

Szegedi Tudományegyetem  
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar  
Elméleti Orvostudományi Doktori Iskola

A szigma-1 receptor ligandumok szerepe az egészséges és cukorbeteg patkányok  
vérlemezkéinek és hasi aortájának arachidonsav-metabolizmusában

Ph.D. Tézis

Váczi Sándor M.Sc.

Témavezető: Dr. Lepránné Dr. Mezei Zsófia kandidátus

Szeged

**2023**

**SZAKDOLGOZAT TÉMÁJÁVAL KAPCSOLATOS TUDOMÁNYOS  
PUBLIKÁCIÓK:**

- I. Váczai S, Barna L, Harazin A, Mészáros M, Porkoláb G, Zvara Á, Ónody R, Földesi I, Veszelka S, Penke B, Fülöp L, Deli MA, Mezei Z. S1R agonist modulates rat platelet eicosanoid synthesis and aggregation. *Platelets*. 2021; 16:1-10. doi:10.1080/09537104.2021.1981843. PMID:34697991

IF: 4.236 Q1

- II. Váczai S, Barna L, Laczi K, Tömösi F, Rákhely G, Penke B, Fülöp L, Bogár F, Janáky T, Deli MA, Mezei Z. Effects of sub-chronic, *in vivo* administration of sigma non-opioid intracellular receptor 1 ligands on platelet and aortic arachidonate cascade in rats. *Eur J Pharmacol*. 2022 Jun 15; 925:174983. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.174983. Epub 2022 Apr 27. PMID: 35487254

IF: 5.195 Q1

- III. Váczai S, Barna L, Laczi K, Tömösi F, Rákhely G, Penke B, Fülöp L, Bogár F, Janáky T, Deli MA, Mezei Z. Effects of sub-chronic, *in vivo* administration of sigma-1 receptor ligands on platelet and aortic arachidonate cascade in streptozotocin-induced diabetic rats. *PLoS One*. 2022 Nov 17; 17 (11):e0265854. doi: 10.1371/journal.pone.0265854. eCollection 2022. PMID: 36395179 Free PMC article.

IF: 3.752 Q1

## BEVEZETÉS

A szigma-1 receptor (S1R) mind a központi idegrendszer, mind a perifériás szervek sejtjeiben expresszáldók. Az S1R-k főként az endoplazmatikus retikulum (ER) mitokondrium-asszociált membránjában (MAM) találhatóak, de más sejtmembránokban is kimutathatók. Az S1R-k részt vesznek az intracelluláris jelátviteli útvonalak szabályozásában azáltal, hogy modulálják az ionszarnák, az inozitol-foszfátázok és a protein-kinázok aktivitását. Az eikozanoidok szubsztrátja, a foszfolipáz A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) által membrán foszfolipidekből (PL) felszabaduló arachidonsav (AA). A szabad AA mennyisége függ a sejtmembrán foszfolipid (PL) tartalmától, a PL-ek re- vagy de-acilációjától, az intracelluláris kalciumion-koncentrációtól ( $[Ca^{2+}]_i$ ), valamint a ciklooxygenáz-1 vagy -2 (COX-1, -2) és lipoxigenáz (LOX) enzimek aktiválódásától. A prosztaglandinokat (PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>), tromboxán A<sub>2</sub>-t (TxA<sub>2</sub>) és prosztaciklint (PGI<sub>2</sub>), a ciklooxygenáz hatására képződő endoperoxidból (PGH<sub>2</sub>), szövetspecifikus szintetázok hozzák létre. Míg a lipoxigenázok aktiválódása hidroxí-eikozatetraénsavak (HETE-k) kialakulását eredményezi.

A S1R-k nemcsak a fiziológiás, hanem a patológias sejtfunkciók szabályozásában is részt vesznek. Az S1R génextpresszióról ismert, hogy szerepet játszik a diabéteszes szövödmények megelőzésében. A glikációs végtermékek (AGE-k) és reaktív oxigén gyökök (ROS) képződéséhez vezető cukorbetegség endotél diszfunkciót és vérlemezke aktivációt eredményez.

A vérlemezkék nemcsak a vérzéscsillapításban, hanem a gyulladáshas és immunfolyamatokban, valamint a mikrokeringés szabályozásában is részt vesznek. A vérlemezkék és az endotélsejtek által szintetizált bioaktív lipidmediátorok fontos szerepet játszanak ezekben a folyamatokban.

## CÉLKITŰZÉS

Elsődleges célunk volt azon hipotézisünk igazolása, hogy a patkány vérlemezkék képesek S1R-t expresszálni.

Feltételeztük, hogy az S1R szerepet játszhat vérlemezkék fiziológiás működésében. Ennek megerősítésére előkísérleteinkben egy ismert S1R agonista ligand, a PRE-084 vérlemezkék *in vitro* AA-metabolizmusára és vérlemezke aggregációra kifejtett hatását vizsgáltuk meg egészséges patkányokban.

Fontosnak tartottuk annak tisztázását is, hogy a patkányoknak szub-krónikus, i.p. adott S1R ligandumok: egy ismert S1R agonista PRE-084, egy antagonistá NE-100 és egy új Dvorácskó és mtsai. (2021) által kiválasztott, (S)-L1 képesek-e olyan mértékű *in vivo*

változásokat előidézni az egészséges patkány vérlemezkék és hasi aorta AA metabolizmusában, amelyek *ex vivo* kimutathatók még akkor is, ha a ligand már nincs jelen a vizsgált közegben.

Feltételeztük, hogy az SIR ligandumok nemcsak a szabad AA-szubsztrát mennyiségét és az enzim aktivitást, hanem a megakariocitákból származó és a vérlemezkékben tárolt SIR-t és COX-ot kódoló gének (*Sigmar1*, *Ptgs*) mRNS-szintjét is befolyásolhatják.

Feltételeztük, hogy a vérlemezkék és endotélsejtek által szintetizált eikozanoidoknak közvetítő szerepe lehet a SIR-k diabéteszben észlelt jótékony hatásában.

Célunk volt annak tisztázása, hogy az STZ-indukált cukorbetegség befolyásolja-e a vérlemezkék *Sigmar1* és *Ptgs* mRNS-szintjét, a vérlemezkék és az aorta AA-metabolizmusát. Majd ezt követően arra kerestük a választ, hogy az i.p. szub-krónikusan beadott SIR ligandumok a diabétesz hatására megváltozott, előbb említett paramétereket helyre tudják-e állítani? Valamint, hogy van-e különbség az egyes ligandumok hatásában?

## MÓDSZEREK

A SIR patkány vérlemezkéken való expresszióját RT-qPSR-rel mutattuk ki és immunfestéssel, valamint konfokális lézer szkennig mikroszkóp segítségével tettük láthatóvá. Az eikozanoid-szintézis tanulmányozására radioaktív szubsztrátot és ELISA-tesztet alkalmaztuk egészséges és diabéteszes állatokban egyaránt. A vérlemezke-aggregációs vizsgálatokat teljes vér, ADP és AA induktorok felhasználásával, „Multiple-electrode” aggregometriával végeztük. LC-MS használatával határoztuk meg a szub-krónikusan, i.p. beadott SIR ligandumok vérszintjét, egészséges és diabéteszes patkányokban. A SIR ligandumok vérlemezke *Sigmar1* és *Ptgs* génjeinek expressziójára kifejtett hatását RT-qPSR segítségével vizsgáltuk. Diabéteszes patkányokat hoztunk létre, a SIR kóros körülmények közötti hatásának tanulmányozása céljából.

## EREDMÉNYEK

A *Sigmar1* génexpressziót nem aktivált, egészséges patkány vérlemezkékben RT-PCR és qPCR módszerrel is kimutattuk ( $17,3 \pm 0,22$ ), és a *Gapdh* és *Actb* kontrol génekhez viszonyított relatív expresszióval számszerűsítettük. Az SIR fehérjeszinten is jelen volt a nem aktivált patkány vérlemezkékben: a pontszerű festődési mintázat ko-lokalizálódott a patkány vérlemezkék F-aktin szerkezetével vagy búzacsira agglutinin lektin festődésével, amit konfokális mikroszkóppal vizualizáltunk.

Ezt követően megvizsgáltuk a már SIR-agonistaként ismert PRE-084 *in vitro* hatását a nem aktivált, egészséges patkány vérlemezkék működésére.

A nem aktivált patkány vérlemezkék *in vitro* radioaktív AA-metabolizmusát az általunk vizsgált PRE-084 minden koncentrációja fokozta, mind a COX, mind a LOX útvonalon keresztül. A COX-útvonalon képződő metabolitok teljes mennyiségét és a TxB<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> valamint PGE<sub>2</sub> szintézisét a PRE-084 2 µM-os koncentrációja fokozta a legjelentősebb mértékben. A PRE-084 dózishatás görbéi az összes fent említett COX-termék esetében szigmoidálisak voltak. *ELISA-val*, mennyiségi elemzéssel is kimutattuk, hogy a 2 µM PRE-084 *in vitro* alkalmazása a vérlemezkékben a COX-1 ( $48,4 \pm 8,3$  ng/ml vs.  $11,3 \pm 2,5$  ng/ml) és a TxB<sub>2</sub> ( $0,528 \pm 0,16$  ng/ml vs.  $0,194 \pm 0,038$ ) koncentrációjának növekedését eredményezte.

A PRE-084 egészséges patkányokban a kontroll mintához képest fokozta az *ADP és AA által kiváltott vérlemezke-aggregációt*. A PRE-084 aggregációra gyakorolt hatása szigmoidális dózishatás görbét eredményezett, a legalacsonyabb hatásos koncentráció 2 µM volt. Nem találtunk szignifikáns különbséget az AA- vagy ADP-indukált vérlemezke aggregáció között azonos agonista alkalmazása mellett. Előzetes kísérleteink igazolták a PRE-084 vérlemezke funkciót fokozó hatását patkányban.

Továbbiakban vizsgálatainkat ki kívántuk terjeszteni az S1R antagonistaként ismert NE-100-ra és egy új ligandumra, az (S)-L1-re, amelyet a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerészeti Kémiai Intézet saját vegyületkönyvtárából választottunk ki *in silico* szűréssel, Dvorácskó és munkatársaival együttműködve.

Molekuláris modellezés segítségével vizsgálva a ligandumok S1R-hez való kötődését, megállapítottuk, hogy az (S)-L1 és az NE-100 nagyon hasonló kötődési pozícióval rendelkezik. *In vitro* kísérleteink igazolták a PRE-084 akut hatását egészséges patkányok vérlemezkéiben. Az S1R ligandumok *in vivo/ex vivo*, szub-krónikus hatásainak tanulmányozásához a ligandumok intraperitoneális beadását választottuk.

Előzetes kísérleteinkben kimutattuk a ligandumok keringésbe jutását és a kezelés után 20 órával történő teljes eliminációját. Közvetlen *ex vivo* vizsgálataink megelőzően, a plazma ligandum-koncentrációja minden egészséges és cukorbeteg állatban a kimutatási vagy mérési határ körül volt, azaz e kísérletek eredményei nem tekinthetők akut ligandum hatásnak.

A szub-krónikus, *in vivo* kezelés alkalmával, a S1R ligandumok egyike sem eredményezte az *ex vivo* radioaktív AA metabolitok össz mennyiségének (COX+LOX) változását, egészséges patkány vérlemezkékben. Azonban mind a PRE-084, mind az (S)-L1 csökkentve a COX- és növelve a LOX-metabolitok képződését, míg az NE-100 ellenkező hatást kiváltva, AA-kaskádon belüli termék eltolódást eredményezett. Az érösszehúzó, vérlemezke aggregáló (CON) és az értágító, vérlemezke aggregációt gátló COX metabolitok arányának csökkenését

csak az (S)-L1 S1R ligand idézte elő. Míg a CON és DIL COX metabolitok képződését PRE-084 azonos mértékben csökkentette, az NE-100 viszont fokozta.

A diabéteszes patkányok vérlemezkéi által COX és LOX úton képzett radioaktív AA metabolitjainak mennyisége az egészségeshez hasonló volt. Ennek ellenére, a diabéteszes patkányok vérlemezkéinek AA metabolizmusát a PRE-084 és az (S)-L1 a LOX út, míg az NE-100 a COX út irányába toltta el. Diabéteszes patkány vérlemezkékben fokozott DIL COX-termék képződést észleltünk, változatlan CON COX-metabolit szintézis mellett. A diabéteszes vérlemezkék DIL COX dominanciáját az NE-100 nem befolyásolta, azonban mind a PRE-084, mind az (S)-L1 csökkentette.

Egészséges és diabéteszes patkány vérlemezkékben is, ki tudtuk mutatni mind a COX-1, mind a COX-2 enzimet, ELISA módszerrel. Egészséges patkány vérlemezkékben (S)-L1 és NE-100 jelentősen növelte, mind a COX-1, mind a COX-2 koncentrációját, ennek következtében a teljes COX (COX-1+COX-2) koncentrációt is. A két enzim koncentráció növekedése eltérő mértékű volt, amit a COX-1/COX-2 hányados csökkenése bizonyít. A konstitutív COX-1 koncentrációja nem különbözött, míg az indukálható COX-2 koncentrációja magasabb volt a vivőanyaggal kezelt cukorbeteg patkányok vérlemezkéiben, mint a vivőanyaggal kezelt egészséges patkányok vérlemezkéiben. A PRE-084 és az (S)-L1 a diabéteszes patkány vérlemezkék COX-1 és COX-2 mennyiségét azonos mértékben fokozódta a vivőanyaggal kezelt egészséges és diabéteszes csoporthoz képest is. Bár a NE-100 is növelte a COX enzimek teljes mennyiségét a diabéteszes vérlemezkékben, ez kizárólag a COX-2 növekedésének volt köszönhető, amit a COX-1/COX-2 arány csökkenése is bizonyít.

Az S1R ligandumok *Sigmar1*, *Ptgs1* és *Ptgs2* transzkriptumokra kifejtett *ex vivo* hatásának vizsgálatakor, sem egészséges, sem diabéteszes patkány vérlemezkékben nem tudtunk kimutatni *Ptgs2* mRNS-t RT-qPCR-rel. Az egészséges patkány vérlemezkék *Sigmar1* és a *Ptgs1* mRNS szintjét nem változtatta meg a S1R ligandumokkal való egyhetes kezelés.

A PRE-084 és az (S)-L1 ligandumokkal végzett *in vivo* kezelés megnövelte a *Sigmar1* transzkript szintjét a diabéteszes patkányok vérlemezkéiben, mind a vivőanyaggal kezelt diabéteszes, mind az egészséges patkánymintákhoz képest. A *Ptgs1* transzkriptum szintje magasabb volt a vivőanyaggal kezelt diabéteszes patkányok vérlemezkéiben, mint a vivőanyaggal kezelt, egészséges állatokban. A diabéteszes patkányokban a PRE-084 kezelés nem változtatta meg a *Ptgs1* mRNS-szintjét a vivőanyaggal kezelt, diabéteszes állatokból származó mintákhoz képest. A *Ptgs1* mRNS-szint alacsonyabb volt az (S)-L1 csoportban, mint a vivőanyaggal vagy PRE-084-gyel kezelt diabéteszes patkányok csoportjában, de nem

különbözött szignifikánsan a vivőanyaggal kezelt, egészséges csoporttól. A NE-100 kezelés a diabéteszes patkányokban csökkentette a vérlemezkék *Ptgs1* szintjét a vivőanyaggal kezelt, diabéteszes csoporthoz képest. Az (*S*)-L1 ligandum a PRE-084-hez hasonlóan növelte a *Sigmar1* mRNS-szintjét mind az egészséges, mind a diabéteszes kontroll csoportban, míg a NE-100-hoz hasonlóan csökkentette a *Ptgs1* mRNS-koncentrációt a vivőanyaggal kezelt diabéteszes patkányok vérlemezkéiben.

*In vivo* kezelést követően, az egészséges patkány hasi aortában, mind a PRE-084, mind az (*S*)-L1 csökkentette, az *ex vivo* radioaktív AA-ból szintetizált eikozanoidok össz mennyiségét (COX+LOX), míg az NE-100 növelte azt. A COX- és LOX-metabolitok mennyiségének változása PRE-084 és NE-100 hatására hasonló mértékű volt, azonban az (*S*)-L1 kezelés csökkentve a LOX-metabolitok képzését, a COX út irányába tolt el az eikozanoid szintézist, amit a COX/LOX arány növekedése is bizonyít. Egészséges patkányok aortájában mind a PRE-084, mind az (*S*)-L1 hasonló csökkenést eredményezett az *ex vivo* CON- és DIL-COX metabolit szintézisben, ezért ebben az esetben nem volt megfigyelhető a CON/DIL arány eltolódása. Azonban, az NE-100 *in vivo* kezelés annak ellenére, hogy növelte mind a CON-, mind a DIL-COX metabolitok képződését, a CON/DIL arány csökkenését, azaz a DIL-COX dominanciát eredményezett. Az egészséges patkány aortában a 6-k-PGF<sub>1α</sub> szintézisét az (*S*)-L1 és az NE-100 növelte, a PRE-084 pedig csökkentette, a vivőanyaggal kezelt mintához képest.

Sem a COX-, sem a LOX-metabolitok mennyisége, sem az össz mennyisége (COX+LOX), sem az arányuk (COX/LOX) nem változott a *cukorbeteg patkányok* aortájában, a vivőanyaggal kezelt, egészséges patkányokéhoz viszonyítva. Nem tudunk különbséget kimutatni sem a CON-, sem a DIL COX metabolitok képződésében a vivőanyaggal kezelt cukorbeteg és a vivőanyaggal kezelt egészséges patkányok aortájában.

A PRE-084 és (*S*)-L1 *in vivo* kezelés csökkentette a LOX termékeinek képződését a diabéteszes patkányok aortájában, míg az NE-100 fokozta azt, a vivőanyaggal kezelt diabéteszes állatokéhoz képest. A diabéteszes patkányok aortában, az (*S*)-L1 kezelés csökkentette a CON-COX metabolitok szintézisét, míg az NE-100 kezelés növelte a DIL-COX képződést, mind az egészséges, mind a diabéteszes, vivőanyaggal kezelt mintákhoz képest, amik a CON/DIL arányt csökkentve, DIL-COX dominanciát eredményeztek. A TxB<sub>2</sub> szintézise nem változott, míg a 6-k-PGF<sub>1α</sub> termelődése szignifikánsan csökkent a vivőanyaggal kezelt, diabéteszes patkány aortában az egészséges állatokhoz képest. Az (*S*)-L1 a TxB<sub>2</sub> szintézisének csökkenését idézte elő a diabéteszes aortában a vivőanyaggal kezelt

egészséges és diabéteszes állatokhoz képest. Az NE-100 azonban egyrészt csökkentette a  $\text{TxB}_2$  termelését, másrészt növelte a  $6\text{-k-PGF}_{1\alpha}$  szintézisét.

Az egészséges patkányok hasi aortájában magasabb COX-2 koncentrációt mutattunk ki, mint COX-1-et, ELISA segítségével. Egészséges patkányok *in vivo* kezelése PRE-084-gyel a COX-1 koncentráció növekedést, míg az NE-100 kezelés COX-2 koncentráció csökkenést idézett elő az aortában. Az (S)-L1 kezelés viszont, mind a COX-1, mind a COX-2 szintjét fokozta, azonban nem egyelő mértékben, mivel a COX-1/COX-2 arány megemelkedett.

A vivőanyaggal kezelt, diabéteszes patkányok aortájában sem a COX-1, sem a COX-2 koncentrációja, sem az összegük (COX-1+COX-2) nem különbözött a vivőanyaggal kezelt, egészséges állatoktól. A diabéteszes patkányok aortájában e paraméterek koncentrációját egyik vizsgált SIR ligandum sem változtatta meg. A COX-1/COX-2 arány azonban a vivőanyaggal, illetve PRE-084-gyel kezelt diabéteszes patkányok aortájában magasabb volt, mint a vivőanyaggal kezelt egészséges patkányokéban.

## **KÖVETKEZTETÉS / MEGBESZÉLÉS**

Az SIR jelenlétét, fiziológias és patológias folyamatokban betöltött szerepét már számos sejttípusban kimutatták, de vérlemezkékben való jelenlétét és szerepét még nem tanulmányozták. Intracellulárisan, az SIR főként az ER mitokondrium-asszociált membránjában található, de képes az ER-ből a plazmamembránba vándorolni.

Bár a vérlemezkék magnélküli sejtek, számos más intracelluláris sejtalkotóval rendelkeznek, amelyek biztosítják az SIR jelenlétének strukturális feltételeit. Még fehérje bioszintézisre is képesek a megakariocitákból származó citoplazmatikus mRNS révén. RT-PCR, qPCR és immuncitokémiai eljárás segítségével, mind mRNS-, mind fehérjeszinten sikerült megerősíteni azon feltételezésünket, hogy a nem aktivált patkány vérlemezkék is expresszálnak SIR-t. A vérlemezkék nemcsak a hemosztázisban, hanem a szervezet védekező reakcióiban is részt vesznek. Aktiválódásuk receptoraik expresszióját, kitapadásukat, degranulációjukat, aggregálódásukat, valamint AA anyagcseréjük fokozódását eredményezi.

Az SIR számos intracelluláris folyamatot (ROS anyagcserét, kóros fehérje eliminációt, ATP-termelést, ionszoptornák működését, ic. lipidszállítást és enzimek aktivitását) befolyásolhat. A SIR membrán szerkezetet és sejtfunkciót módosító hatását már széles körben tanulmányozták, valamint aktiválatlan patkány vérlemezkékben sikerült SIR-t kimutatnunk. Mindezek alapján feltételeztük, hogy az SIR agonista PRE-084 képes befolyásolni a membrán foszfolipidek AA-vá és eikozanoidokká történő metabolizmusát, *in vitro*.



A S1R ligandok hatásának helyes értelmezése érdekében nemben és korban illesztett hím patkányokat használtunk kísérleteink során. Fontos szempont volt a vérlemezkék spontán aktiválódásának, az endotél károsodásának megelőzése, valamint a mintavételt követően gyors felhasználásuk. A vérlemezke-aktiváció megelőzése érdekében szeparáláshoz műanyag eszközöket, vérvételhez vastag tűt, valamint vérlemezke-aggregációt gátló, kalcium kelátképző antikoagulánst, EDTA-t használtunk. A vérlemezkék eikozanoid szintézisének vizsgálatához, EDTA- és plazmafehérje mentes szövettáppoldatot használtunk, ami biztosította a vérlemezkék fiziológiás működéséhez szükséges  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt. A vérlemezkék aktiválódásának elkerülésének céljából, a jelölésként alkalmazott radioaktív szubsztrát koncentrációja (0,172 nM  $1\text{-}^{14}\text{C-AA}$ ) lényegesen kisebb volt, mint az aggregációt előidéző induktor AA (0,5 mM) mennyisége.

A S1R agonista PRE-084 liganddal történő *in vitro* előkezelés fokozta az egészséges, 12 hetes hím patkányok aktiválatlan vérlemezkéinek AA-metabolizmusát, amit szemikvantitatív módon radioaktív szubsztrát alkalmazásával és kvantitatív módon, ELISA-val is ki tudunk mutatni. E hatás magyarázata lehet az, hogy a PRE-084 intracelluláris lipidszállító hatása révén növelte a sejtmembrán PL-tartalmát, míg foszfolipáz-aktiváló képessége révén, a PL-ek deacilációját előidézve, fokozta az eikozanoidok szubsztrátjának, a szabad AA-nak a mennyiségét.

Bár a COX úton és a LOX úton képződő AA metabolitok össz mennyisége is növekedett *in vitro* PRE-084 kezelés hatására, azonban növekedésük mértéke és dózis-függése nem volt azonos. Ezen eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy e S1R ligand, nemcsak a szabad AA szintjének növelése révén, hanem közvetlenül a COX, illetve LOX expressziójára és/vagy aktivitására is stimulálólólag hat. A PRE-084 ligandum COX és LOX expresszióra és/vagy aktivitásra kifejtett különböző hatása, az eltérő behatási időigénnyel és az enzimek eltérő érzékenységgel magyarázható.

A ciklooxygenáz enzim konstitutívan expresszálódó izoformája a COX-1, míg a COX-2 egy indukálható izoenzim. Annak ellenére, hogy a vérlemezkék anukleáris sejtek, mégis képesek *de novo* COX-1-et szintetizálni a megakariocitákból származó citoplazmatikus mRNS-ből. Humán vérlemezkében már ki tudtak mutatni COX-2 mRNS és fehérjét is, azonban a COX-1-nél jóval kisebb mennyiségben. *In vitro* PRE-084 kezelés hatására, COX-1 koncentráció növekedést tudunk kimutatni ELISA segítségével, aktiválatlan patkány vérlemezkékben, ami összhangban van, a radioaktív szubsztrát használatával kapott COX-metabolitok össz mennyiségének fokozódásával. Jelen vizsgálati körülmények között, az egyes COX termékek ( $\text{TxB}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ) szintézise egyaránt, de különböző mértékben fokozódott.

Ezen eredményeink arra utalnak, hogy az aktiválatlan vérlemezkék *in vitro* PRE-084-gyel történő előkezelése nemcsak a PLA<sub>2</sub>, COX és LOX enzimek expresszióját és/vagy aktiválódását képes fokozni, hanem az egyes, COX útvonalon szintetizálódó eikozanoidok képzésében szerepet játszó specifikus enzimeket is. E hatások pontos mechanizmusa még nem ismert, annak ellenére, hogy már több tanulmány is beszámolt, a S1R ioncsatornát és enzim működését moduláló szerepéről. *In vitro*, PRE-084 hatására, a nem aktivált patkány vérlemezkék több aggregáló, és érszűkítő TxA<sub>2</sub> stabil metabolitot, azaz TxB<sub>2</sub>-t, aggregációt gátló és vazodilatátor PGD<sub>2</sub>-t, valamint PGE<sub>2</sub>-t szintetizáltak, melynek azonban vérlemezkékre gyakorolt hatása koncentráció-függő.

Ezen kísérleti eredmények mellett, a PRE-084 trombocita aggregációra gyakorolt hatásának tisztázása érdekében megvizsgáltuk ennek az S1R ligandumnak a közvetlen hatását az ADP és AA által kiváltott trombocita aggregációra. Az aktiválatlan állapotban lévő vérlemezkék eikozanoid-szintézisét fokozó PRE-084 koncentrációk fokozták mind az ADP, mind az AA által kiváltott vérlemezke aggregációt, teljes vér aggregometria alkalmazásakor. Ezen eljárás során, a vérlemezke aggregációt elősegítő fibrinogén, kalcium ion és egyéb keringő vér alakos elem is rendelkezésre állt. Az S1R agonista hatása az AA által kiváltott aggregáció sebességére volt a legkifejezettebb, a kontroll csoporthoz képest. Ez azzal magyarázható, hogy az AA-ból szintetizálódó tromboxán, saját receptoraihoz kötődve, autokrin és parakrin vérlemezke aktiválódást vált ki, valamint az AA által kiváltott vérlemezke aktiválódás endogén (granulumból történő) ADP induktor felszabadulást idéz elő. A PRE-084 dózis-hatása görbéje, az ADP vagy az AA által kiváltott vérlemezke aggregációra nem különbözött szignifikánsan, annak ellenére, hogy az ADP elsődleges hatása a vérlemezkékre receptor-mediált, míg az AA elsődleges hatása nem. Másodlagos intracelluláris jelátviteli útvonalai azonban hasonlóak, mivel mindkettő képes a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> emelkedését és az endogén induktorok, mint a tromboxán, a szerotonin és az ADP szekrécióját kiváltani. Feltételezésük szerint az ADP és az AA ezen közös, intracelluláris jelátviteli útvonalát módosíthatja a PRE-084. Azonban, a PRE-084 által kiváltott vérlemezke-aggregáció emelkedésének mértéke kisebb volt, mint a tromboxán-termelésé. Ez a különbség az antiaggregátor eikozanoidok (PGD<sub>2</sub>, és PGE<sub>2</sub>) képződésének fokozódásával, valamint a PRE-084-t megkötő sejtek és plazmafehérjék egyidejű jelenlétével magyarázható. Ez utóbbi folyamatok mechanizmusa, jelenléte a vérlemezkékben azonban még nem tisztázott egyértelműen. A S1R agonista PRE-084 *in vitro* patkány vérlemezke AA metabolizmust, és aggregációt fokozó hatásának kimutatását követően, vizsgálatainkat kiterjesztettük más S1R ligandumra, mint például a S1R antagónistájaként ismert NE-100-ra és egy új ligandumra, az (S)-L1-re.

Az erek belső felszínét béleelő endotélsejt-réteg és a vérlemezkék funkcionális egységet alkotnak. A vérlemezkék elsősorban érösszehúzó, vérlemezke aktiváló tromboxánt, míg az endotél főként értágító, vérlemezke aggregációt gátló prosztaciklint szintetizál, melyek fiziológiás körülmények között egymással egyensúlyban lévén biztosítják a normál mikrocirkulációt.

Ezen ismeretek birtokában vizsgáltuk a fent említett S1R ligandumok *in vivo/ex vivo* hatását a trombocita- és aorta eikozanoid-szintézisre szub-krónikus i.p. kezelést követően egészséges és STZ-indukált cukorbeteg 16 hetes hím patkányokon. Az alkalmazni kívánt S1R ligandumok kiválasztása receptorhoz való kötődésük erőssége és az S1R kötőzsebében elfoglalt kötőhelyük alapján történt. A fő különbség a S1R agonista és antagonisták kötődése között az, hogy a ligandum kölcsönhatásba tud-e lépni a S1R C-terminális spiráljával. A PRE-084 ciklohexán gyűrűje az egyetlen olyan rész, amely képes kölcsönhatásba lépni ezzel a spirállal. Az (S)-L1, nagyon hasonló kötődési pozícióval rendelkezik, mint az S1R antagonisták NE-100. A kezelés időtartamát a vérlemezkék élettartama (egy hét) határozta meg.

Az i.p. beadott S1R ligandumok mindegyike bekerült a keringésbe, azonban 30 perces szérumszintjük közötti eltérés felszívódásuk sebességének különbségére utalhat. A ligandumok időfüggő szérumszintjének különbsége eltérő metabolizmusukkal és kiválasztásukkal magyarázható, amiknek mechanizmusa még nem teljesen tisztázott. Az S1R ligandumok közvetlen hatásának kizárása érdekében *ex vivo/in vitro* vizsgálatainkat 20 órával az utolsó ligandum kezelés után kezdtük, amikor a ligandumok szérumszintje már a kimutatási vagy mennyiségi meghatározási határ alatt volt. Azaz ebben az esetben, a vérlemezkékben és az aortában *ex vivo* kimutatott AA-metabolizmusban bekövetkező változások a ligandumok által *in vivo* kiváltott hatásoknak tudhatók be.

*In vivo* kezelés alkalmával, az általunk vizsgált S1R ligandumok egyik se eredményezte az egészséges patkány vérlemezkék *ex vivo* radioaktív AA metabolitok össz mennyiségének változását. Ennek ellenére a PRE-084, valamint az (S)-L1 hatására létrejövő COX/LOX arány csökkenés, míg NE-100 hatására ezen arány fokozódása volt kimutatható, vérlemezkékben. Egészséges patkány aorta esetén viszont az AA metabolitok össz mennyiségét a PRE-084 és az (S)-L1 is csökkentette, míg az NE-100 fokozta, sőt mindemellett (S)-L1 kezelés hatására az AA kaskádon belül COX út irányába történő termékeltolódás is megfigyelhető volt. Az egészséges patkány trombocitákban egyik ligandum sem idézett elő változást sem az S1R, sem a COX mRNS szintjében; vagyis az AA-metabolizmusban mutatkozó különbség nem magyarázható a ligandumok S1R vagy

COX enzim átírására gyakorolt hatásával. Annak ellenére, hogy humán vérlemezkékben már kis mennyiségben tudtak COX-2 mRNS-t és fehérjét kimutatni, jelenlegi kísérleti körülményeink között azonban mi nem tudtuk kimutatni a COX-2 (*Ptgs2*) mRNS-t a patkányok vérlemezkéiben 40 ciklusos RT-qPCR-rel. Ez azzal magyarázható, hogy a megakariocitákból származó mRNS-transzkriptek korlátozott poolja használható fel fehérje (pl. COX-2) szintézisre, így a fokozott AA-metabolizmus az ic. tartalékok (mRNS, enzim pool és  $[Ca^{2+}]_i$ ) kimerüléséhez vezethet.

Bár a PRE-084 és az (*S*)-L1 *in vivo* kezelés csökkentette, míg az NE-100 fokozta a radioaktív COX metabolitok össz mennyiségét egészséges patkányok vérlemezkéiben, a PRE-084-gyel történő kezelést követően, nem tudunk kimutatni változást a COX enzim (COX-1+COX-2) koncentrációban ELISA-val, míg (*S*)-L1- és NE-100-kezelés esetén növekedést észleltünk. Mind az (*S*)-L1, mind az NE-100 növelte a vérlemezkék COX-1, és COX-2 enzimek koncentrációját, de a COX-1/COX-2 arány csökkenése mindkét ligandum esetén arra utal, hogy a COX-2-t növelő hatásuk nagyobb mértékű volt, mint a COX-1-é. Mindezt, a COX útvonal által képződő radioaktív AA-metabolitok össz mennyiségének csökkenése egészséges patkányok vérlemezkéiben, PRE-084 és (*S*)-L1 *in vivo* kezelést követően, a COX enzim gátlásával vagy a szabad AA-szubsztrát abszolút vagy relatív mennyiségének csökkenésével magyarázható. Az AA-metabolitok keletkezése elegendő mennyiségű szabad AA jelenlététől függ, amelyet befolyásolhat a membrán PL-összetétele, a foszfolipáz-aktivitás és a  $[Ca^{2+}]_i$  szint. Az SIR közismerten képes mindezen tényezők megváltoztatására. Mivel az egészséges patkány vérlemezkék AA-metabolitjainak (COX+LOX) össz mennyiségét se a PRE-084-gyel, se az (*S*)-L1-gyel történő *in vivo* kezelés nem csökkentette, ezért a szabad AA mennyiségének abszolút csökkenése kizárható. Ezért ebben az esetben a COX-metabolitok össz mennyiségének csökkenését a ciklooxigenáz közvetlen gátlása és/vagy a LOX aktivitásának növekedése, azaz az AA szubsztrát relatív csökkenése okozhatta, amit a COX/LOX arány csökkenése is alátámaszt. Bár a SIR ligandumok COX-aktivításra gyakorolt közvetlen hatásáról nem állnak rendelkezésre adatok, egy nemrégiben végzett lipidomikai vizsgálat, a COX-útvonal downregulációját találta a bufotenin, egy SIR ligandum hatására. A PRE-084 ligandummal ellentétben mind az (*S*)-L1, mind az NE-100 kezelés alkalmával, COX enzimkoncentráció emelkedést tudunk kimutatni, az egészséges patkányok trombocitáiban, ELISA-val. Az (*S*)-L1 azonban csökkentette, míg az NE-100 fokozta a radioaktív COX-metabolitok képződését. Azaz, az egyes ligandumok eltérő hatásainak magyarázata, az egyes ligandumok ciklooxigenáz, valamint az eikozanoidok

szintézisében szerepet játszó specifikus enzimek translációjára, szintézisére, és/vagy aktiválódására kifejtett hatáskülönbsége lehet.

Az egyes S1R ligandummal történő *in vivo* kezelés által kiváltott, különböző mértékű és / vagy irányú változása az egészséges patkány vérlemezkék COX úton képződő metabolitjainak arra utalhat, hogy a ligandumok nemcsak a PLase, COX és LOX, hanem az egyes specifikus enzimek befolyásolásán keresztül is hatnak. Az (S)-L1-kezelés például csökkentve a CON termékek szintézisét, CON/DIL arány csökkenéséhez vezetett. A vérlemezkék fő COX-metabolitjának, az érösszehúzó és vérlemezke-aggregáló tromboxánnak a szintézisét sokkal jobban csökkentette az új ligandumunk, az (S)-L1, mint a PRE-084.

Az általunk vizsgált S1R ligandumok egészséges patkány aorta AA-metabolizmusára kifejtett hatása jelentősen különbözött a vérlemezkékre gyakorolt hatástól. S1R ligandumok az egészséges patkány aorta COX metabolitjainak összmenyiségében a vérlemezkékhez hasonló irányú, de kisebb mértékű változást eredményeztek. A vérlemezkékkel ellentétben az aorta által a LOX útvonalon keresztül képződő eikozanoidok összmenyiségét az (S)-L1 csökkentette, míg a NE-100 növelte. Ezek a változások mind az abszolút, mind a relatív AA-szubsztrát mennyiségének változásával magyarázhatók. Az aortában, az AA-metabolitok (COX+LOX) teljes mennyiségének (S)-L1, valamint PRE-084 általi csökkenése, míg az NE-100 hatására bekövetkező növekedés arra utal, hogy az S1R ligandumok befolyásolhatták az AA foszfolipidekből való felszabadulását, azaz a szubsztrát abszolút mennyiségét. Másrészt a COX és a LOX metabolitok (COX/LOX) arányának (S)-L1 hatására bekövetkező növekedése az aortában, a ciklooxygenáz út dominanciájára utal, ami a LOX enzimek számára relatív szubsztráthiányt eredményezett. Bár a ligandumok hatása a vérlemezke- és aorta-COX-metabolitok összmenyiségére hasonló volt, a COX úton képződő vazokonstriktor és vérlemezke aggregátor (CON), valamint a vazodilatátor, vérlemezke aggregációt gátló COX-metabolitok (DIL) arányára (CON/DIL) gyakorolt hatásuk jelentősen különbözött. Az (S)-L1 a vérlemezkékben, míg az NE-100 az aortában eredményezett CON/DIL csökkenését. Aortában, az NE-100 annak ellenére csökkentette a CON/DIL arányt, hogy mind a CON, mind a DIL-metabolitok szintézisét növelte. Az aorta fő COX-metabolitjának, a vazodilatátor és anti-aggregátor proztaciklin szintézisét az általunk vizsgált új ligandum, az (S)-L1 fokozta, amit viszont a PRE-084 gátolt. A PRE-084, (S)-L1 és NE-100 ligandumokkal történő szub-krónikus *in vivo* kezelés esetén, az értágító és a vérlemezke aggregációt gátló COX eikozanoidok túlsúlyát tudtuk kimutatni *ex vivo*, egészséges patkány vérlemezkékben és aortában. Jelen vizsgálati körülményeink között, a vérlemezke- és érrendszeri eikozanoid-

szintézis egyensúlyának, azaz a szöveti perfúzió és a mikrokeringés fenntartásában az általunk vizsgált SIR ligandumok közül az (S)-L1 bizonyult a leghatásosabbnak.

A PRE-084 és (S)-L1 ligandumokkal való kezelés nem befolyásolta a cukorbeteg patkányok vérlemezkéi által szintetizált radioaktív eikozanoidok (COX+LOX) összmenyiségét, de csökkentette a COX/LOX arányt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PRE-084 és az (S)-L1 a vérlemezkék AA-metabolizmusának eltolódását idézi elő a LOX-út vonal felé anélkül, hogy megváltoztatná a foszfolipidekből felszabaduló AA-szubsztrát mennyiségét. Bár a PRE-084 és az (S)-L1 nem emelte a COX-1 mRNS-t a diabéteszes vérlemezkékben a vivőanyaggal kezelt diabéteszes vérlemezkékhez képest, az ELISA-val meghatározott COX enzimkoncentrációt viszont növelték. Ez azonban nem eredményezte a COX-út vonal termékeinek összmenyiségének növekedését, azaz a COX-enzimaktivitás fokozódását. Míg az egyes COX-termékek szintézisében részt vevő specifikus enzimeket úgy módosították, hogy normalizálják a diabéteszes vérlemezkékben bekövetkező változásokat. Például a diabéteszes patkányoknál a PRE-084- és (S)-L1-kezelt állatok vérlemezkéiben magasabb CON/DIL arányt figyeltünk meg, ami a CON COX metabolitok túlsúlyát jelzi a vivőanyaggal-kezelt, diabéteszes patkányok vérlemezkéihez képest, amelyek viszont csökkent CON/DIL arányt mutattak a vivőanyaggal-kezelt, egészséges csoporthoz képest. A NE-100 nem befolyásolta a cukorbeteg állatokból származó vérlemezkék AA-metabolizmusát a vivőanyaggal-kezelt, cukorbeteg csoporthoz képest.

Bár a vérlemezkék izolálása és az *in vitro* vizsgálatok során számos biztonsági eljárást alkalmaztunk a vérlemezkék spontán aggregációjának megelőzésére, és az *ex vivo* vizsgálatok során közvetlen vérlemezke-aggregációt nem indukáltunk, a vérlemezkék intracelluláris jelátviteli út vonalainak aktiválódása nem zárható ki teljesen. A vérlemezkék elkülönítése során használt EDTA csökkentette a vérlemezkék számára elérhető *e.c.*  $Ca^{2+}$  mennyiségét, amit az *ex vivo* vizsgálatban használt szövettenyésztő közeggel normalizáltunk. *Ex vivo* vizsgálatunkban, mivel a szövettenyésztő közeg nem tartalmazott fibrinogént, a vérlemezke aggregáció nem következhetett be. Vizsgálatunk korlátjának tekintjük, hogy nem nyugalmi állapotban lévő vérlemezke-populációt vizsgáltunk, hanem a táptalaj környezetének fiziológiás paraméterekkel történő változásaihoz adaptálódott vérlemezke-populációt. Ez azonban nem teszi lehetővé az SIR ligandumok *ex vivo* hatásainak összehasonlítását, mivel a ligandummal kezelt és a ligandummal nem kezelt mintákat párhuzamosan, ugyanaból a vérlemezke-populációból nyertük. Az SIR ligandumok eikozanoid-szintézisre gyakorolt hatása a hasi aortában nagyon különbözött a vérlemezkékben megfigyelt hatásoktól. A cukorbeteg patkányok aortájában a 6-k-PGF<sub>1α</sub>

csökkent szintézisét mutattuk ki. Az aortában az NE-100 bizonyult a leghatásosabb S1R ligandumnak a fiziológiás állapot helyreállításának elősegítésében a 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  szintézis fokozásával. Az AA-metabolitok (COX+LOX) összmenyiségének növekedése a NE-100 csoportban arra utal, hogy ez valószínűleg nemcsak a specifikus prosztaciklin-szintézisnek köszönhető, hanem a foszfolipáz aktiváció miatt magasabb AA-szubsztrát hatásának is. Az (S)-L1 viszont azáltal növeli az értágító COX-termékek arányát, hogy csökkenti az érszűkítő, vérlemezke aggregátor eikozanoidok szintézisét mind a vivőanyaggal-kezelt, diabéteszes, mind a vivőanyaggal-kezelt, egészséges patkány aortához képest. Az aorta AA-metabolizmusának vizsgálatában a PRE-084 volt a legkevésbé hatékony ligandum, nem befolyásolta a COX-út vonal termékeinek szintézisét sem a vivőanyaggal-kezelt, egészséges, sem a vivőanyaggal-kezelt, diabéteszes patkányokhoz képest. Ezen eredmények alapján megerősítést nyert az a feltételezésünk, hogy az *in vivo* szub-krónikusan alkalmazott S1R ligandumok mind a vérlemezkék, mind az aorta AA-metabolizmusát képesek *ex vivo* modulálni. A vérlemezkék és az endotélsejtek AA-metabolizmusa egészséges körülmények között közismerten jelentősen különbözik egymástól. A vérlemezkék elsősorban a vazokonstriktor tromboxánt szintetizálják, míg az endotélsejtek elsősorban a vazodilatátor prosztaciklint. Az ezen arachidonsav metabolitok közötti egyensúly, döntő szerepet játszik a normál helyi keringés fenntartásában. Összességében az S1R ligandumok ellentétes hatást gyakorolnak a vérlemezkék és az aorta AA-anyagcseréjére diabéteszes patkányokban. Feltételezésünk, miszerint az S1R ligandok úgy módosítják a diabéteszes patkányok vérlemezkéiben és aorta gyűrűiben a kóros AA-anyagcserét, hogy a közöttük lévő fiziológiás egyensúly helyreáll, megerősítést nyert.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Patkány vérlemezkéken sikerült kimutatnunk S1R-t, mind gén, mind fehérje szinten. A S1R agonistaként ismert PRE-084 ligand *in vitro* alkalmazása fokozta az egészséges, hím patkányok aktiválatlan vérlemezkéinek AA metabolizmusát. E hatást, radioaktív szubsztrát és ELISA segítségével is ki tudtunk mutatni. *In vitro*, PRE-084 hatására, az aktiválatlan patkány vérlemezkék több aggregáló, mint aggregációt gátló COX metabolitot szintetizáltak, ami a vérlemezkék aktiválódásához vezet. Ezen eredményünket a PRE-084 hatására fokozódó ADP- és AA-indukált vérlemezke aggregáció is alátámasztotta. A S1R agonista PRE-084-gyel, az antagonistá NE-100-zal, valamint egy új liganddal, az (S)-L1-gyel történő szub-krónikus, intraperitoneális kezelés olyan *in vivo* vérlemezke és aorta funkcióváltozásokat idézett elő, melyek *ex vivo* is kimutatható eikozanoid szintézismódosulást eredményeztek,

annak ellenére, hogy a vizsgálati minta nem tartalmazott ligandumot. Az egészséges patkány trombocitákban egyik ligandum sem idézett elő változást sem a S1R, sem a COX mRNS szintjében; vagyis az AA-metabolizmusban mutatkozó különbség nem magyarázható a ligandumok S1R vagy COX enzim átírására gyakorolt hatásával. Az egyes S1R ligandumokkal történő *in vivo* kezelés által kiváltott, különböző mértékű és/vagy irányú eikozanoid szintézisváltozás egészséges és diabéteszes patkányok vérlemezkéiben és aortájában arra utal, hogy a ligandumok nemcsak a PLase, COX és LOX, hanem az egyes specifikus enzimek transzlációját, szintézisét, és vagy aktiválódását is eltérő módon befolyásolják. A S1R ligandumok, a vérlemezkék és az aortát bélelő endotélsejtek különböző hatású (aggregáló / vazokonstriktor, és anti-aggregáló / vazodilatátor) eikozanoidjai között fennálló fiziológiás egyensúly fenntartására, illetve diabétesz esetén annak helyreállítására irányuló változását idézik elő. Annak ellenére, hogy az (S)-L1, az S1R antagonista NE-100-hoz hasonló kötődési pozícióval rendelkezik, eikozanoid szintézisre kifejtett hatása azonban, hol a PRE-084, hol az NE-100 liganddal azonos. Az általunk vizsgált S1R ligandumok közül az új, (S)-L1 bizonyult a leghatásosabbnak. Mind ezek alapján, a S1R ligandok nagyfokú enzim-, sejt-, és szövet-specifitással rendelkeznek.

#### **Vizsgálataink legfontosabb megállapításai a következők:**

1. Patkány vérlemezkék rendelkeznek sigma-1 receptorral.
2. A PRE-084 (sigma-1 receptor ligand) fokozza a patkány vérlemezkék *in vitro* AA metabolizmusát valamint ADP- és AA-indukált aggregációját.
3. PRE-084, NE-100 és (S)-L1 (egy új) liganddal történő *in vivo* kezelés *ex vivo* is kimutatható AA metabolizmus változást idéz elő vérlemezkékben és aortában is.
4. A S1R ligandumok elősegítik a vérlemezke és endotél által képzett, ellentétes hatású eikozanoidok közötti egyensúly helyreállítását STZ indukált diabéteszben.
5. A S1R ligandok nagyfokú enzim-, sejt-, és szövet-specifitással rendelkeznek.
6. Vizsgálati körülményeink között, az új, (S)-L1 ligand bizonyult a leghatásosabbnak, azonban annak ellenére, hogy a sigma-1 receptor antagonista NE-100-hoz hasonló kötődési pozícióval rendelkezik, nem nevezhető egyértelműen antagonistának.



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Mezei Zsófiának, akitől sokat tanultam az elmúlt évek során, és aki mindvégig támogatta tudományos pályafutásomat, az ő vezetése nélkül ez a Ph.D értekezésem nem jöhetett volna létre.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Szabó Gyulának a korábbi és Prof. Dr. Rakonczay Zoltánnak a Kóréletlani Tanszék jelenlegi vezetőinek, akik lehetőséget biztosítottak számomra, hogy intézményükben dolgozhassak.

Külön köszönettel tartozom Prof. Dr. Deli Máriának és kutatócsoportjának, különösen Dr. Barna Lillának és Dr. Mészáros Máriának a kísérleteimben nyújtott segítségükért és a közös publikációk létrehozásáért.

Hálás vagyok Prof. Dr. Penke Botondnak, Prof. Dr. Janáky Tamásnak, Dr. Fülöp Líviának és Prof. Dr. Rákhely Gábornak a munkám során nyújtott támogatásukért és segítségükért.

Ezúton is köszönöm Dr. Földesi Imrének és a Laboratóriumi Medicina Intézet munkatársainak, Dr. Ónody Ritának, Dr. Siska Andreának, Kis Anitának és Váradi Anikónak az aggregációs kísérletekben és a laboratóriumi paraméterek meghatározásában nyújtott segítségüket.

Köszönöm Dr. Tömösi Ferencnek, Dr. Bogár Ferencnek és Dr. Laczi Krisztiánnak a kutatásaim során nyújtott segítséget, valamint a Kóréletlani Intézet minden munkatársának a doktori éveim alatt nyújtott segítségüket.

Végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak.