

**Új gyulladáscsökkentő, fájdalomcsillapító és tumorelleses  
gyógyszercélpontok szerepének, jelátvitelének és hatásainak in vitro  
vizsgálata**

**Doktori (PhD) Értekezés**



**Lina Hudhud**

**Gyógyszertudományok Doktori Iskola**

**Doktori iskola vezetője: Dr. Pintér Erika, PhD, DSc**

**Program: Neuroimmun interakciók szerepe fájdalomban és gyulladásban**

**Programvezető: dr: Helyes Zsuzsanna, MD, PhD, DSc**

**Témavezetők: Dr: Szőke Éva, PhD, Kecskés Angéla, PhD**

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar**

**Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet**

**Pécs, Magyarország**

**2023**

## Általános bevezetés

### **1. Fájdalom, neurogén gyulladás és a kapszaicin-érzékeny peptiderg idegek**

“A fájdalom kellemetlen szenzoros és emocionális élmény, amely tényleges vagy potenciális szövetskárosodással jár” [1]. Ezért fontos figyelmeztető és védekező mechanizmus egyben, de a hosszabb ideig fennálló fájdalom krónikussá válhat, és negatívan befolyásolja a betegek életminőségét [2]. A fájdalom lehet nociceptív fájdalom, amely általában gyulladásos betegségekkel jár együtt, például ízületi gyulladással [3], vagy neuropátiás fájdalom, amely idegkárosodással társul, mint például a cukorbetegség [4]. A gyulladás a szervezet válasza a káros ingerekre, például fertőzésre és szövetskárosodásra, amely fontos a homeosztázis helyreállítása szempontjából. A tartósan fennálló gyulladás krónikus fájdalomállapotokhoz vezet és krónikus gyulladásos betegségeket okoz [5]. A gyulladásos válasz összetettségét a sejttípusok széles skálája közvetíti, beleértve az immunsejteket, neuronokat és nem neuronális sejteket [6].

A fájdalom mint inger aktiválja a gyulladásban részt vevő perifériás nociceptív szenzoros neuronok egy alosztályát, amelyeket "kapszaicin-érzékeny érzőidegvégződésekként" írnak le, mivel a chilipaprika csípős összetevője, a kapszaicin aktiválja őket [7]. Az aktivációt a Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1) közvetíti. A TRPV1 különböző fizikai és kémiai ingerek, például 43 °C feletti hőmérséklet, savas extracelluláris körülmények (pH <6) és vanilloidok hatására is aktiválódhat [8]. Ezenkívül megállapították, hogy ezeket a kapszaicin-érzékeny afferenseket a TRPV1-gyel együttesen expresszáló Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatornák is kiválthatják [9]. Aktiváció során a TRPV1-en keresztül  $Ca^{2+}$  és  $Na^+$  ionok beáramlása indul el, ami az idegvégződés depolarizációjához és akciós potenciál kialakulásához vezet. A nocicepció mellett a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégzések úgynevezett "neurogén gyulladást" indukálnak, amelyet olyan pro-inflammatorikus neuropeptidok közvetítenek, mint a tachykininek és a kalcitonin gén rokon peptid, amelyek vazodilatációt és plazmaextraváziót okoznak. Ezek a neuronok olyan neuropeptideket is felszabadíthatnak, mint a szomatosztatin, amely a gyulladásos mediátorokkal együtt lokális és szisztémás gyulladáscsökkentő hatást fejt ki, ezt a jelenséget definiálhatjuk "szenzokrin" funkciónak.

A jelenlegi terápiák, beleértve a nem-szteroid gyulladáscsökkentőket, az opioidokat, az adjuvánt analgetikumokat, például az antikonvulzív szereket és antidepresszánsokat, a helyi fájdalomcsillapítókat, például a lidokaint és a kapszaicint, korlátozott hatékonyságúak és számos mellékhatással járnak. Ezért óriási szükség van új, eltérő hatásmechanizmussal rendelkező gyógyszerek kifejlesztésére.

## **2. TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák a fájdalomban és a tumorban**

A TRPA1 és TRPV1 ioncsatornákat leginkább az érző neuronokban nociceptorként és kemoszenzorként kifejtett hatásuk miatt tanulmányozták. Mindkét csatorna a kis A $\delta$ - és a myelinhüvely nélküli szenzoros C-rostokban expresszálódik, ahol a fájdalmat és a neurogén gyulladást közvetítik [12]. A TRPV1 nagymértékben expresszálódik a nociceptorokon, ezért a neuropátiás és gyulladásos fájdalomban betöltött szerepe a TRP-csatornák közül intenzív érdeklődésre tarthat számot. Emellett a TRPA1-ről megállapították, hogy gyulladásos körülmények között gyulladásos mechanikai hiperalgéziát, valamint hideg hiperalgéziát közvetít [13], [14].

Számos tanulmány számolt be a TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák expressziójáról nem neuronális sejtekben, például szinoviocitákban, kondrocitákban, tüdőhámsejtekben és simaizomsejtekben [15], [16]. Ezen túlmenően ezek az ioncsatornák nagymértékben expresszálódnak különböző daganatokban, például a TRPV1 expresszióját igazolták humán hasnyálmirigyrákban és az emberi szájnyálkahártya laphámsejtes karcinómájában, prosztatákarcinómában és emlőrákban [17]. A TRPA1 nagymértékben expresszálódik olyan daganatokban, mint a hasnyálmirigy adenokarcinóma, az orrgarat karcinóma és a prosztatarákhoz kapcsolódó fibroblaszt sejt kultúrákban.

Jól ismert, hogy mind a TRPA1, mind a TRPV1 aktivációja Ca<sup>2+</sup> beáramlását indukálja a sejtekben. Ez aktiválja a Ca<sup>2+</sup>-függő jelátviteli útvonalakat, például a mitogén-aktivált protein-kináz/extracelluláris szignál szabályozott kináz és a foszfatidil-inozitol-3-kináz/Akt protein-kináz B útvonalakat, amelyek mindegyike fontos szerepet játszik a rákos sejtek proliferációjában, migrációjában, inváziójában és apoptózisában.

### **3. Szomatosztatin receptor 4**

A szomatosztatin, más néven szomatotropin-felszabadulást gátló faktor egy neuropeptid, amely 14-28 aminosavból álló aktív formáiban az egész szervezetben kifejeződik, és többféle biológiai hatással rendelkezik a különböző sejtekben és szervekben. A szomatosztatin saját, membránhoz kötött gátló  $G_i$ -kapcsolt receptorain ( $SST_1$ ,  $SST_2$ ,  $SST_3$ ,  $SST_4$ ,  $SST_5$ ) keresztül fejti ki hatását. Az  $SST_4$  receptor közvetíti endokrin hatások nélkül az antinociceptív és gyulladáscsökkentő hatásokat. A szomatosztatin receptor aktiválása gátolja az adenil-cikláz enzimet, ami viszont csökkenti a cAMP és az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szintet, ami a sejtprolifерáció és a jelátvivő molekulák szekréciójának csökkenéséhez vezet [18].

Kutatócsoportunk kimutatta, hogy a szomatosztatin az aktivált kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből a szisztémás keringésbe kerül, ahol gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatást fejthet ki [7], [19]. Mind az  $SST_2$ , mind az  $SST_4$  receptor expresszálódik a fájdalom jelátviteli útvonalakban, és részt vesz a szomatosztatin által kiváltott analgéziában [20]. Mindazonáltal az  $SST_2$  aktiválása számos mellékhatással jár, mint például a növekedési hormon felszabadulásának gátlása [21], [22] és az inzulinszekréció [23]. Számos tanulmány számolt be az  $SST_4$  jelentőségéről, mint az új, endokrin hatás nélküli gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító terápia potenciális célpontjáról. A szomatosztatinnak azonban nagyon rövid a felezési ideje, így gyógyszerfejlesztésre alkalmatlan. Ezért jelenleg nagy erőfeszítések tesznek egy hosszabb felezési idejű, szelektív  $SST_4$ -agonista kifejlesztésére.

### **4. CÉLKITŰZÉSEK**

Ez a disszertáció három különböző vizsgálatot tartalmaz, amelyekben általánosan használt *in vitro* sejtes vizsgálatokat alkalmaztunk a különböző szintetikus vegyületek fájdalomra és tumorra gyakorolt toxicitása és/vagy hatékonysága mögött álló komplex mechanizmusok vizsgálatára és megértésére. Doktori munkám fő céljai a következők voltak:

- I. Az új retinsav-származékok citotoxikus és genotoxikus potenciáljának (biztonságosságának) *in vitro* értékelése, mint előzetes vizsgálat a TRPV1 és/vagy TRPA1 ioncsatornákat aktiváló képességük jövőbeli vizsgálataihoz.

- II. A TRPA1, TRPV1 expressziójának és funkciójának (agonistáik hatására) vizsgálata egér és humán osteosarcoma szövetekben és K7M2 osteosarcoma sejteken potenciális új terápiás célpontok meghatározása érdekében.
- III. Az SST<sub>4</sub> receptor aktivációjának és cAMP-hoz kapcsolódó jelátvitelének vizsgálata a csoportunk által szabadalmaztatott potenciális új analgetikus és gyulladáscsökkentő jelöltekkel, amelyekről feltételezték, hogy az SST<sub>4</sub> receptoron keresztül hatnak, összehasonlítva két referencia SST<sub>4</sub> agonistával, a J-2156 és a TT-232-vel.

## **I. Új difenil-acetilén alapú retinoidok által kiváltott DNS-károsodás kínai hörcsög ovárium sejtekben**

### **1. Bevezetés**

Az all-transz-retinsav (ATRA), az A-vitamin aktív metabolitja, fontos szerepet játszik a sejt differenciálódásban, a proliferációban és az embrionális fejlődésben. Ezért önmagában vagy fenntartó terápiaként alkalmazzák különböző bőrbetegségek kezelésében és tumorellenes gyógyszerként. Az ATRA azonban hajlamos az izomerizációra és oxidációra, ami befolyásolhatja aktivitását és szelektivitását. E problémák leküzdéséhez stabilabb szintetikus származékokra van szükség, amelyek alacsonyabb toxicitású gyógyszeripari hatóanyagként potenciálisan értékes alternatívákat kínálnak.

A retinoidok súlyos mellékhatásprofilja korlátozta klinikai alkalmazásukat, különösen szisztémás alkalmazásukat. Ezenkívül a retinoidok genotoxicitása is vizsgálat tárgya. Különböző retinoidok, köztük a 13-cisz-retinsav, kromatid-cserét okoztak humán diploid fibroblasztokban [24]. Ezenkívül a retinol kromoszóma-aberrációkat idézett elő humán limfocitákban [25], és egyszálú DNS töréseket, fragmentációt és oxidatív DNS-károsodást okozott tenyésztett Sertoli-sejtekben [26], [27]. Az ATRA és egy szteroid analóg EA-4 kettős szálú DNS-fragmentációt indukált C2C12 egérsejtekben és HL-60 humán akut myeloid leukémia sejtekben [28].

A stabilitás növelése érdekében új difenilacetilén-alapú ATRA-származékokat szintetizáltak több szerkezeti variációval. A DC360 látható fény hatására fluoreszkál, a DC324 egy nem aktív

fluoreszcens retinoid [29]. Az EC23, DC525, DC540, DC645 és DC712 fokozott receptorkötő képességgel és bioaktivitással rendelkezik [29]-[31]. Ezek a szintetikus származékok nagy potenciállal rendelkeznek, mint terápiás szerek számos daganatos és neurodegeneratív betegségben, beleértve az amyotrófiás laterális szklerózist [32].

## 2. Módszerek

- 2.1 Sejttenyésztés
- 2.2 ATP-sejt-életképességi vizsgálat
- 2.3 Comet-teszt (Egysejtes gélelektroforézis)
- 2.4 Statisztikai elemzés és az adatok bemutatása

## 3. Eredmények

A citotoxicitás néhány genotoxicitási vizsgálatban hamis pozitív eredményekhez vezethet. Ha egy vegyületet nagy koncentrációban vizsgálunk, egy nem genotoxikus szer DNS-fragmentációt és sejthalált okozhat, ezért vizsgálatunkban nem citotoxikus koncentrációt választottunk a difenilacetilén alapú retinoidok DNS-károsodásra gyakorolt közvetlen hatásának vizsgálatához. A vizsgált (100 nM-10  $\mu$ M) koncentrációkban az ATRA és a szintetikus analógok nem csökkentették a sejtek életképességét, kivéve a DC324-et, amely statisztikailag szignifikáns viabilitás csökkenést okozott. Az életképesség-gátlás azonban csak 13%-os volt, ami kevesebb, mint a comet-tesztre vonatkozó általánosan elfogadott irányelv, amely 25%-os károsodást fogad el mint küszöb érték a hamis pozitív eredmények elkerülése érdekében. Tehát valamennyi vegyületet tovább lehetett vizsgálni a genotoxicitást vizsgáló comet-teszttel.

Vizsgálatunk azt is kimutatta, hogy az összes szintetikus ATRA-származék az ATRA-hoz hasonló DNS-károsító hatást okozott, de a leginkább hidrofób vegyületek, a DC324, DC360 és EC23 toxikusabbak voltak az ATRA-nál, különösen a magasabb koncentrációkban. Ezeknek a vegyületeknek magas log P szerkezetük van, ezért erősebb off-target kölcsönhatásokat mutathatnak más fehérjékkel és DNS-sel. A DC360 váltotta ki a legerősebb genotoxikus hatást a többihez képest, ami a dihidrokinolin hidrofób régió jelenlétével magyarázható, amely bizonyos körülmények között a sejtkomponensekkel szemben is reaktív lehet.

#### 4. Következtetés

Ez a vizsgálat azt mutatja, hogy az új szintetikus difenilacetilén-alapú ATRA-analógok nem citotoxikusak, de DNS-fragmentációt és migrációt váltanak ki DNS-szálszakadások miatt, ami genotoxicitáshoz és genom-instabilitáshoz vezethet. A mi fluoreszcens vegyületünk, a DC360 indukálja a legkifejezettebb DNS-károsodást. Úgy véljük, hogy ezek a vegyületek retinoid receptorfüggetlen genotoxicitást mutatnak, és ezt figyelembe kell venni a későbbi fejlesztések és alkalmazások során. További vizsgálatokra van szükség a mögöttes molekuláris mechanizmusok azonosításához és e vegyületek komplex biológiai aktivitásának tisztázásához. Jól megfigyelhető, hogy a retinoidok helyi alkalmazása gyakran súlyos helyi irritációhoz, viszketéshez vezet [33], [34]. Emellett a szisztémásan alkalmazott retinoidok csontfájdalmat és súlyos fejfájást is okoznak [33], [35]. A legújabb vizsgálatok arról számoltak be, hogy a retinoidok szelektíven szenzitizálják a TRPV1 ioncsatornát és szenzoros túlérzékenységet okoznak [36]. Továbbá a LE135 szelektív RAR receptor antagonistá aktiválta mind a TRPA1, mind a TRPV1 ioncsatornákat, és fájdalommal kapcsolatos viselkedést váltott ki [37]. A legújabb tanulmányok arról számoltak be, hogy a TRP ioncsatornák különböző tagjai fontos szerepet játszanak a sejtkárosodáshoz vezető oxidatív stresszben. A TRPV1 összefüggésbe hozható az oxidatív stressz által kiváltott fájdalommal és neuronális károsodással [38]. Így a TRPV1 és TRPA1 csatornák aktiválásának vizsgálata, mint e hatás és a retinoidokkal kapcsolatos irritációk és fájdalmas mellékhatások lehetséges molekuláris mechanizmusának vizsgálata jövőbeli kutatásainkban szerepel.

## II. A TRPA1 ioncsatornák funkcionális expressziója egér K7M2 oszteoszarkóma sejtekben

### 1. Bevezetés

Az oszteoszarkóma a leggyakoribb primer rosszindulatú csontdaganat, amely heterogén és elkerülhetetlenül kapcsolódik a mikroköznyezetéhez, amely közvetíti a tumorsejtek túlélését és növekedését [39]. A kutatás és a klinikai kezelés terén elért fejlődés ellenére az áttétes osteosarcoma betegek túlélési aránya még mindig 20% alatt van [39], [40]. Olyan új szerekre van szükség, amelyek képesek elnyomni az oszteoszarkóma sejtek növekedését és növelni a túlélést, hogy terápiás előnyöket nyújtsanak.

Számos tanulmány írta le, hogy mind a TRPV1, mind a TRPA1 ioncsatornák fontos szerepet játszanak a tumor progressziójában. Eddig azonban egyetlen tanulmány sem azonosította a TRPA1 funkcionális expresszióját és/vagy intracelluláris lokalizációját oszteoszarómában. Ezenkívül a TRPV1 a tumoros sejtek proliferációjának, migrációjának és inváziójának szabályozásában is fontos, de nincs elegendő adat a TRPV1 funkcionális expressziójára és lokalizációjára vonatkozóan az oszteoszaróma esetében.

## 2. Módszerek

- 2.1 Sejtenyésztés, egér oszteoszaróma modell, humán oszteoszaróma minták
- 2.2 RNS izolálás és polimeráz láncreakció (PCR) gélelektroferízis
- 2.3 Szövetgyűjtés, valamint minta- és sejtelőkészítés az RNAscope vizsgálathoz
- 2.4 RNAscope
- 2.5 Radioaktív  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  felvétel kísérletek K7M2 sejteken
- 2.6 ATP sejt-életképességi vizsgálat
- 2.7 Statisztikai elemzés és az adatok bemutatása

## 3. Eredmények

Azt találtuk, hogy az AITC  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást indukál a K7M2 sejtekben, és dóziszfüggő módon csökkenti az életképességüket, ami a TRPA1 funkcionális kifejeződését mutatja, ahol az aktiváció által kiváltott hatás  $\text{Ca}^{2+}$ -közvetített mechanizmusokon keresztül feltételezhető. A TRPA1 antagonistá HC-030031 részben visszafordította mind a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást, mind a sejtek életképességének csökkenését. Ezek az eredmények összhangban vannak a korábban leírt eredményekkel, amelyek szerint az AITC nagy dózisa csökkentette a sejtek életképességét, növelte a DNS-károsodást és gátolta a sejt-migrációt. Eredményeink azt mutatják, hogy az AITC gátolhatja az oszteoszaróma sejtek túlélését a TRPA1-függő útvonalon keresztül.

Azt is megállapítottuk, hogy a 48 órás kapszaicin kezelés jelentős koncentrációfüggő életképesség-csökkenést okozott a K7M2 sejtekben. A kapszaicin azonban nem volt hatással a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlásra. A TRPV1 antagonistá kapszazepin nem volt képes megszüntetni a sejtek életképességének kapszaicin-okozta csökkenését. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a kapszaicin TRPV1-független útvonalakon keresztül fejti ki citotoxikus hatását ezekre a sejtekre.



#### 4. Következtetés

Itt közöljük az első adatokat a TRPA1 funkcionális expressziójáról humán és egér oszteoszarkómában, valamint ezen ioncsatornáknak a tumoros sejtek életképességét csökkentő potenciáljáról. Azt is bizonyítottuk, hogy a TRPV1 expressziója az oszteoszarkómában alátámasztja azokat a korábbi eredményeket, amelyek a kapszaicin humán oszteoszarkóma sejtekre gyakorolt citotoxikus hatására utalnak. Azonban receptor működését csak az egér K7M2 sejtvonalon vizsgáltuk, amely nem rendelkezik az összes oszteoszarkóma jellemzővel, ezért nehéz határozottan arra következtetni, hogy a TRPA1 agonistáknak potenciális terápiás alkalmazásai lehetnek. Az oszteoszarkóma azonban rendkívül rosszindulatú daganat, amely rezisztens a terápiával szemben és rossz prognózisú, így a TRPA1 modulálása ígéretes molekuláris eszköz lehet a további szélesebb körű vizsgálatokhoz.

### III. Új fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő gyógyszerjelöltek tesztelése az SST<sub>4</sub> receptoron és a cAMP jelátviteli úton

#### 1. Bevezetés

Kutatócsoportunk a TT-232 szintetikus heptapeptid agonista hatását mutatta ki az SST<sub>4</sub> receptoron. A TT-232 az SST<sub>1</sub> és SST<sub>4</sub> receptorokhoz kötődik, amelyek mind az immunsejteken, mind a primer szenzoros neuronokon találhatóak [11], [41]. A TT-232 intravénás beadása antinociceptív hatást mutatott, amelyet az oktreotiddal nem figyeltek meg [10]. Emellett a TT-232 csökkentette a mechanikus hiperalgéziát diabéteszes neuropátiában [42] és artritisz modellekben [11]. A J-2156 egy ismert erős és szelektív nem-peptid SST<sub>4</sub> szuperagonista csökkentette a nozifeszív viselkedést a formalin teszt második fázisában, az ülőideg ligáció által kiváltott neuropátiás mechanikai hiperalgéziát és az adjuváns által kiváltott krónikus gyulladós mechanikai allodíniát [43]. A J-2156 csökkentette a pro-inflammatorikus neuropeptid felszabadulást a peptiderg szenzoros neuronokból, és mérsékelte a neurogén és nem neurogén gyulladást krónikus artritisz modellben [44], [45]. Sőt, az SST<sub>4</sub> knockout egerek súlyosabb neuropátiás hiperalgéziát és gyulladós fájdalmat mutattak a vad típusú társaikhoz képest [46]. Ezért az SST<sub>4</sub>-et a gyulladás és a krónikus fájdalom kezelésére szolgáló új gyógyszerjelöltek kifejlesztésének egyik érdekes célpontjának tekintik.

Egyértelmű, hogy az SST<sub>4</sub> ígéretes célpont a gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító gyógyszerek fejlesztéséhez. Csoportunk új pirrolo-pirimidin molekulákat szintetizált és szabadalmaztatott (vegyület 1-4), és kimutatta, hogy a J-2156-hoz hasonlóan ezek a vegyületek a nagy affinitású kötőzseb aminosavaival kölcsönhatásba lépnek, és G-protein aktivációs tesztben hatásosak voltak. Ezenkívül e vegyületek egyszeri orális alacsony dózisú beadása gátolta a krónikus neuropátiás mechanikai hiperalgéziát egerekben [47]-[49]. Jelen disszertációban ezen vegyületek SST<sub>4</sub>-hez való kötődési adatait mutatjuk be az SST<sub>4</sub>-et expresszáló CHO sejtekben a cAMP szint gátlásával. Az új pirrolo-pirimidin vegyületeinket a referencia agonistákkal, a J-2156 és TT-232-vel összehasonlítva teszteltük, továbbá a lehetséges szelektív SST<sub>4</sub>-hatást a CHO-SST<sub>2</sub> sejteken való hatás kizárásával teszteltük.

## 2. Módszerek

- 2.1 Sejttenyésztés és kezelések
- 2.2 cAMP-akkumulációs vizsgálat
- 2.3 Statisztikai elemzés és az adatok bemutatása

## 3. Eredmények

A J-2156 és a TT-232 az SST<sub>4</sub>-et expresszáló CHO-sejtekben a cAMP-termelés dóziszfüggő gátlását mutatta 10 pM - 10 µM koncentráció tartományban. A pirrolo-pirimidin molekulák által kiváltott dózis-hatáson alapuló cAMP-gátlás vizsgálata azonban azt mutatta, hogy ezek az új ligandumok nem képesek gátolni a cAMP-t az SST<sub>4</sub>-et expresszáló CHO sejteken. Ezen túlmenően a cAMP-gátlást nem figyeltük meg egyik referencia- vagy vizsgált vegyület esetében sem az SST<sub>2</sub>-expresszáló CHO-sejteken, ami az SST<sub>4</sub>-re való szelektivitásukat bizonyítja.

## 4. Következtetés

Sikeresen felállítottuk és validáltuk az SST<sub>4</sub> receptor aktivációt a cAMP *in vitro* mérésén keresztül, amelyet laboratóriumainkban tovább lehet folytatni az új SST<sub>4</sub> agonisták mint fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő jelöltek szűrésére, más SST receptorok által közvetített mellékhatások nélkül. A J-2156 és TT-232 referencia vegyületek hatása alapján standardizáltunk egy viszonylag nagy áteresztőképességű szűrővizsgálatot 96 lyukú lemezen a további ligandumok teszteléséhez.

Új pirrolo-pirimidin vegyületeink képesek a neuropátiás és gyulladáso s fájdalom szabályozására, de a pontos molekuláris mechanizmus és a lehetséges jelátviteli útvonalak további vizsgálatokat igényelnek.

### **Az új eredmények összefoglalása**

- Először az új difenilacetilén alapú ATRA-származékokat vizsgáltuk a sejtek életképességére és genotoxicitására CHO-sejtvonalon. A DC360 egy fluoreszcens analóg, a DC324 pedig a DC360 nem aktív analógja. Az EC23, DC712, DC645, DC540 és DC525 stabilabb, ígéretes ATRA-analógok. Ezeknek a vegyületeknek nincs citotoxikus hatásuk, azonban mindegyik vegyület DNS-migrációt indukál. A DC360 a legtoxikusabb szer, ami a magas Log P szerkezetnek tudható be. Eredményeink RAR- vagy RXR-független genotoxicitást mutatnak, ezért a TRPV1 és TRPA1 csatornák aktiválásának vizsgálata, mint e hatás és/vagy a retinoidokkal kapcsolatos irritációk és fájdalmas mellékhatások potenciális sejtmekanismusának vizsgálata szerepel jelenlegi és jövőbeli kutatásainkban.
- Megvizsgáltuk a TRPA1 funkcionális expresszióját humán oszteoszarkóma szövetekben, valamint egérszövetekben és sejtvonalon. A TRPA1 kifejeződik humán és egér szövetekben, valamint egér K7M2 oszteoszarkóma sejtekben. A TRPA1 agonista AITC radioaktív kalciumfelvételt indukál és csökkenti a sejtek életképességét. Ezt a hatást a HC-030031 TRPA1 antagonistá blokkolja. A TRPA1 és a TRPV1 mind neuronális, mind nem neuronális sejtekben együttesen expresszálódik, ahol befolyásolhatják egymás működését. Ezért megvizsgáltuk a TRPV1 expresszióját ezekben az oszteoszarkóma modellekben. A TRPV1 expressziót mutat a humán és egér szövetekben, de nagyon alacsony expressziót a K7M2 sejtekben, ez a szövetek és a sejtvonalak közötti tumoros mikrokörnyezet különbségével magyarázható. A kapszaicin nem indukál jelentős kalciumfelvételt, de csökkentette a K7M2 sejtek életképességét, és a TRPV1 antagonistá kapszazepin nem blokkolja ezt a hatást. Ezek az eredmények az oszteoszarkóma sejtek növekedésének és túlélésének TRPA1-függő és TRPV1-független útvonalak általi csökkentésére utalnak. Különböző apoptózisvizsgálatokat tervezünk elvégezni, hogy feltárjuk ezen hatások mögött álló lehetséges molekuláris mechanizmusokat

- Megerősítettük, hogy az SST<sub>4</sub> receptor ígéretes célpont a gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztéséhez. Mind a J-2156, mind a TT-232 gátolta a cAMP-szintet, a pirrolo-pirimidin vegyületek azonban ezt nem befolyásolták. Ez arra utal, hogy gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatásukat különböző jelátviteli útvonalon keresztül fejthetik ki. E vegyületek pontos mechanizmusát még tovább kell vizsgálni, miközben laboratóriumunkban további új molekulák szintézise és értékelése folyik.

## **IRODALOMJEGYZÉK**

- [1] S. N. Raja et al., “The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises,” *Pain*, vol. 161, no. 9, pp. 1976–1982, Sep. 2020, doi: 10.1097/J.PAIN.0000000000001939.
- [2] A. M. Dydyk and T. Conermann, “Chronic Pain,” in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553030/>
- [3] I. Igolnikov, R. M. Gallagher, and B. Hainline, “Chapter 39 - Sport-related injury and pain classification,” in *Handbook of Clinical Neurology*, B. Hainline and R. A. Stern, Eds., in *Sports Neurology*, vol. 158. Elsevier, 2018, pp. 423–430. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444639547000392>
- [4] K. E. M. D. Schmader, “Epidemiology and Impact on Quality of Life of Postherpetic N... : The Clinical Journal of Pain,” *The Clinical Journal of Pain*, 2002. [https://journals.lww.com/clinicalpain/Abstract/2002/11000/Epidemiology\\_and\\_Impact\\_on\\_Quality\\_of\\_Life\\_of.2.aspx](https://journals.lww.com/clinicalpain/Abstract/2002/11000/Epidemiology_and_Impact_on_Quality_of_Life_of.2.aspx) (accessed Jul. 24, 2023).
- [5] L. Chen et al., “Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 6, pp. 7204–7218, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.23208.
- [6] Z. Guan, J. Hellman, and M. Schumacher, “Contemporary views on inflammatory pain mechanisms: TRPping over innate and microglial pathways,” *F1000Res*, vol. 5, pp. F1000-Faculty Rev-2425, 2016, doi: 10.12688/f1000research.8710.1.
- [7] E. Pintér, Z. Helyes, and J. Szolcsányi, “Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception,” *Pharmacol Ther*, vol. 112, no. 2, pp. 440–456, 2006, doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.04.010.
- [8] M. J. Caterina, M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, and D. Julius, “The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway,” *Nature*, vol. 389, no. 6653, pp. 816–824, 1997, doi: 10.1038/39807.
- [9] T. Streng et al., “Distribution and Function of the Hydrogen Sulfide–Sensitive TRPA1 Ion Channel in Rat Urinary Bladder,” *Eur Urol*, vol. 53, no. 2, pp. 391–400, Feb. 2008, doi: 10.1016/J.EURURO.2007.10.024.

- [10] Z. Helyes et al., “Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogues in the rat,” *Neurosci Lett*, vol. 278, no. 3, pp. 185–188, 2000, doi: 10.1016/s0304-3940(99)00936-2.
- [11] Z. Helyes 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*, vol. 50, no. 5, pp. 1677–1685, May 2004, doi: 10.1002/ART.20184.
- [12] H. A. Silverman, A. Chen, N. L. Kravatz, S. S. Chavan, and E. H. Chang, “Involvement of Neural Transient Receptor Potential Channels in Peripheral Inflammation,” *Front Immunol*, vol. 11, p. 590261, Oct. 2020, doi: 10.3389/FIMMU.2020.590261/BIBTEX.
- [13] S. R. Eid et al., “HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity,” *Mol Pain*, vol. 4, p. 48, 2008, doi: 10.1186/1744-8069-4-48.
- [14] D. S. M. Da Costa, F. C. Meotti, E. L. Andrade, P. C. Leal, E. M. Motta, and J. B. Calixto, “The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation,” *Pain*, vol. 148, no. 3, pp. 431–437, 2010, doi: 10.1016/j.pain.2009.12.002.
- [15] E. Fernandes, M. Fernandes, and J. Keeble, “The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves.,” *Br J Pharmacol*, vol. 166, no. 2, pp. 510–521, 2012, doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x.
- [16] S. Luostarinen, M. Hämäläinen, N. Hatano, K. Muraki, and E. Moilanen, “The inflammatory regulation of TRPA1 expression in human A549 lung epithelial cells,” *Pulm Pharmacol Ther*, vol. 70, p. 102059, 2021, doi: 10.1016/j.pupt.2021.102059.
- [17] L. Li et al., “The Impact of TRPV1 on Cancer Pathogenesis and Therapy: A Systematic Review,” *Int J Biol Sci*, vol. 17, no. 8, pp. 2034–2049, 2021, doi: 10.7150/IJBS.59918.
- [18] T. Günther et al., “International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature,” *Pharmacol Rev*, vol. 70, no. 4, p. 763, Oct. 2018, doi: 10.1124/PR.117.015388.
- [19] E. Pintér, G. Pozsgai, Z. Hajna, Z. Helyes, and J. Szolcsányi, “Neuropeptide receptors as potential drug targets in the treatment of inflammatory conditions,” *Br J Clin Pharmacol*, vol. 77, no. 1, pp. 5–20, 2014, doi: 10.1111/bcp.12097.
- [20] G. C. Ji, S. T. Zhou, G. Shapiro, J. C. Reubi, S. M. Carlton, and S. Jurczyk, “Analgesic activity of a non-peptide imidazolidinedione somatostatin agonist: In vitro and in vivo studies in rat,” *Pain*, vol. 124, no. 1–2, pp. 34–49, 2006, doi: 10.1016/J.PAIN.2006.03.014.
- [21] R. M. Parmar et al., “Nonpeptidyl somatostatin agonists demonstrate that sst2 and sst5 inhibit stimulated growth hormone secretion from rat anterior pituitary cells,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 263, no. 2, pp. 276–280, 1999, doi: 10.1006/bbrc.1999.1376.
- [22] I. Shimon, X. Yan, J. E. Taylor, M. H. Weiss, M. D. Culler, and S. Melmed, “Somatostatin receptor (SSTR) subtype-selective analogues differentially suppress in vitro growth hormone and prolactin in human pituitary adenomas. Novel potential therapy for functional pituitary tumors.,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 100, no. 9, p. 2386, Nov. 1997, doi: 10.1172/JCI119779.
- [23] E. Rico, J. Zhao, M. Chen, A. K. Kusnetzow, Y. F. Zhu, and S. F. Betz, “Selective Somatostatin 5 (SST5) and Somatostatin 2 (SST2) Nonpeptide Agonists Potently Suppress Glucose- and

- Tolbutamide-Stimulated Dynamic Insulin Secretion From Isolated Human Islets,” *J Endocr Soc*, vol. 5, no. Suppl 1, p. A325, 2021, doi: 10.1210/jendso/bvab048.663.
- [24] C. Tetzner, H. J. Juhl, and H. W. Rüdiger, “Sister-chromatid exchange induction by metabolically activated retinoids in human diploid fibroblast cultures,” *Mutation Research/Genetic Toxicology*, vol. 79, no. 2, pp. 163–167, 1980, doi: 10.1016/0165-1218(80)90084-1.
- [25] F. M. Badr, O. H. M. El-Habit, M. Hamdy, and G. A. R. Hassan, “The mutagenic versus protective role of vitamin A on the induction of chromosomal aberration in human lymphocyte cultures,” *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 414, no. 1, pp. 157–163, 1998, doi: 10.1016/S1383-5718(98)00038-2.
- [26] F. Dal-Pizzol, F. Klamt, M. S. Benfato, E. A. Bernard, and J. C. F. Moreira, “Retinol supplementation induces oxidative stress and modulates antioxidant enzyme activities in rat Sertoli cells,” *Free Radic Res*, vol. 34, no. 4, pp. 395–404, 2001, doi: 10.1080/10715760100300331.
- [27] M. L. C. da Frota et al., “All-trans retinoic acid induces free radical generation and modulate antioxidant enzyme activities in rat sertoli cells,” *Mol Cell Biochem*, vol. 285, no. 1, pp. 173–179, 2006, doi: 10.1007/s11010-005-9077-3.
- [28] R. S. Alakhras, G. Stephanou, N. A. Demopoulos, and S. S. Nikolaropoulos, “Genotoxicity of all-trans retinoic acid (ATRA) and its steroidal analogue EA-4 in human lymphocytes and mouse cells in vitro,” *Cancer Lett*, vol. 306, no. 1, pp. 15–26, 2011, doi: 10.1016/j.canlet.2011.02.010.
- [29] D. R. Chisholm et al., “Fluorescent Retinoic Acid Analogues as Probes for Biochemical and Intracellular Characterization of Retinoid Signaling Pathways,” *ACS Chem Biol*, vol. 14, no. 3, pp. 369–377, 2019, doi: 10.1021/acscchembio.8b00916.
- [30] H. Hafez, D. R. Chisholm, R. Valentine, E. Pohl, C. Redfern, and A. Whiting, “The molecular basis of the interactions between synthetic retinoic acid analogues and the retinoic acid receptors,” *Medchemcomm*, vol. 8, no. 3, pp. 578–592, 2017, doi: 10.1039/C6MD00680A.
- [31] T. Khatib, D. R. Chisholm, A. Whiting, B. Platt, and P. McCaffery, “Decay in Retinoic Acid Signaling in Varied Models of Alzheimer’s Disease and In-Vitro Test of Novel Retinoic Acid Receptor Ligands (RAR-Ms) to Regulate Protective Genes,” *Journal of Alzheimer’s Disease*, vol. 73, no. 3, p. 935, 2020, doi: 10.3233/JAD-190931.
- [32] J. N. Clark, A. Whiting, and P. McCaffery, “Retinoic acid receptor-targeted drugs in neurodegenerative disease,” *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, vol. 16, no. 11, pp. 1097–1108, 2020, doi: 10.1080/17425255.2020.1811232.
- [33] Geria Aanand N, Lawson Christina N, and Halder Rebat M, “Topical Retinoids for Pigmented Skin - JDDonline - Journal of Drugs in Dermatology,” *Journal of drugs in dermatology*, 2011. <https://jddonline.com/articles/topical-retinoids-for-pigmented-skin-S1545961611P0483X/> (accessed Jul. 24, 2023).
- [34] H. s. Yoon, Y. k. Kim, and J. h. Chung, “High-concentration all-trans retinoic acid induces dermal inflammation and reduces the accumulation of type I procollagen in human skin in vivo,” *British Journal of Dermatology*, vol. 165, no. 3, pp. 669–672, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10435.x.
- [35] J. Kapala, J. Lewandowska, W. Placek, and A. Owczarczyk-Saczonek, “Adverse Events in Isotretinoin Therapy: A Single-Arm Meta-Analysis,” *Int J Environ Res Public Health*, vol. 19, no. 11, p. 6463, 2022, doi: 10.3390/ijerph19116463.

- [36] S. Yin et al., “Retinoids activate the irritant receptor TRPV1 and produce sensory hypersensitivity,” *J Clin Invest*, vol. 123, no. 9, pp. 3941–3951, 2013, doi: 10.1172/JCI66413.
- [37] S. Yin, J. Luo, A. Qian, W. Yu, and H. Hu, “LE135, a retinoid acid receptor antagonist, produces pain through direct activation of TRP channels,” *Br J Pharmacol*, vol. 171, no. 6, pp. 1510–1520, 2014, doi: 10.1111/bph.12543.
- [38] N. Braidy, T. Smani, and M. Naziroglu, “Editorial: Involvements of TRP Channels, Oxidative Stress and Apoptosis in Neurodegenerative Diseases,” *Front Physiol*, vol. 12, p. 649230, Mar. 2021, doi: 10.3389/FPHYS.2021.649230/BIBTEX.
- [39] I. Corre, F. Verrecchia, V. Crenn, F. Redini, and V. Trichet, “The Osteosarcoma Microenvironment: A Complex but Targetable Ecosystem,” *Cells*, vol. 9, no. 4, p. 976, 2020, doi: 10.3390/cells9040976.
- [40] O. Francesconi et al., “Lipoyl-Based Antagonists of Transient Receptor Potential Cation A (TRPA1) Downregulate Osteosarcoma Cell Migration and Expression of Pro-Inflammatory Cytokines,” *ACS Pharmacol Transl Sci*, vol. 5, no. 11, pp. 1119–1127, 2022, doi: 10.1021/acspsci.2c00114.
- [41] E. Pintér et al., “Pharmacological characterisation of the somatostatin analogue TT-232: Effects on neurogenic and non-neurogenic inflammation and neuropathic hyperalgesia,” *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, vol. 366, no. 2, pp. 142–150, 2002, doi: 10.1007/S00210-002-0563-9/METRICS.
- [42] R. dos A. Moraes, R. C. Webb, and D. F. Silva, “Vascular Dysfunction in Diabetes and Obesity: Focus on TRP Channels,” *Front Physiol*, vol. 12, p. 645109, Feb. 2021, doi: 10.3389/FPHYS.2021.645109/BIBTEX.
- [43] K. Sándor et al., “Analgesic effects of the somatostatin sst4 receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models,” *Eur J Pharmacol*, vol. 539, no. 1, pp. 71–75, 2006, doi: 10.1016/j.ejphar.2006.03.082.
- [44] K. Elekes et al., “Inhibitory effects of synthetic somatostatin receptor subtype 4 agonists on acute and chronic airway inflammation and hyperreactivity in the mouse,” *Eur J Pharmacol*, vol. 578, no. 2–3, pp. 313–322, Jan. 2008, doi: 10.1016/J.EJPHAR.2007.09.033.
- [45] Z. Helyes 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*, vol. 149, no. 4, pp. 405–415, 2006, doi: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706876>.
- [46] Z. Helyes 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*, vol. 106, no. 31, pp. 13088–13093, 2009, doi: 10.1073/pnas.0900681106.
- [47] B. Kántás et al., “Novel Drug-Like Somatostatin Receptor 4 Agonists are Potential Analgesics for Neuropathic Pain,” *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 24, 2019, doi: 10.3390/ijms20246245.
- [48] B. Kántás et al., “In Silico, In Vitro and In Vivo Pharmacodynamic Characterization of Novel Analgesic Drug Candidate Somatostatin SST4 Receptor Agonists,” *Front Pharmacol*, vol. 11, 2021, doi: 10.3389/fphar.2020.601887.
- [49] É. Szőke et al., “Small molecule somatostatin receptor subtype 4 (sst4) agonists are novel anti-inflammatory and analgesic drug candidates,” *Neuropharmacology*, vol. 178, p. 108198, 2020, doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108198.

## **Kiadványok listája**

### **A kutatási témához kapcsolódó első szerzői publikációk:**

**Hudhud, L.**, Chisholm, D. R., Whiting, A., Steib, A., Pohóczky, K., Kecskés, A., Szőke, É., & Helyes, Z. (2022). Synthetic Diphenylacetylene-Based Retinoids Induce DNA Damage in Chinese Hamster Ovary Cells without Altering Viability. *Molecules*, 27(3), 977. <https://doi.org/10.3390/molecules27030977>. IF: 4.6.

### **A kutatási témához kapcsolódó társszerzői publikációk:**

Kántás, B., Szőke, É., Börzsei, R., Bánhegyi, P., Asghar, J., **Hudhud, L.**, Steib, A., Hunyady, Á., Horváth, Á., Kecskés, A., Borbély, É., Hetényi, C., Pethő, G., Pintér, E., & Helyes, Z. (2021). In Silico, In Vitro and In Vivo Pharmacodynamic Characterization of Novel Analgesic Drug Candidate Somatostatin SST<sub>4</sub> Receptor Agonists. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.601887>. IF: 5.6.

Börzsei, R., Borbély, É., Kántás, B., **Hudhud, L.**, Horváth, Á., Szőke, É., Hetényi, C., Helyes, Z., & Pintér, E. (2023). The heptapeptide somatostatin analogue TT-232 exerts analgesic and anti-inflammatory actions via SST<sub>4</sub> receptor activation: In silico, in vitro and in vivo evidence in mice. *Biochemical Pharmacology*, 209, 115419. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2023.115419>. IF: 5.8.



## **Köszönetnyilvánítás**

Mély hálával tartozom témavezetőimnek; Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, Dr. Szóke Éva és Dr. Keeskés Angéla professzoroknak a nagyrabecsült bizalmukért, támogatásukért, útmutatásukért és a hatalmas hozzájárulásukért ezen az úton, valamint a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének, Prof. Dr. Pintér Erikának.

Hálás vagyok továbbá a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet munkatársainak, különösen Dr. Pohóczky Krisztinának, Dr. Kormos Viktóriának és Steib Anitának a laboratóriumi munkában nyújtott technikai segítségükért.

Nagyon hálás vagyok szeretett családomnak és barátaimnak a támogatásukért és bátorításukért, valamint annak, aki aki nincs jelen, de mindig velem lesz.

Qusay Hamdannak, a társamnak és legjobb barátomnak, aki nélkül ez nem lett volna lehetséges.