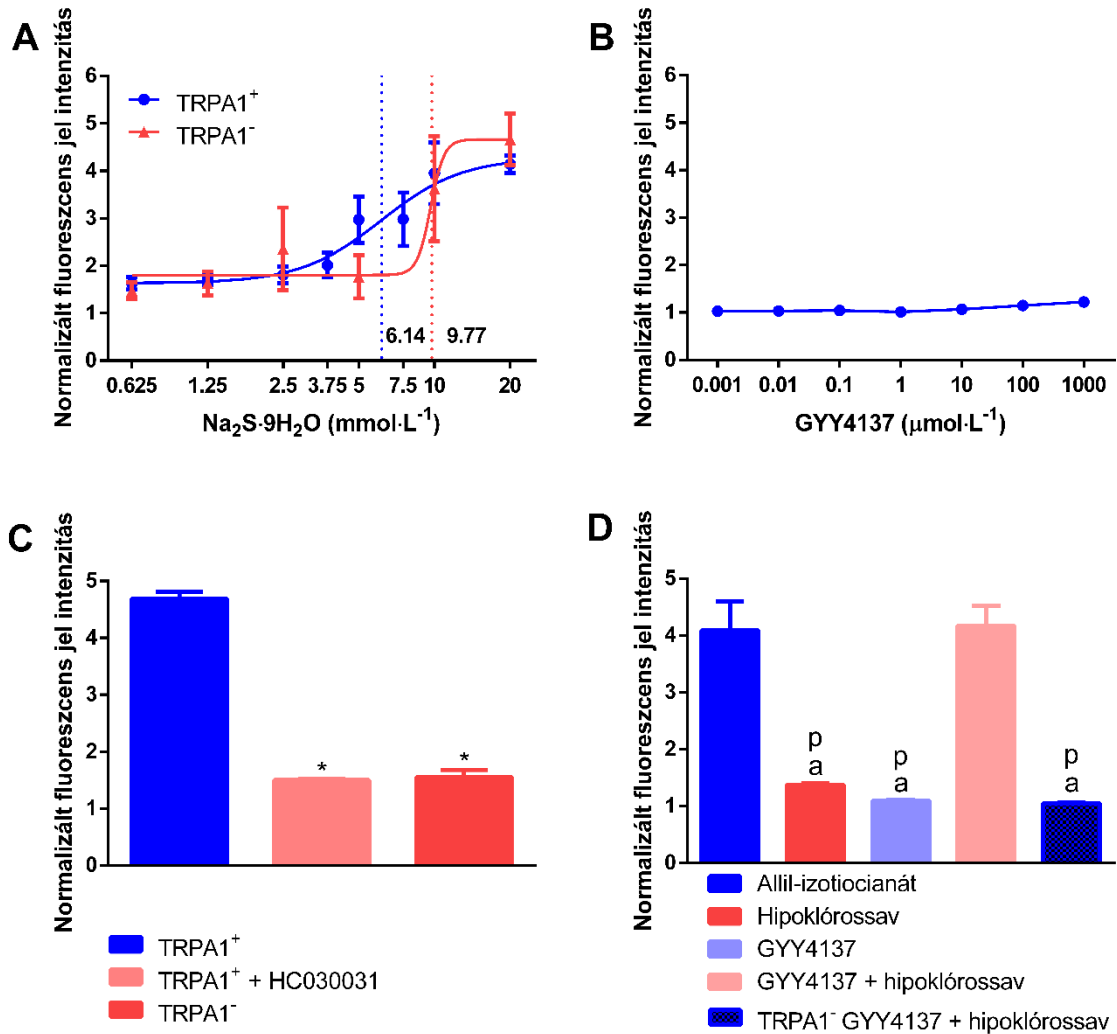
## 1. Az GYY4137 lassú felszabadulású hidrogén-szulfid donor hatásai a K/BxN szérum transzfer artritisz modelljében TRPA1 és sst4 KO egerekben.

### 1.1. Eredmények

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

A GYY4137 hidrogén-szulfid leadó képességét két különböző savval acidifikált oldatban is vizsgáltuk. Citrát pufferben (pH 3,0) szobahőmérsékleten, fénytől védetten, 90 perces inkubációt követően  $328.1 \pm 39.33 \mu\text{mol}$  ( $n = 18$ , hat kísérlet eredménye) hidrogén-szulfid szabadult fel. Ez az érték kisebb volt, amennyiben a GYY4137-t azonos térfogatú 1 mmol  $\text{L}^{-1}$  sósavval 120 percen keresztül inkubáltuk ( $147.3 \pm 15.29 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $n=19$  négy kísérlet eredménye). A GYY4137-hez a 90 perces inkubációt követően, azonos térfogatú 100  $\mu\text{mol}$  hipoklórossavat hozzáadva hideg cianolízissel mérve  $77.15 \pm 15.29 \mu\text{mol}$  poliszulfid keletkezett ( $n = 18$ , hat kísérlet eredménye). Amennyiben a CHO sejteket tisztán a nátrium-szulfid-nonahidrát oldattal kezeltük, csak extrém magas hidrogén-szulfid koncentrációk esetén figyeltünk meg egy dóziszfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást TRPA1 expresszáló és natív sejteken egyaránt (CHO TRPA1<sup>+</sup>:  $\text{EC}_{50} = 6.14 \text{ mmol L}^{-1}$ ; CHO TRPA1<sup>-</sup>:  $\text{EC}_{50} = 9.77 \text{ mmol L}^{-1}$   $n=5-7$  mérési pontonként összesen 4 kísérlet eredményeit egyesítve; **4.A ábra**). A hidrogén-szulfid 1 mmol  $\text{L}^{-1}$ -es koncentráció alatt egyáltalán nem okozott  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást egyik sejt vonal esetében sem. Vizsgáltuk a GYY4137 dózis hatás görbáját a nano mólostól a milli mólosig terjedő tartományban, azonban nem figyeltünk meg semmilyen  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlásból fakadó fluoreszcencia jelet ( $n = 5$  mérési pontonként, összesen négy kísérlet sorozat eredményei; **4.B ábra**). A poliszulfid 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  koncentrációban TRPA1 expresszáló sejteken  $\text{Ca}^{2+}$  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 ( $n = 12$ ; **4.C ábra**). Ezt követően vizsgáltuk, hogy a GYY4137 sósav és hipoklórossav hozzáadást követően mekkora  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást képes kiváltani a pozitív kontrollként alkalmazott, 100  $\mu\text{mol}$  allil-izotiocianáthoz képest. A sósavval inkubált GYY4137 illetve önmagában a hipoklórossav nem volt képes  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást kiváltani

ellenben az acidifikált majd hipoklórossavval reakcióba lépő GYY4137 oldat az allil-izotiocianáthoz mérhető  $\text{Ca}^{2+}$  influxot váltott ki a TRPA1 receptor jelenlétében. A natív CHO sejtek esetében a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás nem jött létre (n= 5-8; **4.D ábra**).

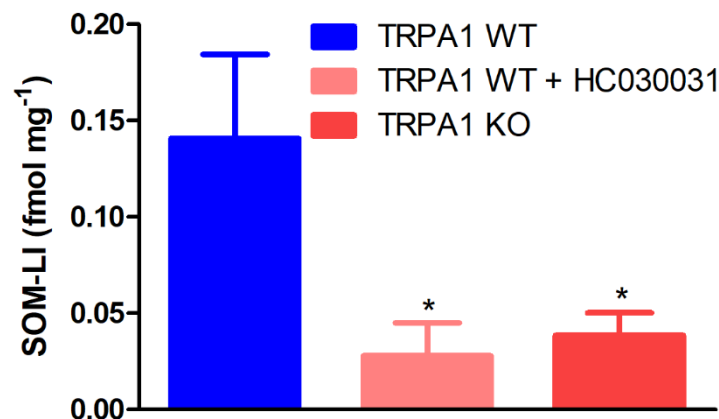


**4. ábra:** Az alacsony pH-n inkubált GYY4137-ből felszabaduló  $\text{H}_2\text{S}$  hipoklórossavval reagálva polyszulfid keletkezik. TRPA1 receptort expresszáló sejteken a polyszulfid  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást vált ki. A  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást a Fluo-4 AM kalcium specifikus festék fluoreszcens jelének regisztrálásával határoztuk meg. **(A)** A nátrium-szulfid-nonahidrátból származó  $\text{H}_2\text{S}$  fiziológias koncentrációtartományban nem aktiválta a TRPA1 receptort. A nátrium-szulfid-nonahidrát  $\text{EC}_{50}$  értékei 6.14 mmol L<sup>-1</sup> és 9.77-nek bizonyultak TRPA1<sup>+</sup> és TRPA1<sup>-</sup> CHO sejtek esetén. (n= 5-7 kísérlet/mérési pont). **(B)** A GYY4137 hatására nem jött létre kalcium beáramlás a TRPA1 expresszáló CHO sejteken (n = 5) **(C)** Az intracelluláris kalcium koncentráció változása natív CHO sejtekben, és TRPA1<sup>+</sup> sejtekben polyszulfid hatására illetve HC030031 preinkubációt követően. (n =12,

\* $p < 0.05$  vs.  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  poliszulfid kezelt TRPA1<sup>+</sup> CHO sejtek). **(D)** Az acidifikált GYY4137-hez ( $7.98 \text{ mmol L}^{-1}$ ) azonos térfogatban hozzáadott hipoklórossav ( $616 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) reakciójából keletkező poliszulfid kalcium beáramlást vált ki a TRPA1 expresszálo CHO sejteken. A hipoklórossav és az acidifikált GYY4137 önmagukban nem aktiválták a TRPA1 receptort.  $n=5-8$ ; <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. allil-izotiocianát; <sup>p</sup> $p < 0.05$  vs. az acidifikált GYY4137 és hipoklórossav reakciójával előállított poliszulfid (Bonferroni módosított poszt-teszttel kiegészített 1-utas ANOVA).

### 1.1.2. *Ex vivo* bőrlebenyekben TRPA1 közvetíti a poliszulfid ingerlést követő szomatosztatin felszabulást

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 ( $n = 12$ , három kísérlet sorozatból; **5. ábra**). A nátrium-szulfid-nonahidrát stimuláció  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  koncentrációig nem okozott szignifikáns SOM-LI felszabadulást (nem ábrázolt adatok).



**5. ábra:** Az inorganikus poliszulfid ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) hatására szomatosztatin szabadul fel *ex vivo* az izolált lábőr preparátumokból. HC-030031 és a TRPA1 receptor hiánya gátolta a szomatosztatin felszabadulást.  $n = 12$ ; \* $p < 0.05$  vs. poliszulfid ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) kezelt TRPA1 WT egerekből származó minták (Kruskal Wallis teszt).

### **1.1.3.A GYY4137 ellentétes hatása a mechanikai hiperalgéziára TRPA1 jelenlétében és hiányában.**

A K/BxN szérum beadását követően TRPA1 WT és KO egerekben egyaránt kialakult a mechanikai hyperalgézia GYY4137 és vehikulum kezelés mellett a BxN szérummal kezelt kontroll egyedekhez képest. (WT, BxN, vehikulum kezelt, n = 7; WT, BxN, GYY4137 kezelt n = 7; WT, K/BxN, vehikulum kezelt n = 9; WT, K/BxN, GYY4137 kezelt n = 9; KO, BxN, vehikulum kezelt n = 9; KO, BxN, GYY4137 kezelt n = 6 ; KO K/BxN vehikulum kezelt n = 9 , KO, K/BxN, GYY4137 kezelt n = 10; **6.B, C ábrák**). A 3. napon a GYY4137 kezelt arthritisz TRPA1 KO egerek mechanikai fájdalomküszöbe szignifikánsan kisebb volt a vehikulummal kezelt KO társaikhoz, illetve a WT GYY4137 kezelésben részesülő egyedekhez képest ( $6.43 \pm 0.33$  vs.  $7.43 \pm 0.29$  g TRPA1 KO vehikulum kezelés esetében;  $6.43 \pm 0.33$  vs.  $7.59 \pm 0.25$  g TRPA1 WT GYY4137 kezelés esetében; **6.A ábra**). A 7. napon a GYY4137 kezelés hatására csökkent a hyperalgézia mértéke a TRPA1 WT egerekben az ugyancsak GYY4137 kezelésben részesülő TRPA1 KO egerekhez képest ( $6.15 \pm 0.36$  vs.  $4.52 \pm 0.15$  g; **6.C ábra**). A nem arthritogén, BxN szérummal kezelt egerek mechanikai fájdalomküszöbét nem befolyásolta a TRPA1 gén jelenléte vagy hiánya illetve a szulfid donorral vagy vehikulumával történő kezelés (**6.A-C ábrák**).

### **1.1.4. A GYY4137 TRPA1 WT egerekben csökkentette az arthritisz score-t**

Az arthritisz súlyosságának megítélésére választott pontrendszer használatával egyértelműen megállapítható a K/BxN szérum beadását követő szignifikáns állapotromlás a nem arthritogén BxN kezeléshez képest (**6.D-F ábrák**). Az 5. napon a GYY4137 mérsékelte az arthritisz külsőleg megfigyelhető jeleit a TRPA1 WT egerekben a vehikulummal kezelt WT és a GYY4137 kezelt KO arthritisz társaikhoz képest ( $5.58 \pm 0.67$  vs.  $7.97 \pm 0.66$  arthritisz TRPA1 WT, vehikulum kezelt; vs.  $8.43 \pm 0.51$  arthritisz TRPA1 KO, GYY4137 kezelt; **6.E ábra**). A nem arthritogén BxN szérumban részesülő egerek pontjai között nem tapasztaltunk különbséget (**6.D-F ábrák**).

### **1.1.5. A nem arthritiszos egerek függeszkedési képessége romlott a TRPA1 gén hiányában.**

Az arthritiszos TRPA1 WT és KO egerek kezeléstől függetlenül szignifikánsan rosszabbul teljesítettek a függeszkedési tesztek során a BxN társaikhoz képest (**6.H és I ábrák**). Ez a különbség 5. napon még csak a WT egereknél jelentkezett, ellenben 7. napra mindkét törzsnél megfigyelhető volt. Ez az eltérés egyaránt megfigyelhető volt GYY4137 és vehikulum kezelés mellett is (5.nap:  $58.89 \pm 1.11$  vs.  $20.3 \pm 4.2$  s és  $58.57 \pm 1.43$  vs.  $21.33 \pm 3.93$  s nem arthritiszos vehikulum, illetve GYY4137 kezelt TRPA1 WT vs. nem arthritiszos vehikulum, illetve GYY4137 kezelt TRPA1 KO egerek; 7. nap  $59.89 \pm 0.11$  vs.  $25.74 \pm 4.71$  s és  $59.86 \pm 0.14$  vs.  $22.83 \pm 7.45$  s nem arthritiszos vehikulum, illetve GYY4137 kezelt TRPA1 WT vs. nem arthritiszos vehikulum- és GYY4137 kezelt TRPA1 KO egerek; **6.H és I ábrák**)

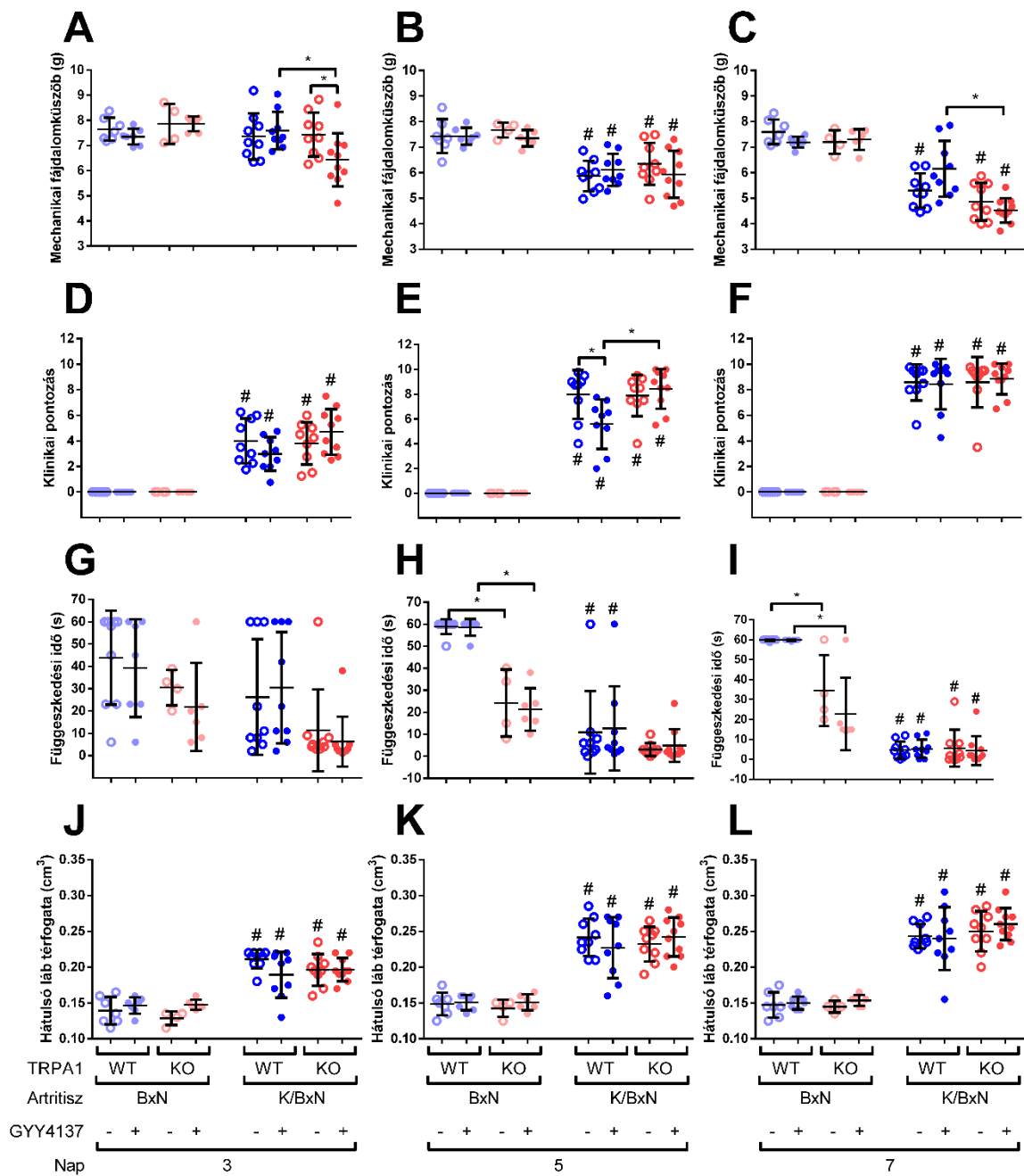
### **1.1.6. A GYY4137 és a TRPA1 gén nincs hatással a pletizmográfiával mért lábtérfogatokra.**

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 (**6.J-L ábrák**). A GYY4137 illetve a TRPA1 gén nem töltött be szignifikáns szerepet az arthritiszos K/BxN egerek lábtérfogatának változásában. Előbbi megállapításunk igaznak bizonyult a nem arthritiszos BxN egerek esetében is (**6.J-L ábrák**).

### **1.1.7. A GYY4137 kezelés nem volt hatással a testsúlyváltozásra.**

Az arthritiszos egerek állapotromlása nyomon követhető volt a testsúlyuk csökkenésével is, azonban a GYY kezelés, illetve a genotípus nem befolyásolta e változásokat. Ugyancsak nem találtunk bizonyítékot arra vonatkozólag, hogy a GYY4137 illetve a vehikulum kezelés

befolyásolná a nem arthritiszos TRPA1 WT és KO egerek testtömegét (nem ábrázolt eredmények).

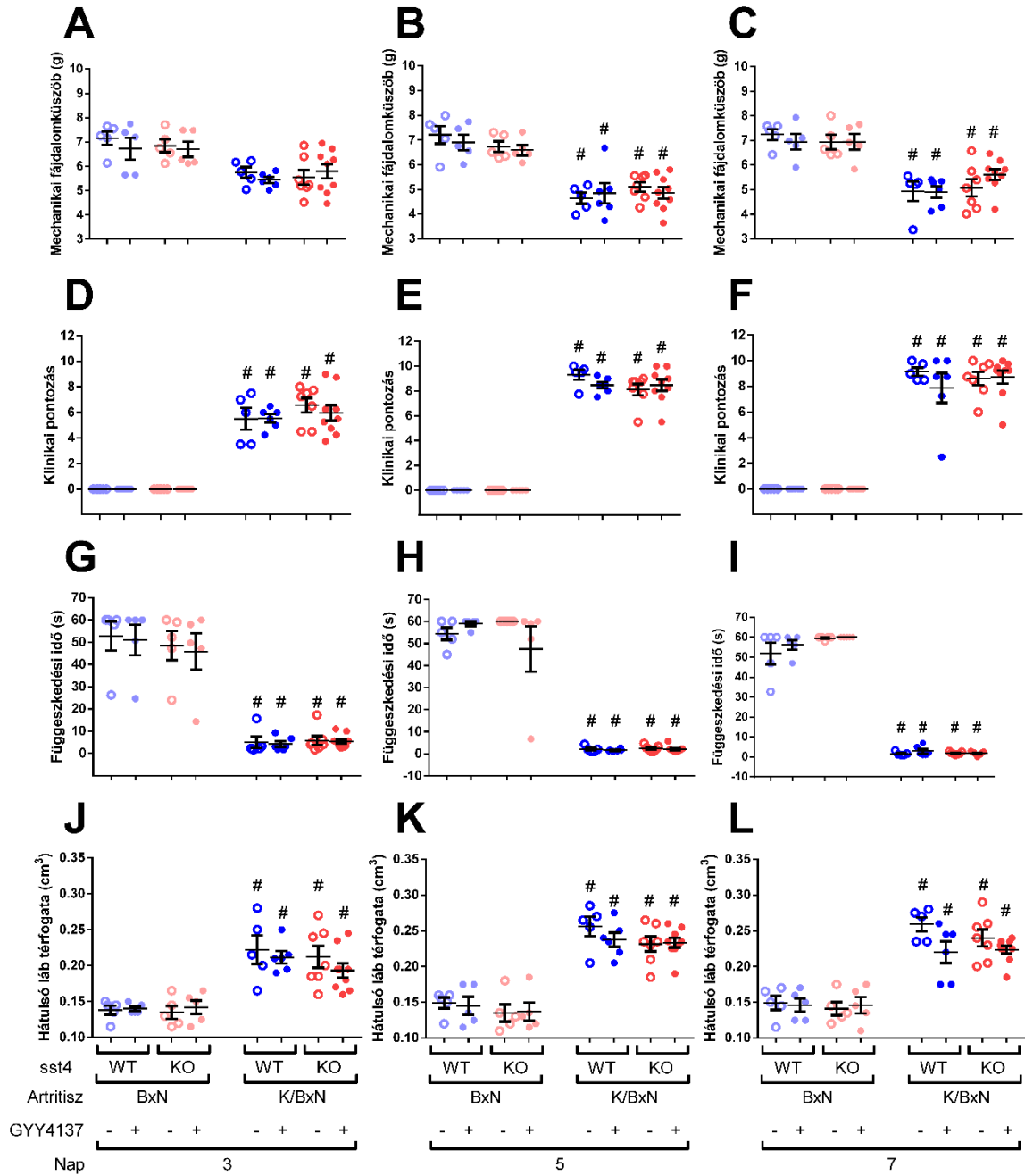


**6. ábra:** A GYY4137 fokozta a TRPA1 KO egerekben a hiperalgézia mértékét és javította a TRPA1 WT egerek végtagjainak általános állapotát. A mechanikai fájdalomküszöb grammban kifejezve arthritiszos és egészséges TRPA1 WT és KO GYY4137 (50 mg ttkg<sup>-1</sup> nap<sup>-1</sup>) illetve azonos térfogatú vehikulum kezelés során a 3. (A), 5. (B), és 7. (C) napokon. A végtagok állapotának szemikvantitatív pontozása a 3. (D), 5. (E), és 7. (F) napokon. Az egerek függeszkedéssel eltöltött ideje 3. (G), 5. (H), és 7. (I) napokon. Az egerek hátsó végtagjainak térfogatának átlaga cm<sup>3</sup>-ben kifejezve a 3. (J), 5. (K), és 7. (L) napokon.

és 7. (L) napokon. n=9-10 K/BxN kezelt csoportoknál és n = 6-9 a BxN kezelt csoportoknál. \*p < 0.05 vs. a jelzett csoport; #p < 0.05 vs. BxN kezelt kontroll csoport. (Bonferroni módosított poszt-teszttel kiegészített 2-utas ANOVA).

### **1.1.8. 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 artritisz súlyosságára, a függeszkedési időre és a lábtérfogatra vonatkozólag (WT, BxN, vehikulum kezelt, n = 5; WT, BxN, GYY4137 kezelt n = 5; WT, K/BxN, vehikulum kezelt n = 5; WT, K/BxN, GYY4137 kezelt n = 6; KO, BxN, vehikulum kezelt n = 5; KO, BxN, GYY4137 kezelt n = 5 ; KO K/BxN vehikulum kezelt n = 7 , KO, K/BxN, GYY4137 kezelt n = 9; nem ábrázolt eredmények; **7.A-L ábrák**).

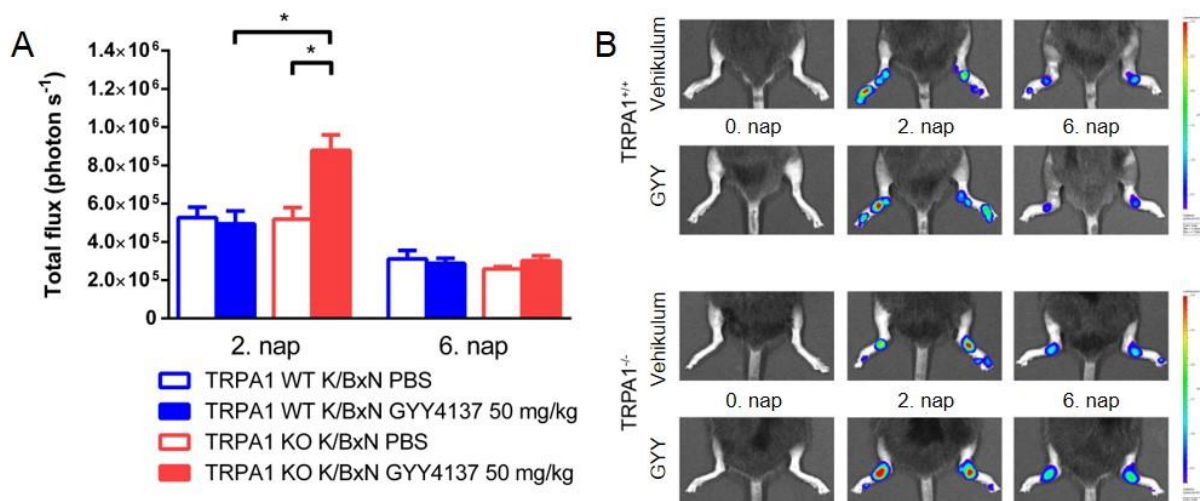


**7. ábra:** A GYY4137 nem befolyásolta a sst4 WT és KO egerekben a mechanikai fájdalomküszöböt, a végtagok állapotát, a függeszkedési időt és a ödéma képződést. A mechanikai fájdalomküszöb grammban kifejezve arthritisz és egészséges TRPA1 WT és KO egereknél GYY4137- (50mg ttkg<sup>-1</sup> nap<sup>-1</sup>), és azonos térfogatú vehikulum kezelés mellett a 3. (A), 5. (B), és 7. (C) napokon. A végtagok állapotának szemikvantitatív pontszáma 3. (D), 5. (E), és 7. (F) napokon. Az egerek függeszkedési ideje a 3. (G), 5. (H), és 7. (I) napokon. Az egerek hátsó végtagjai térfogatának átlaga cm<sup>3</sup>-ben kifejezve a 3. (J), 5. (K), és 7. (L) napokon. n=5-9 K/BxN kezelt csoportoknál és n = 5-5 a BxN kezelt csoportoknál. #p < 0.05 vs. BxN kezelt kontroll csoport. (Bonferroni módosított poszt-tesztel kiegészített 2-utas ANOVA).



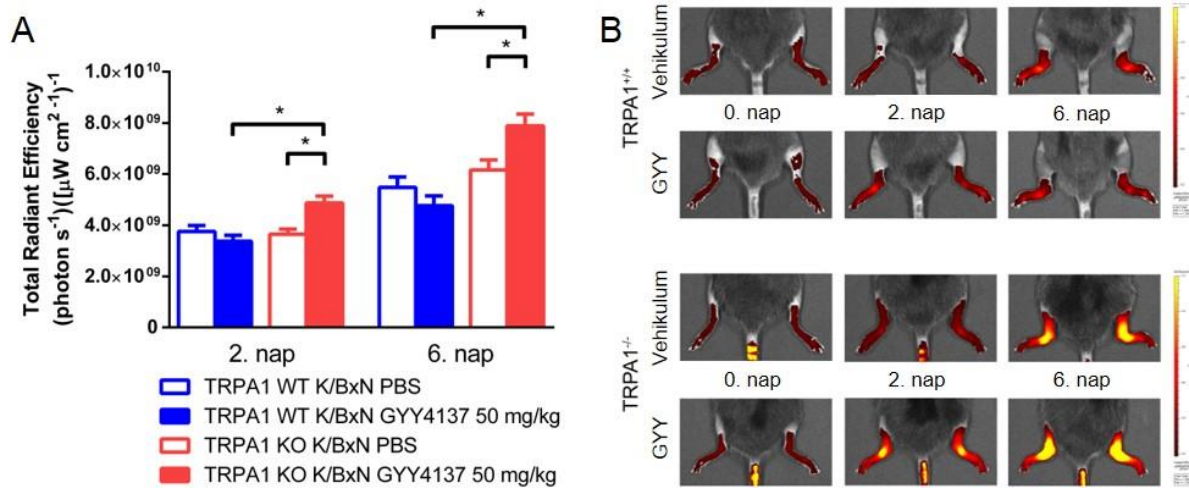
### 1.1.9. GYY4137 kezelés hatására fokozódott a neutrofil granulocita specifikus MPO aktivitás és a plazmafehérje extravazáció mértéke arthritisz TRPA1 KO egerekben

A neutrofil granulocita akkumulációval járó MPO aktivitást kemilumineszcenciával kimutató méréseinket a K/BxN szérum beadását követő 2. és 6. napon luminol segítségével végeztük. A GYY4137 kezelés hatására 2. napon fokozódott az MPO aktivitás az arthritisz TRPA1 KO egerek tibiotarzális ízületeiben, a vehikulummal kezelt társaikhoz képest ( $n=9-10$ ;  $8.79 \cdot 10^5 \pm 8.03 \cdot 10^4$  vs.  $4.94 \cdot 10^5 \pm 6.74 \cdot 10^4$  fotonok  $s^{-1}$ ; **8.A és B ábrák**). Továbbá szignifikánsan magasabb értékeket regisztráltunk, az arthritisz GYY4137 kezelt TRPA1 WT egerek értékeivel összehasonlítva is ( $n=9-10$ ;  $8.79 \cdot 10^5 \pm 8.03 \cdot 10^4$  vs.  $5.19 \cdot 10^5 \pm 6.04 \cdot 10^4$  fotonok  $s^{-1}$ ; **6.A és B ábrák**) A GYY4137 hatására szignifikánsan fokozódott a fluoreszcens IR-676 festékkel meghatározott extravazáció mértéke a 2 és 6. napokon az arthritisz TRPA1 KO egerekben a TRPA1 KO vehikulummal kezelt és a WT GYY4137-t kezelt arthritisz csoportokhoz viszonyítva ( $n = 9-10$ ; 2 napon:  $4.87 \cdot 10^9 \pm 2.73 \cdot 10^8$  vs.  $3.65 \cdot 10^9 \pm 2.0 \cdot 10^8$  és  $3.37 \cdot 10^9 \pm 2.3 \cdot 10^8$  (fotonok  $s^{-1}$ )( $\mu W \text{ cm}^{-2}$ ), (**9.A és B ábrák**); 6 napon:  $7.89 \cdot 10^9 \pm 4.58 \cdot 10^8$  vs.  $6.16 \cdot 10^9 \pm 3.91 \cdot 10^8$  és  $4.76 \cdot 10^9 \pm 3.89 \cdot 10^8$  (fotonok  $s^{-1}$ )( $\mu W \text{ cm}^{-2}$ )<sup>-1</sup>, (**9.A és B ábrák**).



**8. ábra:** A GYY4137 fokozta tibiotarzális ízület felett regisztrált MPO aktivitást a TRPA1 KO egerekben. **(A)** A GYY4137 ( $50 \text{ mg ttkg}^{-1} \text{ nap}^{-1}$ ) és vehikulum kezelt TRPA1 WT és KO egerek tibiotarzális ízületéből származó neutrofil granulocita MPO aktivitásra specifikus kemilumineszcens jel a 2. és 6. napokon az egy másodperc alatt emittált fotonok számában kifejezve. **(B)** Az egyes csoportokról készült reprezentatív képek az arthritisz indukcióját megelőzően (0. nap) és az azt követő

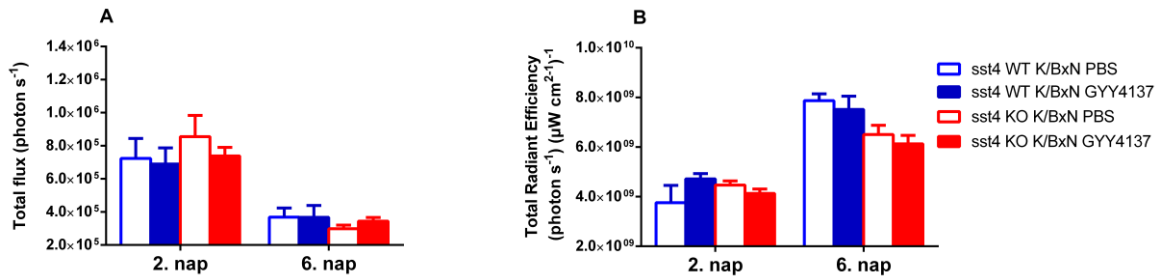
2. és 6. napokon.  $n = 9-10$  \* $p < 0.05$  vs. GYY4137 kezelt TRPA1 WT egerek # $p < 0.05$  vehikulum kezelt TRPA1 KO egerek. (Bonferroni módosított poszt-tesztel kiegészített 2 utas ANOVA).



**9. ábra:** A GYY4137 fokozta az extravazáció mértékét arthritisz TRPA1 KO egerekben. **(A)** Az extravazáció mértékének meghatározása a tibiotarzális ízületek felett az érpályából kilépő IR-676 fluoreszcens festék emissziós jele alapján GYY4137 (50 mg ttkg<sup>-1</sup> nap<sup>-1</sup>) és vehikulum kezelt TRPA1 WT és KO egerekben a 2. és a 6. napokon a sugárzás teljes hatékonyságaként kifejezve. (total radiant efficiency = (fotonok s<sup>-1</sup>)(μW cm<sup>-2</sup>)<sup>-1</sup>). **(B)** Az egyes csoportokról készült reprezentatív képek az arthritisz indukcióját megelőzően (0. nap) és az azt követő 2. és 6. napokon. n = 9-10 \*p <0.05 vs. GYY4137 kezelt TRPA1 WT egerek #p < 0.05 vehikulum kezelt TRPA1 KO egerek. (Bonferroni módosított poszt-tesztel kiegészített 2 utas ANOVA).

### 1.1.10. Az sst4 gén nincs hatással az arthritisz egerekben mért MPO aktivitásra és extravazációra.

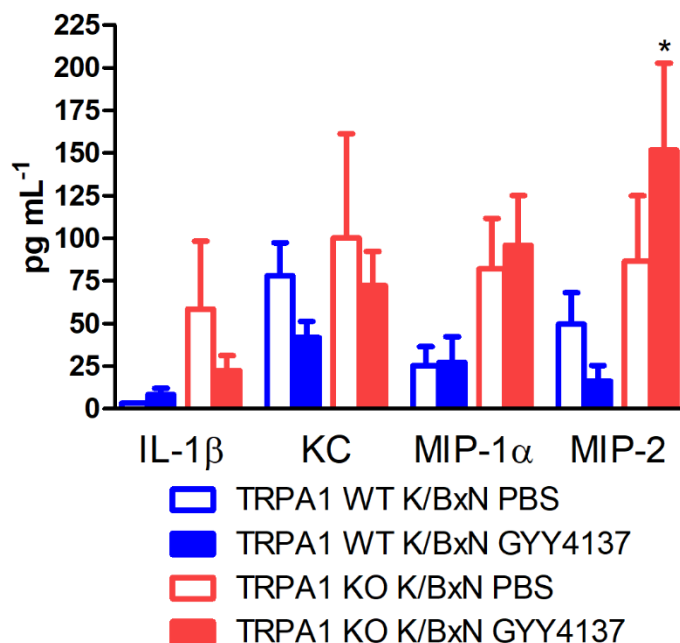
A kemilumineszcens MPO aktivitásra specifikus- és az extravazációt jellemző fluoreszcens képalkotó vizsgálatokat elvégeztük sst4 WT és KO arthritisz egereken is. Megfigyeléseink alapján nem találtunk szignifikáns különbséget az MPO aktivitásban és az extravazációban a vizsgált csoportok között (**10.A és B ábra**).



**10. ábra:** A GYY4137 nem befolyásolta a tibiotarzális ízület felett regisztrált MPO aktivitást a sst4 WT és KO egerekben. A GYY4137 (50mg ttkg<sup>-1</sup> nap<sup>-1</sup>) és vehikulum kezelt sst4 WT és KO egerek tibiotarzális ízületéből származó neutrofil granulocita MPO aktivitásra specifikus kemilumineszcens jel a 2. és 6. napokon az egy másodperc alatt emittált fotonok számában kifejezve. (**A. ábra**) A GYY4137 az extravazáció mértékére, szintén nem volt hatással. Az extravazáció mértékének meghatározása a tibiotarzális ízületek felett az érpályából kilépő IR-676 fluoreszcens festék emissziós jele alapján GYY4137 (50mg ttkg<sup>-1</sup> nap<sup>-1</sup>) és vehikulum kezelt sst4 WT és KO egerekben a 2. és a 6. napokon a teljes sugárzó hatékonyságaként kifejezve (**B. ábra**). n=5-9 K/BxN kezelt csoport.

### 1.1.11. Emelkedett a MIP 2 szintje a GYY4137 kezelés hatására az arthritiszos TRPA1 KO egerek hátsóvégtagjaiban.

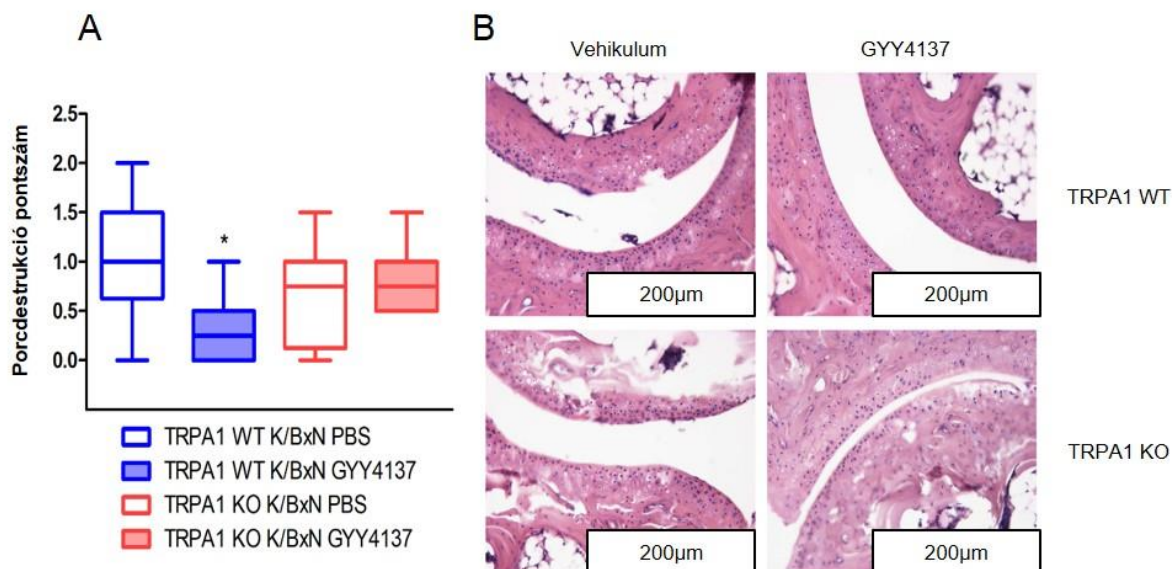
A szérum transzfer arthritiszos egerek lábainak atmoszája által nyert ízületi folyadék mintákban nem találtunk szignifikáns különbséget az IL-1β, KC és MIP-1α koncentrációját illetően. A GYY4137 kezelt TRPA1 KO egerekből származó minták esetén a MIP-2 szignifikánsan magasabbnak mutatkozott a WT párjaikhoz képest az értékek jelentős szórása ellenére (16.31 ± 9.14 vs. 151.8 ± 50.93 pg mL<sup>-1</sup>; **11. ábra**).



**11. ábra:** A MIP-2 szintje megemelkedett a GYY4137 kezelt TRPA1 KO egerek lábaiból származó mintákban. Az IL-1 $\beta$ , KC, MIP-1 $\alpha$  és MIP-2 koncentrációja pg ml<sup>-1</sup>-ben kifejezve arthritisztes TRPA1 WT és KO GYY4137 (50mg ttkg<sup>-1</sup> nap<sup>-1</sup>) illetve vehikulum kezelt egerek talpának 3. napon történő átmosásából származó mintákban. n= 6-8 egér/csoport; \*p <0.05 vs. GYY4137 kezelt TRPA1 WT egerek mintái.

### 1.1.12. Arthritisztes TRPA1 WT egerekben a GYY4137 enyhíti a szövettani elváltozások súlyosságát és az sst4 WT egerekben növelte a fibroblasztok számát és fokozta a kollagén lerakódás mértékét

A tibiotarzális ízületekből készített, HE festett szövettani metszeteken az ízületi felszín kisebb mértékű destrukciója volt megfigyelhető a GYY4137-tel kezelt TRPA1 WT egereknél a vehikulummal kezelt kontroll WT egerekkel szemben (n = 8-8, 0.3125  $\pm$  0.13 vs. 1.063  $\pm$  0.22; **12.A és B ábrák**). A GYY4137 porcvédő hatása hiányzott a TRPA1 KO egerek esetében. A többi vizsgált paraméterre vonatkozólag (mononukleáris sejtinfiltráció, szinoviális hiperplázia, fibroblaszt akkumuláció és kollagén depozíció és kompozit pontozás) nem találtunk eltérést a kísérleti csoportok között. A sst4 egerek esetében fokozott mértékű kollagén lerakódás és a fibroblasztok megnövekedett száma volt megfigyelhető (nerm ábrázolt adatok).



**12. ábra:** A GYY4137 hatására csökkent a porcdestrukció a TRPA1 WT egerek tibiotarzális ízületeiben. **(A)** A K/BxN szérumban részesült TRPA1 WT és KO GYY4137 ( $50\text{mg tkg}^{-1}\text{ nap}^{-1}$ ) illetve vehikulum kezelt egerek ízületi porcdestrukciójának szemikvantitatív pontozása. Az ízületek a 7. napról származnak, dekalifikációt követően hematoxilin-eozin festett metszetek készültek belőlük.  $n = 7-8$  egér/csoport \* $p < \text{vs. vehikulum kezelt TRPA1 WT egerek}$  Dunn-féle poszt-tesztel kiegészített Kruskal-Wallis teszt. **(B)** Reprezentatív mikroszkópos felvételek az egyes csoportok ízületeiről 200-szoros nagyítás mellett.

## 1.2. Új eredmények összefoglalása

*In vitro* igazoltuk, hogy a GYY4137-ből felszabaduló H<sub>2</sub>S 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 artritisz tüneteit. Vizsgálataink fényt derítettek a TRPA1 kiemelt szerepére a hidrogén-szulfid és inorganikus poliszulfid biológiai hatásait illetően. Az sst4 receptor szerepét azonban nem sikerült igazolnunk a GYY4137 hatásainak közvetítésében gén kiütött egerek segítségével (**1. táblázat**).

	GYY4137			
	TRPA1 WT	TRPA1 KO	sst4 WT	sst4 KO
Mechanikai hiperalgécia	↓	↑	—	—
Lábduzzadás	—	—	—	—
Függeszkedési idő	—	—	—	—
Artritisz score	↓	—	—	—
Neutrofil MPO aktivitás	—	↑	—	—
Plazmafehérje extravazáció	—	↑	—	—
MIP2 $\alpha$	—	↑	n.v.	n.v.
Szöveti elváltozások	↓	—	↑	—

**1. táblázat** A TRPA1 és az sst4 gén szerepe a GYY4137 kezelés mellett a K/BxN szérum transzfer artritisz modell vizsgált paramétereire. Jelmagyarázat: ↓: szignifikánsan csökkent s vehikulummal kezelt csoprothoz képest; —: nem változott vehikulummal kezelt csoprothoz

képest; ↑: szignifikánsan emelkedett vehikulummal kezelt csoporthoz képest; n.v.: nem vizsgált paraméter.

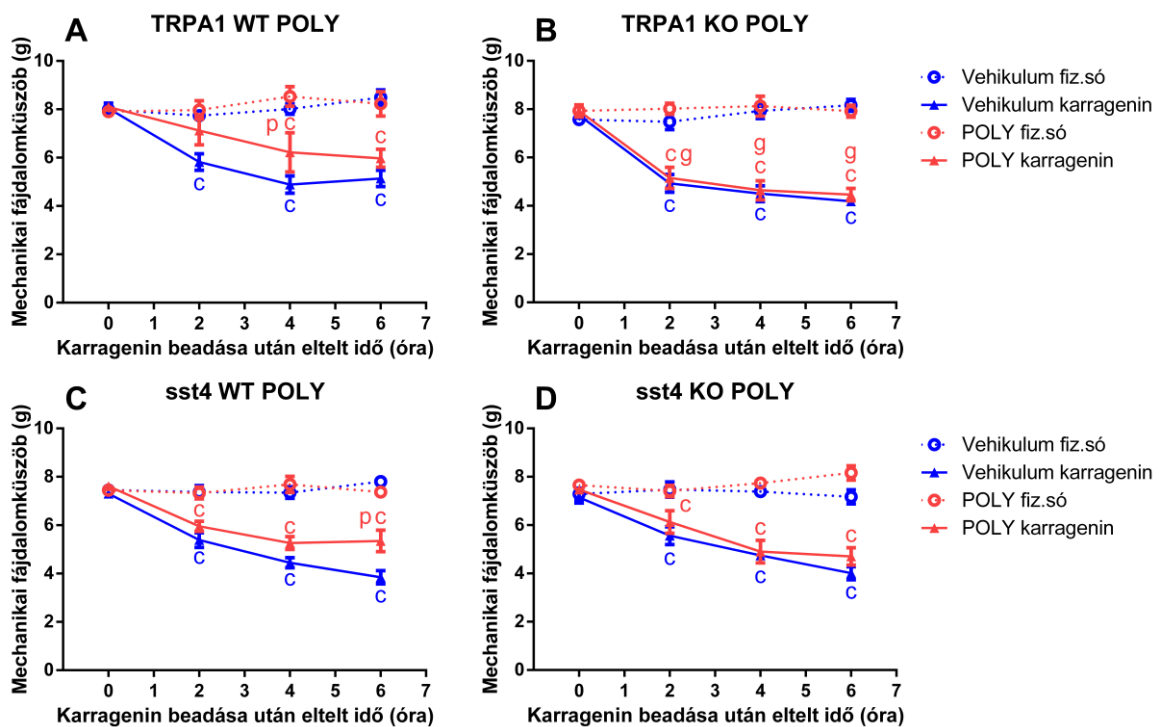


## **2. Az inorganikus poliszulfid és a DMTS hatásai a karragenin indukálta akut gyulladás modelljében TRPA1 és sst4 KO egerekben**

### **2.1. Eredmények**

#### **2.1.1 Akut gyulladásban a POLY mechanikai fájdalmat csökkentő hatását a TRPA1 és sst4 közvetíti**

A vehikulummal kezelt TRPA1 WT és KO egerekben karragenin hatására egyaránt szignifikánsan csökkent a mechanikai fájdalomküszöb nagysága a kontralaterális, fiziológias sóoldattal kezelt lábhoz képest (**13.A és B ábra**). A POLY kezelés TRPA1 WT egerekben szignifikánsan csökkentette a karragenin okozta mechanikai hiperalgécia nagyságát a vehikulummal kezelt egerekhez képest ( $4.89 \pm 0.36$  vs.  $6.22 \pm 0.81$  a 4. órában;  $n = 6-7$ ; **13.ábra**). Ezzel szemben a POLY fájdalomcsillapító hatása nem érvényesült a TRPA1 KO egerekben, továbbá a karragenin kezelt oldalon az összes mérési időpontban szignifikáns különbség mutatkozott a POLY kezelt TRPA1 WT és KO egerek fájdalomküszöb értékei között ( $7.12 \pm 0.6$  vs.  $5.16 \pm 0.44$  g,  $6.22 \pm 0.81$  vs.  $4.64 \pm 0.4$  g,  $5.97 \pm 0.37$  vs.  $4.46 \pm 0.26$  g értelemszerűen a 2., 4. és 6. órában mérve;  $n = 6-7$ ; **13.B ábra**). A POLY vehikulumával kezelt sst4 WT és KO egerekben – a TRPA1 egerekhez hasonlóan – szignifikáns fájdalomküszöb esést váltott ki a karragenin a fiziológias sóoldattal kezelt ellenoldallal szemben ( $n = 6-8$ ; **13.C és D ábrák**). sst4 WT egerekben a POLY a vehikulum kezeléshez képest hatásosan emelte a fájdalomküszöböt a hatodik órára a karragenin stimulált oldalon ( $3.85 \pm 0.27$  vs.  $5.35 \pm 0.45$  g, 6. órában mérve;  $n = 7-8$ ; **13.C ábra**). A POLY hatástalannak bizonyult sst4 KO egerekben a mechanikai fájdalmat illetően. Genotípustól függetlenül a POLY kezelés indifferens volt a fiziológias sóoldattal kezelt lábak fájdalomküszöb-értékeire, azaz a kontroll oldalon végzett méréseket nem befolyásolta (**13.A-D ábrák**).

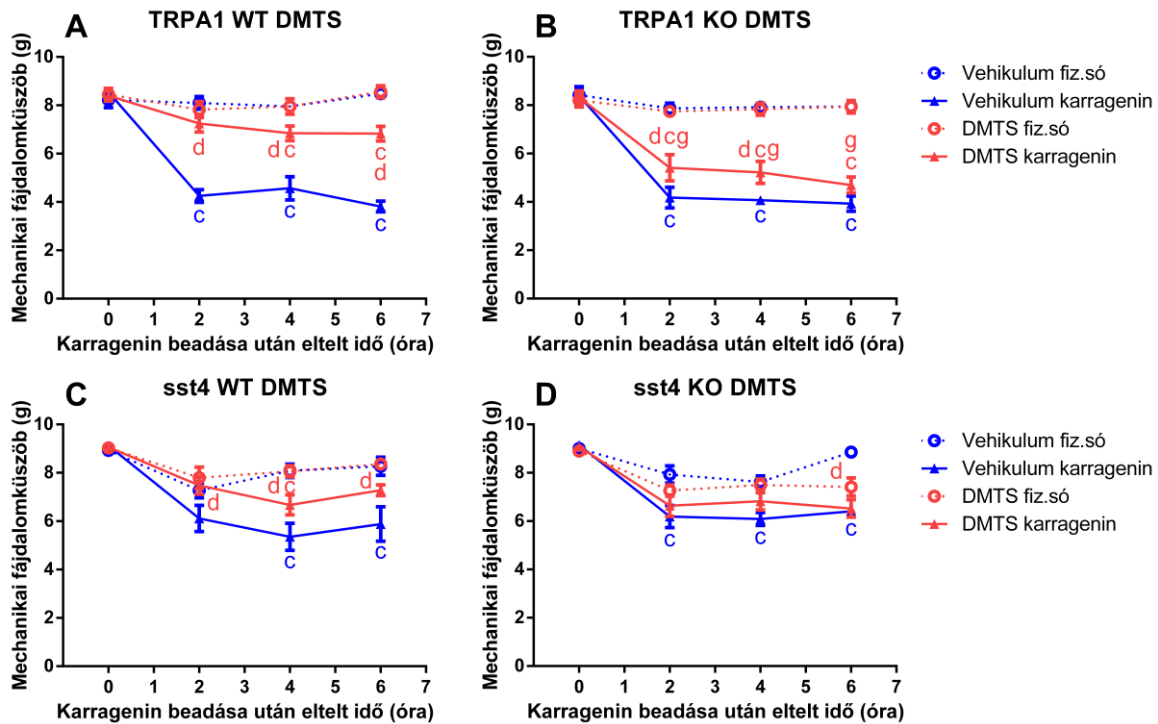


**13. ábra:** Az inorganikus poliszulfid (POLY, 17  $\mu\text{mol tkg}^{-1}$ ) antinociceptív hatásait a TRPA1 és sst4 receptorok közvetítik a karragenin által kiváltott akut gyulladás modelljében. A hátsó végtagok mechanikai fájdalomküszöbe grammokban kifejezve a fiziológias sóoldat, vagy karragenin (3 m/v% 20  $\mu\text{l}$  fiziológias sóoldatban) beadását követően az i.p. POLY vagy vehikulum kezelés mellett (A) TRPA1 WT, (B) TRPA1 KO (C) sst4 receptor WT és (D) sst4 receptor KO egerekben.  $n=6-8$  egér/csoport;  $^c p < 0.05$  vs. fiziológias sóoldattal kezelt láb;  $^p p < 0.05$  vs. vehikulum kezelés;  $^s p < 0.05$  vs. TRPA1 WT egerek azonos lába (Bonferroni módosított poszt-tesztel kiegészített 2-utas ANOVA).

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

TRPA1 WT és KO egerekben a DMTS oldószerre nem befolyásolta a hiperalgémia kialakulásának mértékét, a szignifikáns különbség mindhárom mérési időpontban fennállt a fiziológiás, illetve karrageninnel kezelt oldal között (n = 6-7; **14.A és B ábrák**). A DMTS kezelés TRPA1 WT egerekben a karragenin okozta hiperalgémia nagymértékben csökkentette. A DMTS fájdalomcsillapító hatása jelentősen kisebb mértékben érvényesült a TRPA1 KO egerekben összehasonlítva vad típusú párjaikkal (n = 6-7; **14.A ábra**). Ennek ellenére a DMTS kezelés TRPA1 KO egerekben is hatékonynak bizonyult a 2. és 4. órában a vehikulummal kezelt csoporttal összehasonlítva (n = 7; **14.B ábra**). A DMTS illetve vehikulummal kezelt TRPA1 WT és KO egerek fiziológiás sóoldattal kezelt lábainak fájdalomküszöbei nem tértek el egymástól (**14.A és B ábrák**).

A karragenin okozta mechanikai hiperalgémia ugyancsak kialakult sst4 WT és KO egerekben vehikulum kezelés mellett, a kontralaterális, fiziológiás sóoldattal kezelt oldalhoz képest (n = 7-8; **14.C és D ábrák**). sst4 WT egerekben karrageninnel kezelt oldal esetén a DMTS kezelés a vehikulummal szemben kicsi, de szignifikáns mértékben emelte a fájdalomküszöb értékét (n = 7; **14.C ábra**). Nem volt különbség az sst4 WT egerek fiziológiás sóoldattal kezelt lábain mért a mechanikai fájdalomküszöb nagyságában függetlenül az alkalmazott kezeléstől (**14.C ábra**). A DMTS alkalmazása nem gátolta a karragenin által kiváltott mechanikai hiperalgémia kifejlődését sst4 KO egerekben (**14.D ábra**). Érdekes, hogy a DMTS kezelés hatására a fájdalomküszöb szignifikánsan alacsonyabb értéken maradt a 6. órában a fiziológiás sóoldattal kezelt sst4 KO egerek lábait illetően összehasonlítva az azonos, de vehikulum kezelésben részesülő csoporttal szemben (n = 7-8; **14.D ábra**).



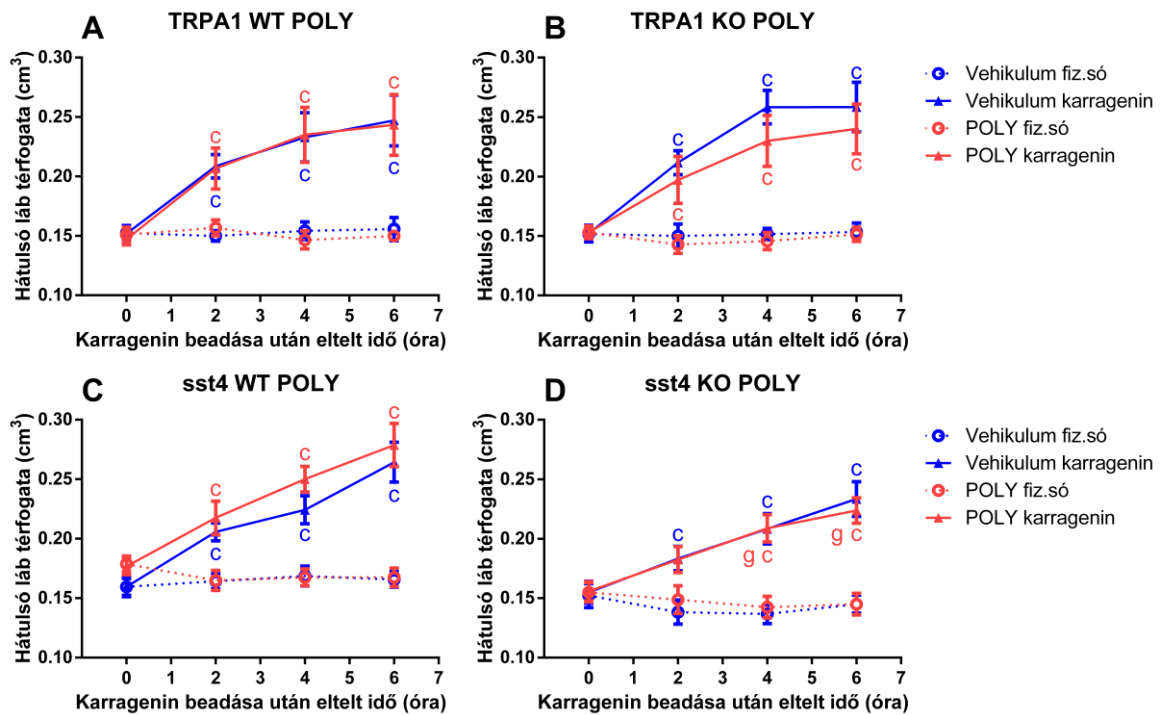
**14. ábra:** A DMTS ( $250 \mu\text{mol tkg}^{-1}$ ) csökkentette a karragenin hatására kialakuló hiperalgéziát. A hatás kialakításához, hozzájárult a TRPA1 receptor, azonban az sst4 receptor jelenléte nélkülözhetetlen volt. A hátsó végtagok mechanikai fájdalomküszöb értéke grammban kifejezve a fizioológias sóoldat, vagy karragenin ( $3 \text{ m/v}\%$   $20 \mu\text{l}$  fizioológias sóoldatban) beadását követően az i.p. DMTS vagy vehikulum kezelés mellett.  $n=6-8$  egér/csoport;  $^c p < 0.05$  vs. fizioológias sóoldattal kezelt láb;  $^p p < 0.05$  vs. vehikulum;  $^s p < 0.05$  vs. TRPA1 WT egerek (Bonferroni módosított poszt-teszttel kiegészített 2 utas ANOVA).

### 2.1.3. A POLY nincs hatással a karragenin okozta akut gyulladással járó lábtérfogat növekedésre

TRPA1 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 ( $n = 6-7$ ; **15.A és B ábrák**). Igaz, hogy szignifikáns különbséget nem regisztráltunk a lábtérfogat növekedését illetően, mégis megfigyelhető a TRPA1 KO egereknél a POLY kedvező hatása a vehikulummal kezelt társaikkal szemben ( $n = 6-7$ ; **15.B ábra**).

sst4 WT és KO egereknél szintén minden esetben kialakult a szignifikáns ödéma képződés a karragenin kezelés hatására. Adott sst4 WT és KO egereknél a POLY összehasonlítva a

vehikulum kezeléssel nem volt hatással a lábterfogat változására (n = 6-8; **15.C és D ábrák**). Ugyanakkor jelentős különbséget mutatkozott a POLY-val kezelt sst4 WT és KO egerek karrageninnek kitett lábai között a 4. és a 6. órában (n = 8; **15.D ábra**). A fiziológiás sóoldattal kezelt láb térfogatára egyik változó sem gyakorolt hatást (**15.C és D ábrák**).

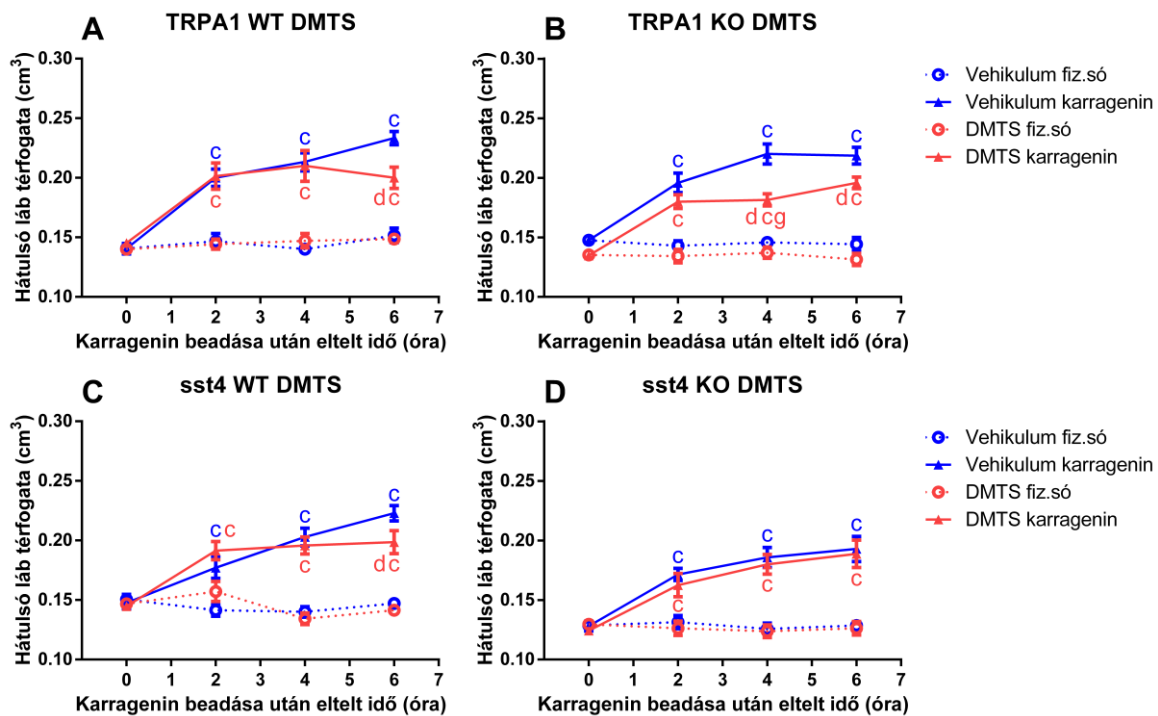


**15. ábra:** Az inorganikus poliszulfid (POLY, 17 $\mu$ mol ttkg<sup>-1</sup>) nem befolyásolta a végtagok duzzadását a karragenin beadását követően. A hátsó végtagok térfogata cm<sup>3</sup>-ben kifejezve a fiziológiás sóoldat, vagy karragenin (3 m/v% 20  $\mu$ l fiziológiás sóoldatban) beadását követően az i.p. POLY vagy vehikulum kezelés mellett (A) TRPA1 WT, (B) TRPA1 KO (C) sst4 receptor WT és (D) sst4 receptor KO egerekben. n=6-8 egér/csoport; \*p < 0.05 vs. fiziológiás sóoldattal kezelt láb. (Bonferroni módosított poszt-teszttel kiegészített 2 utas ANOVA).

#### **2.1.4. A DMTS TRPA1 független és sst4 függő módon képes csökkenteni az ödémaképződést.**

A karragenin beadását követően a fiziológias sóoldathoz képest szignifikáns mértékű lábduzzadás jött létre a választott kezeléstől függetlenül, TRPA1 WT és KO egerekben egyaránt (n =6-7; **16.A és B ábra**). TRPA1 WT egerekben a DMTS hatására a vehikulum kezeléssel szemben csökkent ödémaképződés volt megfigyelhető a 6. órára (n = 6-7; **16.A ábra**). Ez a hatás TRPA1 KO egerekben még kifejezettebben érvényesült, szignifikánsan kisebb értékeket mértünk a DMTS kezelés hatására, már a 4. és 6. órában is (n = 7; **16.B ábra**). Tovább erősíti ezen megfigyelést a DMTS kezelt TRPA1 KO egereknél a 4. órában regisztrált jelentősen kisebb lábtérfogat WT társaikkal szemben (n =.7; **16.B ábra**)

Az sst4 gén jelenléte vagy hiánya, illetve mindkét fajta beavatkozás esetén is szignifikáns ödémaképződés történt a karrageninnel stimulált oldalon (n = 7-8; **16.C és D ábrák**). sst4 WT egerekben a DMTS mérsékelte a lábduzzadás mértékét a vehikulum kezeléshez képest (n = 7; **16.C ábra**). A DMTS nem befolyásolta a pletizmográfias eredményeket sst4 KO egerekben (n = 8; **16.D ábra**). A DMTS kezelés egyik törzs esetén sem volt hatással a kontroll láb térfogatára (n = 7-8; **16.C és D ábrák**).



**16. ábra:** A DMTS ( $250 \mu\text{mol ttkg}^{-1}$ ) a TRPA1 receptortól függetlenül gátolja az ödémaképződést az sst4 receptor meglétekor. A hátsó végtagok térfogata  $\text{cm}^3$ -ben kifejezve a fiziológias sóoldat, vagy karragenin beadását követően az i.p. DMTS vagy vehikulum kezelés mellett (A) TRPA1 WT, (B) TRPA1 KO (C) sst4 receptor WT és (D) sst4 receptor KO egerekben.  $n=6-8$  egér/csoport;  $^c p < 0.05$  vs. fiziológias sóoldattal kezelt láb;  $^d p < 0.05$  vs. vehikulum kezelés;  $^s p < 0.05$  vs. TRPA1 WT egerek azonos lába (Bonferroni módosított poszt-tesztel kiegészített 2 utas ANOVA).

### 2.1.5. A POLY nem volt hatással a neutrofil specifikus MPO aktivásra karrageninrel kiváltott akut gyulladás során

Az MPO aktivitás egyaránt fokozódott a karrageninrel kezelt TRPA1 WT és KO egerek hátsó végtagjaiban. A POLY nem volt lényeges hatással a karrageninrel kezelt lábak értékeire, továbbá nem okozott változást a kontroll végtagokban vehikulummal kezelt állatokhoz képest sem (17.A és B ábrák).

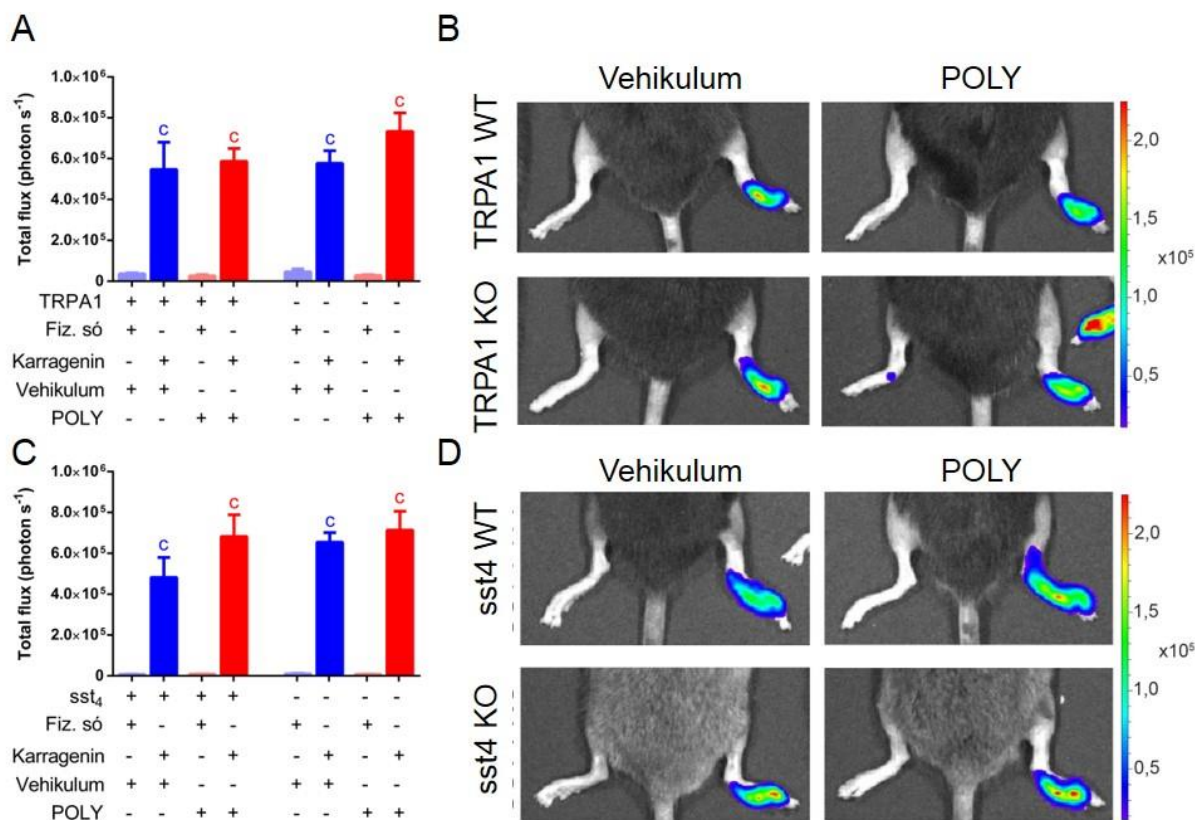
sst4 WT és KO egereknél ugyancsak kialakult a fokozott MPO aktivitás a karragenin beadását követően és a gén megléte vagy hiánya nem okozott különbséget (17.C és D ábrák). Törzstől függetlenül a POLY vagy vehikulum kezelés nem befolyásolta az ipszi- illetve kontralaterális oldalon regisztrált értékek nagyságát (17.A-D ábrák).

### **2.1.6. A DMTS sst4 WT és KO egerekben egyaránt csökkentette a neutrofil granulociták MPO aktivitását a karrageninnel kezelt lábokban**

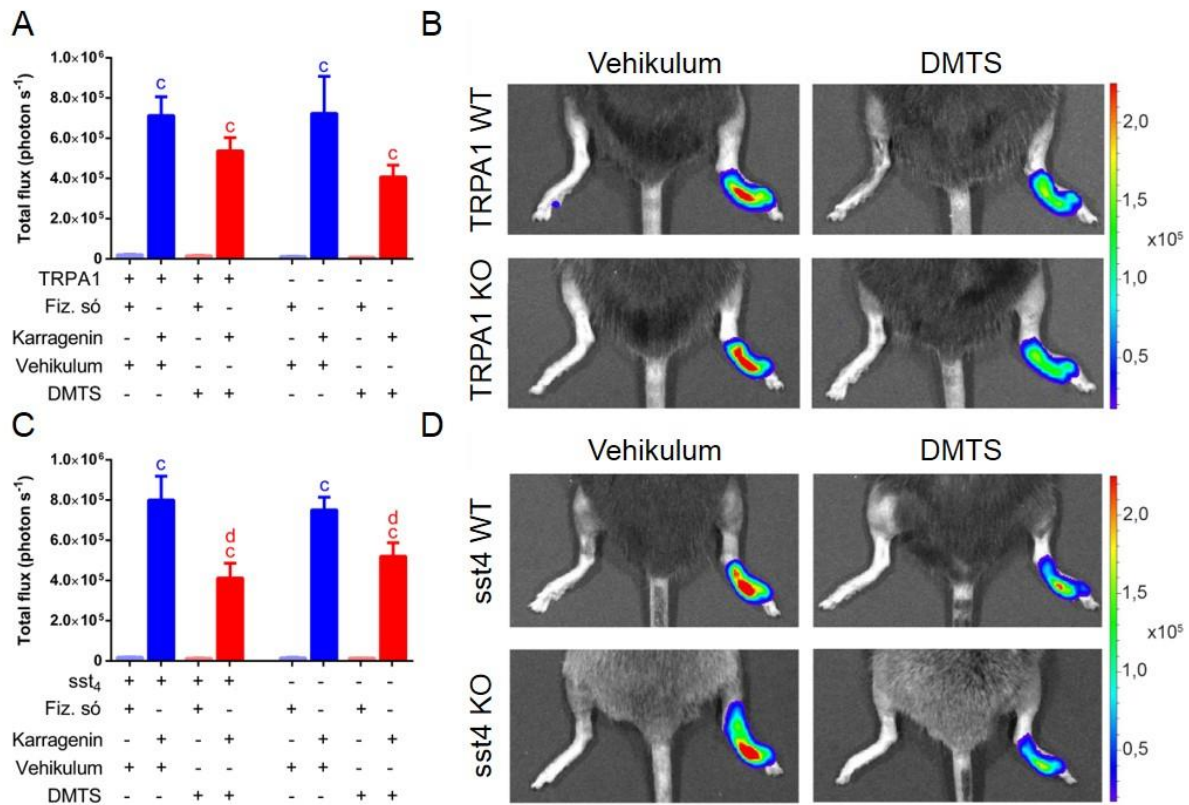
TRPA1 WT és KO egerekben a DMTS illetve vehikulum kezelés mellett is szignifikánsan emelkedett az MPO aktivitás a karragenin beadását követően ipszilaterálisan, a kontralaterális, fiziológiás sóoldattal kezelt lábához képest. Annak ellenére, hogy ne volt kifejezett különbség a csoportok között, mégis mindkét törzsben egyaránt megfigyelhető volt a DMTS MPO aktivitáscsökkentő hatása a gyulladt lábokban a vehikulum kezeltekhez képest. sst4 WT és KO egerekben a TRPA1 WT és KO egerekhez hasonlóan szignifikánsan emelte az MPO aktivitást a karragenin beadásával kiváltott gyulladás a fiziológiás sóoldattal kezelt lábakkal szemben **(18.A és B ábrák)**.

Ellenben, ameddig a DMTS a TRPA1 törzsek esetében csak mérsékelt különbséget okozott, addig az sst4 WT és KO egerek karrageninnel kezelt lábaiban szignifikánsan kisebb MPO aktivitást mértünk, mint a vehikulummal kezelt egerek esetében **(18.C és D ábrák)**. A fiziológiás sóoldattal kezelt oldalon a DMTS vagy vehikulum kezelés indifferens hatással bírt a regisztrált értékekre az összes törzs esetén **(18.A és D ábrák)**.





**17. ábra:** Az inorganikus poliszulfid (POLY, 17 $\mu$ mol ttkg<sup>-1</sup>) nem csökkentette a luminollal meghatározott MPO aktivitást a karrageninnel kiváltott akut gyulladás modellben. (A) TRPA1 WT és KO POLY kezelt egerek egészséges és gyulladt (karragenin 3 m/v% 20  $\mu$ l fiziológias sóoldatban) lábaiból származó kemilumineszcencia és a (B) hozzájuk tartozó reprezentatív képek. (C) sst4 WT és KO POLY kezelt egerek egészséges és karrageninnel (3 m/v% 20  $\mu$ l fiziológias sóoldatban) kezelt lábaiból származó kemilumineszcencia és a (D) hozzájuk tartozó reprezentatív képek. n=7-8 egér/csoport;  $^{\circ}$ p < 0.05 vs. fiziológias sóoldattal kezelt láb (Bonferroni módosított poszt-teszttel kiegészített 1 utas ANOVA).



**18. ábra:** A DMTS (250  $\mu\text{mol tkg}^{-1}$ ) sst4 WT és KO egerekben szignifikánsan csökkentette a luminállal meghatározott MPO aktivitást a karragenin beadását követő 6. órában. (A) TRPA1 WT és KO POLY kezelt egerek egészséges és karragenin (3 m/v% 20  $\mu\text{l}$  fiziológiás sóoldatban) által gyulladásba hozott lábaiból származó kemilumineszcencia és a (B) hozzájuk tartozó reprezentatív képek. (C) sst4 WT és KO POLY kezelt egerek egészséges és karragenin (3 m/v% 20  $\mu\text{l}$  fiziológiás sóoldatban) kezelt lábaiból származó kemilumineszcencia és a (D) hozzájuk tartozó reprezentatív képek.  $n=6-9$  egér/csoport;  $^{\text{c}}p < 0.05$  vs. fiziológiás sóoldattal kezelt láb;  $^{\text{c,d}}p < 0.05$  vs. vehikulum kezelésben részesült egér karrageninnel kezelt lába (Bonferroni módosított poszt-teszttel kiegészített 1 utas ANOVA).

## 2.2. Új 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 bír. A jelenséget igazolja, hogy TRPA1 KO és sst4 KO egerekben nem volt kimutatható a poliszulfid hiperalgéria 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 ödémaképződés mértékére. Ellenben a DMTS csökkentette a gyulladt végtagok térfogatnövekedését TRPA1 WT és KO, illetve sst4 WT egerekben is. A megfigyeltet 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 hiperalgéria	↓	↓	↓	—	↓	↓	—	—
Lábduzzadás	↓	—	↓	—	↓	—	—	—
Neutrofil MPO aktivitás	(↓)	—	(↓)	—	↓	—	↓	—

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

## MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

A K/BxN szérumsztransfer artritisz 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. Artritiszes 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 H<sub>2</sub>S donor. Részletesebben megvizsgálva, a TRPA1 WT egerekben mérséklődött a hiperalgézia, csökkent a gyulladás külső jeleit értékelő pontszám és mérséklődött a porcdestrukció mértéke az ízületek felszínén. Ezzel szemben a TRPA1 KO egerekben fokozódott a hiperalgézia, emelkedett az MPO aktivitás és extravazáció mértéke, továbbá emelkedett a MIP-2 proinflammatorikus citokin koncentrációja az artritiszes hátsó végtagokban. Mérési eredményeink alapján erős bizonyítékot találtunk arra vonatkozólag, hogy paradigmánk során nem a közvetlenül felszabaduló H<sub>2</sub>S 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 szérumsztransfer artritisz az összes vizsgálati törzsben kialakult, és a TRPA1 WT egerekben GYY4137 kezelés mellett csökkent a betegség külsőleg megítélhető manifesztációja az 5. napon értékelve. Eredetileg nem anticipált, váratlan eredmények születtek a függeszkedési idők tekintetében. A nem artritogén BxN szérumsztransferrel kezelt kontroll állatok között a TRPA1 KO egerek teljesítménye konzekvensen alulmaradt a WT egerekhez viszonyítva. A különbség egyaránt jelentkezett a GYY4137- és vehikulum kezelés mellett is. A teszt során az állatok többnyire izometrikus izommunkát végeznek. Ez némileg párhuzamba állítható Craighead et al. eredményeivel, amely során atlétáknál TRPA1 és TRPV1 agonisták segítségével késleltetni lehetett a izometriás terhelés során jelentkező izomgörcs jelentkezését (Craighead et al., 2017). TRPA1 KO egerek WT társaikhoz képes jelentősen rosszabbul teljesítettek a rotaroddal végzett a motoros funkciókra irányuló komplex vizsgálati teszteken (Lee et al., 2017).

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 (Fox et al., 2012). *In vivo*, egerek térd ízületébe CFA beadásával kiváltott akut gyulladás modelljében is igazolódott a GYY4137 protektív hatása (Li et al., 2013). Ezen korábbi publikációkkal összhangban, a TRPA1 WT egerektől származó eredményeink (csökkent mechanikai hiperalgészia, 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 arthritisz TRPA1 KO egerek lábterefogataiban nem okozott eltérést a GYY4137 kezelés, ellenben markánsan emelte a képzővizsgálatok során az extravazáció mértékét. A jelenség hátterében 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 lábterefogat mérésével ellentétben az ödéma képződésének és oldódásának kumulatív mértékéről ad tájékoztatást. Hasonlóan szemlátomást provokatív eredménynek tűnhet az MPO aktivitás, MIP-2 $\alpha$  koncentráció és a szövettanilag értékelt mononukleáris sejt infiltráció között fennálló látszólagos diszkrépancia. Ismételt, figyelembe kell vennünk az egyes mérések temporális eloszlását, miszerint a neutrofil granulocita MPO aktivitására specifikus méréseinket a 2. nap végeztük, a gyulladt lábak atmoszférájából származó minták citokin meghatározását az arthritogén K/BxN szérumbeadását követő 3. napon értékeltük és a szövettani analízis a 7. napon terminált állatok tibiotarzáris ízületéből származik. A K/BxN szérumbeadás modell több fázisra osztható és a kezdeti napokban jelentkező neutrofil akkumulációt az idő előre haladásával egyre inkább mononukleáris sejtek infiltrációja váltja fel.

Hogyan lehetséges, hogy egy nocicepcióért felelős receptor aktiválódása gyulladáscsökkentő 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<sup>2+</sup> influx hatására szomatosztatin szabadul fel az idegvégződésekből (Pethő et al., 2017; Pozsgai et al., 2017a). A jelenségről, miszerint fájdalmas ingerek hatására megemelkedik a keringésben a szomatosztatin szintje, állatkísérletek mellett humán adatok is rendelkezésre állnak (Helyes et al., 2004; Antal et al., 2008; Suto et al., 2010). A szomatosztatin fájdalom- és gyulladáscsökkentő hatást fejt ki a sst4 receptoron keresztül. Számos helyen expresszálódik az sst4 receptor, többek között neuronokon, limfocitákon és vaszkuláris endotél sejteken is (Pintér et al., 2006; Sándor et al., 2006). 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 kiütött 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. A szomatosztatin nem kizárólag az sst4 receptoron fejt ki gyulladásgátló hatásait. Többek között monociták, makrofágok és szinoviociták is expresszálnak sst2 receptorokat (Dalm et al., 2003). Ismert a makrofágok kulcsfontosságú szerepe a K/BxN szérumsztransfer artritisz modell patogenezisében (Christensen et al., 2016). Casnici és munkatársai *in vitro* kimutatták, hogy a sst2 agonista octreotid gátolta a reumatoid artritiszes betegekből származó stimulált primér szinoviociták proinflammatorikus citokin termelését (Casnici et al., 2018). Az eredményeink értelmezése során, az sst4-n keresztül érvényesülő antiinflammatorikus hatások mellett, érdemes újra kiemelni a szomatosztatinnal egyidejűleg felszabaduló opioid peptidek jelenlétét is (Pethő et al., 2017).

Nem kizárható, hogy a GYY4137 kedvező hatása származhat a nem neuronális, immunsejteken elhelyezkedő TRPA1 receptorok aktivációjából is. A K/BxN szérumsztransfer artritisz patomechanizmusában – a korábban már említett makrofágokon kívül – lényeges szerepet játszanak a T-sejtek és a neutrofil granulociták is (Christensen et al., 2016). CD4<sup>+</sup> T sejteken mRNS és fehérje szinten is sikerült validálni a TRPA1 receptor jelenlétét, amelyek elektrofiziológiailag is funkcióképesnek bizonyultak (Bertin and Raz, 2016). *In vivo* az autoimmun kolitisz egérmodelljében a TRPA1 KO egerek betegsége súlyosabb volt a WT társaikhoz képest és a TRPA1 aktiváció képes volt csökkenteni a Th1 sejtek mediálta immunválaszt (Bertin et al., 2017). TRPA1 pozitív CD4<sup>+</sup> T sejtek jelenlétét írták le a pszoriázis állatmodelljében, ahol ugyancsak protektív, immunszuppressziót váltott ki a TRPA1 aktiváció (Kemény et al., 2018). Fokozódott a TRPA1 expresszió a RA betegek vérmintáiból származó leukocitákon (Pereira et al., 2017). A makrofágokon is leírásra került a

TRPA1 receptor jelenléte. Allil-izotiocianát hatására csökkent az ApoE<sup>-/-</sup> egerekben az arterioszklerózis súlyossága, ezzel fordítottan, a betegség fokozódását figyelték még TRPA1 receptor hiánya vagy gátlása esetén (Zhao et al., 2016). Összeségében az irodalomban fellelhető bizonyítékok alapján, feltételezhető, a poliszulfid közvetlen immunsejteken jelentkező TRPA1 mediálta gátlása.

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. A NaHS képes volt tartósan aktiválni az egészséges önkéntesekből származó perifériás makrofágokban a pro- és antiinflammatorikus jellemzőkkel is rendelkező ap38/Akt és CREB útvonalakat *in vitro* (Sulen et al., 2016). Különböző gyulladással járó állatmodellben súlyosbodott a betegség hidrogén-szulfid kezelés hatására, illetve az endogén hidrogén-szulfid termelés gátlása előnyösnek bizonyult. A publikációk alapján a hidrogén-szulfid PI3K/Akt/Sp1, COX2 és NF- $\kappa$ B útvonalakon keresztül fejtette ki proinflammatorikus hatásait. Jelen kísérleteinkben megfigyeltek alapján a TRPA1 mediálta antiinflammatorikus hatások domináltak a proinflammatorikus hatásokkal szemben (Ang et al., 2011; Badiei et al., 2013; Gaddam et al., 2016; George et al., 2016; Liu et al., 2016, 2017; Ahmad et al., 2017). 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 (Qin et al., 2017). A MIP-2 hatását a neutrofileken kifejeződő CXCR2 receptor közvetíti. A K/BxN szérumsztransfer artritisz modellben a MIP-2 fő forrása az aktivált makrofágok, amit tovább bizonyít a makrofág depletált egerek relatív védettsége az artritisz kifejlődésével szemben (Christensen et al., 2016). A TRPA1 receptor hatással lehet a MIP-2 szekréciójára. Bizonyos modellekben a TRPA1 KO egerek esetében alacsonyabb szintben volt kimutatható (Moilanen et al., 2015).



A kísérleteink során feltételezzük, hogy az elnyújtott hatású hidrogén-szulfid donor GYY4137, valójában a gyulladt szövetekre specifikus, nagy affinitású poliszulfid donorként viselkedhet. A GYY4137 bomlási kinetikája erősen hőmérséklet és pH-függő; magasabb hőmérsékleten és alacsonyabb pH-n fokozódik a donor a H<sub>2</sub>S leadása (Li et al., 2008). Általánosan elfogadott, hogy a gyulladás hatására csökkenhet a szöveti pH, továbbá RA-es beteg szinoviális folyadékjának pH-ja is alacsonyabbnak bizonyult a kontroll csoportokhoz képest (Ward and Steigbigel, 1978; Farr et al., 1985). Nagy és Winterbourne kísérletesen bizonyította, hogy a hidrogén-szulfid a neutrofil granulociták MPO enzimeje által termelt hipoklórossavval reakcióba lépve poliszulfiddá alakul át (Nagy and Winterbourn, 2010). Eredményeink egyik lehetséges magyarázata, hogy a gyulladt szövetekben fokozottan felszabaduló hidrogén-szulfid reakcióba lép a neutrofil granulocitákból származó hipoklórossavval. A hipoklórossav csökkent szintje érthető módon képes fokozni a neutrofilek MIP-2 termelését, ami ezáltal további neutrofileket lesz képes toborozni (Martínez et al., 2006; Tateno et al., 2013). Ezzel egyidőben a keletkező poliszulfid képes aktiválni a nociceptív idegvégződés TRPA1 receptorait és protektív, antiinflammatorikus mechanizmusokat indukálni. A neutrofil granulociták hipoklórossav termelése az MPO enzimen keresztül valósul meg (Albrett et al., 2018). A TRPA1 KO egerekben mért magasabb MPO aktivitás hatására, a keletkező poliszulfid mennyisége is megnövekedhet, ami a hidrogén-szulfid és poliszulfid TRPA1 független proinflammatorikus hatásainak fokozott érvényesüléséhez vezethetett.

A hidrogén-szulfid biológiai hatásainak kutatását több mint egy évtizede tartó felvirágzása óta folyamatosan ellentmondások övezik. Jelen eredményeink alátámasztják a hidrogén-szulfid kettős szerepét. A protektív hatások a TRPA1 aktivációt követően alakulnak ki, az ezzel ellentétes proinflammatorikus mechanizmusok hátterében a hidrogénszulfid egyéb pleiotróp hatásai felelhetnek. Kísérleti elrendezésünk, lehetővé tette, hogy vizsgáljuk a hosszú hatású hidrogén-szulfid donor GYY4137 és a TRPA1 receptor szerepét a K/BxN szérumszintézis arthritisz modelljében. Ennek során rávilágítottunk, hogy a hidrogén-szulfid komplex hatásainak feltérképezése során kritikus szerepet tölthet be a TRPA1 receptor.

A K/BxN szérumszintézis arthritisz 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 (Nagy and Winterbourn, 2010; Kimura, 2017; Miyamoto et al., 2017). 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 (Pozsgai et al., 2017a). Jelen kísérleteinkben bővíteni szándékoztuk a rendelkezésre álló tudásunkat, ezért a forrázást követő gyulladás helyett egy másik modellt, a karragenin beadásával kiváltott akut gyulladás paradigmáját alkalmaztuk, illetve a szerves vegyületek közé tartozó DMTS mellett vizsgáltuk az inorganikus 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 ödémaképződés mértékét, amely jelenség háttérében szintén a neuro-szomatosztatin tengely alternatív, TRPA1 független aktivációja állhat. Számos lehetséges magyarázat létezik a nem TRPA1 mediálta neuronális eredetű szomatosztatin felszabadulásra. A H<sub>2</sub>S koncentrációtól függően ellentétes hatást fejt ki a nociceptorokon található T típusú feszültségfüggő Ca<sub>v</sub>3.2 csatornákra. Alacsonyabb koncentrációkban gátló, szuprafiziológiás koncentrációkban serkentő hatását írták le (Todorovic and Jevtovic-Todorovic, 2011; Elies et al., 2016; Fukami et al., 2017). Továbbá ismert, hogy a H<sub>2</sub>S gátló hatású képes a feszültségfüggő K<sub>v</sub>4.2 csatornákat, amely hatásáért a csatorna kritikus ciszteinein bekövetkező perszulfidációja tehető felelőssé. *Ex vivo* a H<sub>2</sub>S K<sub>v</sub>4.3 csatornákon keresztül kontrakciót váltott ki az izolált gyomor simaizom preparátumokban. A H<sub>2</sub>S gátló hatása érvényesült a H293 sejteken expresszáldó K<sub>v</sub>4.3 esetében is, illetve felfüggeszhető volt redukáló reagensekkel és a tiol csoportok blokkolásával (Liu et al., 2014). Jelen eredményeink értékelése során fontos figyelembe venni, hogy a K<sub>v</sub>4.3 csatorna is expresszáldó a DRG neuronokon ezért potenciálisan hozzájárulhatott a szenzoros neuronokból történő szomatosztatin felszabaduláshoz (Yunoki et al., 2014). Az előbb említett publikációkban H<sub>2</sub>S-t alkalmaztak, ellenben nem kizárható, hogy a hatásokat valójában a poliszulfid hozta létre az ioncsatornákon. Mindenesre a hidrogén-szulfid és poliszulfid rendkívül komplex redox rendszerekben vesznek részt és a DMTS, illetve POLY önmaguk is szolgálhattak H<sub>2</sub>S donorként.

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. Greiner et al. munkássága

alapján tudjuk, hogy a kálium-poliszulfid képes az intakt HEK293T sejtekbe bejutni és perszulfidációt létrehozni, azonban nem tartjuk valószínűnek, hogy az inorganikus poliszulfidok effektíven átjutnának a vér agy gáton (Greiner et al., 2013). Az organikus 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 (Kiss et al., 2017). 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.

Paradox módon kisebb mértékű lábduzzadást regisztráltunk a POLY kezelt sst4 egerekben a vad társaikhoz képest. Első vizsgálatra ellentmondásos a szomatosztatin protektív hatásáért felelős sst4 gén hiányában tapasztalt enyhébb ödémaképződés a POLY kezelés mellett, mégis irodalmi adatok alapján nem teljesen egyedülálló. Ezt megfigyelték a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) és receptora VPAC1 esetében is. A PACAP a szomatosztatinhoz hasonlóan egy protektív attribútumokkal felruházott neuropeptid. Az experimentális autoimmun encefalitisz (EAE) modell a PACAP KO egerekben súlyosabb elváltozásokat generált (Tan et al., 2009). Azonban, a VPAC1 gén hiánya, ezzel szemben javulást hozott létre az érintett egerekben. A VPAC1 gén hiánya protektívnek bizonyult a dextrán-szulfát indukált kolitisz modelljében is. Részletesebb vizsgálatok igazolták, hogy a VPAC1 KO egerek Th2 sejtjeiben csökkent a proinflammatorikus citokinek és kemokinek mRNS expressziója (Abad et al., 2016). Parallel a VPAC1 KO egerekkel, nem kizárható az sst4 gén hiányában a proinflammatorikus gének csökkent expressziója a karragenin modellben szerepet játszó immunsejtek esetében sem (neutrofilek, makrofágok) (Yadav et al., 2011).

A DMTS hatására csökkent a neutrofil specifikus MPO aktivitás, amely az sst4 törzsek esetében hangsúlyosabb volt és a szignifikáns mértéket is elérte. Egyik lehetséges és egyben legegyszerűbb magyarázat, hogy a DMTS-ből származó H<sub>2</sub>S közvetlen gátló hatást fejtett ki az MPO enzimre (Benavides et al., 2007; Pálincás et al., 2015). Ugyanakkor komplexebb mechanizmusok is állhatnak a csökkent neutrofil specifikus MPO aktivitás hátterében. A H<sub>2</sub>S csökkentette a neutrofil akkumulációt és ROS termelődését a ventilációval kiváltott tüdőszérülés egérmodelljében (Spasov et al., 2017). Humán neutrofil sejtek esetében károsodott kemotaxist és csökkent degranulációt írtak le H<sub>2</sub>S kezelés hatására (Mariggio et

al., 1997). Továbbá a  $K_{ATP}$  csatorna gátlásán keresztül a  $H_2S$  képes volt gátolni a neutrofilek adherenciáját patkány mesenterialis erekben.

A  $H_2S$  hatására fokozódott a  $TNF\alpha$  konvertáló enzim (ADAM-17) aktivitása amelynek következtében csökkent a neutrofilek kitapadásához szükséges L-selectin mennyisége (Ball et al., 2013). A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján, egyaránt lehetséges, hogy a DMTS közvetlenül gátolta a neutrofil specifikus MPO aktivitást, illetve, hogy a regisztrált csökkent MPO aktivitásért indirekten a csökkent neutrofil akkumuláció tehető felelőssé.

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. Összeségében 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 cian mérgezés esetére.

## IRODALOMJEGYZÉK

- Abad, C., Jayaram, B., Becquet, L., Wang, Y., O'Dorisio, M.S., Waschek, J.A., et al. (2016). VPAC1 receptor (Vipr1)-deficient mice exhibit ameliorated experimental autoimmune encephalomyelitis, with specific deficits in the effector stage. *J. Neuroinflammation* 13: 169.
- Ahmad, A., Druzhyna, N., and Szabo, C. (2017). Cystathionine-gamma-lyase deficient mice are protected against the development of multiorgan failure and exhibit reduced inflammatory response during burn. *Burns* 43: 1021–1033.
- Albrett, A.M., Ashby, L. V., Dickerhof, N., Kettle, A.J., and Winterbourn, C.C. (2018). Heterogeneity of hypochlorous acid production in individual neutrophil phagosomes revealed by a rhodamine-based probe. *J. Biol. Chem.* jbc.RA118.004789.
- Andersson, D.A., Gentry, C., and Bevan, S. (2012). TRPA1 Has a Key Role in the Somatic Pro-Nociceptive Actions of Hydrogen Sulfide. *PLoS One* 7: e46917.
- Ang, S.-F.S.-F., Sio, S.W.S., Moochhala, S.M., MacAry, P.A., and Bhatia, M. (2011). Hydrogen Sulfide Upregulates Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E Metabolite in Sepsis-Evoked Acute Lung Injury via Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Channel Activation. *J. Immunol.* 187: 4778–4787.
- Ang, S., Moochhala, S.M., and Bhatia, M. (2010). Hydrogen sulfide promotes transient receptor potential vanilloid 1-mediated neurogenic inflammation in polymicrobial sepsis\*. *Crit. Care Med.* 38: 619–628.
- Antal, A., Nemeth, J., Szolcsányi, J., Pozsgai, G., and Pinter, E. (2008). Abdominal surgery performed under general anesthesia increases somatostatin-like immunoreactivity in human serum. *Neuroimmunomodulation* 15: 153–6.
- Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S., and Murad, F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 3203–3207.
- Badiei, A., Rivers-Auty, J., Ang, A.D., and Bhatia, M. (2013). Inhibition of hydrogen sulfide production by gene silencing attenuates inflammatory activity of LPS-activated RAW264.7 cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 7845–7852.
- Ball, C.J., Reiffel, A.J., Chintalapani, S., Kim, M., Spector, J.A., and King, M.R. (2013).

Hydrogen Sulfide Reduces Neutrophil Recruitment in Hind-Limb Ischemia-Reperfusion Injury in an L-Selectin and ADAM-17-Dependent Manner. *Plast. Reconstr. Surg.* *131*: 487–497.

Baraldi, P.G., Preti, D., Materazzi, S., and Geppetti, P. (2010). Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Channel as Emerging Target for Novel Analgesics and Anti-Inflammatory Agents. *J. Med. Chem* *53*: 5085–5107.

Bátai, I.Z., Horváth, Á., Pintér, E., Helyes, Z., and 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. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. *9*: 55.

Bautista, D.M., Jordt, S.-E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., et al. (2006). TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. *Cell* *124*: 1269–1282.

Bautista, D.M., Movahed, P., Hinman, A., Axelsson, H.E., Sterner, O., Hogestatt, E.D., et al. (2005). Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*: 12248–12252.

Benavides, G.A., Squadrito, G.L., Mills, R.W., Patel, H.D., Isbell, T.S., Patel, R.P., et al. (2007). Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*: 17977–82.

Bertin, S., Aoki-Nonaka, Y., Lee, J., Jong, P.R. de, Kim, P., Han, T., et al. (2017). The TRPA1 ion channel is expressed in CD4+ T cells and restrains T-cell-mediated colitis through inhibition of TRPV1. *Gut* *66*: 1584–1596.

Bertin, S., and Raz, E. (2016). Transient Receptor Potential (TRP) channels in T cells. *Semin. Immunopathol.* *38*: 309–319.

Bessac, B.F., and Jordt, S.-E. (2008). Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control. *Physiology (Bethesda)*. *23*: 360–70.

Bhatia, M. (2005). Hydrogen sulfide as a vasodilator. *IUBMB Life (International Union Biochem. Mol. Biol. Life)* *57*: 603–606.

Bodkin, J. V., and Brain, S.D. (2011). Transient receptor potential ankyrin 1: emerging pharmacology and indications for cardiovascular biology. *Acta Physiol.* *203*: 87–98.

- Bölcseki, K., Helyes, Z., Szabó, Á., Sándor, K., Elekes, K., Németh, J., et al. (2005). Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 117: 368–376.
- Borbély, É., Botz, B., Bölcseki, K., Kenyér, T., Kereskai, L., Kiss, T., et al. (2015). Capsaicin-sensitive sensory nerves exert complex regulatory functions in the serum-transfer mouse model of autoimmune arthritis. *Brain. Behav. Immun.* 45: 50–59.
- Borbély, É., Kiss, T., Szabadfi, K., Pintér, E., Szolcsányi, J., Helyes, Z., et al. (2018). Complex Role of Capsaicin-Sensitive Afferents in the Collagen Antibody-Induced Autoimmune Arthritis of the Mouse. *Sci. Rep.* 8: 15916.
- Botz, B., Bölcseki, K., Kereskai, L., Kovács, M., Németh, T., Szigeti, K., et al. (2014a). Differential regulatory role of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide in the serum-transfer arthritis model. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* 66: 2739–50.
- Botz, B., Bölcseki, K., Kereskai, L., Kovács, M., Németh, T., Szigeti, K., et al. (2014b). Differential regulatory role of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide in the serum-transfer arthritis model. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* 66: 2739–50.
- Brewster, M.S.J., and Gaudet, R. (2015). How the TRPA1 receptor transmits painful stimuli: Inner workings revealed by electron cryomicroscopy. *Bioessays* 37: 1184–92.
- Camino, D. del, Murphy, S., Heiry, M., Barrett, L.B., Earley, T.J., Cook, C.A., et al. (2010). TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. *J. Neurosci.* 30: 15165–74.
- Cao, D.-S., Zhong, L., Hsieh, T.-H., Abooj, M., Bishnoi, M., Hughes, L., et al. (2012). Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells. *PLoS One* 7: e38005.
- Casnici, C., Lattuada, D., Crotta, K., Truzzi, M.C., Corradini, C., Ingegnoli, F., et al. (2018). Anti-inflammatory Effect of Somatostatin Analogue Octreotide on Rheumatoid Arthritis Synoviocytes. *Inflammation* 41: 1648–1660.
- Chen, J., and Hackos, D.H. (2015). TRPA1 as a drug target--promise and challenges. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 388: 451–463.
- Chen, J., Kang, D., Xu, J., Lake, M., Hogan, J.O., Sun, C., et al. (2013). Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nat. Commun.* 4: 2501.

- Christensen, A.D., Haase, C., Cook, A.D., and Hamilton, J.A. (2016). K/BxN Serum-Transfer Arthritis as a Model for Human Inflammatory Arthritis. *Front. Immunol.* 7: 213.
- Cordero-Morales, J.F., Gracheva, E.O., and Julius, D. (2011). Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: E1184–E1191.
- Cortese-Krott, M.M., Kuhnle, G.G.C., Dyson, A., Fernandez, B.O., Grman, M., DuMond, J.F., et al. (2015). Key bioactive reaction products of the NO/H<sub>2</sub>S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112: E4651-60.
- Craighead, D.H., Shank, S.W., Gottschall, J.S., Passe, D.H., Murray, B., Alexander, L.M., et al. (2017). Ingestion of transient receptor potential channel agonists attenuates exercise-induced muscle cramps. *Muscle Nerve* 56: 379–385.
- Dalm, V.A.S.H., Hagen, P.M. van, Koetsveld, P.M. van, Achilefu, S., Houtsmuller, A.B., Pols, D.H.J., et al. (2003). Expression of somatostatin, cortistatin, and somatostatin receptors in human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Am. J. Physiol. Metab.* 285: E344–E353.
- Delgermurun, D., Yamaguchi, S., Ichii, O., Kon, Y., Ito, S., and Otsuguro, K. (2016). Hydrogen sulfide activates TRPA1 and releases 5-HT from epithelioid cells of the chicken thoracic aorta. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 187: 43–49.
- Dux, M., Will, C., Vogler, B., Filipovic, M.R., and Messlinger, K. (2016). Meningeal blood flow is controlled by H<sub>2</sub>S-NO crosstalk activating a HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Br. J. Pharmacol.* 173: 431–445.
- Eberhardt, M., Dux, M., Namer, B., Miljkovic, J., Cordasic, N., Will, C., et al. (2014). H<sub>2</sub>S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO–TRPA1–CGRP signalling pathway. *Nat. Commun.* 5: 4381.
- Elies, J., Scragg, J.L., Boyle, J.P., Gamper, N., and Peers, C. (2016). Regulation of the T-type Ca(2+) channel Cav3.2 by hydrogen sulfide: emerging controversies concerning the role of H<sub>2</sub>S in nociception. *J. Physiol.* 594: 4119–4129.
- Farr, M., Garvey, K., Bold, A.M., Kendall, M.J., and Bacon, P.A. (1985). Significance of the hydrogen ion concentration in synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 3: 99–104.



Fernandes, V.S., Recio, P., López-Oliva, E., Martínez, M.P., Ribeiro, A.S., Barahona, M.V., et al. (2016). Role of endogenous hydrogen sulfide in nerve-evoked relaxation of pig terminal bronchioles. *Pulm. Pharmacol. Ther.* *41*: 1–10.

Fernandes, V.S., Ribeiro, A.S.F., Martínez, P., López-Oliva, M.E., Barahona, M.V., Orensanz, L.M., et al. (2014). Hydrogen Sulfide Plays a Key Role in the Inhibitory Neurotransmission to the Pig Intravesical Ureter. *PLoS One* *9*: e113580.

Filipovic, M.R., Eberhardt, M., Prokopovic, V., Mijuskovic, A., Orescanin-Dusic, Z., Reeh, P., et al. (2013). Beyond H<sub>2</sub>S and NO Interplay: Hydrogen Sulfide and Nitroprusside React Directly to Give Nitroxyl (HNO). A New Pharmacological Source of HNO. *J. Med. Chem.* *56*: 1499–1508.

Fox, B., Schantz, J.-T., Haigh, R., Wood, M.E., Moore, P.K., Viner, N., et al. (2012). Inducible hydrogen sulfide synthesis in chondrocytes and mesenchymal progenitor cells: is H<sub>2</sub>S a novel cytoprotective mediator in the inflamed joint? *J. Cell. Mol. Med.* *16*: 896–910.

Fukami, K., Sekiguchi, F., and Kawabata, A. (2017). Hydrogen Sulfide and T-Type Ca<sup>2+</sup> Channels in Pain Processing, Neuronal Differentiation and Neuroendocrine Secretion. *Pharmacology* *99*: 196–203.

Gaddam, R.R., Fraser, R., Badieli, A., Chambers, S., Cogger, V.C., Couteur, D.G. Le, et al. (2016). Cystathionine-Gamma-Lyase Gene Deletion Protects Mice against Inflammation and Liver Sieve Injury following Polymicrobial Sepsis. *PLoS One* *11*: e0160521.

García-Añoveros, J., and Duggan, A. (2007). TRPA1 in Auditory and Nociceptive Organs.

Gaudet, R. (2008). A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol. Biosyst.* *4*: 372.

George, L., Ramasamy, T., Manickam, V., Iyer, S.K., and Radhakrishnan, V. (2016). Novel phenanthridine (PHE-4i) derivative inhibits carrageenan-induced rat hind paw oedema through suppression of hydrogen sulfide. *Inflammopharmacology* *24*: 173–180.

Greiner, R., Pálincás, Z., Bäsell, K., Becher, D., Antelmann, H., Nagy, P., et al. (2013). Polysulfides link H<sub>2</sub>S to protein thiol oxidation. *Antioxid. Redox Signal.* *19*: 1749–1765.

Hajna, Z., Ságthy, É., Payrits, M., Aubdool, A.A., Szőke, É., Pozsgai, G., et al. (2016). Capsaicin-Sensitive Sensory Nerves Mediate the Cellular and Microvascular Effects of H<sub>2</sub>S via TRPA1 Receptor Activation and Neuropeptide Release. *J. Mol. Neurosci.* *60*: 157–170.

Hatakeyama, Y., Takahashi, K., Tominaga, M., Kimura, H., and Ohta, T. (2015). Polysulfide Evokes Acute Pain through the Activation of Nociceptive TRPA1 in Mouse Sensory Neurons. *Mol. Pain* 11: s12990-015–0023.

Helyes, Z., Pintér, E., Sándor, K., Elekes, K., Bánvölgyi, A., Keszthelyi, D., et al. (2009). Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 13088–93.

Helyes, Z., Szabó, Á., Németh, J., Jakab, B., Pintér, E., Bánvölgyi, Á., et al. (2004). Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Rheum.* 50: 1677–1685.

Helyes, Z., Thán, M., Oroszi, G., Pintér, E., Németh, J., Kéri, G., et al. (2000). Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogues in the rat. *Neurosci. Lett.* 278: 185–188.

Horváth, Á., Menghis, A., Botz, B., Borbély, É., Kemény, Á., Tékus, V., et al. (2017). Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of the Novel Semicarbazide-Sensitive Amine-Oxidase Inhibitor SzV-1287 in Chronic Arthritis Models of the Mouse. *Sci. Rep.* 7: 39863.

Horváth, Á., Tékus, V., Boros, M., Pozsgai, G., Botz, B., Borbély, É., et al. (2016). Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: in vivo study using TRPA1-deficient mice. *Arthritis Res. Ther.* 18: 6.

Hosoki, R., Matsuki, N., and Kimura, H. (1997). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237: 527–531.

Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 9265–9269.

Jakus, Z., Simon, E., Balázs, B., and Mócsai, A. (2010). Genetic deficiency of Syk protects mice from autoantibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 62: 1899–910.

Jaquemar, D., Schenker, T., and Trueb, B. (1999). An Ankyrin-like Protein with Transmembrane Domains Is Specifically Lost after Oncogenic Transformation of Human Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 274: 7325–7333.

- Kádková, A., Synytsya, V., Krusek, J., Zimová, L., and Vlachová, V. (2017). Molecular basis of TRPA1 regulation in nociceptive neurons. A review. *Physiol. Res.* 66: 425–439.
- Kang, K. (2016). Exceptionally high thermal sensitivity of rattlesnake TRPA1 correlates with peak current amplitude. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858: 318–325.
- Kemény, Á., Kodji, X., Horváth, S., Komlódi, R., Szöke, É., Sándor, Z., et al. (2018). TRPA1 Acts in a Protective Manner in Imiquimod-Induced Psoriasisiform Dermatitis in Mice. *J. Invest. Dermatol.* 138: 1774–1784.
- Kerstein, P.C., Camino, D. del, Moran, M.M., and Stucky, C.L. (2009). Pharmacological Blockade of TRPA1 Inhibits Mechanical Firing in Nociceptors. *Mol. Pain* 5: 1744-8069-5–19.
- Khalil, M., Alliger, K., Weidinger, C., Yerinde, C., Wirtz, S., Becker, C., et al. (2018). Functional Role of Transient Receptor Potential Channels in Immune Cells and Epithelia. *Front. Immunol.* 9: 174.
- Kimura, H. (2013). Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. *Neurochem. Int.* 63: 492–497.
- Kimura, H. (2017). Hydrogen Sulfide and Polysulfide Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 27: 619–621.
- Kimura, Y., Mikami, Y., Osumi, K., Tsugane, M., Oka, J., and Kimura, H. (2013). Polysulfides are possible H<sub>2</sub>S-derived signaling molecules in rat brain. *FASEB J.* 27: 2451–7.
- Kimura, Y., Toyofuku, Y., Koike, S., Shibuya, N., Nagahara, N., Lefer, D., et al. (2015). Identification of H<sub>2</sub>S<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>S produced by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the brain. *Sci. Rep.* 5: 14774.
- Kiss, L., Bocsik, A., Walter, F.R., Ross, J., Brown, D., Mendenhall, B.A., et al. (2017). 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.* 160: 398–407.
- Koizumi, K., Iwasaki, Y., Narukawa, M., Iitsuka, Y., Fukao, T., Seki, T., et al. (2009). Diallyl sulfides in garlic activate both TRPA1 and TRPV1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382: 545–548.
- Koroleva, K., Mustafina, A., Yakovlev, A., Hermann, A., Giniatullin, R., and Sitdikova, G.

(2017). Receptor Mechanisms Mediating the Pro-Nociceptive Action of Hydrogen Sulfide in Rat Trigeminal Neurons and Meningeal Afferents. *Front. Cell. Neurosci.* 11: 226.

Kouskoff, V., Korganow, A.-S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). Organ-Specific Disease Provoked by Systemic Autoimmunity. *Cell* 87: 811–822.

Kovács, M., Németh, T., Jakus, Z., Sitaru, C., Simon, E., Futosi, K., et al. (2014). 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.* 211: 1993–2011.

Kun, J., Perkecz, A., Knie, L., Sétáló, G., Tornóczki, T., Pintér, E., et al. (2017). TRPA1 receptor is upregulated in human oral lichen planus. *Oral Dis.* 23: 189–198.

Kun, J., Szitter, I., Kemény, Á., Perkecz, A., Kereskai, L., Pohóczky, K., et al. (2014). Upregulation of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Ion Channel in the Inflamed Human and Mouse Colon and Its Protective Roles. *PLoS One* 9: e108164.

Kwan, K.Y., Allchorne, A.J., Vollrath, M.A., Christensen, A.P., Zhang, D.-S., Woolf, C.J., et al. (2006). TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50: 277–289.

Kwan, K.Y., Glazer, J.M., Corey, D.P., Rice, F.L., and Stucky, C.L. (2009). TRPA1 Modulates Mechanotransduction in Cutaneous Sensory Neurons. *J. Neurosci.* 29: 4808–4819.

Laursen, W.J., Bagriantsev, S.N., and Gracheva, E.O. (2014). TRPA1 Channels: Chemical and Temperature Sensitivity. *Curr. Top. Membr.* 74: 89–112.

Lee, K.-I., Lin, H.-C., Lee, H.-T., Tsai, F.-C., and Lee, T.-S. (2017). Loss of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Deregulates Emotion, Learning and Memory, Cognition, and Social Behavior in Mice. *Mol. Neurobiol.* 54: 3606–3617.

Lennertz, R.C., Kossyrev, E.A., Smith, A.K., and Stucky, C.L. (2012). TRPA1 Mediates Mechanical Sensitization in Nociceptors during Inflammation. *PLoS One* 7: e43597.

Li, L., Fox, B., Keeble, J., Salto-Tellez, M., Winyard, P.G., Wood, M.E., et al. (2013). 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.* 17: 365–376.

Li, L., Whiteman, M., Guan, Y.Y., Neo, K.L., Cheng, Y., Lee, S.W., et al. (2008). Characterization of a Novel, Water-Soluble Hydrogen Sulfide-Releasing Molecule

(GYY4137): New Insights Into the Biology of Hydrogen Sulfide. *Circulation* 117: 2351–2360.

Liu, D.H., Huang, X., Meng, X.M., Zhang, C.M., Lu, H.L., Kim, Y.C., et al. (2014). Exogenous H<sub>2</sub>S enhances mice gastric smooth muscle tension through S-sulphydration of K<sub>v</sub> 4.3, mediating the inhibition of the voltage-dependent potassium current. *Neurogastroenterol. Motil.* 26: 1705–1716.

Liu, M., Jia, Z., Sun, Y., Zhang, A., and Yang, T. (2016). A H<sub>2</sub>S Donor GYY4137 Exacerbates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Mice. *Mediators Inflamm.* 2016: 8145785.

Liu, Y., Liao, R., Qiang, Z., and Zhang, C. (2017). Pro-inflammatory cytokine-driven PI3K/Akt/Sp1 signalling and H<sub>2</sub>S production facilitates the pathogenesis of severe acute pancreatitis. *Biosci. Rep.* 37: BSR20160483.

Logashina, Y.A., Korolkova, Y. V., Kozlov, S.A., and Andreev, Y.A. (2019). TRPA1 Channel as a Regulator of Neurogenic Inflammation and Pain: Structure, Function, Role in Pathophysiology, and Therapeutic Potential of Ligands. *Biochem.* 84: 101–118.

Long, S.B., Campbell, E.B., and Mackinnon, R. (2005). Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K<sup>+</sup> Channel. *Science* (80-. ). 309: 897–903.

López-Requena, A., Boonen, B., Gerven, L. Van, Hellings, P.W., Alpizar, Y.A., and Talavera, K. (2017). Roles of Neuronal TRP Channels in Neuroimmune Interactions (CRC Press/Taylor & Francis).

Lu, W., Li, J., Gong, L., Xu, X., Han, T., Ye, Y., et al. (2014). H<sub>2</sub>S modulates duodenal motility in male rats via activating TRPV1 and K(ATP) channels. *Br. J. Pharmacol.* 171: 1534–1550.

Macpherson, L.J., Dubin, A.E., Evans, M.J., Marr, F., Schultz, P.G., Cravatt, B.F., et al. (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 445: 541–545.

Mariggiò, M.A., Pettini, F., and Fumarulo, R. (1997). Sulfide influence on polymorphonuclear functions: A possible role for Ca<sup>2+</sup>-involvement. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 19: 393–404.

Marsakova, L., Barvik, I., Zima, V., Zimova, L., and Vlachova, V. (2017). The First Extracellular Linker Is Important for Several Aspects of the Gating Mechanism of Human

TRPA1 Channel. *Front. Mol. Neurosci.* 10: 16.

Martínez, D., Vermeulen, M., Trevani, A., Ceballos, A., Sabatté, J., Gamberale, R., et al. (2006). Extracellular acidosis induces neutrophil activation by a mechanism dependent on activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. *J. Immunol.* 176: 1163–71.

McGaraughty, S., Chu, K.L., Perner, R.J., DiDomenico, S., Kort, M.E., and Kym, P.R. (2010). TRPA1 Modulation of Spontaneous and Mechanically Evoked Firing of Spinal Neurons in Uninjured, Osteoarthritic, and Inflamed Rats. *Mol. Pain* 6: 1744-8069-6–14.

Medeiros, J.V.R., Bezerra, V.H., Lucetti, L.T., Lima-Júnior, R.C.P., Barbosa, A.L.R., Tavares, B.M., et al. (2012). Role of KATP channels and TRPV1 receptors in hydrogen sulfide-enhanced gastric emptying of liquid in awake mice. *Eur. J. Pharmacol.* 693: 57–63.

Miyamoto, R., Koike, S., Takano, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Hanaoka, K., et al. (2017). Polysulfides (H<sub>2</sub>Sn) produced from the interaction of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and nitric oxide (NO) activate TRPA1 channels. *Sci. Rep.* 7: 45995.

Miyamoto, R., Otsuguro, K., and Ito, S. (2011). Time- and concentration-dependent activation of TRPA1 by hydrogen sulfide in rat DRG neurons. *Neurosci. Lett.* 499: 137–142.

Moilanen, L.J., Hämäläinen, M., Lehtimäki, L., Nieminen, R.M., and Moilanen, E. (2015). Urate crystal induced inflammation and joint pain are reduced in transient receptor potential ankyrin 1 deficient mice--potential role for transient receptor potential ankyrin 1 in gout. *PLoS One* 10: e0117770.

Nagai, Y., Tsugane, M., Oka, J.-I., and Kimura, H. (2004). Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB J.* 18: 557–559.

Nagy, P., and Winterbourn, C.C. (2010). Rapid Reaction of Hydrogen Sulfide with the Neutrophil Oxidant Hypochlorous Acid to Generate Polysulfides. *Chem. Res. Toxicol.* 23: 1541–1543.

Ogawa, H., Takahashi, K., Miura, S., Imagawa, T., Saito, S., Tominaga, M., et al. (2012). H<sub>2</sub>S functions as a nociceptive messenger through transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation. *Neuroscience* 218: 335–343.

Okubo, K., Matsumura, M., Kawaishi, Y., Aoki, Y., Matsunami, M., Okawa, Y., et al. (2012). Hydrogen sulfide-induced mechanical hyperalgesia and allodynia require activation of both

Cav3.2 and TRPA1 channels in mice. *Br. J. Pharmacol.* 166: 1738–1743.

Pálinkás, Z., Furtmüller, P.G., Nagy, A., Jakopitsch, C., Pirker, K.F., Magierowski, M., et al. (2015). Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase. *Br. J. Pharmacol.* 172: 1516–32.

Patacchini, R., Santicioli, P., Giuliani, S., and Maggi, C.A. (2004). Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) stimulates capsaicin-sensitive primary afferent neurons in the rat urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.* 142: 31–34.

Paulsen, C.E., Armache, J.P., Gao, Y., Cheng, Y., and Julius, D. (2015). Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* 520: 511–517.

Pereira, I., Mendes, S.J.F., Pereira, D.M.S., Muniz, T.F., Colares, V.L.P., Monteiro, C.R.A. V., et al. (2017). Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Expression on Peripheral Blood Leukocytes from Rheumatoid Arthritic Patients and Correlation with Pain and Disability. *Front. Pharmacol.* 8: 53.

Pethő, G., Bölskei, K., Füredi, R., Botz, B., Bagoly, T., Pintér, E., et al. (2017). Evidence for a novel, neurohumoral antinociceptive mechanism mediated by peripheral capsaicin-sensitive nociceptors in conscious rats. *Neuropeptides* 62: 1–10.

Pintér, E., Helyes, Z., Németh, J., Pórszász, R., Pethő, G., Thán, M., et al. (2002). Pharmacological characterisation of the somatostatin analogue TT-232: effects on neurogenic and non-neurogenic inflammation and neuropathic hyperalgesia. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 366: 142–150.

Pintér, E., Helyes, Z., and Szolcsányi, J. (2006). Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol. Ther.* 112: 440–456.

Pozsgai, G., Hajna, Z., Bagoly, T., Boros, M., Kemény, Á., Materazzi, S., et al. (2012). The role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor activation in hydrogen-sulphide-induced CGRP-release and vasodilation. *Eur. J. Pharmacol.* 689: 56–64.

Pozsgai, G., Payrits, M., Sággy, É., Sebestyén-Bátai, R., Steen, E., Szőke, É., et al. (2017a). Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst 4 receptors. *Nitric Oxide* 65: 10–21.

Pozsgai, G., Payrits, M., Sággy, É., Sebestyén-Bátai, R., Steen, E., Szőke, É., et al. (2017b). Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst4receptors.

Nitric Oxide Biol. Chem. 65: 10–21.

Prior, M., Green, F., Lopez, A., Balu, A., DeSanctis, G.T., and Fick, G. (1990). Capsaicin Pretreatment Modifies Hydrogen Sulphide-Induced Pulmonary Injury in Rats. *Toxicol. Pathol.* 18: 279–288.

Qin, C.-C., Liu, Y.-N., Hu, Y., Yang, Y., and Chen, Z. (2017). Macrophage inflammatory protein-2 as mediator of inflammation in acute liver injury. *World J. Gastroenterol.* 23: 3043–3052.

Rapoport, R.M., Draznin, M.B., and Murad, F. (1983). Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 306: 174–176.

Sándor, K., Elekes, K., Szabó, Á., Pintér, E., Engström, M., Wurster, S., et al. (2006). Analgesic effects of the somatostatin sst4 receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models. *Eur. J. Pharmacol.* 539: 71–75.

Schenker, T., and Trueb, B. (1998). Down-Regulated Proteins of Mesenchymal Tumor Cells. *Exp. Cell Res.* 239: 161–168.

Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K.Y., Corey, D.P., and Khakh, B.S. (2012). TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat. Neurosci.* 15: 70–80.

Spasov, S.G., Donus, R., Ihle, P.M., Engelstaedter, H., Hoetzel, A., and Faller, S. (2017). Hydrogen Sulfide Prevents Formation of Reactive Oxygen Species through PI3K/Akt Signaling and Limits Ventilator-Induced Lung Injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017: 1–14.

Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., et al. (2003). ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell* 112: 819–829.

Streng, T., Axelsson, H.E., Hedlund, P., Andersson, D.A., Jordt, S.-E., Bevan, S., et al. (2008). Distribution and Function of the Hydrogen Sulfide–Sensitive TRPA1 Ion Channel in Rat Urinary Bladder. *Eur. Urol.* 53: 391–400.

Sulen, A., Gullaksen, S.-E., Bader, L., McClymont, D.W., Skavland, J., Gavasso, S., et al. (2016). Signaling effects of sodium hydrosulfide in healthy donor peripheral blood mononuclear cells. *Pharmacol. Res.* 113: 216–227.



- Suto, B., Bagoly, T., Borzsei, R., Lengl, O., Szolcsanyi, J., Nemeth, T., et al. (2010). Surgery and sepsis increase somatostatin-like immunoreactivity in the human plasma. *Peptides* 31: 1208–1212.
- Szabo, A., Helyes, Z., Sándor, K., Bite, A., Pintér, E., Németh, J., et al. (2005). Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptors in Adjuvant-Induced Chronic Arthritis: In Vivo Study Using Gene-Deficient Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314: 111–119.
- Szolcsányi, J. (2014). Capsaicin and sensory neurones: a historical perspective. *Prog. Drug Res.* 68: 1–37.
- Takahashi, K., and Ohta, T. (2013). Inflammatory acidic pH enhances hydrogen sulfide-induced transient receptor potential ankyrin 1 activation in RIN-14B cells. *J. Neurosci. Res.* 91: 1322–1327.
- Takahashi, N., Kozai, D., and Mori, Y. (2012). TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals. *Front. Physiol.* 3: 324.
- Tan, Y.-V., Abad, C., Lopez, R., Dong, H., Liu, S., Lee, A., et al. (2009). Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide is an intrinsic regulator of Treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 2012–2017.
- Tateno, N., Matsumoto, N., Motowaki, T., Suzuki, K., and Aratani, Y. (2013). Myeloperoxidase deficiency induces MIP-2 production via ERK activation in zymosan-stimulated mouse neutrophils. *Free Radic. Res.* 47: 376–385.
- Teicher, C., Col, R. De, and Messlinger, K. (2017). Hydrogen Sulfide Mediating both Excitatory and Inhibitory Effects in a Rat Model of Meningeal Nociception and Headache Generation. *Front. Neurol.* 8: 336.
- Terada, Y., Fujimura, M., Nishimura, S., Tsubota, M., Sekiguchi, F., and Kawabata, A. (2015). Roles of Ca<sub>v</sub> 3.2 and TRPA1 channels targeted by hydrogen sulfide in pancreatic nociceptive processing in mice with or without acute pancreatitis. *J. Neurosci. Res.* 93: 361–369.
- Todorovic, S.M., and Jevtovic-Todorovic, V. (2011). T-type voltage-gated calcium channels as targets for the development of novel pain therapies. *Br. J. Pharmacol.* 163: 484–495.
- Trevisan, G., Hoffmeister, C., Fortes Rossato, M., Marchesan Oliveira, S., Arnoldi Silva, M., Regina Silva, C., et al. (2014). TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to

trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout.

Trevisani, M., Patacchini, R., Nicoletti, P., Gatti, R., Gazzieri, D., Lissi, N., et al. (2005). Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. *Br. J. Pharmacol.* *145*: 1123–1131.

Tsubota-Matsunami, M., Noguchi, Y., Okawa, Y., Sekiguchi, F., and Kawabata, A. (2012). Colonic Hydrogen Sulfide<sup>^</sup>Induced Visceral Pain and Referred Hyperalgesia Involve Activation of Both Cav3.2 and TRPA1 Channels in Mice. *J. Pharmacol. Sci.* *119*: 293–296.

Ujike, A., Kuraishi, T., Yamaguchi, S., Eguchi, R., Kitano, T., Kamise, J., et al. (2018). IL-1 $\beta$  augments H<sub>2</sub>S-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> through polysulfides generated from H<sub>2</sub>S/NO interaction. *Eur. J. Pharmacol.* *821*: 88–96.

Ujike, A., Otsuguro, K., Miyamoto, R., Yamaguchi, S., and Ito, S. (2015). Bidirectional effects of hydrogen sulfide via ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and transient receptor potential A1 channels in RIN14B cells. *Eur. J. Pharmacol.* *764*: 463–470.

Viana, F. (2016). TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue damage. *J. Physiol.* *594*: 4151–4169.

Voets, T., Janssens, A., Droogmans, G., and Nilius, B. (2004). Outer pore architecture of a Ca<sup>2+</sup>-selective TRP channel. *J. Biol. Chem.* *279*: 15223–30.

Ward, T.T., and Steigbigel, R.T. (1978). Acidosis of synovial fluid correlates with synovial fluid leukocytosis. *Am. J. Med.* *64*: 933–936.

Weinhold, P., Hennenberg, M., Strittmatter, F., Stief, C.G., Gratzke, C., and Hedlund, P. (2017). Transient receptor potential a1 (TRPA1) agonists inhibit contractions of the isolated human ureter. *Neurourol. Urodyn.*

White, B.J.O., Smith, P.A., and Dunn, W.R. (2013). Hydrogen sulphide-mediated vasodilatation involves the release of neurotransmitters from sensory nerves in pressurized mesenteric small arteries isolated from rats. *Br. J. Pharmacol.* *168*: 785–793.

Wild, V., Messlinger, K., and Fischer, M.J.M. (2015). Hydrogen sulfide determines HNO-induced stimulation of trigeminal afferents. *Neurosci. Lett.* *602*: 104–109.

Wood, J.L. (1987). Sulfane sulfur. *Methods Enzymol.* *143*: 25–29.

Wu, X., Indzhukulian, A.A., Niksch, P.D., Webber, R.M., Garcia-Gonzalez, M., Watnick, T.,

et al. (2016). Hair-Cell Mechanotransduction Persists in TRP Channel Knockout Mice. *PLoS One* 11: e0155577.

Yadav, M., Huang, M.-C., and Goetzl, E.J. (2011). VPAC1 (vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor type 1) G protein-coupled receptor mediation of VIP enhancement of murine experimental colitis. *Cell. Immunol.* 267: 124–132.

Yassaka, R.T., Inagaki, H., Fujino, T., Nakatani, K., and Kubo, T. (2010). Enhanced activation of the transient receptor potential channel TRPA1 by ajoene, an allicin derivative. *Neurosci. Res.* 66: 99–105.

Yu, W., Liao, Y., Huang, Y., Chen, S.Y., Sun, Y., Sun, C., et al. (2017). Endogenous Hydrogen Sulfide Enhances Carotid Sinus Baroreceptor Sensitivity by Activating the Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 1 (TRPV1) Channel. *J. Am. Heart Assoc.* 6:.

Yunoki, T., Takimoto, K., Kita, K., Funahashi, Y., Takahashi, R., Matsuyoshi, H., et al. (2014). Differential contribution of Kv4-containing channels to A-type, voltage-gated potassium currents in somatic and visceral dorsal root ganglion neurons. *J. Neurophysiol.* 112: 2492–2504.

Zappia, K.J., O'Hara, C.L., Moehring, F., Kwan, K.Y., and Stucky, C.L. (2017). Sensory Neuron-Specific Deletion of TRPA1 Results in Mechanical Cutaneous Sensory Deficits. *ENeuro* 4: ENEURO.0069-16.2017.

Zhao, J.-F., Shyue, S.-K., Kou, Y.R., Lu, T.-M., and Lee, T.-S. (2016). Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Involved in Atherosclerosis and Macrophage-Foam Cell Formation. *Int. J. Biol. Sci.* 12: 812–23.

Zygmunt, P.M., and Högestätt, E.D. (2014). TRPA1. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, pp 583–630.

# 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., ... Pintér, E. (2016). Capsaicin-Sensitive Sensory Nerves Mediate the Cellular and Microvascular Effects of H<sub>2</sub>S 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., Batai, I. Z., Kerényi, 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., Bátai, I. Z., Pozsgai, G., Nagy, L., Pintér, E., & Nagy, G. (2017). Highly sensitive potentiometric measuring method for measurement of free H<sub>2</sub>S 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., Bártai, 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:**

**Bártai 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.

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

**Bártai I. Z.,** Török O. A neivolol dilatációt okoz izolált arteria basilarison XXXI. OTDK, Budapest, Magyarország, 2013.

Török O., **Bártai I.Z.**, Az intracellularis Ca<sup>2+</sup> ion szerepe a perivaszkuláris hemolizált vér-indukált cerebrovaszkularis konstriktió 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., Kerényi 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., Kerényi 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 egérmódeljében. 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.

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

**Báta** **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.

**Báta** **I. Z.**, Pintér E., Öböli 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. Bölcseki Katának a képalkotó vizsgálatokban nyújtott segítségükért. Továbbá Hírné Perkecz Anikónak, Fábián 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 Öböli Gyulánétól kaptam az állatkísérletek végzése során. Kiss Tamás, mindig készen állt segíteni a képalkotó vizsgálatokban. Meg szeretném köszönni 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







# 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

István Z. Bátaï, Ádám Horváth, Erika Pintér, Zsuzsanna Helyes and Gábor Pozsgai\*

Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Hubert Vaudry,  
Université de Rouen, France

### Reviewed by:

Nils Lambrecht,  
University of California, Irvine,  
United States  
Gábor B. Makara,  
Hungarian Academy of Sciences  
(MTA), Hungary

### \*Correspondence:

Gábor Pozsgai  
gabor.pozsgai@aok.pte.hu

### Specialty section:

This article was submitted to  
Neuroendocrine Science,  
a section of the journal  
Frontiers in Endocrinology

**Received:** 31 October 2017

**Accepted:** 06 February 2018

**Published:** 27 February 2018

### Citation:

Bátaï IZ, Horváth Á, Pintér E,  
Helyes Z and 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.  
*Front. Endocrinol.* 9:55.  
doi: 10.3389/fendo.2018.00055

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) non-selective ligand-gated cation channels are mostly expressed in primary sensory neurons. Polysulfides (POLYs) are Janus-faced substances interacting with numerous target proteins and associated with both protective and detrimental processes. Activation of TRPA1 in sensory neurons, consequent somatostatin (SOM) liberation and action on sst4 receptors have recently emerged as mediators of the antinociceptive effect of organic trisulfide dimethyl trisulfide (DMTS). In the frame of the present study, we set out to compare the participation of this mechanism in antinociceptive and anti-inflammatory effects of inorganic sodium POLY and DMTS in carrageenan-evoked hind-paw inflammation. Inflammation of murine hind paws was induced by intraplantar injection of carrageenan (3% in 30  $\mu$ L saline). Animals were treated intraperitoneally with POLY (17  $\mu$ mol/kg) or DMTS (250  $\mu$ mol/kg) or their respective vehicles 30 min prior paw challenge and six times afterward every 60 min. Mechanical pain threshold and swelling of the paws were measured by dynamic plantar aesthesiometry and plethysmometry at 2, 4, and 6 h after initiation of inflammation. Myeloperoxidase (MPO) activity in the hind paws were detected 6 h after challenge by luminescent imaging. Mice genetically lacking TRPA1 ion channels, sst4 receptors and their wild-type counterparts were used to examine the participation of these proteins in POLY and DMTS effects. POLY counteracted carrageenan-evoked mechanical hyperalgesia in a TRPA1 and sst4 receptor-dependent manner. POLY did not influence paw swelling and MPO activity. DMTS ameliorated all examined inflammatory parameters. Mitigation of mechanical hyperalgesia and paw swelling by DMTS were mediated through sst4 receptors. These effects were present in TRPA1 knockout animals, too. DMTS inhibited MPO activity with no participation of the sensory neuron–SOM axis. While antinociceptive effects of POLY are transmitted by activation of peptidergic nerves *via* TRPA1, release of SOM and its effect on sst4 receptors, those of DMTS partially rely on SOM release triggered by other routes. SOM is responsible for the inhibition of paw swelling by DMTS, but TRPA1 does not contribute to its release. Modulation of MPO activity by DMTS is independent of TRPA1 and sst4.

**Keywords:** transient receptor potential ankyrin 1, sst4, somatostatin, dimethyl trisulfide, polysulfide, carrageenan, luminol, IR-676

## INTRODUCTION

Inorganic polysulfides (POLYs; hydrogen polysulfide) have been demonstrated to be synthesized in the human body (1). These species possess antioxidant and radical scavenging properties. Beside *in vitro* systems, these findings were confirmed in lung tissue from patients suffering from chronic obstructive pulmonary disease too (2–5). According to some opinions inorganic POLYs might mediate persulfidation of cysteine residues of proteins, a process traditionally attributed to hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) (6). Dimethyl trisulfide (DMTS) is an organic trisulfide compound naturally occurring in garlic. It is used widely as a food additive (7). Recently, DMTS has been patented in the US as a parenteral antidote of cyanide poisoning (8). This adds vastly to the translation potential of the drug. We have reported lately antinociceptive properties of DMTS against mechanical hyperalgesia evoked by heat injury in mice. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) ion channels and somatostatin (SOM) sst4 receptors contribute pivotally to these effects (9). Chemically, alkyl trisulfides (such as DMTS) produce tri/disulfide metabolites with the thiol groups of cysteine amino acids (unlike inorganic POLYs leading to protein persulfidation). Others propose organic trisulfides to be sources of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) (10). Based on the latest findings, H<sub>2</sub>S in concert with nitric oxide reacts with thiol residues of proteins (11, 12). H<sub>2</sub>S released from organic trisulfides might influence protein-associated metal atoms too (13). Organic trisulfides were reported to exert antioxidant and anti-inflammatory effects mostly studied in animal models of inflammatory bowel disease (14–16). Inorganic POLYs are known to interact with functional cysteines of the TRPA1 ion channel (17). As mentioned above our previous work suggests that one of the targets of DMTS is the ion channel TRPA1 as well (9).

Transient receptor potential ankyrin 1 is a non-selective cation channel permeable to Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup>. TRPA1 is a member of transient receptor potential ankyrin subfamily of ion channels, itself being a subdivision of the transient receptor potential family. TRPA1 is the only ankyrin-type TRP channel to be found in mammals. Polymodal TRPA1 channels might be opened by chemical substances, temperature, mechanical stimuli, potential difference, or changes of pH. Electrophilic agents—most probably including organic trisulfide compounds—excite TRPA1 by forming covalent bonds with cysteine residues (18). TRPA1 is mostly expressed in primary nociceptor neurons, but it was evinced in the cornea, skin, pancreas, spleen, lung, kidney, testis, and the human endometrium (19). Expression of TRPA1 channels in polymorphonuclear granulocytes of patients suffering from chronic inflammatory disease was shown to correlate with nociception (20). The role of TRPA1 is known in complete Freund's adjuvant-induced inflammation. However, no involvement was detected in carrageenan-evoked paw inflammation (21, 22). TRPA1 channels are typically expressed by sensory neurons containing neuropeptides (e.g., SOM). Activation of the channel leads to Ca<sup>2+</sup> influx into the nerve endings and release of peptides. Earlier we found SOM liberation from murine sensory neurons upon stimulation with DMTS (9).

Somatostatin is a cyclic peptide with important endocrine function besides its presence in the sensory nervous system

(23). SOM is expressed in 17.8% of human dorsal root ganglion neurons. The peptide might be liberated by TRPA1 agonists (24). Unlike most neuropeptides, SOM is distributed by the bloodstream and exerts antinociceptive and anti-inflammatory effects distant from the release site in numerous animal models of inflammatory disease (25). These could be ameliorated by depletion of peptides from sensory nerves, administration of anti-SOM antibody or SOM receptor antagonist (24). According to previous data, these effects are mediated by one of five SOM receptors: sst4 (9, 26–29). Antinociceptive and anti-inflammatory effects could be mimicked by two different agonists (TT-232, J-2156) of sst4 receptors. The agonists were ineffective in animals lacking the corresponding functional receptor (24, 30). Sst4 is present in sensory neurons, lymphocytes, and vascular endothelial cells enabling the transmission of the aforementioned beneficial effects of SOM (25).

In the present study, we set out to investigate the effect of inorganic sodium POLY and DMTS on the sensory-SOM-sst4 system in carrageenan-induced hind paw inflammation in genetically engineered mice lacking either functional TRPA1 or sst4. Both mechanical nociception and inflammatory parameters, such as paw swelling and myeloperoxidase (MPO) activity of accumulated neutrophil granulocytes, were assessed.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Experiments were conducted on genetically modified male mice lacking functional TRPA1 or sst4 receptors (KO) and their wild-type counterparts (WT; 2–4 months, 20–25 g) (27, 31). Age-matched animals were used in the study. The original heterozygous TRPA1 breeding pair was a generous gift from Pierangelo Geppetti (University of Florence, Italy). These mice were originally generated and characterized by Bautista and colleagues (31). Neither the strain with genetic modification of TRPA1 nor that with modified sst4 gene is available commercially. TRPA1 and sst4 WT and KO breeding lines were produced by crossing respective heterozygote animals. WT and KO animals were chosen from the resulting litter and used for further breeding (i.e., WT mice were mated with WT ones and KO mice with KO ones). For the fifth-generation clean WT and KO breeding lines were established and maintained by inbreeding. All animals were genotyped until generation 5 and random sentinel litters of the WT and KO lines afterward. Due to poor breeding performance of the sst4 colony, heterozygotes were used in the breeding even after the fifth generation and all offspring were genotyped for an extended period of time. Animals were bred and kept in the Laboratory Animal Centre of University of Pécs under standard pathogen free conditions at 24–25°C, 12 h light/dark cycles. Mice were housed in groups of 5–10 in polycarbonate cages (330 cm<sup>2</sup> floor space, 12 cm height) on wood shavings bedding. Animals were provided standard diet and water *ad libitum*. All experimental procedures were carried out according to the European Communities Council Directive of 2010/63/EU. The studies were approved by the Ethics Committee on Animal Research, University of Pécs (license number: BA02/2000-47/2017).

## Carrageenan-Induced Hind Paw Inflammation

Inflammation of one hind paw was triggered by intraplantar injection of carrageenan (20  $\mu\text{L}$ , 3% in saline). The contralateral paw received saline. The side of carrageenan injection was randomized. Animals were treated with either POLY (17  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , i.p.) or DMTS (250  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , i.p.) or the respective vehicle 30 min before challenge of the paws and every 60 min afterward (seven times altogether). POLY was prepared freshly before each application. DMTS was prepared daily.

## Preparation of POLY and DMTS Solutions

Polysulfide was prepared as described earlier (32). Stock solutions of hypochlorous acid and sodium sulfide nonahydrate were prepared in distilled water using polypropylene tubes blown with nitrogen gas beforehand. All later dilutions and reactions were performed in similar tubes. Reagents were kept on ice. Concentration of hypochlorous acid was calculated from the light extinction of the solution at 292 nm wavelength ( $E_{292} = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Concentration of sulfide was derived from the extinction at 230 nm ( $E_{230} = 7700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) and the reaction with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Extinction of the reaction product of sulfide and DTNB was measured at 412 nm ( $E_{412} = 28,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Sulfide concentration was calculated as the mean of the two values yielded by direct spectrophotometry and reaction with DTNB. Stock solutions of hypochlorous acid and sulfide were prepared daily. Sulfide stock solution was diluted further in distilled water to 60 mM. Hypochlorous acid solution was added slowly under stirring to produce 20 mM in the final volume. The reaction of sulfide and hypochlorous acid produces POLY. This POLY solution was diluted to twofold in distilled water containing 4.17% v/v 10x concentrated phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). This amount of PBS renders the POLY solution isosmotic. Concentrated hydrochloric acid was then added by 5  $\mu\text{L}$  under stirring to set the pH to 7.4 (app. 25–30  $\mu\text{L}$ , as required). Concentration of the resulting POLY solution was measured by cold cyanolysis, as described earlier (33). Shortly, the isosmotic and isohydric POLY solution was alkalinized by the addition of  $\text{NH}_4\text{OH}$  and reacted with KCN. After 25 min incubation at room temperature formaldehyde and Goldstein reagent ( $\text{FeCl}_3$  dissolved in 18.38%  $\text{HNO}_3$ ) were added. Absorbance of the formed orange product was detected after 15 min reaction time at room temperature at 460 nm. POLY concentration was calculated using a standard curve constructed with KSCN. The buffered solution was found to contain 3.3 mM POLY, yielding a dose of 17  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  at 5 mL/kg. Isosmotic and isohydric POLY solution was injected into the mice immediately after production. PBS was used as vehicle control.

A DMTS solution of 1 M was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). This solution was diluted to 100 mM in saline containing 2% v/v polysorbate 80. After slow dissolution, a further dilution commenced in saline to 25 mM. The 25 mM solution was injected at 10 mL/kg i.p. resulting in a dose of 250  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ . In vehicle, DMSO was applied instead of 1 M DMTS solution. Final DMTS solutions contained 2.24% v/v DMSO and 0.45% v/v polysorbate 80. Vehicle had 2.5% v/v DMSO.

## Measurement of Mechanical Pain Threshold of the Hind Paws

Mechanical hyperalgesia evoked by carrageenan was assessed by dynamic plantar aesthesiometry (DPA, Hugo Basile, Italy) 2, 4, and 6 h after the initiation of inflammation. Baseline values were taken on three separate days before paw challenge. Stimulator of the instrument reached 10 g “force” in 4 s.

## Detection of Paw Swelling by Plethysmometry

Swelling of inflamed and control hind paws was measured by plethysmometry (Hugo Basile, Italy). These measurements were performed following DPA experiments to prevent stressing the animals before aesthesiometry. Control measurements were conducted right after control DPA experiments on three separate days preceding paw challenge. Paw volumes were measured in  $\text{cm}^3$ .

## Detection of MPO Activity in the Hind Paws by Luminescent Imaging

Animals were anesthetized with ketamine and xylazine (120 and 12 mg/kg) 6 h after hind paw challenge. Mice were injected i.p. with sodium luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-dione; 150 mg/kg) dissolved in sterile PBS. Luminol signals reactive oxygen species correlated with MPO activity of neutrophil granulocytes *via* luminescence (34). Bioluminescence of luminol was captured 10 min after administration. Measurements were conducted in an IVIS Lumina II (PerkinElmer, Waltham, USA; 120 s acquisition, F/stop = 1, Binning = 8) instrument and Living Image® software (Perkin-Elmer, Waltham, USA). Identical regions of interest (ROIs) were applied to both hind paws and calibrated units of luminescence (total radiance = total photon flux/s) originating from the ROIs were detected (35).

## Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma Aldrich, Hungary unless otherwise stated. DMSO was from Reanal, Hungary. Ketamine was from Richter Gedeon, Hungary. Xylazine was from Eurovet Animal Health BV, Netherlands.

## Statistics

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Two-way repeated-measure ANOVA followed by Bonferroni's test was used for mechanonociceptive threshold and paw volume data. Some data on mechanonociceptive threshold were analyzed by plain one-way ANOVA followed by Tukey's test. Results on MPO activity were analyzed by plain one-way ANOVA and Bonferroni's test. Statistical analysis was performed by GraphPad Prism 5 software.

## RESULTS

### Inhibition of Carrageenan-Evoked Mechanical Pain by POLY Is TRPA1 and $\text{sst}_4$ Receptor-Dependent

Carrageenan-injected paws of TRPA1 WT and KO mice undergoing vehicle administration developed significantly lowered mechanical pain threshold compared to saline-treated ones

( $n = 6-7$ ; **Figures 1A,B**). POLY significantly reduced mechanical hyperalgesia in carrageenan-injected feet of TRPA1 WT animals in comparison with those of vehicle-treated ones ( $4.89 \pm 0.36$  vs.  $6.22 \pm 0.81$  g at 4 h after challenge;  $n = 6-7$ ; **Figure 1A**). Inhibitory effect of POLY on mechanical nociception in carrageenan-treated hind paws was lacking in TRPA1 KO animals compared to WT ones ( $7.12 \pm 0.6$  vs.  $5.16 \pm 0.44$  g,  $6.22 \pm 0.81$  vs.  $4.64 \pm 0.4$  g,  $5.97 \pm 0.37$  vs.  $4.46$  vs.  $0.26$  g at 2, 4 and 6 h after challenge;  $n = 6-7$ ; **Figure 1B**). POLY had no effect on the mechanical pain thresholds of saline-injected feet of TRPA1 WT and KO animals (**Figures 1A,B**).

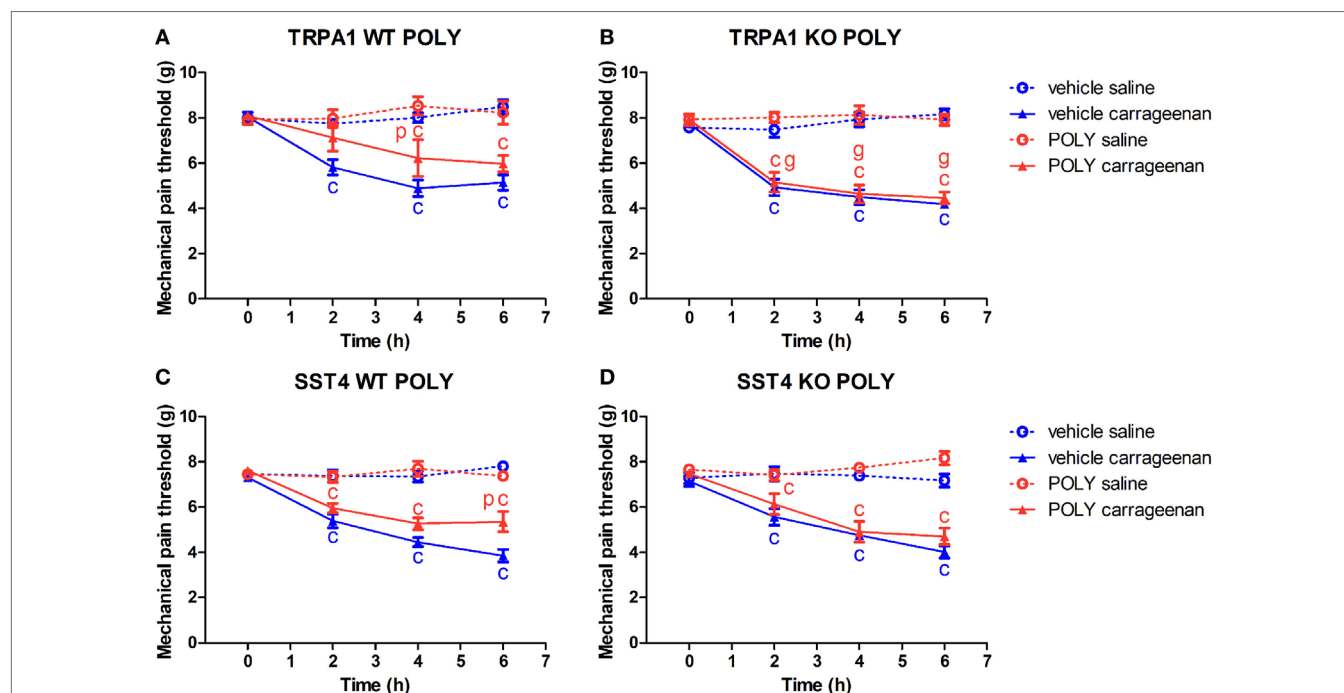
Similar to the above, both sst4 receptor WT and KO animals treated with the vehicle of POLY responded with reduced mechanical pain threshold to carrageenan administration ( $n = 6-8$ ; **Figures 1C,D**). POLY significantly relieved mechanical nociception 6 h after challenge in carrageenan-injected feet of sst4 WT animals compared to those of vehicle-treated ones ( $3.85 \pm 0.27$  vs.  $5.35 \pm 0.45$  g at 6 h after challenge;  $n = 7-8$ ; **Figure 1C**). No effect of POLY was observed in sst4 KO mice. POLY did not affect mechanical pain thresholds of saline-treated paws of sst4 receptor WT and KO animals (**Figures 1C,D**).

## No Exclusive Role of TRPA1 Ion Channel in the Protective Effect of DMTS in Carrageenan-Induced Mechanical Hyperalgesia

Carrageenan-injected hind paws of TRPA1 WT and KO animals treated with vehicle of DMTS developed mechanical

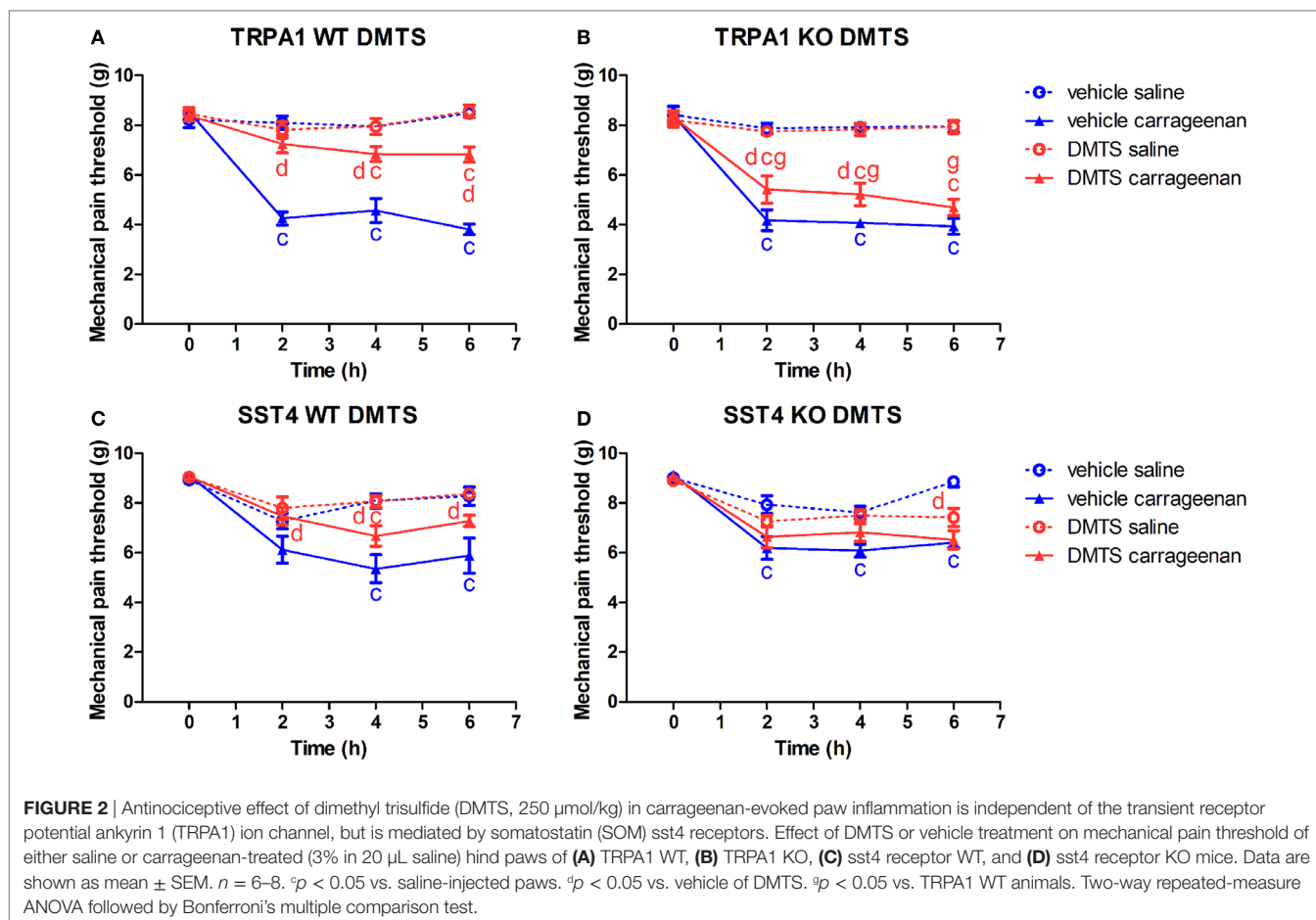
hyperalgesia compared to saline-injected contralateral paws ( $n = 6-7$ ; **Figures 2A,B**). Carrageenan-treated hind paws of TRPA1 WT mice undergoing DMTS administration showed significantly less hyperalgesia than those administered vehicle ( $n = 6-7$ ; **Figure 2A**). Protective effect of DMTS was reduced in carrageenan-injected feet of TRPA1 KO animals compared to those of TRPA1 WT ones ( $n = 6-7$ ; **Figure 2B**). However, DMTS still alleviated mechanical hyperalgesia in carrageenan-treated feet of TRPA1 KO mice at 2 and 4 h after challenge in comparison with vehicle-treated animals ( $n = 7$ ; **Figure 2B**). Saline-injected paws of DMTS and vehicle-treated TRPA1 WT and KO animals did not differ from one another (**Figures 2A,B**).

Carrageenan-injected hind paws of sst4 receptor WT and KO animals being administered vehicle of DMTS exhibited mechanical hyperalgesia compared to saline-injected control feet ( $n = 7-8$ ; **Figures 2C,D**). Carrageenan-treated hind paws of sst4 receptor WT mice injected with DMTS developed significantly smaller hyperalgesia than those of vehicle-treated control animals ( $n = 7$ ; **Figure 2C**). Mechanical pain threshold of saline-treated paws of DMTS and vehicle-injected sst4 receptor WT animals did not differ statistically (**Figure 1C**). DMTS did not inhibit nociception in carrageenan-treated feet of sst4 receptor KO animals compared to those of their WT counterparts (**Figure 2D**). Saline-treated feet of vehicle-injected sst4 receptor KO animals developed significantly larger mechanical pain threshold at 6 h than those of DMTS-treated ones ( $n = 7-8$ ; **Figure 1D**).



**FIGURE 1** | Antinociceptive effect of sodium polysulfide (POLY, 17  $\mu\text{mol/kg}$ ) in carrageenan-induced paw inflammation is mediated by transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and sst4 receptors. Mechanical pain threshold of saline or carrageenan-injected (3% in 20  $\mu\text{L}$  saline) hind paws of **(A)** TRPA1 WT, **(B)** TRPA1 KO, **(C)** sst4 receptor WT, and **(D)** sst4 receptor KO animals in response to POLY or vehicle treatment. Data are shown as mean  $\pm$  SEM.  $n = 6-8$ .  $^*p < 0.05$  vs. saline-injected paws.  $^{\#}p < 0.05$  vs. vehicle of POLY.  $^{\text{p}}p < 0.05$  vs. TRPA1 WT animals. Two-way repeated-measure ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.





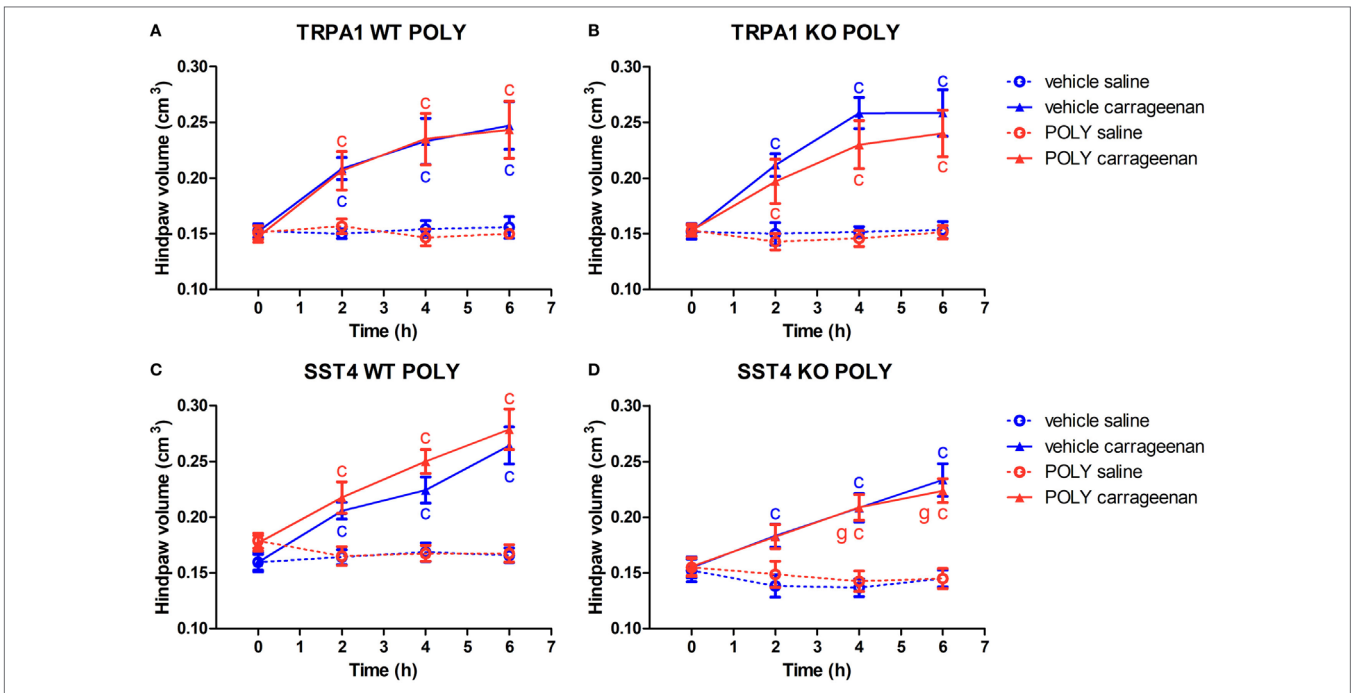
## POLY Does Not Affect Paw Swelling Evoked by Carrageenan

Both vehicle and POLY-treated TRPA1 WT and KO mice exhibited significant paw swelling upon carrageenan stimulation of the hind paws. POLY had no statistically significant inhibitory effect on the swelling of the feet in TRPA1 WT or KO animals. T-values of two-way ANOVA followed by Bonferroni's test for the comparison of POLY- and vehicle-treated carrageenan-injected paws of TRPA1 KO animals are the following: 0 h, 0.04846; 2 h, 0.8061; 4 h, 1.573; and 6 h, 1.018. A trend for inhibition by POLY can be seen in carrageenan-injected feet of TRPA1 KO mice in comparison to those of vehicle-treated ones that does not reach the level of statistical significance ( $n = 6-7$ ; **Figures 3A,B**). POLY or vehicle treatment did not change paw volumes of saline-injected control paws. Similar results were obtained in sst4 receptor WT and KO mice regarding lack of statistically significant effect of POLY in either saline or carrageenan-injected paws compared to vehicle ( $n = 6-8$ ). Volume of carrageenan-injected hind feet of sst4 KO mice was significantly smaller at 4 and 6 h post challenge than those of WT ones ( $n = 8$ ; **Figures 3C,D**).

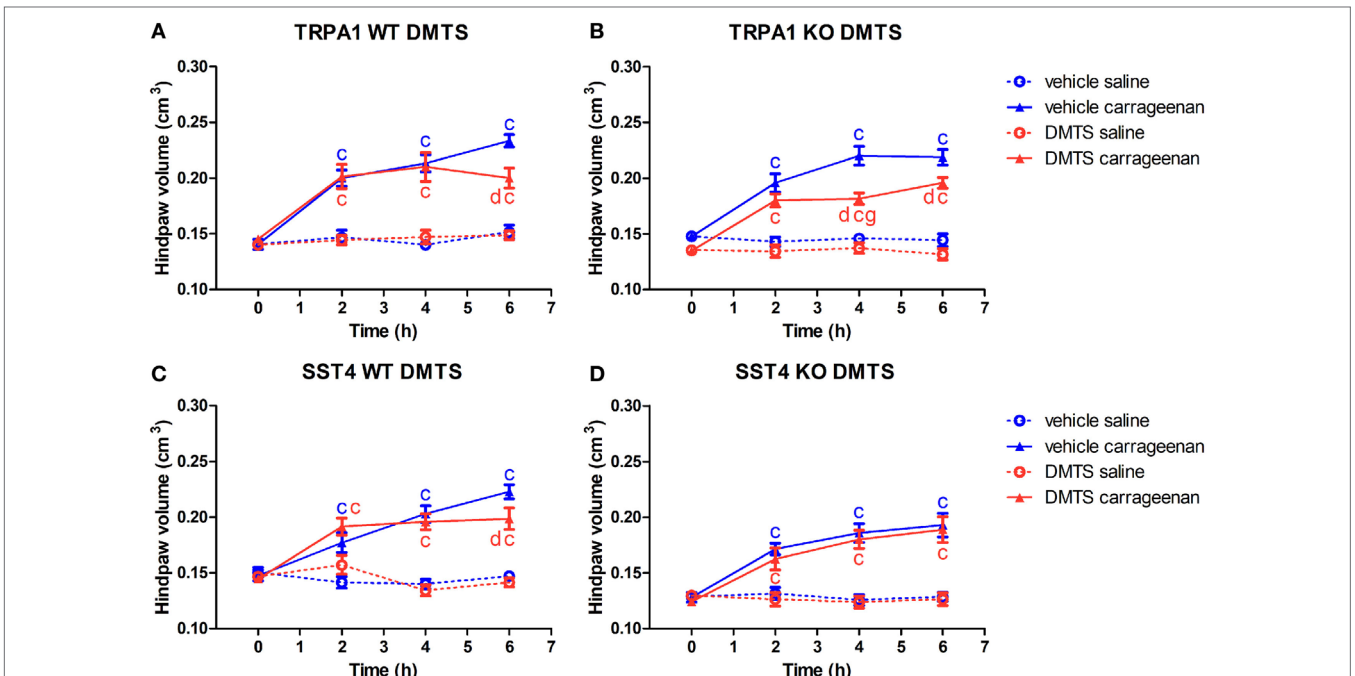
## Protective Effect of DMTS in Carrageenan-Evoked Paw Swelling Is Independent of TRPA1, but Is Mediated Through sst4 Receptors

Transient receptor potential ankyrin 1 WT and KO mice developed significant swelling of the hind feet irrespectively of DMTS or vehicle treatment ( $n = 6-7$ ). DMTS ameliorated swelling at 6 h in carrageenan-injected feet of TRPA1 WT mice compared to those of vehicle-treated ones ( $n = 6-7$ ; **Figure 4A**). DMTS significantly relieved swelling in carrageenan-treated paws of TRPA1 KO mice at 4 and 6 h after challenge in comparison with those of vehicle-treated ones ( $n = 7$ ; **Figure 4B**). DMTS produced a stronger inhibition of swelling in the carrageenan-injected feet of TRPA1 KO animals at 4 h than in those of TRPA1 WT mice ( $n = 7$ ; **Figure 4B**). Edema formation in saline-injected feet of TRPA1 WT and KO mice was not affected by DMTS or vehicle treatment.

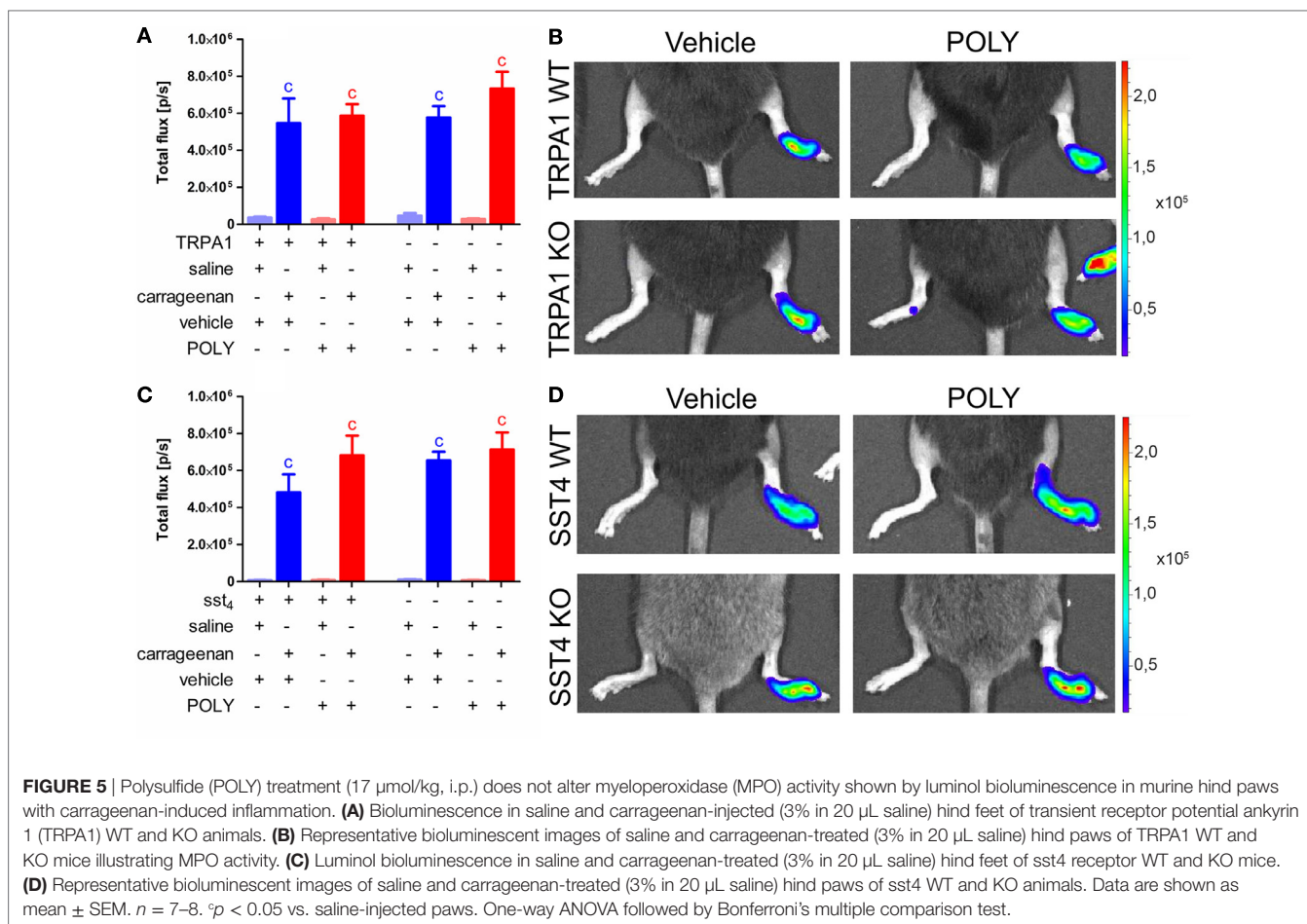
Carrageenan challenge lead to significant paw swelling in sst4 receptor WT and KO mice irrespectively of vehicle or DMTS treatment ( $n = 7-8$ ). DMTS relieved edema formation in carrageenan-treated paws of sst4 WT animals at 6 h in comparison with those of vehicle-treated ones ( $n = 7$ ; **Figure 4C**). DMTS did not show any protective effect in sst4 receptor KO mice (**Figure 4D**).



**FIGURE 3** | Sodium polysulfide (POLY; 17  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) does not affect paw swelling detected by plethysmometry in carrageenan-induced hind paw inflammation. Effect of POLY or vehicle treatment on paw swelling of either saline or carrageenan-treated (3% in 20  $\mu\text{L}$  saline) hind paws of (A) transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) WT, (B) TRPA1 KO, (C) sst4 receptor WT, and (D) sst4 receptor KO mice. Data are shown as mean  $\pm$  SEM.  $n = 6-8$ .  $^{\circ}p < 0.05$  vs. saline-injected paws. Two-way repeated-measure ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.



**FIGURE 4** | Alleviating effect of dimethyl trisulfide (DMTS, 250  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) on edema formation in carrageenan-induced hind paw inflammation is independent of the transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) ion channel, but is mediated by somatostatin (SOM) sst4 receptors. Effect of DMTS or vehicle treatment on hind paw edema detected by plethysmometry in saline or carrageenan-treated (3% in 20  $\mu\text{L}$  saline) feet of (A) TRPA1 WT, (B) TRPA1 KO, (C) sst4 receptor WT, and (D) sst4 receptor KO mice. Data are shown as mean  $\pm$  SEM.  $n = 6-8$ .  $^{\circ}p < 0.05$  vs. saline-injected paws.  $^{\text{q}}p < 0.05$  vs. vehicle of DMTS.  $^{\text{p}}p < 0.05$  vs. TRPA1 WT animals. Two-way repeated-measure ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.



## Carrageenan-Evoked MPO Activity of Accumulated Neutrophil Cells Is Unaffected by Administration of POLY

Both TRPA1 WT and KO animals developed significantly elevated MPO activity in carrageenan-injected hind paws independently from vehicle or POLY administration ( $n = 7$ ). POLY did not ameliorate MPO activity in any animal groups nor did it affect the values of saline-injected control paws (**Figures 5A,B**). Similar data were produced in sst4 receptor WT and KO mice ( $n = 7-8$ ; **Figures 5C,D**). Fluorescent determination of plasma extravasation following measurement of MPO activity produced no significant difference in either POLY or DMTS treated groups of any genetic background. (Datasheet 1 in Supplementary Material).

## DMTS Inhibits MPO Activity of Accumulated Neutrophil Granulocytes Independently of sst4 Receptors

Carrageenan-injected feet of TRPA1 WT and KO animals developed significantly increased MPO activity irrespectively of vehicle or DMTS administration ( $n = 6-7$ ). MPO activity in carrageenan-injected hind paws of DMTS-treated TRPA1 WT and KO mice tends to be smaller than in those of vehicle-treated

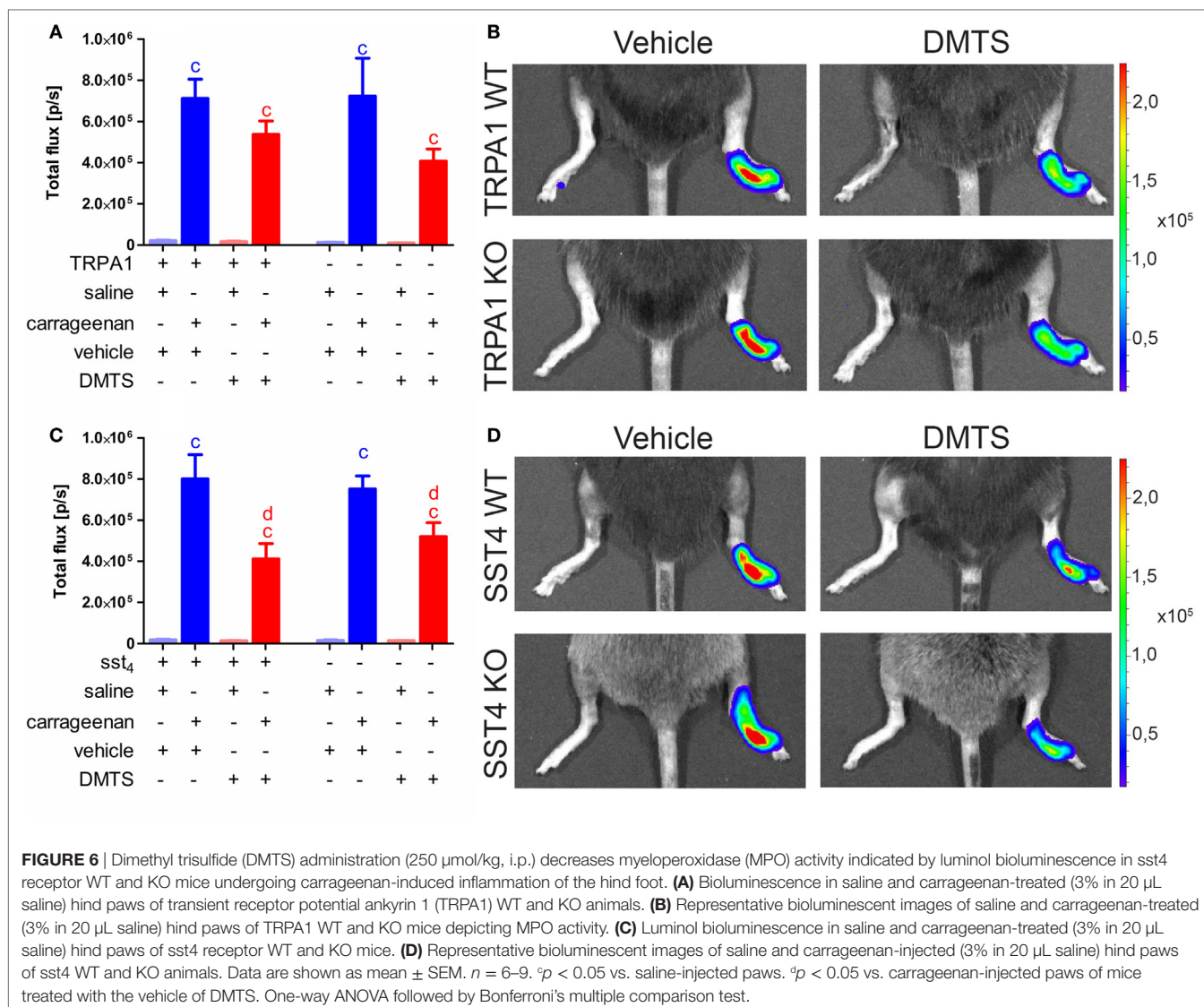
ones (**Figures 6A,B**). Sst4 WT and KO mice showed significantly elevated MPO activity upon carrageenan injection independently of vehicle or DMTS treatment ( $n = 7-9$ ). DMTS did not alter MPO activity of saline-injected control paws. DMTS ameliorated MPO activity in carrageenan-treated feet of both sst4 WT and KO mice compared to those of vehicle-treated ones ( $n = 7-9$ ; **Figures 6C,D**).

## DISCUSSION

The main novel findings of the current study are the following:

- Antinociceptive effect of POLY in carrageenan-evoked paw inflammation depends on TRPA1 ion channel opening by the drug, release of SOM from the activated peptidergic sensory nerve fibers and subsequent activation of sst4 receptors, as the antihyperalgesic effect of POLY was absent in TRPA1 and sst4 KO mice.
- Organic trisulfide DMTS possessed an antinociceptive effect not only in TRPA1 and sst4 receptor WT animals, but also in TRPA1 KO ones. Protective activity was significantly weaker in TRPA1 KO mice than in WT ones. These findings imply target molecules of DMTS on sensory nerve endings other than TRPA1 leading to activation of the fibers and SOM release.





- iii. Polysulfide administration exhibited no statistically significant effect on carrageenan-induced paw edema, unlike DMTS that ameliorated swelling in TRPA1 WT, KO, and sst4 receptor WT mice. These data point toward other mediators of DMTS effect than TRPA1 on peptidergic nociceptors.
- iv. Polysulfide had no effect on MPO activity of the inflamed hind paws. Interestingly, DMTS significantly lowered MPO activity characterizing neutrophil accumulation in sst4 receptor WT and KO animals. A similar trend emerged in TRPA1 WT and KO animals not bestriding the limit of statistical significance. Our results indicate a mechanism of action of DMTS regarding MPO activity differing completely from the one suggested by data on mechanical nociception and paw swelling. Activation of TRPA1, release of SOM and its effect on sst4 receptors do not contribute to the inhibition of MPO activity by DMTS.

Most authors familiar with the area agree that activation of TRPA1 ion channels on nociceptor sensory nerve endings by  $\text{H}_2\text{S}$ , POLYs, or other agonists is painful due to activation of the ascending pain pathway (17, 36, 37). We do not debate that TRPA1 receptor activation is acutely painful. Intraperitoneal administration of POLY and DMTS surely evoked abdominal discomfort in our experimental animals. However, it is not only well documented scientifically, but exploited clinically that activation of peptidergic primary sensory neurons mediates a later onset antinociceptive effect (we refer to the dermal patch Qutenza<sup>®</sup> with high capsaicin content used in the therapy of neuropathic pain and relying on a different mechanism of action than that suggested for POLY and DMTS by the present work).

It was reported earlier that peptidergic sensory nerve endings release neuropeptides upon activation, among them SOM. Beside a population of nociceptors SOM is expressed in the central nervous system and peripheral tissues, too (23, 38). Treatment

with TRPA1 receptor agonists or nociceptor activation by other means leads to SOM release from primary sensory neurons and the peptide reaches significant concentration in the bloodstream (9, 39–42). SOM exerts antinociceptive and anti-inflammatory effects at parts of the body distant from the site of release. These effects were shown to be mediated by somatostatin sst4 receptors (9, 25, 28, 40). Antinociceptive and anti-inflammatory SOM effects are obviated by somatostatin receptor antagonist, depletion of SOM from sensory nerves, an antibody catching the peptide and genetic lack of the sst4 receptor. On the other hand, sst4 receptor agonists induce similar beneficial effects to those of SOM (24, 30). Sst4 receptors expressed in sensory neurons, lymphocytes, and vascular endothelial cells might contribute to the protective effect (25). Non-neuronal sources of TRPA1 activation-induced surge of SOM in the circulation shall not be taken into account, hence denervation or defunctionalization of the area exposed to TRPA1 agonist prevented such effects (39, 43).

Somatostatin is a prerequisite of antihyperalgesic and anti-inflammatory effects mediated by peptidergic nerve endings. It is known that other mediators contribute too. The sensory neuron-dependent antinociceptive effect was abolished by antagonism of opioid receptors. Opioid peptides might be released from sensory neurons and leukocytes (39).

According to our data activation routes of the sensory neuron–somatostatin axis other than TRPA1 ion channels are in play in case of DMTS, as the organic trisulfide elicited antinociceptive effect and inhibited paw swelling independently of TRPA1, but still *via* sst4 receptors. Similar mechanisms might have been in play leading to the trend of inhibition of hind paw edema detected by plethysmometry in TRPA1 KO mice treated with POLY (**Figure 3B**). Several such mechanisms were suggested for H<sub>2</sub>S. TRPV1 channels co-expressed with TRPA1 can be ruled out because DMTS failed to produce Ca<sup>2+</sup> signals in CHO cells expressing the channel (9). Taken into account that organic trisulfides are donors of H<sub>2</sub>S, these mechanisms might be valid for DMTS as well (10). Conversion of inorganic POLY into sulfide in living cells is an active field of research and remains to be elucidated. H<sub>2</sub>S was reported to activate T-type CaV 3.2 channels of sensory neurons (36). These ion channels modulate pain sensation by regulating the activity of sensory neurons (44). It has to be noted that inhibition of CaV 3.2 channels by H<sub>2</sub>S was detected, too. Supraphysiological concentration of H<sub>2</sub>S behaves rather as an activator, while normal concentration leads to inhibition of T-type Ca<sup>2+</sup> channels (45). Voltage-gated K<sup>+</sup> channels are potential mediators of the effects of DMTS too. KV 4.3 voltage-gated K<sup>+</sup> channels are expressed in DRG neurons (46). H<sub>2</sub>S was reported to contract murine gastric smooth muscle by persulfidation of KV 4.3 channels. Inhibition of KV 4.3 channels was reproducible in H293 cells and could be diminished by a reducing agent and a blocker of free thiol groups that prevent protein persulfidation (47). Ability of the organic trisulfide DMTS to inhibit voltage-gated K<sup>+</sup> channels could contribute to depolarization of peptidergic sensory neurons and SOM release from these cells.

Sodium POLY is an anionic compound, thus it most probably cannot penetrate into the central nervous system. It reacts readily with cysteine amino acids of proteins and loses its negative charge. However, proteins are excluded from the brain and cannot

transport POLY there. This way the effects of POLY described in the present study might rely on a peripheral mechanism (even SOM released from the sensory nerves is excluded from the central nervous system). Potassium POLY was found to enter intact HEK293T cells and produce protein persulfidation (6). Organic trisulfides such as DMTS are highly lipophilic and penetrate the blood–brain barrier freely. An uptake *via* facilitated diffusion or active transport has been proposed in case of DMTS too (48). Target proteins in the spinal cord and brain available for DMTS might contribute to its differing effect on nociception from that of POLY.

Mechanical pain threshold data of carrageenan-injected feet of TRPA1 and sst4 WT and KO animals treated with vehicle of POLY or DMTS were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. Statistically significant difference was found between POLY- and DMTS-treated TRPA1 WT mice at 2 h ( $p < 0.05$ ), POLY- and DMTS-treated sst4 WT animals at 0 ( $p < 0.05$ ) and 6 h ( $p < 0.01$ ), POLY- and DMTS-treated sst4 KO mice at 0 ( $p < 0.05$ ) and 6 h ( $p < 0.01$ ). It is needless to state that it makes no sense to compare TRPA1 and sst4 strains. The above differences do not influence the power of conclusions on the mechanism of either DMTS or POLY action because conclusions were drawn from within either POLY- or DMTS-treated groups, where influencing factors were homogeneous.

Interestingly, a smaller paw volume was detected at 4 and 6 h in the carrageenan-injected hind paws of POLY-treated sst4 KO mice compared to the WT ones. This might conflict with protective nature of SOM discussed above. Compensatory changes in the expression of inflammatory genes in knockout animals might be responsible. Unfortunately, the sst4 receptor gene-modified mouse strain utilized in the present study has not been characterized yet in that regard. However, similar results were published on another protective neuropeptide and its receptor: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and VPAC1 receptor. PACAP is usually known as a protective peptide. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was found to be more severe in PACAP peptide knockout mice (49). Mirroring our findings on sst4 SOM receptors, animals genetically lacking VPAC1 PACAP receptors exhibited ameliorated responses in the same EAE model and in dextran sulfate-evoked colonic inflammation too (50, 51). VPAC1 KO mice had decreased mRNA levels of T<sub>H2</sub> cytokines and chemokines (50). A similar compensatory mechanism in sst4 KO animals might influence the activation of neutrophils and macrophages—the dominant cells involved in carrageenan-induced paw edema inflammation—and decrease edema formation (52).

An inhibitory effect of DMTS on MPO activity was found that is mediated by neither TRPA1 nor SOM. Sulfide potentially being released from DMTS directly inhibits MPO activity of neutrophil granulocytes offering a straightforward mechanism (10, 53). Sulfide was documented to inhibit neutrophil cell accumulation and formation of reactive oxygen species in murine ventilator-induced lung injury, as well as to interfere with Ca<sup>2+</sup>-dependent cytoskeletal activities (chemotaxis and release of azurophilic granules) of human neutrophils (54, 55). H<sub>2</sub>S suppressed adherence of rat neutrophil granulocytes in the mesenteric blood vessels detected by intravital microscopy. The effect was found

to be mediated by the inhibition of  $K_{ATP}$  ion channels (56, 57). Similarly, recruitment of human neutrophil cells was reduced by sulfide by the stimulation of L-selectin shedding. L-selectin is necessary for the adhesion of the inflammatory cells to endothelium. Activation of TNF- $\alpha$ -converting enzyme (ADAM-17) is supposed to be responsible (58).

We conclude that activation of peptidergic sensory neurons, release of SOM and subsequent activation of sst4 receptors are important mediators of antihyperalgesic effect of both POLY and DMTS. Unlike POLY, DMTS possesses anti-inflammatory activity too. The aforementioned mechanism contributes to the amelioration of edema formation by DMTS complemented by other means of peptidergic-nerve activation as the effect depends on the presence of functional sst4 receptors. DMTS is able to suppress MPO activity of neutrophil granulocytes at the site of inflammation without the involvement of the sensory neuron-SOM axis. Superior chemical stability, favorable pharmacokinetic properties, and significant translational potential—due to being a recognized food additive and having been patented as cyanide antidote—set DMTS in front of sodium POLY as a candidate of drug development which is only set back by the characteristic odor of the substance.

## ETHICS STATEMENT

All experimental procedures were carried out according to the European Communities Council Directive of 2010/63/EU. The studies were approved by the Ethics Committee on Animal Research, University of Pécs (license number: BA02/2000-47/2017).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

IB designed and performed *in vivo* experiments, as well as fluorescent and luminescent imaging. He was involved in sodium

polysulfide synthesis and cold cyanolysis and evaluation of data. HÁ performed fluorescent and luminescent imaging. HZ and PE contributed to the conception and design of the study and provided financial background. PG designed the study, performed *in vivo* experiments, contributed to sodium polysulfide synthesis, and drafted the manuscript. He provided funding too.

## ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Prof. Péter Nagy, Virág Bogdándi, and Zoltán Pálincás from the Department of Molecular Immunology and Toxicology, National Institute of Oncology, Budapest, Hungary for introducing us to polysulfide chemistry and detection. We would like to thank Mr. Alexander Bragvin Aaleskjaer from the Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary for his practical help.

## FUNDING

This study was funded by the following grants of the National Research, Development and Innovation Office—NKFIH, Hungary: OTKA PD 112171, OTKA NN 114458. This work was funded by the grants GINOP-2.3.2-15-2016-00048 STAY ALIVE and EFOP-3.6.2-16-2017-00006 LIVE LONGER from the European Regional Development Fund. This project was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (GP).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00055/full#supplementary-material>.

## REFERENCES

- Kimura H. Hydrogen sulfide and polysulfide signaling. *Antioxid Redox Signal* (2017) 27(10):619–21. doi:10.1089/ars.2017.7076
- Abiko Y, Shinkai Y, Unoki T, Hirose R, Uehara T, Kumagai Y. Polysulfide Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> regulates the activation of PTEN/Akt/CREB signaling and cytotoxicity mediated by 1,4-naphthoquinone through formation of sulfur adducts. *Sci Rep* (2017) 7(1):4814. doi:10.1038/s41598-017-04590-z
- Numakura T, Sugiura H, Akaike T, Ida T, Fujii S, Koarai A, et al. Production of reactive persulfide species in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* (2017) 72(12):1074–83. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-209359
- Misak A, Grman M, Bacova Z, Rezuchova I, Hudecova S, Ondriasova E, et al. Polysulfides and products of H<sub>2</sub>S/S-nitrosoglutathione in comparison to H<sub>2</sub>S, glutathione and antioxidant Trolox are potent scavengers of superoxide anion radical and produce hydroxyl radical by decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Nitric Oxide* (2017). doi:10.1016/j.niox.2017.09.006
- Ikeda M, Ishima Y, Kinoshita R, Chuang VTG, Tasaka N, Matsuo N, et al. A novel S-sulfhydrated human serum albumin preparation suppresses melanin synthesis. *Redox Biol* (2018) 14:354–60. doi:10.1016/j.redox.2017.10.007
- Greiner R, Pálincás Z, Bäsell K, Becher D, Antelmann H, Nagy P, et al. Polysulfides link H<sub>2</sub>S to protein thiol oxidation. *Antioxid Redox Signal* (2013) 19(15):1749–65. doi:10.1089/ars.2012.5041
- Roth M, Meiringer M, Kollmannsberger H, Zarnkow M, Jekle M, Becker T. Characterization of key aroma compounds in Distiller's grains from wheat as a basis for utilization in the food industry. *J Agric Food Chem* (2014) 62(45):10873–80. doi:10.1021/jf503281x
- Bartling CM, Andre JC, Howland CA, Hester ME, Cafmeyer JT, Kerr A, et al. Stability characterization of a polysorbate 80-dimethyl trisulfide formulation, a cyanide antidote candidate. *Drugs R D* (2016) 16(1):109–27. doi:10.1007/s40268-016-0122-3
- Pozsgai G, Payrits M, Sággy É, Sebestyén-Bátaï R, Steen E, Szőke 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
- Benavides GA, Squadrito GL, Mills RW, Patel HD, Isbell TS, Patel RP, et al. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104(46):17977–82. doi:10.1073/pnas.0705710104
- Cortese-Krott MM, Pullmann D, Feelisch M. Nitrosopersulfide (SSNO-) targets the Keap-1/Nrf2 redox system. *Pharmacol Res* (2016) 113:490–9. doi:10.1016/j.phrs.2016.09.022
- Cortese-Krott MM, Kuhnle GGC, Dyson A, Fernandez BO, Grman M, DuMond JF, et al. Key bioactive reaction products of the NO/H<sub>2</sub>S 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
- Kolluru GK, Shen X, Yuan S, Kevil CG. Gasotransmitter heterocellular signaling. *Antioxid Redox Signal* (2017) 26(16):936–60. doi:10.1089/ars.2016.6909



14. Bai A-P, Ouyang Q, Hu R-W. Diallyl trisulfide inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* (2005) 50(8):1426–31. doi:10.1007/s10620-005-2857-5
15. Lee HGH-J, Lee HGH-J, Choi K-S, Surh Y-J, Na H-K. Diallyl trisulfide suppresses dextran sodium sulfate-induced mouse colitis: NF- $\kappa$ B and STAT3 as potential targets. *Biochem Biophys Res Commun* (2013) 437(2):267–73. doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.064
16. Miltonprabu S, Sumedha NC, Senthilraja P. Diallyl trisulfide, a garlic polysulfide protects against as-induced renal oxidative nephrotoxicity, apoptosis and inflammation in rats by activating the Nrf2/ARE signaling pathway. *Int Immunopharmacol* (2017) 50:107–20. doi:10.1016/j.intimp.2017.06.011
17. 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) 11:24. doi:10.1186/s12990-015-0023-4
18. Zygmunt PM, Högestätt ED. TRPA1. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer (2014). p. 583–630.
19. Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol* (2012) 166(2):510–21. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x
20. Pereira I, Mendes SJF, Pereira DMS, Muniz TF, Colares VLP, Monteiro CRA, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 channel expression on peripheral blood leukocytes from rheumatoid arthritic patients and correlation with pain and disability. *Front Pharmacol* (2017) 8:53. doi:10.3389/fphar.2017.00053
21. Horváth Á, Tékus V, Boros M, Pozsgai G, Botz B, Borbély É, 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
22. Fernandes ES, Russell FA, Alawi KM, Sand C, Liang L, Salamon R, et al. Environmental cold exposure increases blood flow and affects pain sensitivity in the knee joints of CFA-induced arthritic mice in a TRPA1-dependent manner. *Arthritis Res Ther* (2016) 18(1):7. doi:10.1186/s13075-015-0905-x
23. ten Bokum AM, Hofland LJ, van Hagen PM. *European Cytokine Network*. (Vol. 11). Montrouge, France: John Libbey Eurotext Ltd (2000). p. 161–76.
24. Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z, Petho G. Inhibition of the function of TRPV1-expressing nociceptive sensory neurons by somatostatin 4 receptor agonism: mechanism and therapeutic implications. *Curr Top Med Chem* (2011) 11(17):2253–63. doi:10.2174/156802611796904852
25. Pintér E, Helyes Z, Szolcsányi J. Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther* (2006) 112(2):440–56. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.04.010
26. Helyes Z, Pintér E, Németh J, Sándor K, Elekes K, Szabó A, et al. Effects of the somatostatin receptor subtype 4 selective agonist J-2156 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rodents. *Br J Pharmacol* (2006) 149(4):405–15. doi:10.1038/sj.bjp.0706876
27. Helyes Z, Pintér E, Sándor K, Elekes K, Bánvölgyi A, Keszthelyi D, 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):13088–93. doi:10.1073/pnas.0900681106
28. Markovics A, Szöke É, Sándor K, Börzsei R, Bagoly T, Kemény Á, et al. Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of cortistatin-14 and somatostatin-14 in distinct in vitro and in vivo model systems. *J Mol Neurosci* (2012) 46(1):40–50. doi:10.1007/s12031-011-9577-4
29. Sándor K, Elekes K, Szabó Á, Pintér E, Engström M, Wurster S, et al. Analgesic effects of the somatostatin sst4 receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models. *Eur J Pharmacol* (2006) 539(1–2):71–5. doi:10.1016/j.ejphar.2006.03.082
30. Schuelert N, Just S, Kuelzer R, Corradini L, Gorham LCJ, Doods H. The somatostatin receptor 4 agonist J-2156 reduces mechanosensitivity of peripheral nerve afferents and spinal neurons in an inflammatory pain model. *Eur J Pharmacol* (2015) 746:274–81. doi:10.1016/j.ejphar.2014.11.003
31. Bautista DM, Jordt S-E, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* (2006) 124(6):1269–82. doi:10.1016/j.cell.2006.02.023
32. Nagy P, Winterbourn CC. Rapid reaction of hydrogen sulfide with the neutrophil oxidant hypochlorous acid to generate polysulfides. *Chem Res Toxicol* (2010) 23(10):1541–3. doi:10.1021/tx100266a
33. Wood JL. Sulfane sulfur. *Methods Enzymol* (1987) 143:25–9. doi:10.1016/0076-6879(87)43009-7
34. Botz B, Bölskei K, Kereskai L, Kovács M, Németh T, Szigeti K, et al. Differential regulatory role of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide in the serum-transfer arthritis model. *Arthritis Rheumatol* (2014) 66(10):2739–50. doi:10.1002/art.38772
35. Borbély É, Botz B, Bölskei K, Kenyér T, Kereskai L, Kiss T, et al. Capsaicin-sensitive sensory nerves exert complex regulatory functions in the serum-transfer mouse model of autoimmune arthritis. *Brain Behav Immun* (2015) 45:50–9. doi:10.1016/j.bbi.2014.12.012
36. Fukami K, Fukami K, Sekiguchi F, Sekiguchi F, Kawabata A, Kawabata A. Hydrogen sulfide and T-type Ca<sup>2+</sup> channels in pain processing, neuronal differentiation and neuroendocrine secretion. *Pharmacology* (2017) 99(3–4):196–203. doi:10.1159/000449449
37. Andersen HH, Lo Vecchio S, Gazerani P, Arendt-Nielsen L. Dose–response study of topical allyl isothiocyanate (mustard oil) as a human surrogate model of pain, hyperalgesia, and neurogenic inflammation. *Pain* (2017) 158(9):1723–32. doi:10.1097/j.pain.0000000000000979
38. Gamse R, Leeman SE, Holzer P, Lembeck F. Differential effects of capsaicin on the content of somatostatin, substance P, and neurotensin in the nervous system of the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (1981) 317(2):140–8. doi:10.1007/BF00500070
39. Pethő G, Bölskei K, Füredi R, Botz B, Bagoly T, Pintér E, et al. Evidence for a novel, neurohumoral antinociceptive mechanism mediated by peripheral capsaicin-sensitive nociceptors in conscious rats. *Neuropeptides* (2017) 62:1–10. doi:10.1016/j.npep.2017.02.079
40. Helyes Z, Szabó Á, Németh J, Jakab B, Pintér E, Bánvölgyi Á, et al. Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Rheum* (2004) 50(5):1677–85. doi:10.1002/art.20184
41. Antal A, Nemeth J, Szolcsányi J, Pozsgai G, Pinter E. Abdominal surgery performed under general anesthesia increases somatostatin-like immunoreactivity in human serum. *Neuroimmunomodulation* (2008) 15(3):153–6. doi:10.1159/000151528
42. Suto B, Bagoly T, Borzsei R, Lengl O, Szolcsányi J, Nemeth T, et al. Surgery and sepsis increase somatostatin-like immunoreactivity in the human plasma. *Peptides* (2010) 31(6):1208–12. doi:10.1016/j.peptides.2010.03.018
43. Bölskei K, Tékus V, Dézsi L, Szolcsányi J, Pethő G. Antinociceptive desensitizing actions of TRPV1 receptor agonists capsaicin, resiniferatoxin and N-oleoyldopamine as measured by determination of the noxious heat and cold thresholds in the rat. *Eur J Pain* (2010) 14(5):480–6. doi:10.1016/j.ejpain.2009.08.005
44. 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):484–95. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01256.x
45. Elies J, Scragg JL, Boyle JP, Gamper N, Peers C. Regulation of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel Cav3.2 by hydrogen sulfide: emerging controversies concerning the role of H<sub>2</sub>S in nociception. *J Physiol* (2016) 594(15):4119–29. doi:10.1113/JP270963
46. Yunoki T, Takimoto K, Kita K, Funahashi Y, Takahashi R, Matsuyoshi H, 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):2492–504. doi:10.1152/jn.00054.2014
47. Liu D-H, Huang X, Meng X-M, Zhang C-M, Lu H-L, Kim Y-C, et al. Exogenous H<sub>2</sub>S enhances mice gastric smooth muscle tension through S-sulfhydration of Kv4.3, mediating the inhibition of the voltage-dependent potassium current. *Neurogastroenterol Motil* (2014) 26(12):1705–16. doi:10.1111/nmo.12451
48. Kiss L, Bocsik A, Walter FR, Ross J, Brown D, Mendenhall BA, et al. 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
49. Tan Y-V, Abad C, Lopez R, Dong H, Liu S, Lee A, et al. Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide is an intrinsic regulator of Treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106(6):2012–7. doi:10.1073/pnas.0812257106

50. Abad C, Jayaram B, Becquet L, Wang Y, O'Dorisio MS, Waschek JA, et al. VPAC1 receptor (Vipr1)-deficient mice exhibit ameliorated experimental autoimmune encephalomyelitis, with specific deficits in the effector stage. *J Neuroinflammation* (2016) 13(1):169. doi:10.1186/s12974-016-0626-3
51. Yadav M, Huang M-C, Goetzl EJ. VPAC1 (vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor type 1) G protein-coupled receptor mediation of VIP enhancement of murine experimental colitis. *Cell Immunol* (2011) 267(2):124–32. doi:10.1016/j.cellimm.2011.01.001
52. Tejada MA, Montilla-García A, Cronin SJ, Cikes D, Sánchez-Fernández C, González-Cano R, et al. Sigma-1 receptors control immune-driven peripheral opioid analgesia during inflammation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017) 114(31):8396–401. doi:10.1073/pnas.1620068114
53. Pálkás Z, Furtmüller PG, Nagy A, Jakopitsch C, Pirker KF, Magierowski M, et al. Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase. *Br J Pharmacol* (2015) 172(6):1516–32. doi:10.1111/bph.12769
54. Mariggiò MA, Pettini F, Fumarulo R. Sulfide influence on polymorphonuclear functions: a possible role for CA<sup>2+</sup> involvement. *Immunopharmacol Immunotoxicol* (1997) 19(3):393–404. doi:10.3109/08923979709046984
55. 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) 2017:3715037. doi:10.1155/2017/3715037
56. Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S, et al. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology* (2005) 129(4):1210–24. doi:10.1053/j.gastro.2005.07.060
57. Zanardo RCO, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J* (2006) 20(12):2118–20. doi:10.1096/fj.06-6270fje
58. 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):487–97. doi:10.1097/PRS.0b013e31827c6e9c

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Bátai, Horváth, Pintér, Helyes and Pozsgai. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



# TRPA1 Ion Channel Determines Beneficial and Detrimental Effects of GYY4137 in Murine Serum-Transfer Arthritis

István Z. Batai<sup>1</sup>, Cecília Pápainé Sár<sup>2</sup>, Ádám Horváth<sup>1</sup>, Éva Borbély<sup>1</sup>, Kata Bölcskei<sup>1</sup>, Ágnes Kemény<sup>1,3</sup>, Zoltán Sándor<sup>1</sup>, Balázs Nemes<sup>1</sup>, Zsuzsanna Helyes<sup>1</sup>, Anikó Perkecz<sup>1</sup>, Attila Mócsai<sup>4,5</sup>, Gábor Pozsgai<sup>††</sup> and Erika Pintér<sup>1\*†</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School and János Szentágotthai Research Centre & Centre for Neuroscience, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>2</sup> Department of Organic and Pharmacological Chemistry, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>3</sup> Department of Medical Biology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>4</sup> Department of Physiology, Faculty of Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary, <sup>5</sup> MTA-SE "Lendület" Inflammation Physiology Research Group of the Hungarian Academy of Sciences and the Semmelweis University, Budapest, Hungary

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Syed Nasir Abbas Bukhari,  
Al Jouf University, Saudi Arabia

### Reviewed by:

Romina Nassini,  
University of Florence, Italy  
Rosanna Di Paola,  
University of Messina, Italy

### \*Correspondence:

Erika Pintér  
erika.pinter@aok.pte.hu

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work.

### Specialty section:

This article was submitted to  
Experimental Pharmacology  
and Drug Discovery,  
a section of the journal  
Frontiers in Pharmacology

**Received:** 12 April 2019

**Accepted:** 29 July 2019

**Published:** 04 September 2019

### Citation:

Batai IZ, Sár CP, Horváth Á, Borbély É, Bölcskei K, Kemény Á, Sándor Z, Nemes B, Helyes Z, Perkecz A, Mócsai A, Pozsgai G and Pintér E (2019) TRPA1 Ion Channel Determines Beneficial and Detrimental Effects of GYY4137 in Murine Serum-Transfer Arthritis. *Front. Pharmacol.* 10:964. doi: 10.3389/fphar.2019.00964

Modulation of nociception and inflammation by sulfide in rheumatoid arthritis and activation of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) ion channels by sulfide compounds are well documented. The present study aims to investigate TRPA1-mediated effects of sulfide donor GYY4137 in K/BxN serum-transfer arthritis, a rodent model of rheumatoid arthritis. TRPA1 and somatostatin sst4 receptor wild-type (WT) and knockout mice underwent K/BxN serum transfer and were treated daily with GYY4137. Functional and biochemical signs of inflammation were recorded, together with histological characterization. These included detection of hind paw mechanical hyperalgesia by dynamic plantar esthesiometry, hind paw volume by plethysmometry, and upside-down hanging time to failure. Hind paw erythema, edema, and passive movement range of tibiotarsal joints were scored. Somatostatin release from sensory nerve endings of TRPA1 wild-type and knockout mice in response to polysulfide was detected by radioimmunoassay. Polysulfide formation from GYY4137 was uncovered by cold cyanolysis. GYY4137 aggravated mechanical hyperalgesia in TRPA1 knockout mice but ameliorated it in wild-type ones. Arthritis score was lowered by GYY4137 in TRPA1 wild-type animals. Increased myeloperoxidase activity, plasma extravasation, and subcutaneous MIP-2 levels of hind paws were detected in TRPA1 knockout mice upon GYY4137 treatment. Genetic lack of sst4 receptors did not alter mechanical hyperalgesia, edema formation, hanging performance, arthritis score, plasma extravasation, or myeloperoxidase activity. TRPA1 WT animals exhibited smaller cartilage destruction upon GYY4137 administration. Sodium polysulfide caused TRPA1-dependent somatostatin release from murine nerve endings. Sulfide released from GYY4137 is readily converted into polysulfide by hypochlorite. Polysulfide potently activates human TRPA1 receptors expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells. According to our data, the protective effect of GYY4137 is mediated by TRPA1, while detrimental actions are independent of the ion channel in the K/BxN serum-transfer arthritis model in mice. At acidic pH in inflamed tissue sulfide is released from GYY4137

and reacts with neutrophil-derived hypochlorite. Resulting polysulfide might be responsible for TRPA1-mediated antinociceptive and anti-inflammatory as well as TRPA1-independent pro-inflammatory effects.

**Keywords:** GYY4137, TRPA1, K/BxN serum-transfer model, arthritis, hydrogen sulphide, polysulfide, hypochlorite, MIP-2

## INTRODUCTION

Despite a heavy improvement in remissions and disease activity due to emerging targeted disease-modifying biologic treatment options, adverse drug reactions still make the pharmacotherapy of rheumatoid arthritis (RA) a challenging quest for patient and physician (Chatzidionysiou et al., 2017; Edwards et al., 2017). Animal models of the disease are valuable tools in the search for therapeutic targets. The murine K/BxN serum-transfer arthritis is a much-preferred model of RA because it is suitable for a variety of gene-deficient mouse strains and is extremely reliable. Arthritis is induced by intraperitoneal administration of serum from genetically arthritic K/BxN animals. Development of inflammatory response involves autoantibody formation against the enzyme glucose-6-phosphate isomerase and immune complex-driven activation of neutrophil granulocytes and macrophages. Several cytokines, chemokines, the complement system, adhesion molecules, and receptors contribute to the molecular pathology. Although glucose-6-phosphate isomerase is surely not the major autoantigen in human RA, the K/BxN serum-transfer arthritis model is very useful in the investigation of the interaction between autoantibodies and the innate immune system, as well as inflammatory pain (Christensen et al., 2016).

The gaseous mediator hydrogen sulfide (in the following text, the term sulfide denotes  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HS}^-$ , and  $\text{S}^{2-}$ ) is known to play a regulatory role in inflammation. Some authors report anti-inflammatory effects of  $\text{H}_2\text{S}$ , while others have found pro-inflammatory action (Burguera et al., 2017; Muniraj et al., 2017). The two kinds of findings might be both true and complementary. Inflammation might induce the  $\text{H}_2\text{S}$ -producing enzyme cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE) resulting in elevated  $\text{H}_2\text{S}$  concentration.  $\text{H}_2\text{S}$  might contribute to inflammatory vasodilatation and might compromise mitochondrial function by inhibiting complex IV of the electron transport chain. On the other hand, smaller  $\text{H}_2\text{S}$  concentration in the mitochondria can actually fuel oxidative phosphorylation and mitigate oxidative stress (Ahmad and Szabo, 2016). Today, slow-releasing donors of sulfide are preferred over inorganic sulfide sources (e.g.,  $\text{NaHS}$  and  $\text{Na}_2\text{S}$ -nonahydrate). Inorganic salts produce a swift but short-lived elevation of sulfide concentration not necessarily representing physiological conditions. Slow-releasing donors might better mimic the endogenous situation. The two most studied donors are GYY4137 and AP39. GYY4137 releases sulfide in every tissue, while AP39 is selective to mitochondria, enabling the investigation of the protective effects of the gasotransmitter (Li et al., 2008; Szczesny et al., 2014).

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) non-selective cation channel belongs to transient receptor potential ankyrin

receptor subfamily of transient receptor potential ion channels. It is the sole ankyrin-type TRP channel in mammals. TRPA1 is expressed in primary nociceptor neurons and non-neuronal cells including joint-related cells (e.g., chondrocytes and synoviocytes) and immune cells (Zygmunt and Högestätt, 2014). TRPA1 is known to contribute to inflammatory hyperalgesia in murine complete Freund's adjuvant-induced (CFA) arthritis—another animal model of human RA (Fernandes et al., 2016; Horváth et al., 2016). Expression of TRPA1 channels in peripheral blood leukocytes of RA patients was shown to correlate with the perceived pain (Pereira et al., 2017). TRPA1 receptors can be activated by various stimuli ranging from temperature to chemicals. Electrophilic agents excite TRPA1 by forming covalent bonds with cysteine residues of the receptor (Zygmunt and Högestätt, 2014). Sulfide is able to activate TRPA1 receptors (Hajna et al., 2016). This interaction is most probably transmitted by polysulfides—originating from sulfide—in concert with hypochlorite or nitric oxide (Greiner et al., 2013; Cortese-Krott et al., 2015). These characteristics set sulfide in the focus point of the modulation of the inflammatory process in RA, marking it as a promising drug target. A well-characterized potential downstream mechanism of activation of peptidergic nociceptors via TRPA1 opening is a consequent release of somatostatin (SOM) from the nerve fibers and signaling of sst4 receptors on nociceptors and other cell types (Pintér et al., 2006).

The present study was intended to investigate the role of sulfide and TRPA1 channels in the murine K/BxN arthritis model. The slow-releasing donor of sulfide, GYY4137, was administered to TRPA1 wild-type (WT) and knockout (KO) animals undergoing serum-evoked polyarthritis. Functional parameters of the arthritic changes (e.g., mechanical hyperalgesia and grip strength) were evaluated alongside with markers of inflammation (e.g., clinical score, plasma extravasation, myeloperoxidase (MPO) activity, and cytokine concentrations in the affected joints). Similar experiments were conducted with mice lacking somatostatin sst4 receptor gene. Release of SOM from the isolated skin pieces of TRPA1 WT and KO animals due to stimulation with polysulfide (POLY) was detected by radioimmunoassay. Formation of POLY from GYY4137 upon reaction with hypochlorite was characterized by cold cyanolysis.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Experiments were carried out on male TRPA1 or sst4 deficient mice (KO) and on their wild-type counterparts



(WT). Both strains were generated on C57BL/6J background. The experimental animals were offspring of heterozygous parents, and their genotype was determined using real-time polymerase chain reaction (PCR) technique. The original heterozygous TRPA1 breeding pair was a generous gift from Pierangelo Geppetti (University of Florence, Italy). These mice were originally generated and characterized by Bautista and colleagues (Bautista et al., 2006). Sst4 KO animals were generated by Jeremy P. Allen and Piers C. Emson (Helyes et al., 2009). The mice were kept and bred in the Laboratory Animal House of the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy at the University of Pécs under standard pathogen-free conditions. Standard mouse chow and water were provided *ad libitum*. Temperature was maintained between 24°C and 25°C, and the light–dark cycle was set to 12 h. Mice were housed in groups of 5–10 in polycarbonate cages (330-cm<sup>2</sup> floor space, 12-cm height) on wood shavings bedding. Certificate numbers of the animal breeding facilities (*Department of Pharmacology and Pharmacotherapy and Szentágothai Research Centre, University of Pécs*) are ZOHU0104L09 and ZOHU0104L03.

## Drugs and Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, except for the following: ketamine (Calypsol, Gedeon Richter Plc., Budapest, Hungary), xylazine (Sedaxylan, Eurovet Animal Health B.V., Bladel, the Netherlands), luminol sodium salt (Gold Biotechnology, Olivette, MO, USA), and IR-676 (Spectrum-Info Ltd., Kyiv, Ukraine). GYY4137 was synthesized at the Department of Organic Chemistry, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, as previously described (Li et al., 2008).

## Detection of Polysulfide Formation From GYY4137 by Cold Cyanolysis

GYY4137 was dissolved in distilled water (7.95 mmol L<sup>-1</sup>), and equal volume of citrate buffer (100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 3.0) was added. The mixture was incubated for 90 min, and equal volume of hypochlorous acid (200 μmol L<sup>-1</sup>) was added. Cold cyanolysis was performed as described earlier (Wood, 1987). The mixture of hypochlorous acid and GYY4137 was alkalized and reacted with KCN. Formaldehyde and Goldstein reagent (Bátaï et al., 2018) were added, and absorbance was detected at 460 nm. POLY concentration was calculated according to a standard curve constructed with KSCN.

## Measurement of Ca<sup>2+</sup> Influx Into CHO Cells Expressing Human TRPA1 in Response to GYY4137 and Hypochlorous Acid by Flow Cytometry

Chinese hamster ovary (CHO) cells were transfected with human TRPA1, as described earlier (Pozsgai et al., 2017). Human TRPA1 cDNA clone was purchased from Life Technologies CloneRanger collection (clone ID: 100016279).

The cDNA was inserted between the cytomegalovirus (CMV) promoter and the bovine growth hormone polyA region in pT3CMV vector. pT3CMV originates from the pT2/BH Sleeping Beauty transposon vector (Addgene, ID: 26556) with neomycin expression cassette. CHO cells were co-transfected with vectors containing human TRPA1 and the pCMVSB100x vector carrying the transposase. Successful clones were selected in medium containing G418 (500 μg mL<sup>-1</sup>). After trypsin treatment, cells were loaded with Fluo-4 AM (Invitrogen) for 30 min at 37°C. Extracellular solution (ECS) was added (400 μL, containing in mmol L<sup>-1</sup>: NaCl, 160; KCl, 2.5; CaCl<sub>2</sub>, 1; MgCl<sub>2</sub>, 2; HEPES, 10; glucose, 10; pH 7.3). Sodium sulfide nonahydrate (Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O) was dissolved in Millipore water. Tubes used were previously filled with nitrogen. Concentration of the solution was measured by detecting light absorption at 230 nm (based on  $E_{230} = 7,700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), as well as adding 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) and measuring light absorption at 412 nm. A concentration response curve was constructed using various concentrations of sodium sulfide nonahydrate. GYY4137 was dissolved in distilled water (3 mg mL<sup>-1</sup>, 7.95 mmol L<sup>-1</sup>). GYY4137 was diluted further in ECS buffer, and a concentration–response curve was produced. POLY (10 μmol L<sup>-1</sup> in ECS) was added to the cell suspensions, too. POLY was prepared as described earlier (Bátaï et al., 2018). Stock solutions of hypochlorous acid and sodium sulfide nonahydrate were prepared in distilled water using polypropylene tubes blown with nitrogen gas. Stock solutions were aliquoted and stored at –20°C. Sulfide stock solution was diluted in distilled water to 60 mmol L<sup>-1</sup>. Hypochlorous acid solution was added slowly to produce 20 mmol L<sup>-1</sup> concentration. The resulting POLY solution was diluted two-fold in distilled water containing 4.17% v/v 10× concentrated phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Concentrated hydrochloric acid was then added gradually to set the pH to 7.4. This POLY solution was diluted further in ECS buffer. Sulfide and POLY solutions were kept on ice and were protected from direct light. We examined if polysulfide resulting from the reaction GYY4137-released sulfide and hypochlorous acid activates TRPA1 ion channels in CHO cells. Allyl isothiocyanate (100 μmol L<sup>-1</sup>) was used as positive control. GYY4137 was dissolved in distilled water (3 mg mL<sup>-1</sup>, 7.95 mmol L<sup>-1</sup>). Equal volume of hydrochloric acid (1 mmol L<sup>-1</sup>) was added, and the mixture was incubated at room temperature in the dark for 120 min. Sulfide released from GYY4137 was determined with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) as described above. Hypochlorous acid (616 μmol L<sup>-1</sup> final concentration in the mixture) was added to convert sulfide into POLY. Respective concentrations of hypochlorous acid and GYY4137 were tested separately in TRPA1-expressing CHO cells. The mixture of acidified GYY4137 and hypochlorous acid was examined using CHO cells expressing human TRPA1 ion channels and untransfected ones. Cell suspensions were analyzed by flow cytometry. Fluo-4 AM was excited at 488 nm, and fluorescence was detected at 504 nm. Mean green fluorescence of the samples was compared with base fluorescence of dye-loaded control cells, resulting in a baseline value of 1. Some cell groups



were pre-incubated with selective TRPA1 receptor antagonist HC-030031 (50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  in ECS) for 5 min. Flow cytometry experiments were performed at room temperature.

### Detection of Somatostatin Release From Murine Nerve Endings by Radioimmunoassay

POLY was prepared as described above (Nagy and Winterbourn, 2010; Bátaí et al., 2018). POLY solution was diluted in distilled water to yield 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  in the organ bath.

TRPA1 WT and KO mice were sacrificed by cervical dislocation. Hind legs were shaved by a fine clipper. The skin was removed and placed in oxygenated synthetic interstitial fluid (SIF; composition in  $\text{mmol L}^{-1}$ : NaCl 107.8,  $\text{NaHCO}_3$  26.2, sodium gluconate 9.64, sucrose 7.6, glucose 5.05, KCl 3.48,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.67,  $\text{CaCl}_2$  1.53, and  $\text{MgSO}_4$  0.69) at room temperature. Skin samples were fixed inside-out on acrylic rods by sutures and were transferred to 37°C oxygenated SIF solution in a shaking bath. After being shaken for 30 min, samples were transferred into glass test tubes containing 800  $\mu\text{L}$  of SIF for 5 min. Then samples were forwarded into a new series of similar tubes containing 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of POLY in SIF for 5 min, and previous incubating solutions were harvested. Finally, the samples were placed into other tubes containing 800  $\mu\text{L}$  of SIF for another 5 min. POLY-containing and final incubating solutions were harvested, too. The solutions of the first series were evaluated for basal, the ones from the second series for stimulated, and the ones of the third series for post-stimulated SOM release. In some experiments, stimulated and post-stimulated fractions contained 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of HC-030031 (Pozsgai et al., 2017). Wet weight of skin samples was taken after experiments. Radioimmunoassay was performed to detect somatostatin-like immunoreactivity in the incubating solutions as described earlier (Pozsgai et al., 2017). Shortly, phosphate buffer (pH 7.4, 50  $\text{mmol L}^{-1}$ ) containing sodium chloride (100  $\text{mmol L}^{-1}$ ), sodium azide (0.05% w/v), and bovine serum albumin (0.25% w/v) was used for the assay. The assay includes samples or standard peptides, tracer, and antiserum. Somatostatin-14 was used as standard. Tracer was produced from (Tyr1)-somatostatin-14 by iodinating the peptide with  $\text{Na}^{125}\text{I}$ . Iodination is catalyzed by 1,3,4,6-tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenylglycouril. Antiserum has been raised in sheep against somatostatin-14-bovine thyroglobulin. Antiserum was diluted 1:260,000. Immune complexes and free peptides were separated by Norit-A (10% w/v), dextran (molecular weight [MW]: 65–73 kDa, 1% w/v), and commercial fat-free milk powder (0.2% w/v) in distilled water. Radioactivity of both free peptides and immune complexes were detected (Gamma NZ-310, Hungary). Standard curve was generated by plotting the ratio of the activity of pellets and activity of supernatants of standard samples. Results are expressed as total SOM-like immunoreactivity (fmol SOM-LI) per milligram wet skin. Total SOM-LI is made up of the sum of stimulated and post-stimulated values with basal release values subtracted from each value.

### In Vivo Luminescence and Fluorescence Imaging

In the K/BxN serum-transfer arthritis model, i.p. luminol sodium salt (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-dione; 150  $\text{mg kg}^{-1}$ ) dissolved in sterile PBS (30  $\text{mg mL}^{-1}$ ) was used to detect production of reactive oxygen species (ROS) correlated with neutrophil MPO activity. Furthermore, i.v. IR-676 (0.5  $\text{mg kg}^{-1}$ ) fluorescent dye dissolved in aqueous solution of Kolliphor HS 15 (5% v/v) was used to assess plasma protein extravasation 0, 2, and 6 days following serum administration (Botz et al., 2014). Mice were anesthetized by ketamine/xylazine (120/12  $\text{mg kg}^{-1}$  i.p.). Bioluminescence was measured for 10 min and fluorescence 20 min postinjection using the IVIS Lumina II (PerkinElmer, Waltham, USA; 120-s acquisition, F/stop = 1, binning = 8 in bioluminescence; auto acquisition time, F/stop = 1, binning = 2, excitation/emission filter 640/700 nm in fluorescence). Living Image® software (PerkinElmer, Waltham, USA) was used. Identical region of interests (ROIs) were drawn around both ankle joints; then calibrated units of luminescence (total radiance = total photon flux  $\text{s}^{-1}$ ) and fluorescence (total radiant efficiency =  $(\text{photons s}^{-1})(\mu\text{W cm}^{-2})^{-1}$ ) originating from the ROIs were analyzed (Borbély et al., 2015).

### K/BxN Serum-Transfer Model of Autoimmune Arthritis

Kouskoff et al. generated the K/BxN spontaneously arthritic mouse strain with distinct features representing human rheumatoid arthritis (Kouskoff et al., 1996). Transferring sera from K/BxN mice into non-arthritic mouse strains results in a similar arthritic condition as described in the donor K/BxN strain. In a comprehensive review, Christensen et al. summarized the underlying pathogenesis and distinct features of the K/BxN serum-transfer arthritis model (Christensen et al., 2016). Briefly, in our protocol, serum-transfer arthritis was induced by a single intraperitoneal injection of 300  $\mu\text{L}$  of serum acquired from K/BxN mice. The non-arthritogenic control serum was obtained from BxN mice. Prior to the induction of arthritis, mice received a single treatment of slow-releasing sulfide donor GYY4137 or PBS. The treatment with GYY4137 (50  $\text{mg kg}^{-1}$  day $^{-1}$ ) or PBS was continued daily for 7 days after serum transfer. The intraperitoneal administration of GYY4137 or vehicle always preceded the scoring, functional tests, and *in vivo* imaging by 1 h. The following experimental animal groups were examined: 1) K/BxN serum-treated arthritic TRPA1 WT mice injected daily with vehicle of GYY4137 (PBS) participating in dynamic plantar esthesiometry, drop latency testing, plethysmometry, scoring, and luminescence and fluorescence imaging to detect myeloperoxidase activity and plasma extravasation, as well as histological processing of tibiotarsal joints; 2) TRPA1 KO mice receiving K/BxN serum, identical vehicle treatment, and evaluation; 3) K/BxN serum-injected sst4 receptor WT animals administered vehicle undergoing the above experimental processes; 4) sst4 KO mice treated with K/BxN serum and vehicle used in similar experiments; 5) K/BxN serum-treated arthritic TRPA1 WT mice injected daily with GYY4137 (50  $\text{mg kg}^{-1}$  day $^{-1}$ )

undergoing dynamic plantar esthesiometry, drop latency testing, plethysmometry, scoring, and luminescence and fluorescence imaging to detect myeloperoxidase activity and plasma extravasation, as well as histological processing of tibiotarsal joints; 6) TRPA1 KO animals treated with K/BxN serum and GYY4137 ( $50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) participating in the above experiments; 7) K/BxN serum-injected sst4 receptor WT mice receiving GYY4137 ( $50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) and used in the above experimental settings; 8) K/BxN serum-treated sst4 KO animals injected with GYY4137 ( $50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) undergoing identical processes; 9) K/BxN serum-injected TRPA1 WT mice administered vehicle of GYY4137 (PBS) daily utilized to collect subcutaneous lavage fluid from inflamed hind paws for cytokine detection; 10) TRPA1 KO mice treated with K/BxN serum and vehicle used to collect lavage fluid; 11) K/BxN serum-injected TRPA1 WT mice administered GYY4137 ( $50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) used to collect subcutaneous lavage fluid from inflamed hind paws for cytokine detection; 12) K/BxN serum-treated TRPA1 KO mice administered GYY4137 used to collect lavage samples of the hind paws; and 13–24) the above treatments were performed on non-arthritic control animals injected with BxN serum to validate the serum-transfer arthritis model. **Figure 1** gives a schematic representation of the treatment groups.

## Dynamic Plantar Esthesiometry

Mechanical hyperalgesia of the hind paws was determined by dynamic plantar aesthesiometry (DPA, Ugo Basile 37400, Comerio, Italy). The measurements were performed on three separate days prior to induction of serum-transfer arthritis and thereafter on days 3, 5, and 7. A maximum force equivalent to 10 g with a 4-s latency was applied to the hind paws. Mechanical hyperalgesia was defined as decrease of mechanical pain threshold compared with baseline (average of the three measurements before induction of arthritis) and was expressed in grams.

## Drop Latency/Grip Test

To assess the function of the joints and the overall stamina of the animals, a simple grip test was performed on days 3, 5, and 7. Mice were placed on a wire grid, which was then lifted up in horizontal position and rotated  $180^\circ$  around its horizontal axis, leaving the animal in an upside-down position and forcing it to hold onto the grid against its bodyweight. Healthy mice are able to cling to the grid for at least 20 s. The test was stopped at 60 s. Baseline was acquired during three measurements performed on separate days prior to the induction of serum-transfer arthritis.

## Detection of Hind Paw Volume by Plethysmometry

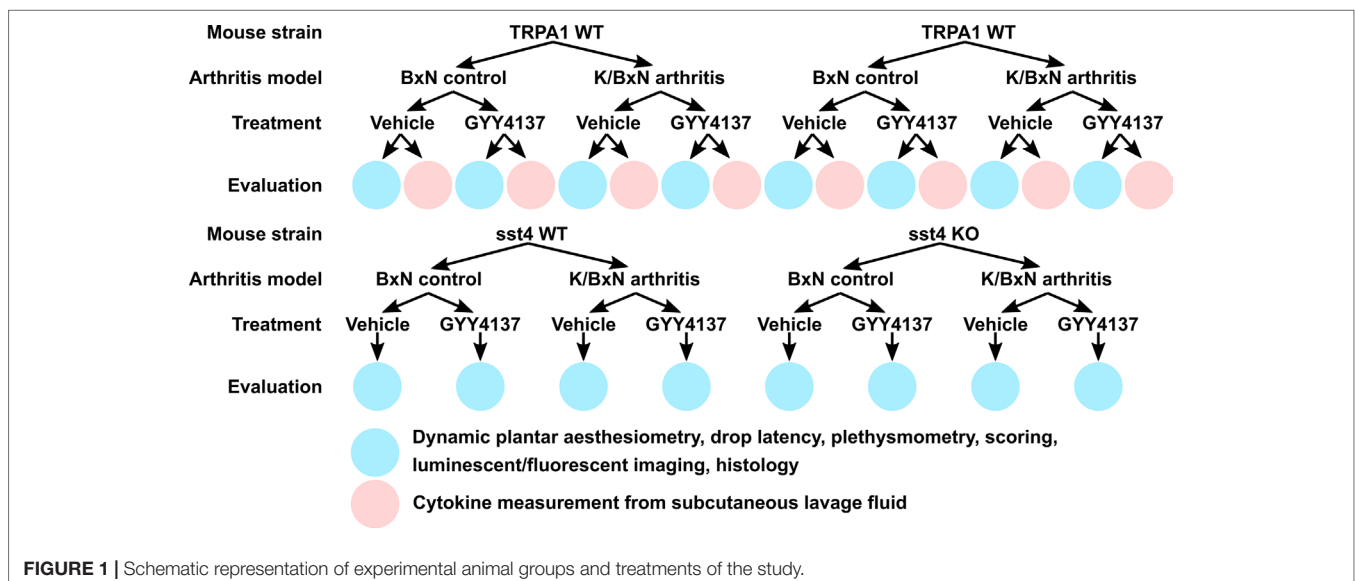
Volumes of the hind paws were measured by plethysmometry (Ugo Basile Plethysmometer 7140, Comerio, Italy). Both mechanical pain threshold and paw volume measurements were carried out on the same days: three times prior to the induction of arthritis and on days 3, 5, and 7 thereafter. Esthesiometry was always performed first followed by plethysmometry. Baseline volume is the average of three measurements from before the induction of arthritis. Data are expressed in cubic centimeters.

## Arthritis Score

The extent of edema formation and hyperemia of the hind limbs were evaluated on days 3, 5, and 7 according to a semiquantitative clinical score system (0–1.5, healthy condition; 1.5–2.5, minimal signs of disease; 2.5–4, mild inflammation; 4–7, moderate inflammation; and 7–10, severe inflammation) (Jakus et al., 2010; Botz et al., 2014).

## Detection of Inflammatory Cytokines

Cytokine measurements were performed on samples of subcutaneous flush fluid acquired from hind paws as described by Kovács et al. (2014). Briefly, after induction of arthritis, on day 3, mice were anesthetized with ketamine/xylazine



(100/10 mg kg<sup>-1</sup>) and were sacrificed via cervical dislocation. Subcutaneous tissue of the hind paws was flushed immediately with 1 mL of ice-cold PBS solution supplemented with 10 mmol L<sup>-1</sup> of EDTA (pH 7.5) and 20 mmol L<sup>-1</sup> of HEPES (pH 7.4). Samples were then snap frozen in liquid nitrogen and were stored at -80°C. Quantitative determination of IL-1 $\beta$ , KC, MIP-1 $\alpha$ , and MIP-2 concentrations from the samples were performed using MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel—Immunology Multiplex Assay (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). A Luminex 100 device was used for the measurement, and the interpretation of data was performed with the Luminex 100 IS software.

## Histological Evaluation

Tibiotarsal joints were harvested on day 7. Samples were fixed in 4% buffered paraformaldehyde and then decalcified and embedded in paraffin. Sections of 3–5  $\mu$ m were produced and stained with hematoxylin and eosin (Szabo et al., 2005). Histopathological changes were scored (0–3) by a blinded independent expert. Factors taken into consideration were the following: cartilage destruction, mononuclear cell infiltration, synovial cell proliferation, fibroblast number, and collagen deposition. A composite arthritis score (ranging 0–12) was created (Botz et al., 2014).

## Statistical Analysis

Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean. Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's, Dunnett's, or Bonferroni's test. Data of SOM release were analyzed by Kruskal–Wallis test due to deviation from normal distribution in various tests. Scatterplots of data on mechanical pain threshold, arthritis score, suspension time, and hind paw volume show all individual data points. Box plots on histological scores show median values (horizontal line), minimal and maximal values (whiskers), and the 25th and 75th percentiles (box). Histological score values were analyzed by Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test. Concentration–response curves were fitted with GraphPad Prism 5.0 using a four-parameter equation.

## RESULTS

### Addition of Hypochlorous Acid to GYY4137 Leads to Formation of Polysulfide

Sulfide was released from acidified solution of GYY4137. The GYY4137 solution released  $328.1 \pm 39.33 \mu\text{mol L}^{-1}$  of sulfide after 90-min incubation with citrate buffer (pH 3.0). Addition of  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  of hypochlorous acid resulted in the formation of  $77.15 \pm 9.85 \mu\text{mol L}^{-1}$  of POLY ( $n = 18$ , data of six different experiments). Incubation of GYY4137 solution with equal volume of hydrochloric acid ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) for 120 min resulted in the release of  $147.3 \pm 15.29 \mu\text{mol L}^{-1}$  of sulfide ( $n = 19$ , data of four different experiments). Treatment of CHO cells with sodium sulfide nonahydrate solution elicited calcium responses

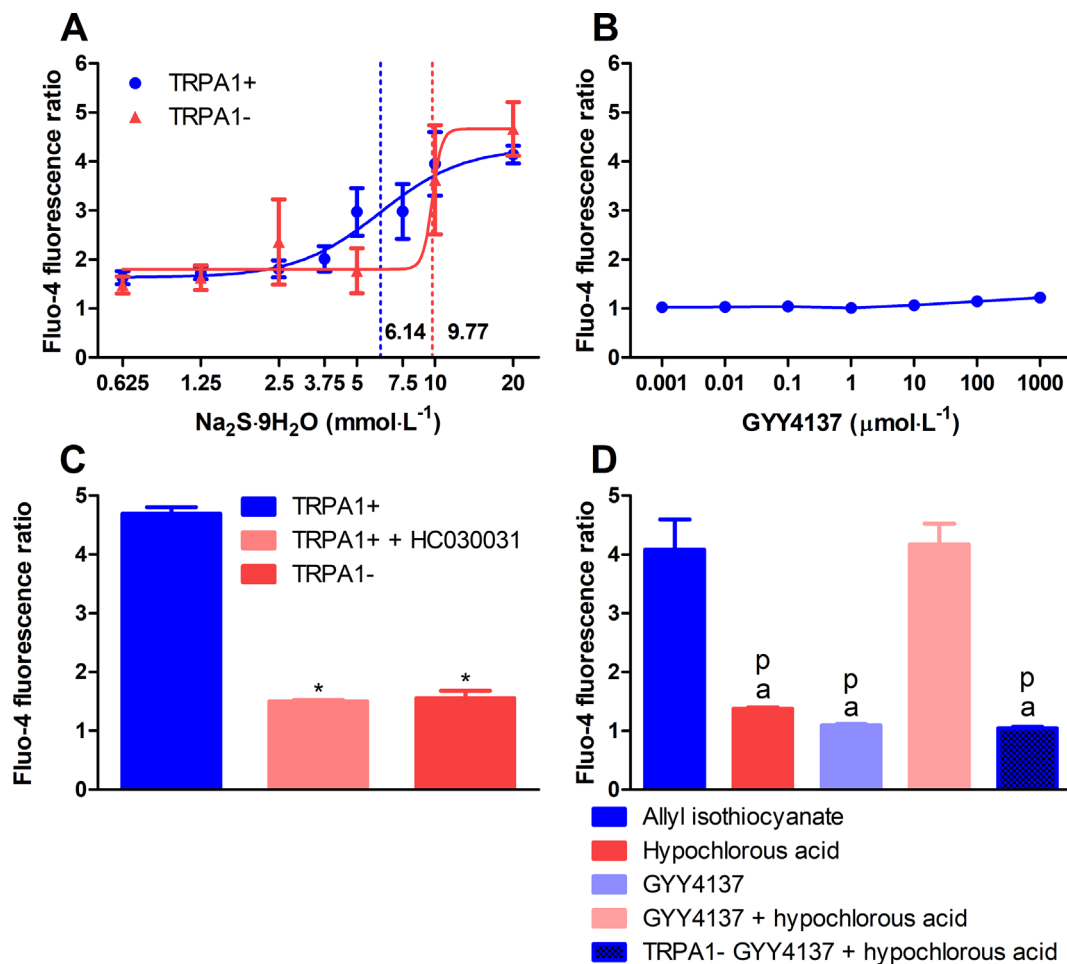
only at extremely supraphysiological concentrations. EC<sub>50</sub> values in CHO cells expressing human TRPA1 ion channels and in ones lacking the channel were 6.14 and 9.77 mmol L<sup>-1</sup>, respectively ( $n = 5–7$ , data from four experiments; **Figure 2A**). No calcium influx was detected below 1 mmol L<sup>-1</sup>. Addition of GYY4137 to CHO cells with human TRPA1 up to 1 mmol L<sup>-1</sup> did not induce any calcium signals ( $n = 5$ , data from four experiments; **Figure 2B**). POLY ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) activated CHO cells expressing human TRPA1. TRPA1 activation by POLY was prevented by HC-030031 ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) and was absent in cells not expressing the ion channel ( $n = 12$ , each data point represents  $\times 10^4$  cells, **Figure 2C**). We investigated if POLY produced in GYY4137 solution acidified with hydrochloric acid (see above) by the addition of hypochlorous acid activates TRPA1 in CHO cells. Responses to TRPA1 agonist allyl isothiocyanate ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) were used as positive control. Neither GYY4137 solution acidified with hydrochloric acid nor hypochlorous acid produced calcium influx compared with allyl isothiocyanate. On the other hand, the combination of acidified GYY4137 and hypochlorous acid induced a similar calcium response to that seen with allyl isothiocyanate. The calcium signal was absent if CHO cells not expressing TRPA1 ion channel were used ( $n = 5–8$ , **Figure 2D**).

### Sodium Polysulfide Stimulates Somatostatin Release From Nociceptor Nerve Endings in a TRPA1-Dependent Manner

Skin flaps of TRPA1 WT mice responded to stimulation with  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  of POLY by releasing  $0.1407 \pm 0.044 \text{ fmol mg}^{-1}$  of somatostatin-like immunoreactivity (SOM-LI). Treatment of the samples with  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  of HC-030031 and genetic lack of TRPA1 ameliorated SOM liberation ( $0.1407 \pm 0.044$  vs.  $0.0279 \pm 0.017$  and  $0.0386 \pm 0.012 \text{ fmol mg}^{-1}$ ,  $n = 12$ , data from three separate experiments, **Figure 3**). Stimulation of skin samples with sodium sulfide nonahydrate up to 1 mmol L<sup>-1</sup> did not provoke comparable SOM secretion (data are not shown).

### GYY4137 Aggravates Mechanical Hyperalgesia in Arthritic TRPA1 KO Animals and Ameliorates It in TRPA1 WT Animals

K/BxN serum decreased the mechanical pain threshold in vehicle- or GYY4137-treated TRPA1 WT and KO mice (WT, BxN, vehicle treated,  $n = 7$ ; WT, BxN, GYY4137 treated,  $n = 7$ ; WT, K/BxN, vehicle treated,  $n = 9$ ; WT, K/BxN, GYY4137 treated,  $n = 9$ ; KO, BxN, vehicle treated,  $n = 9$ ; KO, BxN, GYY4137 treated,  $n = 6$ ; KO, K/BxN, vehicle treated,  $n = 9$ ; WT, K/BxN, GYY4137 treated,  $n = 10$ ) compared with the non-arthritis control mice (**Figures 4B, C**). On day 3, GYY4137 aggravated mechanical nociception in arthritic TRPA1 KO animals than did both vehicles of GYY4137 in TRPA1 KO animals and TRPA1 WT GYY4137-treated ones ( $6.43 \pm 0.33$  vs.  $7.43 \pm 0.29 \text{ g}$  in TRPA1 KO vehicle treated and vs.  $7.59 \pm 0.25 \text{ g}$  in TRPA1 WT GYY4137 treated; **Figure 4A**). On day 7, GYY4137 treatment ameliorated mechanical pain in TRPA1 WT animals compared with KO ones ( $6.15 \pm 0.36$  and  $4.52 \pm 0.15 \text{ g}$  in GYY4137-treated TRPA1 WT



**FIGURE 2** | Polysulfide produced by hypochlorous acid out of sulfide released from acidified GYY4137 activates TRPA1 ion channels in CHO cells. **(A)** Sodium sulfide nonahydrate did not activate human TRPA1 ion channels expressed in CHO cells at physiological concentrations indicated by Fluo-4 AM fluorescence. EC<sub>50</sub> values of TRPA1-expressing and non-expressing cells were 7.68 and 9.87 mmol L<sup>-1</sup>, respectively ( $n = 5-7$ , dotted lines show EC<sub>50</sub> values). **(B)** GYY4137 did not elicit calcium influx in TRPA1-expressing CHO cells ( $n = 5$ ). **(C)** Changes of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> of Fluo-4 AM-loaded CHO cells expressing human TRPA1 ion channels upon addition of sodium polysulfide (10 μmol L<sup>-1</sup>). Ca<sup>2+</sup> concentration is characterized by increased fluorescence compared with dye-loaded unstimulated cells. Cell expressing human TRPA1 showed increased Ca<sup>2+</sup> concentration in response to polysulfide. The reaction was prevented by treatment with HC-030031 (50 μmol L<sup>-1</sup>) and lack of TRPA1 channels ( $n = 12$ , each data point represents  $\cdot 10^4$  cells). \* $p < 0.05$  vs. 10 μmol L<sup>-1</sup> of sodium polysulfide in TRPA1-expressing CHO cells). **(D)** Polysulfide produced by adding hypochlorous acid (616 μmol L<sup>-1</sup>) to acidified GYY4137 (7.95 mmol L<sup>-1</sup> of GYY4137 plus equal volume of 1 mmol L<sup>-1</sup> of hydrochloric acid) activates human TRPA1 ion channels expressed in CHO cells similarly to allyl isothiocyanate (100 μmol L<sup>-1</sup>). Calcium influx was not detected in cells lacking the ion channel. Neither acidified GYY4137 nor hypochlorous acid alone induced calcium signals ( $n = 5-8$ , \* $p < 0.05$  vs. 100 μmol L<sup>-1</sup> of allyl isothiocyanate, <sup>p</sup> $p < 0.05$  vs. acidified GYY4137 mixed with hypochlorous acid).

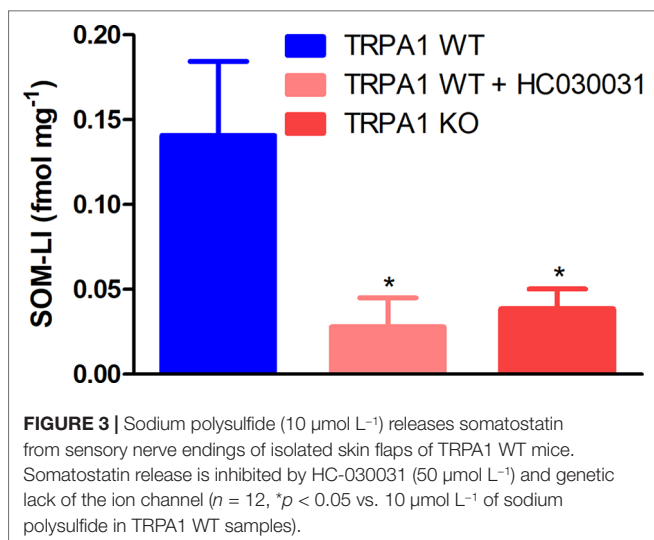
and KO mice; **Figure 4C**). Neither GYY4137 nor genetic lack of TRPA1 altered mechanical pain threshold in animals injected with non-arthritis BxN serum (**Figures 4A–C**).

## GYY4137 Lowers Arthritis Score in TRPA1 WT Animals

Condition of the hind limbs was assessed based on a semiquantitative clinical scoring system (0–1.5, healthy; 1.5–2.5, minimal signs of disease; 2.5–4, mild inflammation; 4–7, moderate inflammation; 7–10, severe inflammation) described earlier by Jakus et al. (Jakus et al., 2010; Horváth et al., 2017). The condition of the hind limbs deteriorated in all K/BxN

serum-treated mice (WT, BxN, vehicle treated,  $n = 7$ ; WT, BxN, GYY4137 treated,  $n = 7$ ; WT, K/BxN, vehicle treated,  $n = 9$ ; WT, K/BxN, GYY4137 treated,  $n = 9$ ; KO, BxN, vehicle treated,  $n = 9$ ; KO, BxN, GYY4137 treated,  $n = 6$ ; KO, K/BxN, vehicle treated,  $n = 9$ ; WT, K/BxN, GYY4137 treated,  $n = 10$ ; **Figures 4D–F**). The score of TRPA1 WT vehicle-treated mice undergoing arthritis was higher on day 5 than that of their GYY4137-treated counterparts ( $7.97 \pm 0.66$  vs.  $5.58 \pm 0.67$ ; **Figure 4E**). The difference between GYY4137-treated TRPA1 WT and KO animals with serum-transfer arthritis stresses the beneficial effect of the drug in WT mice ( $5.58 \pm 0.67$  vs.  $8.43 \pm 0.51$ ; **Figure 4E**). Neither GYY4137 nor TRPA1 KO genotype influenced arthritis score in mice injected with control BxN serum (**Figures 4D–F**).





### Genetic Lack of TRPA1 Impairs Hanging Performance in Mice Injected With BxN Serum Irrespective of GYY4137 Administration

The ability of arthritic mice to keep their suspended position was severely impaired in all groups regardless of genotype or treatment on day 7 and in TRPA1 WT animals on day 5 (WT, BxN, vehicle treated,  $n = 9$ ; WT, BxN, GYY4137 treated,  $n = 7$ ; WT, K/BxN, vehicle treated,  $n = 9$ ; WT, K/BxN, GYY4137 treated,  $n = 9$ ; KO, BxN, vehicle treated,  $n = 9$ ; KO, BxN, GYY4137 treated,  $n = 6$ ; KO, K/BxN, vehicle treated,  $n = 9$ ; WT, K/BxN, GYY4137 treated,  $n = 10$ ; **Figures 4H, I**). TRPA1 KO mice injected with inactive BxN serum exhibited statistically shorter suspension on days 5 and 7 when treated with vehicle than the respective TRPA1 WT groups ( $58.89 \pm 1.11$  vs.  $20.3 \pm 4.2$  s and  $58.57 \pm 1.43$  vs.  $21.33 \pm 3.93$  s in non-arthritic TRPA1 WT vs. KO animals treated with vehicle on day 5;  $p < 0.001$ ;  $59.89 \pm 0.11$  vs.  $25.74 \pm 4.71$  s and  $59.86 \pm 0.14$  vs.  $22.83 \pm 7.45$  s in BxN serum-injected TRPA1 WT vs. KO mice treated with vehicle on day 7; **Figures 4H, I**).

### GYY4137 Does Not Influence Body Weight and Hind Paw Volume Detected by Plethysmometry

Arthritis led to weight loss in all animal groups until day 7 (data are not shown). Neither differences of treatment nor those of genotype revealed any influence on the course of body weight changes. This was true as well in non-arthritic animals treated with BxN serum.

Swelling developed in the hind paws of all groups of arthritic mice (TRPA1 WT, BxN, vehicle treated,  $n = 7$ ; TRPA1 WT, BxN, GYY4137 treated,  $n = 7$ ; TRPA1 WT, K/BxN, vehicle treated,  $n = 9$ ; TRPA1 WT, K/BxN, GYY4137 treated,  $n = 9$ ; TRPA1 KO, BxN, vehicle treated,  $n = 9$ ; TRPA1 KO, BxN, GYY4137 treated,  $n = 6$ ; TRPA1 KO, K/BxN, vehicle treated,  $n = 9$ ; TRPA1 WT, K/BxN, GYY4137 treated,  $n = 10$ ; **Figures 4J–L**). Neither genetic

constitution nor treatment with GYY4137 influenced paw swelling in K/BxN serum-injected arthritic and BxN-injected control mice (**Figures 4J–L**).

### Sst4 Receptors Do Not Mediate Protective Effects of GYY4137 in Serum-Transfer Arthritis

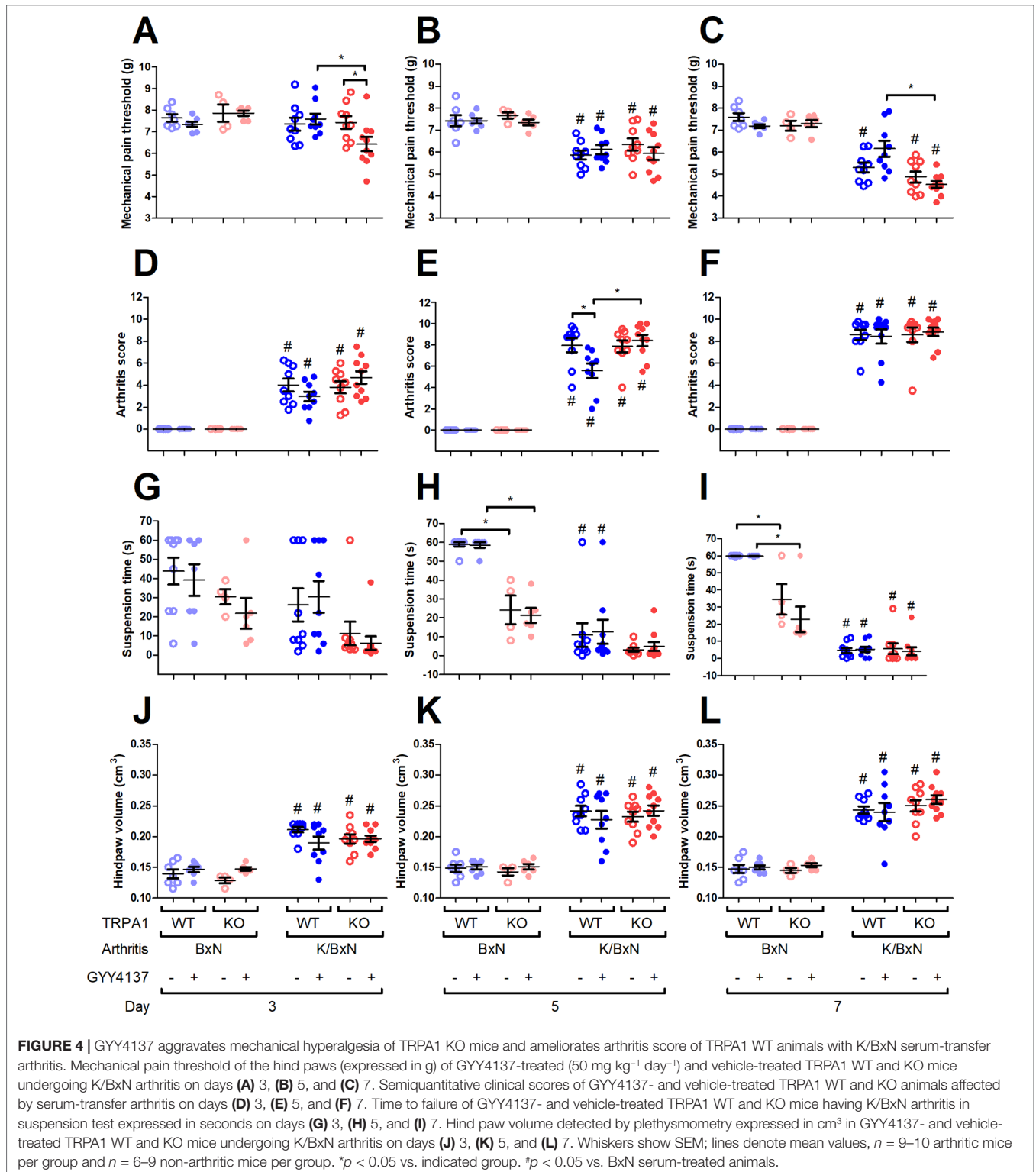
No differences in mechanical pain threshold, hanging performance, arthritis score, or body weight were found between GYY4137-treated sst4 WT and KO mice undergoing K/BxN arthritis. Similarly, no influence of the genetic lack of sst4 receptor was detected in arthritic mice receiving vehicle of GYY4137 (**Supplementary Figure 1**; WT, BxN, vehicle treated,  $n = 5$ ; WT, BxN, GYY4137 treated,  $n = 5$ ; WT, K/BxN, vehicle treated,  $n = 5$ ; WT, K/BxN, GYY4137 treated,  $n = 6$ ; KO, BxN, vehicle treated,  $n = 5$ ; KO, BxN, GYY4137 treated,  $n = 5$ ; KO, K/BxN, vehicle treated,  $n = 7$ ; WT, K/BxN, GYY4137 treated,  $n = 9$ ).

### GYY4137 Treatment Increases Neutrophil Granulocyte Accumulation and Plasma Extravasation in Arthritic TRPA1 KO Mice

Neutrophil cell accumulation characterized by luminol bioluminescence indicating MPO activity was measured before serum transfer and then 2 and 6 days later. Daily treatment with GYY4137 elevated bioluminescence at day 2 in TRPA1 KO animals compared with TRPA1 WT GYY4137-treated mice and with TRPA1 KO vehicle-treated ones as well ( $n = 9–10$  mice;  $8.79 \cdot 10^5 \pm 8.03 \cdot 10^4$  vs.  $4.94 \cdot 10^5 \pm 6.74 \cdot 10^4$  and  $5.19 \cdot 10^5 \pm 6.04 \cdot 10^4$  photons  $\text{s}^{-1}$ ; **Figures 5A, B**). These data suggest that  $\text{H}_2\text{S}$  aggravates accumulation of neutrophil granulocytes in TRPA1 KO animals at day 2—when the involvement of these cells is maximal in the arthritic reaction—but does not influence cellular inflammation in WT mice. At day 6, there is no more participation of neutrophil cells in the foreground of serum-transfer arthritis. Plasma extravasation detected as IR-676 fluorescence in tissues was aggravated by GYY4137 injections in TRPA1 KO animals in relation to TRPA1 WT GYY4137-treated mice and to TRPA1 KO vehicle-treated animals at both 2 days ( $n = 9–10$  mice;  $4.87 \cdot 10^9 \pm 2.73 \cdot 10^8$  vs.  $3.37 \cdot 10^9 \pm 2.3 \cdot 10^8$  and  $3.65 \cdot 10^9 \pm 2 \cdot 10^8$  (photons  $\text{s}^{-1}$ ) ( $\mu\text{W cm}^{-2}$ )<sup>-1</sup>; **Figures 6A, B**) and 6 days ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ ;  $7.89 \cdot 10^9 \pm 4.58 \cdot 10^8$  vs.  $4.76 \cdot 10^9 \pm 3.89 \cdot 10^8$  and  $6.16 \cdot 10^9 \pm 3.91 \cdot 10^8$  (photons  $\text{s}^{-1}$ ) ( $\mu\text{W cm}^{-2}$ )<sup>-1</sup>; **Figures 6A, B**). According to our findings, the rate of ongoing plasma extravasation—detected by fluorescence imaging—was elevated by  $\text{H}_2\text{S}$  in TRPA1 KO animals at both days 2 and 6 but was left unaffected in WT ones.

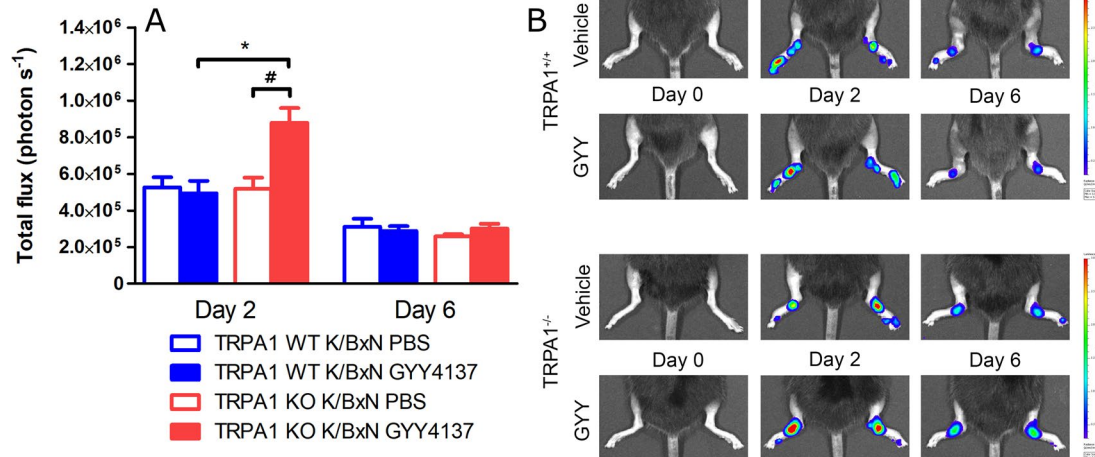
### Genetic Lack of sst4 Somatostatin Receptor Does Not Influence Myeloperoxidase Enzyme Activity and Plasma Extravasation in Arthritic Mice

No difference in MPO activity detected by luminescence imaging was recorded between arthritic sst4 receptor WT and KO GYY4137-treated animals. No participation of the receptor

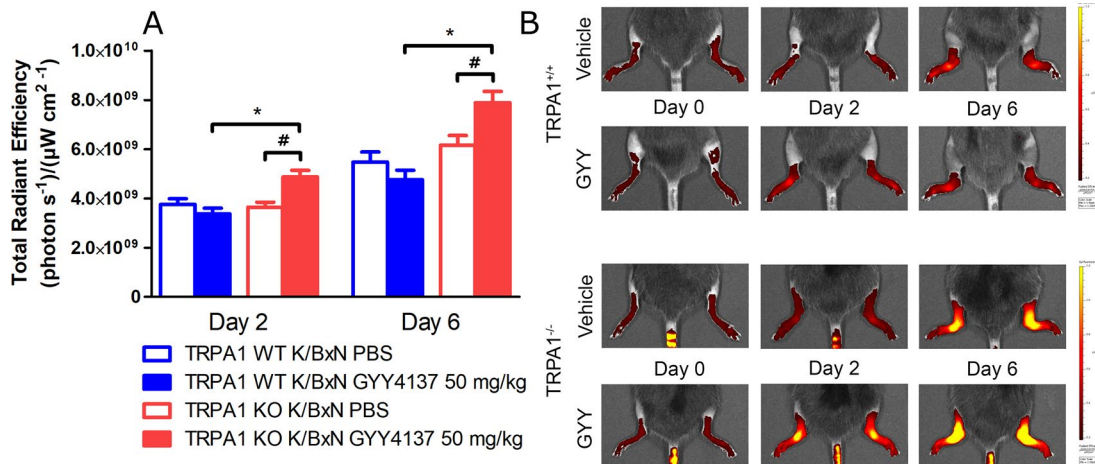


showed up when comparing *sst4* WT and KO mice receiving vehicle of GYY4137. Similar data were generated when detecting plasma extravasation by fluorescence imaging (Supplementary Figure 2; WT, BxN, vehicle treated, n = 5; WT, BxN, GYY4137

treated, n = 5; WT, K/BxN, vehicle treated, n = 5; WT, K/BxN, GYY4137 treated, n = 6; KO, BxN, vehicle treated, n = 5; KO, BxN, GYY4137 treated, n = 5; KO, K/BxN, vehicle treated, n = 7; WT, K/BxN, GYY4137 treated, n = 9).



**FIGURE 5 |** GYY4137 increases MPO activity in arthritic tibiotarsal joints of TRPA1 KO mice. **(A)** MPO activity in inflamed tibiotarsal joints of GYY4137-treated (50 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> i.p.) and vehicle-treated TRPA1 WT and KO animals undergoing K/BxN arthritis on days 2 and 6 shown as emitted photons s<sup>-1</sup>. **(B)** Representative bioluminescence images illustrating MPO activity characterized by luminol bioluminescence in tibiotarsal joints of GYY4137- and vehicle-treated TRPA1 WT and KO animals undergoing K/BxN arthritis. Data are shown as mean ± SEM of *n* = 9–10 mice per group. \**p* < 0.05 vs. GYY4137-treated TRPA1 WT mice. #*p* < 0.05 vs. TRPA1 KO animals treated with vehicle of GYY4137.



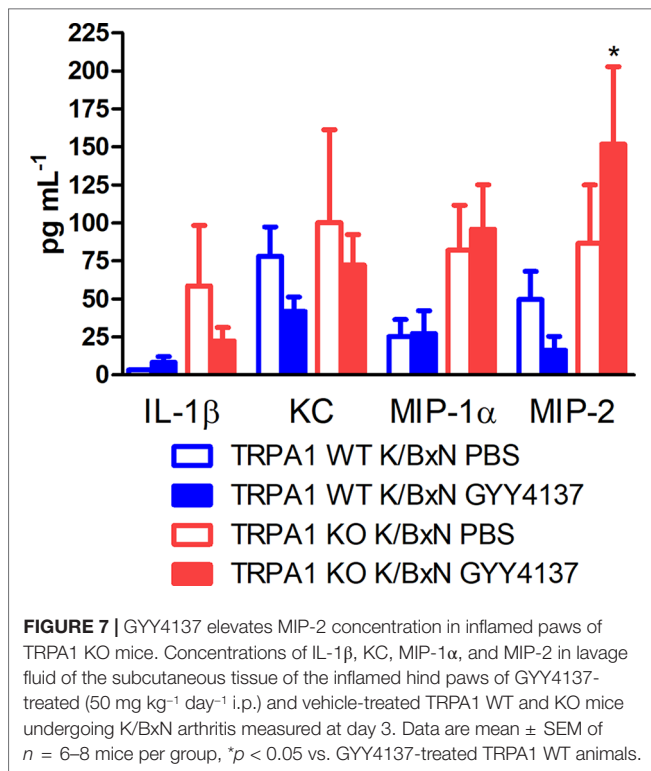
**FIGURE 6 |** GYY4137 exacerbates plasma extravasation in arthritic tibiotarsal joints of TRPA1 KO mice. **(A)** Edema formation characterized by extravasation of micellar fluorescent IR-676 dye in tibiotarsal joints of GYY4137-treated (50 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> i.p.) and vehicle-treated TRPA1 WT and KO mice undergoing K/BxN arthritis on days 2 and 6 expressed as (photons s<sup>-1</sup>)/(μW cm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). **(B)** Representative fluorescence images showing plasma protein extravasation characterized by extravasation of micellar IR-676 dye in tibiotarsal joints of GYY4137- and vehicle-treated TRPA1 WT and KO mice undergoing K/BxN arthritis. Data are shown as mean ± SEM of *n* = 9–10 mice per group. \**p* < 0.05 vs. GYY4137-treated TRPA1 WT mice. #*p* < 0.05 vs. TRPA1 KO animals treated with vehicle of GYY4137.

## GYY4137 Elevates MIP-2 Level in Inflamed Hind Paws of TRPA1 KO Mice

Serum-transfer arthritis did not affect concentrations of IL-1β, KC and MIP-1α in the subcutaneous flushing fluid of the hind paws (*n* = 12–16). In case of MIP-2, larger concentrations were measured in TRPA1 KO GYY4137-treated animals compared with WT GYY4137-treated ones—despite remarkably large standard deviation of data (16.31 ± 9.14 vs. 151.8 ± 50.93 pg mL<sup>-1</sup> in TRPA1 WT and KO GYY4137-treated mice; **Figure 7**).

## GYY4137 Ameliorates Histological Cartilage Destruction in TRPA1 Wild-Type Animals

Cartilage destruction score was lowered by GYY4137 (50 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> i.p.) in TRPA1 WT arthritic mice compared with vehicle-treated ones (1.063 ± 0.22 vs. 0.3125 ± 0.13, *n* = 8, **Figures 8A, B**). No difference of cartilage damage was noted in TRPA1 KO animals. Other histological parameters (mononuclear cell infiltration, synovial hyperplasia, fibroblast



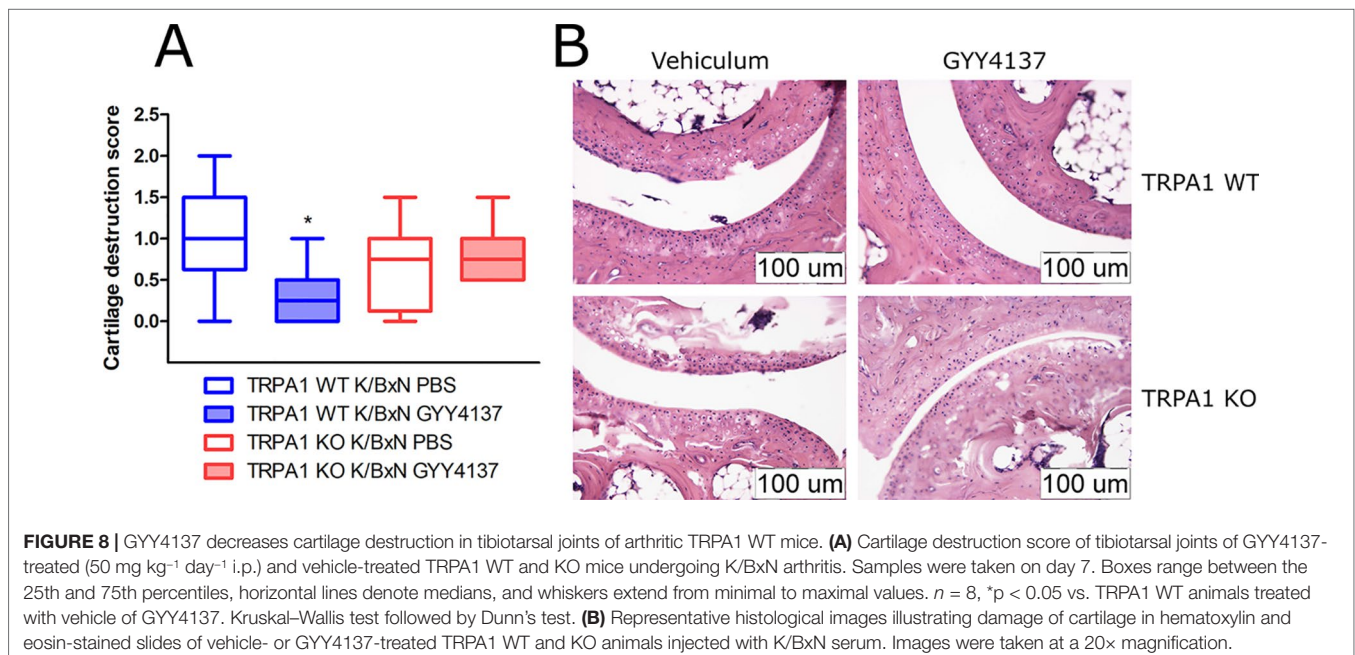
accumulation and collagen deposition, and the composite score) did not change in vehicle- or GYY4137-treated or animals of any genotype. Sst4 receptor WT animals treated with GYY4137 exhibited elevated fibroblast cell count and collagen deposition in comparison to vehicle-treated ones (Supplementary Figure 3).

## DISCUSSION

The main novel finding of this study is that the presence or absence of functional TRPA1 channels determines pronociceptive, pro-inflammatory, or, conversely, analgesic and anti-inflammatory effects of sulfide. Mice undergoing K/BxN serum-transfer arthritis and lacking functional TRPA1 receptors showed more severe mechanical hyperalgesia, more expressed plasma extravasation, and MPO activity in the inflamed limb, as well as increased MIP-2 concentration in the affected paws when administered GYY4137. Alternatively, the slow-releasing sulfide donor ameliorated hyperalgesia, arthritis score, and histological cartilage destruction in TRPA1 WT animals. Another interesting point is that the protective effect was not mediated directly by sulfide itself but by polysulfides being formed out of it.

The protective role of TRPA1-mediated GYY4137 effect is pronounced by DPA measurement. WT animals showed elevated mechanical pain threshold, but we detected aggravated reaction in KO mice. K/BxN serum proved to be arthritogenic in all examined genotypes. GYY4137 caused significant reduction of the arthritis on day 5 in TRPA1 WTs. Interestingly, in our study, TRPA1 KO animals injected with non-arthritogenic BxN serum exhibited shorter time to failure than did their WT counterparts when suspended upside-down irrespective of GYY4137 or vehicle administration. Muscle cramps of athletes upon isometric strain might resemble a similar situation. TRPA1 and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) agonists prevent such cramps, supporting our findings (Craighead et al., 2017). Lee and colleagues reported on deteriorated motor performance of TRPA1 KO mice (Lee et al., 2017).

In the hands of other authors, GYY4137 had an anti-inflammatory action in CFA-induced murine arthritis. GYY4137 inhibited mediator release from activated human synoviocytes and articular chondrocytes as well (Fox et al., 2012; Li et al., 2013).





These previous data are in concordance with our present results: TRPA1 WT mice showed milder mechanical hyperalgesia, arthritis score, and cartilage damage in response to GYY4137.

Surprisingly, GYY4137 did not affect paw swelling measured by plethysmometry but increased plasma extravasation detected by fluorescence imaging of IR-676 in TRPA1 KO animals. Plethysmometry was executed on days 3, 5, and 7; fluorescence imaging was performed on days 2 and 6. The two methods detect different parameters. Plethysmometry provides information about the cumulative swelling—which means the equilibrium of edema formation and resolution—since the initiation of inflammation. Fluorescence imaging characterizes the actual rate or velocity of plasma extravasation since the administration of the fluorescent dye (20 min). The other seemingly conflicting data are the elevated MPO activity and MIP-2 content of inflamed paws despite no change in histological mononuclear cell accumulation score. MPO activity and cytokine measurements were performed on days 2 and 3, while histological evaluation took place at a different stage of the inflammatory process on day 7. At this time, rather, mononuclear cells dominate, and neutrophil accumulation together with MPO activity ceases.

It might seem also contradictory how the activation of TRPA1 channels and an increase of  $[Ca^{2+}]_i$  in nociceptors could lead to an opposite effect than nociception and inflammation. One proposed mechanism is the release of inhibitory neuropeptides (e.g., somatostatin). SOM release might be due to opening of TRPA1 or TRPV1 channels (Pethő et al., 2017; Pozsgai et al., 2017). Elevated SOM plasma concentration in response to painful disease was detected in rodents and patients (Helyes et al., 2004; Antal et al., 2008; Suto et al., 2010). SOM possesses systemic antinociceptive and anti-inflammatory properties mediated by  $sst_4$  receptors (Helyes et al., 2004; Pintér et al., 2006; Schuelert et al., 2015; Pozsgai et al., 2017).  $Sst_4$  receptors expressed in sensory neurons, lymphocytes, and vascular endothelial cells might contribute to the protective effect (Pintér et al., 2006). However, in the present model of arthritis, genetic lack of  $sst_4$  receptors did not diminish protective effect of GYY4137. It has to be noted that protective effect of GYY4137 on mechanical pain threshold was also not detected in  $sst_4$  WT mice. This might be explained by minor genetic differences between TRPA1 and  $sst_4$  genetically modified mouse strains together with compensatory changes of gene expression in genetically modified animals. Macrophages play a decisive role in the mediation of serum-transfer arthritis (Christensen et al., 2016). Somatostatin  $sst_2$  receptors dominate in human monocytes and macrophages (Dalm et al., 2003).  $Sst_2$  receptor agonist octreotide inhibits release of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-15) from synoviocytes of RA patients, offering a plausible mechanism for the anti-inflammatory effect of GYY4137 (Casnici et al., 2018). Besides, sensory neuron-derived opioid peptides might contribute to antinociceptive action, too (Pethő et al., 2017).

The protective effect of sulfide in the K/BxN serum-transfer arthritis model might be mediated by non-neuronal TRPA1 expressed on immune and inflammatory cells. CD4+ T cells have a major role in the development of serum-transfer arthritis, as mutation of the T-cell receptor and formation of autoreactive T cells are key features of the model. Depletion of either neutrophil granulocytes

or macrophages is protective against serum-transfer arthritis (Christensen et al., 2016). TRPA1 expression in CD4+ T cells was confirmed on the level of mRNA and by immunohistochemistry. TRPA1 channels of T lymphocytes were found to be functional by electrophysiological methods. Genetic abrogation of TRPA1 exacerbated a murine model of autoimmune colitis. TRPA1 was found to inhibit Th1 immune response (Bertin et al., 2017). TRPA1 was detected in murine CD4+ T cells in a model of psoriasis by immunohistochemistry (Kemény et al., 2018). Activation of the ion channel mediates a protective effect in psoriasiform dermatitis. Increased expression of TRPA1 was reported in peripheral blood leukocytes of rheumatoid arthritis patients. Antagonism of TRPA1 aggravated inflammation and MIP-2 secretion from macrophages. TRPA1 agonist allyl isothiocyanate was protective against atherosclerosis and ameliorated MIP-2 release (Zhao et al., 2016). All the above findings indicate that activation of TRPA1 by sulfide on T lymphocytes, neutrophil granulocytes, or macrophages might have contributed to the anti-inflammatory effect revealed by the present study.

Several possible mechanisms could be supposed in the background of TRPA1-independent pro-inflammatory effect of GYY4137. Sulfide donor NaHS produced non-canonical p38/Akt and CREB activation in human peripheral blood monocytes (Sulen et al., 2016). Various inflammatory animal models were reported to be augmented by sulfide or alleviated by disabled synthesis of the gasotransmitter. The signaling pathways involved include PI3K/Akt/Sp1, COX2, and NF- $\kappa$ B (Ang et al., 2011; Badiei et al., 2016; Gaddam et al., 2016; George et al., 2016; Liu et al., 2016; Ahmad et al., 2017; Liu et al., 2017). Our results indicate that TRPA1-mediated protective effects of  $H_2S$  “overwrite” inflammatory and pro-algesic effects mediated via other pathways. Detrimental effects only manifest in the absence of TRPA1.

According to our data, concentration of the chemoattractant MIP-2 (CXCL2) was elevated by GYY4137 in inflamed hind paws of arthritic TRPA1 KO animals on day 3. This finding is in alignment with increased MPO activity—denoting neutrophil granulocyte accumulation—in tibiotarsal joints of TRPA1 KO mice detected on day 2. MIP-2 is a chemoattractant for neutrophil cells and is released by monocytes, macrophages, epithelial cells, and hepatocytes (Qin et al., 2017). In the K/BxN serum-transfer arthritis model, activated neutrophils might express CXCL2 themselves. Recruitment of neutrophil granulocytes depends on the expression of CXCR2, the receptor of MIP-2. Depletion of macrophages—an important source of MIP-2—is protective against serum-transfer arthritis (Christensen et al., 2016). Activation of TRPA1 is involved in MIP-2 secretion, too. TRPA1 KO mice showed lowered concentration of the chemoattractant in a subcutaneous air pouch model (Moilanen et al., 2015).

Our data point towards GYY4137 being an “inflammation-selective” polysulfide donor. As it was described earlier and confirmed by our data, sulfide release from GYY4137 increases dramatically at pH 3.0 (Li et al., 2008). Acidic pH was found in RA synovial fluid (Martínez et al., 2006). Addition of hypochlorous acid to the liberated sulfide rapidly yields POLY (Nagy and Winterbourn, 2010). We postulate that excess sulfide released in acidic inflamed tissues is scavenged by hypochlorite from neutrophil granulocytes. Lack of hypochlorite was suspected to

increase MIP-2 production of neutrophil cells (Tateno et al., 2013). Elevated MIP-2 concentrations were measured in subcutaneous flushing fluid of arthritic TRPA1 KO mice by the authors. On the other hand, POLY resulting from the reaction of sulfide and hypochlorite persulfidates TRPA1 ion channels of nociceptor nerve endings and might trigger protective effects. Production of hypochlorite by neutrophils is MPO dependent (Albrett et al., 2018). Elevated MPO activity in GYY4137-treated TRPA1 KO animals suggests larger hypochlorite and POLY formation. A larger amount of POLY could mediate more expressed TRPA1-independent inflammatory changes.

Inconsistent data on the effect of sulfide in inflammation and nociception have been published since the advent of sulfide research a decade ago. According to our present study, protective actions of the gasotransmitter are associated with TRPA1 receptor activation, while detrimental ones are mediated by other mechanisms in murine arthritis. In the present study, slow-releasing sulfide donor GYY4137 is an instrument to study the role of TRPA1 ion channel in the effects of sulfide in murine K/BxN serum-transfer arthritis model. Our approach provides hints on the importance of TRPA1 channels for the development and application of sulfide therapeutics depending on whether amelioration of inflammation or cytotoxic effect is desired.

## DATA AVAILABILITY

All datasets generated and analyzed for this study are included in the manuscript and/or the **Supplementary Files**.

## ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of 1998/XXVIII Act of the Hungarian Parliament on Animal Protection and Consideration Decree of Scientific Procedures of Animal Experiments (243/1998) and the European Communities Council Directive of 2010/63/EU, complied with the recommendations of the International Association for the Study of Pain (IASP). The protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Research of

University of Pécs and Semmelweis University according to the Ethical Codex of Animal Experiments (licence No.: BA 02/2000–2/2012 and PE/EA/3895-6/2016).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

ÁH, GP, ZH, and EP designed the study. IB, ÁH, and GP conducted experiments. IB, BN, and ZS performed fluorescent Ca<sup>2+</sup> imaging experiments on CHO cells. ÁH and IB performed IVIS measurements. CS synthesized GYY4137. KB optimized experiments on SOM release from murine skin. ÉB and AP performed histology and evaluation of slides. ÁK performed cytokine measurements. AM provided BxN and K/BxN sera and corresponding know-how. ZH, AM, GP, and EP drafted the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

## FUNDING

This project was supported by the János Bolyai Research Scholarship (GP) and by János Szentágothai Fellowship A2-SZJÖ-TOK-13-0149 (EP) of the Hungarian Academy of Sciences. This work was funded by grants GINOP-2.3.2.-15-2016-00048 STAY ALIVE and EFOP-3.6.2-16-2017-00006 LIVE LONGER from the European Regional Development Fund. The study was supported by the ÚNKP-18-4 New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities. BN was supported by Richter Gedeon Talentum Alapítvány.

## ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Mrs. Gyuláné Ömböli and Janka Csepregi for their expert technical assistance in the generation of K/BxN serum.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00964/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Ahmad, A., Druzhyna, N., and Szabo, C. (2017). Cystathionine-gamma-lyase deficient mice are protected against the development of multiorgan failure and exhibit reduced inflammatory response during burn. *Burns* 43, 1021–1033. doi: 10.1016/j.burns.2017.02.011
- Ahmad, A., and Szabo, C. (2016). Both the H<sub>2</sub>S biosynthesis inhibitor aminoxyacetic acid and the mitochondrially targeted H<sub>2</sub>S donor AP39 exert protective effects in a mouse model of burn injury. *Pharmacol. Res.* 113, 348–355. doi: 10.1016/j.phrs.2016.09.013
- Albrett, A. M., Ashby, L. V., Dickerhof, N., Kettle, A. J., and Winterbourn, C. C. (2018). Heterogeneity of hypochlorous acid production in individual neutrophil phagosomes revealed by a rhodamine-based probe. *J. Biol. Chem.* 293, 15715–15724. doi: 10.1074/jbc.RA118.004789
- Ang, S.-F., Sio, S. W. S., Mochhala, S. M., MacAry, P. A., and Bhatia, M. (2011). Hydrogen sulfide upregulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E metabolite in sepsis-evoked acute lung injury via transient receptor potential vanilloid type 1 channel activation. *J. Immunol.* 187, 4778–4787. doi: 10.4049/jimmunol.1101559
- Antal, A., Nemeth, J., Szolcsányi, J., Pozsgai, G., and Pinter, E. (2008). Abdominal surgery performed under general anesthesia increases somatostatin-like immunoreactivity in human serum. *Neuroimmunomodulation* 15, 153–156. doi: 10.1159/000151528
- Badié, A., Chambers, S. T., Gaddam, R. R., and Bhatia, M. (2016). Cystathionine-γ-lyase gene silencing with siRNA in monocytes/macrophages attenuates inflammation in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse. *J. Biosci.* 41, 87–95. doi: 10.1007/s12038-016-9598-9
- Bátaï, I. Z., Horváth, Á., Pintér, E., Helyes, Z., and 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. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 9, 55. doi: 10.3389/fendo.2018.00055

- Bautista, D. M., Jordt, S.-E., Nikai, T., Tsuruda, P. R., Read, A. J., Poblete, J., et al. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124, 1269–1282. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.023
- Bertin, S., Aoki-Nonaka, Y., Lee, J., de Jong, P. R., Kim, P., Han, T., et al. (2017). The TRPA1 ion channel is expressed in CD4+ T cells and restrains T-cell-mediated colitis through inhibition of TRPV1. *Gut* 66, 1584–1596. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310710
- Borbély, É., Botz, B., Bölcskei, K., Kenyér, T., Kereskai, L., Kiss, T., et al. (2015). Capsaicin-sensitive sensory nerves exert complex regulatory functions in the serum-transfer mouse model of autoimmune arthritis. *Brain. Behav. Immun.* 45, 50–59. doi: 10.1016/j.bbi.2014.12.012
- Botz, B., Bölcskei, K., Kereskai, L., Kovács, M., Németh, T., Szigeti, K., et al. (2014). Differential regulatory role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the serum-transfer arthritis model. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* 66, 2739–2750. doi: 10.1002/art.38772
- Burguera, E. F., Mejjide-Failde, R., and Blanco, F. J. (2017). Hydrogen sulfide and inflammatory joint diseases. *Curr. Drug Targets* 18, 1641–1652. doi: 10.2174/1389450117666160829112824
- Casnici, C., Lattuada, D., Crotta, K., Truzzi, M. C., Corradini, C., Ingegnoli, F., et al. (2018). Anti-inflammatory Effect of somatostatin analogue octreotide on rheumatoid arthritis synoviocytes. *Inflammation* 41, 1648–1660. doi: 10.1007/s10753-018-0808-5
- Chatzidionysiou, K., Emamikia, S., Nam, J., Ramiro, S., Smolen, J., van der Heijde, D., et al. (2017). Efficacy of glucocorticoids, conventional and targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 1102–1107. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210711
- Christensen, A. D., Haase, C., Cook, A. D., and Hamilton, J. A. (2016). K/BxN serum-transfer arthritis as a model for human inflammatory arthritis. *Front. Immunol.* 7, 213. doi: 10.3389/fimmu.2016.00213
- Cortese-Krott, M. M., Kuhnle, G. G. C., Dyson, A., Fernandez, B. O., Grman, M., DuMond, J. E., et al. (2015). Key bioactive reaction products of the NO/H<sub>2</sub>S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E4651–E4660. doi: 10.1073/pnas.1509277112
- Craighead, D. H., Shank, S. W., Gottschall, J. S., Passe, D. H., Murray, B., Alexander, L. M., et al. (2017). Ingestion of transient receptor potential channel agonists attenuates exercise-induced muscle cramps. *Muscle Nerve* 56, 379–385. doi: 10.1002/mus.25611
- Dalm, V. A. S. H., van Hagen, P. M., van Koetsveld, P. M., Achilefu, S., Houtsmuller, A. B., Pols, D. H. J., et al. (2003). Expression of somatostatin, cortistatin, and somatostatin receptors in human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Am. J. Physiol. Metab.* 285, E344–E353. doi: 10.1152/ajpendo.00048.2003
- Edwards, C. J., Fautrel, B., Schulze-Koops, H., Huizinga, T. W. J., and Kruger, K. (2017). Dosing down with biologic therapies: a systematic review and clinicians' perspective. *Rheumatology (Oxford)* 56, 1847–1856. doi: 10.1093/rheumatology/kew464
- Fernandes, E. S., Russell, F. A., Alawi, K. M., Sand, C., Liang, L., Salamon, R., et al. (2016). Environmental cold exposure increases blood flow and affects pain sensitivity in the knee joints of CFA-induced arthritic mice in a TRPA1-dependent manner. *Arthritis Res. Ther.* 18, 7. doi: 10.1186/s13075-015-0905-x
- Fox, B., Schantz, J.-T., Haigh, R., Wood, M. E., Moore, P. K., Viner, N., et al. (2012). Inducible hydrogen sulfide synthesis in chondrocytes and mesenchymal progenitor cells: is H<sub>2</sub>S a novel cytoprotective mediator in the inflamed joint? *J. Cell. Mol. Med.* 16, 896–910. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01357.x
- Gaddam, R. R., Fraser, R., Badiei, A., Chambers, S., Cogger, V. C., Le Couteur, D. G., et al. (2016). Cystathionine-gamma-lyase gene deletion protects mice against inflammation and liver sieve injury following polymicrobial sepsis. *PLoS One* 11, e0160521. doi: 10.1371/journal.pone.0160521
- George, L., Ramasamy, T., Manickam, V., Iyer, S. K., and Radhakrishnan, V. (2016). Novel phenanthridine (PHE-4i) derivative inhibits carrageenan-induced rat hind paw oedema through suppression of hydrogen sulfide. *Inflammopharmacology* 24, 173–180. doi: 10.1007/s10787-016-0273-4
- Greiner, R., Pálkás, Z., Bäsell, K., Becher, D., Antelmann, H., Nagy, P., et al. (2013). Polysulfides link H<sub>2</sub>S to protein thiol oxidation. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1749–1765. doi: 10.1089/ars.2012.5041
- Hajna, Z., Ságghy, É., Payrits, M., Aubdool, A. A., Szóke, É., Pozsgai, G., et al. (2016). Capsaicin-sensitive sensory nerves mediate the cellular and microvascular effects of H<sub>2</sub>S via TRPA1 receptor activation and neuropeptide release. *J. Mol. Neurosci.* 60, 157–170. doi: 10.1007/s12031-016-0802-z
- Helyes, Z., Pintér, E., Sándor, K., Elekes, K., Bánvölgyi, A., Keszthelyi, D., et al. (2009). Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13088–13093. doi: 10.1073/pnas.09006811106
- Helyes, Z., Szabó, Á., Németh, J., Jakab, B., Pintér, E., Bánvölgyi, Á., et al. (2004). Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Rheum.* 50, 1677–1685. doi: 10.1002/art.20184
- Horváth, Á., Menghis, A., Botz, B., Borbély, É., Kemény, Á., Tékus, V., et al. (2017). Analgesic and anti-inflammatory effects of the novel semicarbazide-sensitive amine-oxidase inhibitor SzV-1287 in chronic arthritis models of the mouse. *Sci. Rep.* 7, 39863. doi: 10.1038/srep39863
- Horváth, Á., Tékus, V., Boros, M., Pozsgai, G., Botz, B., Borbély, É., et al. (2016). Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: in vivo study using TRPA1-deficient mice. *Arthritis Res. Ther.* 18, 6. doi: 10.1186/s13075-015-0904-y
- Jakus, Z., Simon, E., Balázs, B., and Mócsai, A. (2010). Genetic deficiency of Syk protects mice from autoantibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 62, 1899–1910. doi: 10.1002/art.27438
- Kemény, Á., Kodji, X., Horváth, S., Komlódi, R., Szóke, É., Sándor, Z., et al. (2018). TRPA1 acts in a protective manner in imiquimod-induced psoriasisform dermatitis in mice. *J. Invest. Dermatol.* 138, 1774–1784. doi: 10.1016/j.jid.2018.02.040
- Kouskoff, V., Korganow, A.-S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 87, 811–822. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81989-3
- Kovács, M., Németh, T., Jakus, Z., Sitaru, C., Simon, E., Futosi, K., et al. (2014). 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.* 211, 1993–2011. doi: 10.1084/jem.20132496
- Lee, K.-I., Lin, H.-C., Lee, H.-T., Tsai, F.-C., and Lee, T.-S. (2017). Loss of transient receptor potential ankyrin 1 channel deregulates emotion, learning and memory, cognition, and social behavior in mice. *Mol. Neurobiol.* 54, 3606–3617. doi: 10.1007/s12035-016-9908-0
- Li, L., Fox, B., Keeble, J., Salto-Tellez, M., Winyard, P. G., Wood, M. E., et al. (2013). 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.* 17, 365–376. doi: 10.1111/jcmm.12016
- Li, L., Whiteman, M., Guan, Y. Y., Neo, K. L., Cheng, Y., Lee, S. W., et al. (2008). Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation* 117, 2351–2360. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.753467
- Liu, M., Jia, Z., Sun, Y., Zhang, A., and Yang, T. (2016). A H<sub>2</sub>S donor GYY4137 exacerbates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Mediators Inflamm.* 2016, 8145785. doi: 10.1155/2016/8145785
- Liu, Y., Liao, R., Qiang, Z., and Zhang, C. (2017). Pro-inflammatory cytokine-driven PI3K/Akt/Sp1 signalling and H<sub>2</sub>S production facilitates the pathogenesis of severe acute pancreatitis. *Biosci. Rep.* 37, BSR20160483. doi: 10.1042/BSR20160483
- Martínez, D., Vermeulen, M., Trevani, A., Ceballos, A., Sabatté, J., Gamberale, R., et al. (2006). Extracellular acidosis induces neutrophil activation by a mechanism dependent on activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. *J. Immunol.* 176, 1163–1171. doi: 10.4049/jimmunol.176.2.1163
- Moilanen, L. J., Hämäläinen, M., Lehtimäki, L., Nieminen, R. M., and Moilanen, E. (2015). Urate crystal induced inflammation and joint pain are reduced in transient receptor potential ankyrin 1 deficient mice—potential role for transient receptor potential ankyrin 1 in gout. *PLoS One* 10, e0117770. doi: 10.1371/journal.pone.0117770
- Muniraj, N., Stamp, L. K., Badiei, A., Hegde, A., Cameron, V., and Bhatia, M. (2017). Hydrogen sulfide acts as a pro-inflammatory mediator in rheumatic disease. *Int. J. Rheum. Dis.* 20, 182–189. doi: 10.1111/1756-185X.12472
- Nagy, P., and Winterbourn, C. C. (2010). Rapid reaction of hydrogen sulfide with the neutrophil oxidant hypochlorous acid to generate polysulfides. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 1541–1543. doi: 10.1021/tx100266a
- Pereira, I., Mendes, S. J. F., Pereira, D. M. S., Muniz, T. F., Colares, V. L. P., Monteiro, C. R. A. V., et al. (2017). Transient receptor potential ankyrin 1 channel expression on peripheral blood leukocytes from rheumatoid arthritic

- patients and correlation with pain and disability. *Front. Pharmacol.* 8, 53. doi: 10.3389/fphar.2017.00053
- Pethő, G., Bölcskei, K., Füredi, R., Botz, B., Bagoly, T., Pintér, E., et al. (2017). Evidence for a novel, neurohumoral antinociceptive mechanism mediated by peripheral capsaicin-sensitive nociceptors in conscious rats. *Neuropeptides* 62, 1–10. doi: 10.1016/j.npep.2017.02.079
- Pintér, E., Helyes, Z., and Szolcsányi, J. (2006). Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol. Ther.* 112, 440–456. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.04.010
- Pozsgai, G., Payrits, M., Sághy, É., Sebestyén-Bátaï, R., Steen, E., Szőke, É., et al. (2017). Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst4 receptors. *Nitric Oxide* 65, 10–21. doi: 10.1016/j.niox.2017.01.012
- Qin, C.-C., Liu, Y.-N., Hu, Y., Yang, Y., and Chen, Z. (2017). Macrophage inflammatory protein-2 as mediator of inflammation in acute liver injury. *World J. Gastroenterol.* 23, 3043–3052. doi: 10.3748/wjg.v23.i17.3043
- Schuelert, N., Just, S., Kuelzer, R., Corradini, L., Gorham, L. C. J., and Doods, H. (2015). The somatostatin receptor 4 agonist J-2156 reduces mechanosensitivity of peripheral nerve afferents and spinal neurons in an inflammatory pain model. *Eur. J. Pharmacol.* 746, 274–281. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.11.003
- Sulen, A., Gullaksen, S.-E., Bader, L., McClymont, D. W., Skavland, J., Gavasso, S., et al. (2016). Signaling effects of sodium hydrosulfide in healthy donor peripheral blood mononuclear cells. *Pharmacol. Res.* 113, 216–227. doi: 10.1016/j.phrs.2016.08.018
- Suto, B., Bagoly, T., Borzsei, R., Leng, O., Szolcsányi, J., Nemeth, T., et al. (2010). Surgery and sepsis increase somatostatin-like immunoreactivity in the human plasma. *Peptides* 31, 1208–1212. doi: 10.1016/j.peptides.2010.03.018
- Szabo, A., Helyes, Z., Sándor, K., Bite, A., Pintér, E., Németh, J., et al. (2005). Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 111–119. doi: 10.1124/jpet.104.082487
- Szczesny, B., Módis, K., Yanagi, K., Coletta, C., Le Trionnaire, S., Perry, A., et al. (2014). AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 41, 120–130. doi: 10.1016/j.niox.2014.04.008
- Tateno, N., Matsumoto, N., Motowaki, T., Suzuki, K., and Aratani, Y. (2013). Myeloperoxidase deficiency induces MIP-2 production via ERK activation in zymosan-stimulated mouse neutrophils. *Free Radic. Res.* 47, 376–385. doi: 10.3109/10715762.2013.778990
- Wood, J. L. (1987). Sulfane sulfur. *Methods Enzymol.* 143, 25–29. doi: 10.1016/0076-6879(87)43009-7
- Zhao, J.-F., Shyue, S.-K., Kou, Y. R., Lu, T.-M., and Lee, T.-S. (2016). Transient receptor potential ankyrin 1 channel involved in atherosclerosis and macrophage-foam cell formation. *Int. J. Biol. Sci.* 12, 812–823. doi: 10.7150/ijbs.15229
- Zygmunt, P. M., and Högestätt, E. D. (2014). “TRPA1,” in *Handbook of experimental pharmacology*. Eds. B. Nilius and V. Flockerzi (Springer Berlin Heidelberg), 583–630. doi: 10.1007/978-3-642-54215-2\_23

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Bátaï, Sár, Horváth, Borbély, Bölcskei, Kemény, Sándor, Nemes, Helyes, Perkecz, Mócsai, Pozsgai and Pintér. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.