

**ÚJ FÁJDALOMCSILLAPTÓ GYÓGYSZERCÉLPONTOK ÉS  
HATÁSMECHANIZMUSOK AZONOSÍTÁSA, ÚJ HATÓANYAGOK  
FEJLESZTÉSE**

**MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**



**Dr. Szőke Éva**

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs

2025

*Mentoromnak, Szolcsányi János professzornak*

## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	4
KUTATÁSI KONCEPCIÓ.....	5
I. BEVEZETÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
1.1. Fájdalom, alapfogalmak, a fájdalomérzékelésben fontos struktúrák.....	7
1.2. Kapszaicin.....	8
1.3. A TRP ioncsatornák.....	8
1.3.1. A TRPV1 ioncsatorna.....	8
1.3.2. A TRPA1 ioncsatorna.....	10
1.3.3. A TRPM8 ioncsatorna.....	10
1.3.4. A TRPM3 ioncsatorna.....	11
1.4. A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés és speciális hármass funkciójuk.....	11
1.5. A lipid raftok.....	11
1.5.1. A lipid raftok élettani szerepe.....	12
1.5.2. A lipid raftok farmakológiai vizsgálati lehetőségei.....	13
1.5.3. A lipid raftok szerepe a TRP ioncsatornák működésében.....	13
1.5.4. Ciklodextrinek szerepe a lipid raft kutatásban és a gyógyszeres terápiában.....	14
1.6. A szemikarbazid-szenzitív amin-oxidáz (SSAO) szerepe a gyulladásban és a fájdalomban.....	15
1.6.1. Egy új ígéretes SSAO gátló oxim vegyület, az SZV-1287.....	16
1.7. A szomatosztatin és a szomatosztatin 4-es receptor jelentősége gyulladás és fájdalom folyamatokban.....	16
1.7.1. A szomatosztatin.....	16
1.7.2. A szomatosztatin receptorai.....	17
1.7.3. A kortisztatin és szerepe a nocicepcióban és gyulladásos folyamatokban.....	17
1.7.4. A szomatosztatin SST4 receptoron ható szelektív agonisták, saját szabadalmaztatott kismolekulás pirrolo-pirimidin vegyületeink.....	18
II. CÉLKITŰZÉSEK.....	19
II.1. LIPID RAFTOK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA TRP ION- CSATORNÁK AKTIVÁCIÓJÁBAN, GYULLADÁSBAN, FÁJDALOMBAN.....	19
II.2. ÚJ SSAO GÁTLÓ OXIM VEGYÜLETÜNK, AZ SZV-1287 HATÁSMECHANIZMUSÁNAK <i>IN VITRO</i> VIZSGÁLATA.....	19
II.3. TERMÉSZETES ÉS SZINTETIKUS POTENCIÁLIS SST4 RECEPTOR AGONISTÁK VIZSGÁLATA.....	19
III. KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK.....	20
3.1. Primer sejtenyészet és sejtvonalak.....	20
3.2. Anyagok.....	20
3.3. <i>In vitro</i> vizsgálati módszerek és modellek.....	21
3.4. <i>In silico</i> vizsgálati módszerek és modellek.....	21
3.5. <i>In vivo</i> vizsgálati módszerek és modellek.....	21
IV. EREDMÉNYEK.....	22
IV. 1. A LIPID RAFTOK VIZSGÁLATA.....	22
4.1.1. A koleszterin depléció hatásának vizsgálata.....	22
4.1.2. A szfingomielin depléció hatásának vizsgálata.....	23
4.1.3. Karboxamido-szteroid vegyületek hatásának vizsgálata.....	23
4.1.4. A lipid raft diszrupció hatása a sejtmembrán polaritására és fluiditására.....	24
4.1.5. Az RvD1 és RvD2 TRPV1 és TRPA1 aktivációra és a lipid raftok	

integritására kifejtett hatásának vizsgálata.....	24
4.1.6. A lipid raft károsító anyagok feszültségfüggő ioncsatornák aktivációjára gyakorolt hatásának vizsgálata.....	24
4.1.7. Koleszterin depléció hatásának vizsgálata a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktiválhatóságára <i>in vivo</i> állatmodellekben.....	25
4.1.8. Szfingolipid depléció hatásának vizsgálata a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktiválhatóságára <i>in vivo</i> állatmodellekben.....	26
4.1.9. Különböző CD származékok szisztematikus <i>in vitro</i> vizsgálata.....	27
4.1.10. Különböző CD származékok szisztematikus <i>in vivo</i> vizsgálata fájdalom és gyulladás modellekben.....	28
IV. 2. AZ SZV-1287 SSAO GÁTLÓ VEGYÜLETÜNK <i>IN VITRO</i> VIZSGÁLATA.....	30
IV. 3. POTENCIÁLIS SST4 RECEPTOR AGONISTÁK VIZSGÁLATA .....	31
4.3.1. A CST-14 és a szomatosztatin összehasonlító vizsgálata.....	31
4.3.2. Saját, SST4-es receptoron ható molekulák fejlesztése.....	32
V. MEGBESZÉLÉS.....	34
V. 1. A MEMBRÁN LIPID RAFTOK SZEREPE A TRP IONCSATORNÁK AKTIVÁCIÓJÁBAN.....	34
V. 2. AZ ÚJ SSAO-GÁTLÓ OXIM VEGYÜLET, AZ SZV-1287 KÖZVETLEN TRPA1 ÉS TRPV1 ANTAGONISTA HATÁSAI MEGBESZÉLÉSE.....	41
V. 3. AZ SST4 RECEPTORON HATÓ CST-14 ÉS ÚJ, KISMOLEKULÁS AGONISTÁK HATÁSAI.....	42
VI. KONKLÚZIÓ ÉS HASZNOSÍTHATÓSÁG.....	45
VII. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	46
A DOKTORI ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	47
ELSŐ/UTOLSÓ SZERZŐS EGYÉB KÖZLEMÉNYEK .....	49
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	51

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

[ <sup>35</sup> S]GTPγS:	[ <sup>35</sup> S]guanozin-5'-O-[γ-tio]trifoszfát
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> :	intracelluláris Ca <sup>2+</sup> koncentráció
AITC:	allil-izotiocianát
ATP:	adenozin trifoszfát
CGRP:	calcitonin gene-related peptide/kalcitonin gén-rokon peptid
CHO:	chinese hamster ovary/kínai hörcsög ovárium
COX:	ciklooxigenáz
CST:	kortisztatin
CZP:	kapszazepin
DHEA:	dehidroepiandroszteron
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DRG:	dorsal root ganglion/hátsógyöki ganglion
ER:	endoplazmatikus retikulum
fura-2-AM:	fura-2 acetoxi-metilészter
GDP:	guanozin-5'-difoszfát
GP:	generalised polarisation/generalizált polarizáció
GPI:	glikozil-foszfatidil-inozitol
GPR:	G-protein kapcsolt receptor
IL:	interleukin
IFNγ:	interferon γ
MCD:	metil-β-ciklodextrin
MO:	mustárolaj
NGF:	nerve growth factor/idegi növekedési faktor
NKA:	neurokinin A
NSAID:	nem-szteroid gyulladásgátlók
OLDA:	N-Oleoyl dopamin
PAG:	periakveduktális szürkeállomány
PGE <sub>2</sub> :	prostaglandin E <sub>2</sub>
PIP <sub>2</sub> :	foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
PS:	pregnenolon-szulfát
PTX:	pertussis toxin
RAMEB:	random metilált β-ciklodextrin
RIA:	radioimmunoassay
ROS:	reactive oxygen species/reaktív oxigén gyök
RTX:	reziniferatoxin
SM-áz:	szfingomielináz
SP:	substance P/P-anyag
SRIF:	somatotropin release inhibiting factor/szomatotropin felszabadulást gátló faktor
SST1, 2, 3, 4, 5	szomatosztatin 1, 2, 3, 4, 5 receptor
SST4 <sup>-/-</sup> egér:	szomatosztatin 4 receptor génhányos egér
TNFα:	tumor nekrosis faktor α
TG:	trigeminális ganglion
TRP:	Tranziens Receptor Potenciál
TRPA1:	Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1
TRPM3:	Tranziens Receptor Potenciál Melasztatin 3
TRPM8:	Tranziens Receptor Potenciál Melasztatin 8
TRPV1:	Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1

## KUTATÁSI KONCEPCIÓ

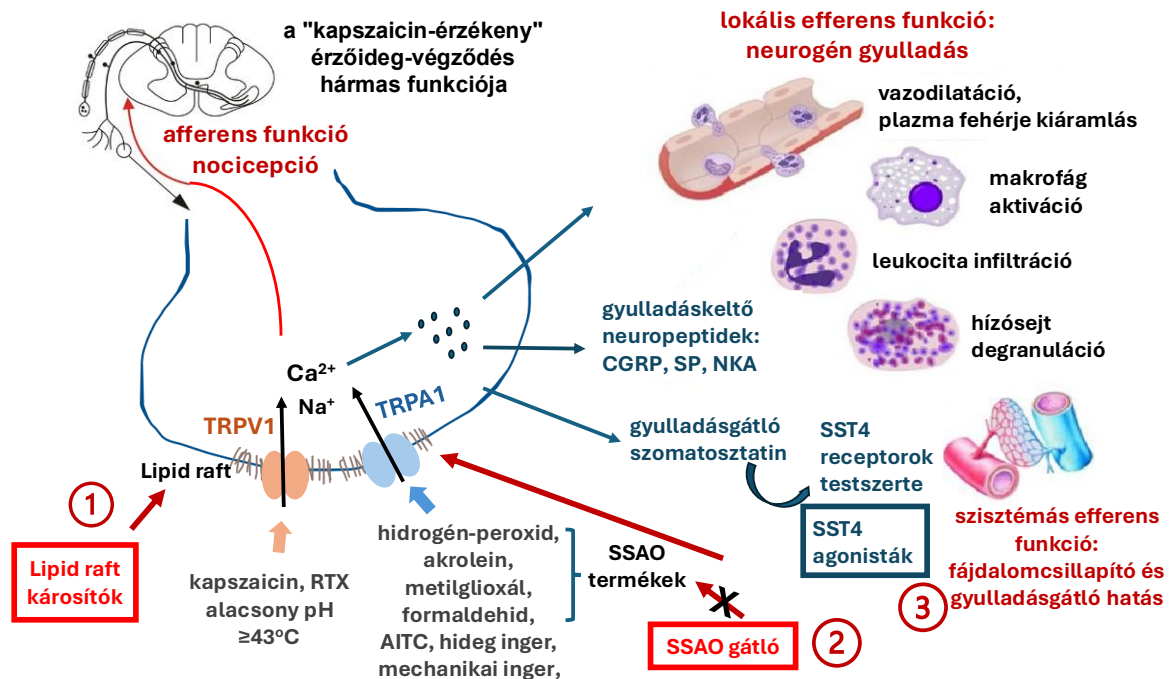
A fájdalom tényleges vagy potenciális szövetkárosodást jelző, kellemetlen és szubjektív érzéskvalitás. A nociceptorok termális, mechanikai és kémiai szövetkárosító ingerekre specifikusan reagáló érzőideg-végződés melyek a központi idegrendszerbe közvetítenek fájdalomszignált. A perifériás nociceptorok egy speciális típusán, az ún. kapszaicin-érzékeny peptiderg afferenseken expresszálódik a Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1) ioncsatorna mely receptor a csípős paprikában található kapszaicinnal szelektíven aktiválható. Ezek az **érzőideg-végzések hármass funkcióval** rendelkeznek: afferens, lokális és szisztémás efferens funkciókkal bírnak. Az **afferens funkció** maga a fájdalom közvetítése a központi idegrendszer felé, de egyedülálló jellegzetességük, hogy aktivációjuk során neuropeptid szabadul fel az érzőideg-végződésből (P-anyag (SP), calcitonin gén-rokon peptid (CGRP)). Ezek a beidegzett területen vazodilatációt, plazmafehérje kiáramlást és gyulladást valamint immunsejtek aktivációját okozzák. Az így kialakuló neurogén gyulladás egy **lokális efferens funkció** számos betegség patomechanizmusában fontos szerepet játszik (migrén, asztma, gyulladást bélbetegség, reumatoid artritisz). Kutatócsoportunk bizonyította, hogy az aktivált érzőideg-végződésből a gyulladást kiváltó neuropeptideken kívül szomatostatin, egy gátló neuropeptid is felszabadul, mely szisztémás gyulladáscsökkentő hatásokat fejt ki. Ez az érzőideg-végzések **szisztémás neurohumorális efferens** funkciója melyet egykori mentorom, Szolcsányi János akadémikus szenzokrin működésnek nevezett el (**1. ábra**).

A jelenleg elérhető gyógyszeres terápia nem képes hatékonyan kezelni ezeket a betegségeket, valamint a neuropátiás fájdalmat. Új hatásmechanizmusú, az érzőideg-végzések szintjén ható fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő gyógyszerjelöltek fejlesztése szükséges. A fájdalmat jelző nociceptorokon szelektíven ható gyógyszerjelöltek fő célmolekulájának a TRPV1 receptor bizonyult ígéretesnek. Számos gyógyszergyár több mint egymilliárd dollárt fektetett az antagonisták fejlesztésébe, az áttörés azonban még várat magára a TRPV1 mellékhatások (hipertermia, hőérzékelési zavar) miatt. Manapság a kapszaicin-érzékeny nociceptorokon szintén kifejeződő TRP ioncsatornát, a TRP Ankyrin 1 (TRPA1) receptort tartják fontos gyógyszer-célpontra.

A kutatócsoportomhoz 1996-ban csatlakoztam, az elmúlt 30 évben saját kutatómunkám és a későbbiekben saját kutatócsoportom az alábbi területekre fókuszált, melyeket az **1. ábrán** 1, 2 és 3 jelöléssel tüntettem fel:

1. A receptorok hidrofób kapcsolatainak vizsgálata alternatív alapkísérletes megközelítés lehet a receptorműködés befolyásolásának, vizsgálatának. A plazmamembránban a receptorok, ioncsatornák és a jelátvitelben fontos molekulák az úgynevezett **lipid raftokban**, lipid tutajokban foglalnak helyet, a lipid réteg speciális régióiban. A TRP receptorok aktivációs és gátló mechanizmusairól rengeteg közlemény számol be, de hogy a lipid raftokban milyen jelátviteli komplexet képez, és a raftok szerkezeti integritása milyen hatással van a receptorműködésre, arról nagyon keveset tudunk, és a kutatás kezdetén ellentmondásos irodalmi adatok jelentek meg. Általánosan elterjedt módszer a raftok vizsgálatára a koleszterindepléciót okozó metil- $\beta$ -ciklodextrin (MCD), mely így megbontva a raftokat befolyásolja a jelátviteli funkciót. A lipid raftok integritását többféle módon

befolyásoltuk, azzal a céllal, hogy feltárjuk, hogy ez az alternatív, receptorműködést befolyásoló módszer hatékony fájdalomcsillapító perspektívát jelenthet-e. Az eredményeket 13 eredeti közleményben és 2 összefoglaló cikkben írtuk le (1-14 a disszertációban bemutatott közleményeket vastag arab számmal jelölöm a szövegben).



**1. ábra.: A kapszaicin-érzékeny érző idegvégződés hármass funkciója** (klasszikus afferens funkció, lokális efferens funkció, szisztémás efferens funkció). CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid, SP: P-anyag, NKA: neurokinin A, SST4: szomatosztatin 4-es receptor, RTX: reziniferatoxin, SSAO: szemikarbazid-szenzitív amin-oxidáz, TRPV1: Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1, TRPA1: Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1.

- A szemikarbazid-szenzitív amin oxidáz (SSAO)-gátló** vegyületek primer aminok oxidatív dezaminációját katalizálják, melynek végtermékei a hidrogén peroxid, az ammónia, a metilglioxál és különböző aldehidek, mint például a formaldehid, melyek a TRPA1 ioncsatorna aktivátorai. Az SSAO vegyületeknek és gátlóiknak a szerepét gyulladásos folyamatokban már bizonyították, fájdalomállapotokban betöltött szerepéről a kutatás indulásakor még nem sokat tudtunk. Egy új SSAO-gátló vegyület vizsgálatát végeztük, potenciális TRPV1 és TRPA1 gátló hatását vizsgáltuk. A kutatáshoz *in vitro* sejttes vizsgálatokkal járultam hozzá, melyek eredményeit 2 közleményben írtuk le (15-16).
- Kutatócsoportunk **szomatosztatin 4-es receptor (SST4)** géndeficiens egerekkel úttörő kísérleteket végzett és elsőként szolgáltatott bizonyítékokat arra, hogy az SST4-nek protektív szerepe van mind akut gyulladásos folyamatokban, mind krónikus ízületi gyulladás során. Az eredményeink alapján az SST4 receptor új célpont lehet fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő gyógyszerfejlesztés tekintetében. Saját kismolekulás, SST4 receptoron ható potenciális gyógyszerjelöltjeink komplex vizsgálatát végeztük *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* állatkísérletes modellrendszerünkben. Az eredményeket 4 közleményben írtuk le (17-20). Az értekezésben a PhD utáni közel két évtized munkáját szeretném bemutatni, amit ennek a kutatásnak szenteltünk.

## I. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 1.1. Fájdalom, alapfogalmak, a fájdalomérzékelésben fontos struktúrák

Az értekezésben a **fájdalom** és a **neurogén gyulladás** vizsgálata áll a fókuszban, *in vitro*, *in silico*, *ex vivo* és *in vivo* állatkísérletes vizsgálatok eredményeit, potenciális új fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő módszerek hatásmechanizmusát mutatjuk be. Amit állatokban vizsgálni tudunk, az a **nocicepció**, vagyis a szövetkárosító ingerekre létrejövő elkerülő, **nocifenzív** magatartási reakció, mely lehet az ingerelt testrész nyalása, rázása, rágása, elhúzása. Az ingerek melyek a fájdalmat, vagyis nocicepciót kiváltják lehetnek mechanikai, termális (forró inger vagy fájdalmasan hideg) és kémiai jellegűek, így beszélhetünk mechano-, termo- és kemonocicepcióról. Ezen ingerek felfogására specializálódott idegvégződések a nociceptorok. A **nociceptorok** az elsődleges érzőneuronok (primer afferens) bőrben és nyálkahártyákban elhelyezkedő perifériás végződései. A hozzájuk tartozó sejttest pedig az érző dúcokban van (hátsó gyöki ganglionok („dorsal root ganglia”, DRG), trigeminális ganglion (TG), juguláris ganglion és ganglion nodosum). Pseudounipoláris neuronok ezek, a sejttestből kiinduló axon elágazik, a perifériás nyúlvány a szövetekbe fut, a centrális pedig a gerincvelő hátsó szarvi szürkeállományában lévő centrális terminálisban végződik. A fájdalompálya második neuronjai azok a neuronok, amelyek a primer afferensek centrális végződéséből kapják az információt, és azt a talamuszba vezetik. A harmadik neuron az információt a talamuszból a szenzoros kortexbe szállítja. A **hiperalgécia** az enyhe fájdalmas ingerek által okozott fokozott fájdalomérzetet jelenti, mely az ingernek megfelelően lehet mechanikai, termális vagy kémiai. A **hipoalgécia**, **analgécia** a fájdalmas ingerek által okozott csökkent fájdalomérzetet, vagy a fájdalomérzet hiányát jelenti. Az **alلودinia** az amúgy normális, egészséges egyedekben fájdalmat nem okozó ingerekkel kiváltott fájdalomérzet, ez is lehet mechanikai, termális illetve kémiai.

A **neurogén gyulladás** számos betegség patomechanizmusában kulcsfontosságú szerepet játszik, ugyanakkor a jelenleg rendelkezésre álló **gyógyszeres kezelések** ezt a folyamatot nem képesek hatékonyan befolyásolni. Az **opioidok** erős és nagy hatékonyságú fájdalomcsillapítók, amelyek analgetikus hatásukat többek között a leszálló gátló pályák aktiválásán keresztül, valamint gerincvelői szinten fejtik ki: preszinaptikusan gátolják a mediátorok felszabadulását, posztoszínaptikusan pedig a membrán hiperpolarizációját idézik elő. Alkalmazásukat azonban jelentősen korlátozzák súlyos mellékhatásaik, például a légzőközpont depressziója, illetve a kezelés során kialakuló opioidfüggőség. A széles körben használt **nem-szteroid gyulladásgátlók** (NSAID-ok) a gyulladás- és fájdalomkeltő prosztaglandinok képződéséért felelős ciklooxygenáz (COX) enzimet gátolják. Bár az opioidokkal ellentétben nem okoznak függőséget, hatékonyságuk kisebb, és gyakran váltanak ki gasztrointesztinális, renális vagy hematológiai mellékhatásokat. A mellékhatások mérséklésére kifejlesztett, COX-2 preferenciális szerek ugyan csökkentik a gasztrointesztinális toxicitást, de a nem-szelektív készítményekhez hasonlóan jelentősen növelik a kardiovaszkuláris kockázatot. Az **adjuváns analgetikumok** – például a triciklikus antidepresszánsok, antiepileptikumok vagy helyi érzéstelenítők – elsősorban neuropátiás fájdalomban hatékonyak, de általános fájdalomcsillapító hatással nem rendelkeznek. Mindezek alapján egyértelműen szükség van új

hatásmechanizmusú, elsősorban az érzőideg-végződéseken ható fájdalomcsillapítók és gyulladáscsökkentők fejlesztésére.

## **1.2. Kapszaicin**

A nociceptív elsődleges érzőneuronok vizsgálatában fontos szerepe van a paprika (*Capsicum annuum*) csípős anyagának, a kapszaicinnek (8-metil-N-vanillil-6-nonénamid), hatása nagymértékben szelektív a C és A $\delta$  polimodális nociceptorokra. Szerkezetét 1919-ben erősítették meg nem sokkal később szintézisét is leírták. A kapszaicin kutatásban fontos szerepet töltek be magyar kutatók. Hőgyes Endre nevéhez fűződik az első jelentős megfigyelés, ő írta le elsőként, hogy a kapszaicin elsősorban érzőidegekre hat. Nagyon fontos volt Jancsó Miklós megfigyelése, mely szerint nagy dózisú kapszaicin kezelés után kémiai fájdalomkeltő anyagokkal szemben deszenzibilizáció alakul ki. Ha a kapszaicin-érzékeny nociceptorokat akár ortodrómosan vagy antidrómosan stimulálták, a beidegzés területén vazodilatáció és plazma protein extravazáció alakult ki, ezt a folyamatot mind a denerváció, mind kapszaicinnal történő deszenzibilizáció gátolta. Arra a következtetésre jutottak, hogy a gyulladáskeltő anyagok a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből szabadulnak fel. Szintén nagy jelentőséggel bírtak Szolcsányi János és Jancsó-Gábor Aranka szerkezet-hatás vizsgálatai, mely alapján a kapszaicin receptor létezését elsőként vetették fel. Több mint egy évtized telt el és a hátsógyöki neuronok membránjában specifikus kötőhelyeket azonosítottak reziniferatoxin (RTX) számára, továbbá leírtak kapszaicin analógokat kötő fehérjéket is. Az első kompetitív antagonistát, a kapszazepint (CZP) 1992-ben szintetizálták, ezzel lehetővé vált a kapszaicin receptor élettani szerepének felderítése. A receptor létezését klónozással sikerült bizonyítani, ez fontos mérföldköve a kapszaicin kutatásnak. A receptor először a Vanilloid Receptor 1 (VR1) nevet kapta, mivel a kapszaicin mellett számos vanilloid szerkezetű molekula is aktiválja a receptort. Később a receptort szerkezete alapján a Tranziens Receptor Potenciál családba és legfontosabb ligandjának struktúrája okán a Vanilloid alcsaládba sorolták, a receptor a TRPV1 elnevezést kapta.

## **1.3. A TRP receptorok**

A TRP receptorok nem-szelektív kationcsatornák melyek számos szövetben és sejttípusban expresszálódnak, a szekvenciájuk és szerkezetük alapján 6 alcsaládot különböztetünk meg - TRPV (Vanilloid), TRPM (Melasztatin), TRPP (Policisztin), TRPML (Mukolipin), TRPA (Ankyrin), TRPC (Kanonikus/Klasszikus), TRPN (no mechanoreceptor potential C). Az értekezésben négy hőmérséklet-érzékeny TRP receptor, az ún. „termo TRP receptorok” állnak a fókuszban, a TRPV1, TRPA1, TRPM3 és TRPM8, melyek a fájdalomérzékelésben is kulcsszerepet játszanak, és potenciális gyógyszerfejlesztési célpontok lehetnek.

### **1.3.1. TRPV1 receptor**

A TRP receptorcsalád talán legjobban jellemzett tagja a TRPV1. Expresszióját kis és közepes méretű, azaz nociceptív neuronokban mutatták ki DRG-kben, szenzoros vagális ganglionokban és TG-ben, valamint a hozzájuk tartozó C és A $\delta$  rostokban. A receptor a polimodális nociceptoroknak mind a peptiderg, mind a nem-peptiderg al csoportjában megtalálható, valamint a gerincvelő hátsó szarvában, az agytörzsben és a hipotalamuszban is. A nem-szelektív kationcsatorna leginkább Ca<sup>2+</sup>-ra permeábilis, kisebb mértékben Na<sup>+</sup> és K<sup>+</sup> ionokra. Az

aktivációjakor fellépő nagymértékű befelé irányuló  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  ionáram membrán depolarizációhoz, illetve akciós potenciál kialakulásához vezet. A megnövekedett intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) a végződésben tárolt neuropeptidek exocitózist váltja ki, emellett fontos szerepe van olyan jelátviteli utak aktiválásában, amelyek a neuronok későbbi deszenzibilizációjához vezetnek, amit az idegnövekedési faktor (NGF) a tirozin kináz A receptoron keresztül gátolni képes. A TRPV1 a kapszaicin mellett aktiválható az ultrapotens kapszaicin analóg RTX-el is. Újabb kutatások rávilágítottak, hogy a receptor molekulán belül alloszterikus kötőhelyek léteznek a két agonista, a kapszaicin és az RTX számára, és nem két külön receptoron hatnak. A receptor aktiválható alacsony extracelluláris pH-val (pH5 és pH6 között), valamint 43 °C-nál magasabb hőmérséklettel. Az exogén aktivátorok mellett endokannabinoidok, mint az anandamid és az N-arachidonoil-dopamin is aktivátora az ioncsatornának, valamint a nem-kannabinoid endogén lipofil vegyület az N-oleoyl dopamin (OLDA). Potens endogén lipofil TRPV1 antagonistákat is azonosítottak, a resolvin D<sub>2</sub> és a resolvin E<sub>1</sub> antagonizálják a TRPV1-et. A TRPV1 receptorhoz kötődik a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PIP<sub>2</sub>) és a kalcium-kalmodulin, ezeknek szerepe van a receptor aktiváció szabályozásában. A foszforiláció szenzitiválja a TRPV1 receptort. Egyes gyulladáskeltő mediátorok, mint pl. a prosztaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), bradikinin, NGF, szerotonin, adozin trifoszfát (ATP) nem kötődnek magához a TRPV1-hez, azonban olyan jelátviteli folyamatokat indítanak el saját receptorukhoz való kötődésük során, amelyek azután a TRPV1 foszforilációjához, majd szenzibilizációjához/aktivációjához vezetnek. A TRPV1-et tehát tekinthetjük számos endogén és exogén fájdalomkeltő kémiai anyag, valamint a forró ingerek egyfajta molekuláris integrátorának.

A ruténiumvörös és a CZP voltak az elsőként előállított TRPV1 antagonisták. A TRPV1 ioncsatornát számos endogén mediátor képes aktiválni, amelyek gyulladás, szövetkárosodás vagy idegsérülés során keletkeznek, vagy szabadulnak fel. Ez a felismerés vetette fel először annak lehetőségét, hogy a TRPV1 farmakológiai blokkolása ezekben az állapotokban fájdalomcsillapító hatást fejthet ki. A TRPV1-génhiányos („knock-out”, KO) egerek vizsgálata kimutatta, hogy a TRPV1 hiánya gyulladásszerű modellekben gyakorlatilag teljes mértékben kivédi a termális hiperalgéziát. Tekintettel arra, hogy a termális hiperalgézia túlnyomórészt perifériás szenzitiváció következménye, valószínű volt, hogy a perifériás nociceptorokon expresszálandó TRPV1 meghatározó szerepet játszik e jelenség kialakulásában. Mindemellett gyulladásszerű állapotokban a TRPV1 fokozott expresszióját is kimutatták. Ezekre a megfigyeléseken alapulva számos gyógyszerként kezdett TRPV1 receptor antagonisták, új, perifériás támadáspontú fájdalomcsillapítók előállítását célzó fejlesztésbe. Ennek köszönhetően több mint húsz vegyület került preklinikai vizsgálatba, nemcsak gyulladásszerű, hanem bizonyos neuropátiás és daganatos fájdalommodellekben is. Az ígéretes állatkísérleti eredményeket követően, melyekben nemcsak termális, hanem mechanikai hiperalgézia ellen is sikeres szereket teszteltek, számos TRPV1-antagonista jutott el a klinikai kipróbáláshoz, Fázis I és II vizsgálatig fogfájdalom és oszteoartritisszel járó fájdalom mérséklésében. Két váratlan mellékhatás azonban akadályozta a fejlesztést. Az egyik a testhőmérséklet emelkedése (hipertermia), a másik mellékhatás a termális fájdalomküszöb emelkedése volt, amelyhez a küszöb feletti hőingerek érzékelésének károsodása társult. Ennek következményeként forrázásos sérülések jelentek meg. Így a TRPV1 antagonisták fejlesztésére elköltött dollármilliók és a ráfordított idő a mai napig nem eredményezett kereskedelmi forgalomban

kapható gyógyszert. Ennek ellenére a mai napig tartanak a kutatások egy olyan szer reményében, amely modalitás-specifikus és nem befolyásolja a TRPV1 hőérzékenységet, ugyanakkor mérsékli az agonisták izgató hatását, tehát képes úgy gátolni az aktivációt, hogy közben nem rontja a hőérzékelési funkciókat. Jenleg a terápiában a TRPV1 agonista kapszaicin tartalmú készítmények elérhetőek. A 8 % kapszaicin tartalmú Qutenza tapasz hatása a deszenzibilizáció jelenségén alapul, terápiásan övsömört követő, illetve diabéteszes neuropátia kezelésére használják.

Ismerünk endogén TRP ioncsatorna gátló vegyületeket is. A **resolvinok lipid mediátorok**, amelyek gyulladáscsökkentő funkciókkal rendelkeznek. A resolvin D1 (RvD1) a dokozahexaénsavból származik és hatékony gátolja a gyulladással és posztoperatív fájdalmat, de molekuláris hatásmechanizmusa nem tisztázott. Az RvD1-et a TRPA1 szelektív gátlójaként írták le a DRG neuronokban. A resolvin D2 (RvD2) a leukocita funkciók szabályozója és a szepszis szabályozásában játszik szerepet. Az RvD2-t nagyon hatékony TRPV1 és TRPA1 ioncsatorna gátlóként írták le a DRG neuronokban, amely nanomoláris koncentrációban képes gátolni a kationok beáramlását az ioncsatorna pórusán. Feltételezhetően ezt a hatást specifikus G-proteinhez kapcsolt receptora (GPR) közvetíti, ezt GPR18-nak nevezik, és emberi leukocitákon, köztük polimorfonukleáris neutrofil sejteken, monocitákon és makrofágokon írták le. A DRV1/GPR32 az RvD1 receptora, amelyet emberi leukocitákban azonosítottak.

### 1.3.2. A TRPA1 receptor

A TRPA1 és a TRPV1 nagyfokú koexpressziót mutat a peptiderg afferens A $\delta$  és C rostok egy részében és a rostokhoz tartozó sejttestekben. A TRPA1 receptor a TG neuronok 36,5%-ában expresszálódik. Szerkezeti jellegzetessége az N-terminálison előforduló nagyszámú (14-18) ankyrin ismétlődés. A TRPA1 receptort 17 °C alatti hideg inger, mechanikai ingerek, valamint endogén és exogén ligandok is aktiválják. Szövetkárosodás során és oxidatív stressz hatására keletkező szabad gyökök elektrofil tulajdonságuk miatt szintén direkt módon képesek aktiválni a TRPA1-et. Gyulladással járó folyamatok során felszabaduló endogén agonistái a TRPA1 receptornak az SSAO enzim termékei: hidrogén-peroxid, formaldehid és a metilglioxál. Az exogén agonisták főként természetes kémiai irritáns anyagok, mint a mustárolaj (MO) aktív hatóanyaga, az allil-izotiocianát (AITC), az allicin és a fahéjaldehid. Az akut- és krónikus gyulladás, valamint a neuropátiás fájdalom vizsgálata, valamint a TRPV1 receptor antagonisták fejlesztésének kudarcát felvetette a TRPA1 receptor potenciálját, mint gyógyszer-célpont. A szelektív TRPA1 receptor antagonisták HC-030031 gyulladásmódelben gátolta a termális és a mechanikai hiperalgéziát. A TRPA1 antagonisták esetén a transzláció lehetősége korlátozott mivel a receptor aminosavszekvenciája fajoként változó így nagy kihívást jelentenek a TRPA1 receptort célzó gyógyszerfejlesztések. Preklinikai vizsgálatok során alternatív utat jelenthet a humán TRPA1 receptort expresszáló transzgenikus állatok használata.

### 1.3.3. A TRPM8 receptor

A Transiens Receptor Potenciál Melasztatin 8 (TRPM8) receptor szintén fontos termoszenzitív ioncsatorna. Aktiválja a 26 °C alatti hőmérsékletet, az supercooling anyag, az icilin, a mentol és az eukaliptol. A TG és DRG neuronok 10-15%-án expresszálódik. Az N-terminális nem tartalmaz ankyrin-ismétlődéseket ellentétben a TRPV1 és TRPA1 receptorokkal.

#### 1.3.4. A TRPM3 receptor

A TRPM3 legpotensebb agonistája a neuroszteroid pregnenolon-szulfát (PS), mely sok szteránvázis hormon prekursor molekulája, TRPM3-génhiányos állatok segítségével megerősítették a PS *in vivo* hatását is. A receptor aktiváló hatás szempontjából kulcsfontosságú a szulfát-csoport jelenléte és sztereokémiai helyzete. Egyéb szteránvázis molekulák is aktiválják, a receptoron specifikus szteroid kötőhelyet írtak le. A TRPM3 receptor is feszültség-érzékenységet mutat ebben hasonlít a TRPV1 receptorhoz. A receptort a magas hőmérséklet aktiválja, részt vesz az akut hőérzékelésben (aktivációs küszöbe 40 °C) valamint a hiperalgéria kialakulásában. Így ez a receptor is szolgálhat célmolekulaként analgetikum fejlesztésben.

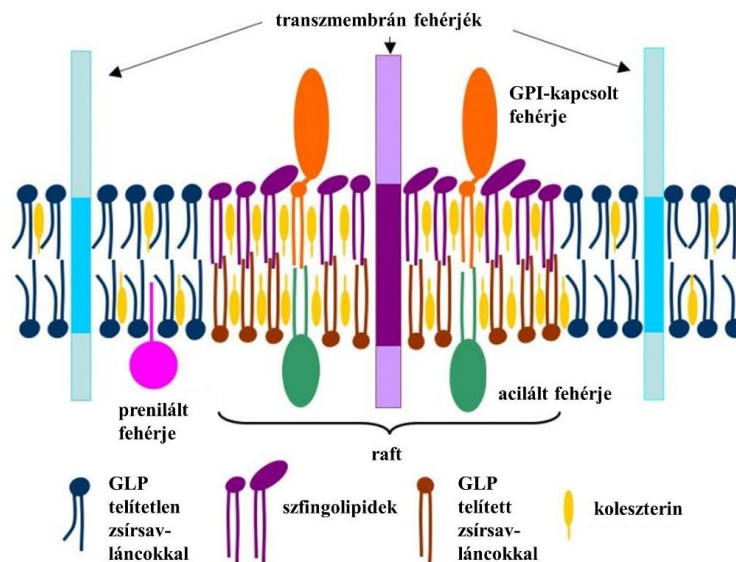
#### 1.4. A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés és speciális hármás funkciójuk

A kapszaicin-érzékeny peptiderg érzőideg-végződés melyek expresszálják a TRPV1-et, speciális, hármás funkcióval rendelkeznek; klasszikus afferens, lokális és szisztémás efferens működéseket közvetítenek (**1. ábra**). A **klasszikus afferens** működésük a nociceptív információ transzmissziója a központi idegrendszer felé, melynek eredménye a **nocicepció** kialakulása. A kapszaicin-érzékeny érző idegvégződés ezen kívül efferens funkcióval is rendelkeznek. A TRPV1 receptor aktivációja során a neuronokban megemelkedik az  $[Ca^{2+}]_i$  koncentráció, ez pedig a végződésben tárolt gyulladáskeltő neuropeptidok (CGRP, SP, hemokinin 1 (HK1), neurokinin A (NKA)) exocitózist idézi elő. Ezek vazodilatációt, plazmaprotein extravazációt, gyulladásosejtek akkumulációját, immunsejt aktivációt, hízósejt degranulációt váltanak ki a beidegzett területen. Ez az érző idegvégződés **lokális efferens** funkciója, ennek következtében alakul ki a **neurogén gyulladás**. A jelenleg forgalomban lévő gyulladáscsökkentők nem képesek hatékonyan gyógyítani ezt a folyamatot, számos gyulladásosejtes betegségről, reumatoid artritiszről, asztmáról, gyulladásosejtes bélbetegségekről igazolódott be, hogy a neurogén komponens fontos szerepet játszik a patomechanizmusában. Kutatócsoportunk tagjai, Szolcsányi János és Pintér Erika professzorok bizonyították, hogy az aktivált végződésekből a gyulladáskeltő neuropeptideken kívül gyulladásgátló neuropeptidok, pl. a szomatosztatin is felszabadul. A szomatosztatin a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatást fejt ki a test távoli pontjain is. Ez az érzőideg-végződés harmadik, **szisztémás efferens funkciója** melyet Szolcsányi professzor úr szenzokrin működésként definiált.

#### 1.5. A lipid raftok

Bár sokat tudunk a TRP receptorok aktivációs és gátló folyamatairól, kapcsolatukról az őket körülvevő lipid kettős réteggel keveset. A Singer és Nicolson-féle folyékony mozaik modell szerint a lipid kettős rétegben a membránok alkotóelemei pl. a foszfolipidek, glikolipidek és koleszterin egyenletesen, a plazma proteinek random módon helyezkednek el. Ez a biológiai membránok szerkezetének legelfogadottabb elmélete ugyanakkor nem tudja megmagyarázni a membrán fehérjék sejt felszíni inhomogén eloszlását. Egy másik elmélet szerint a plazmamembránban speciális mikrodomének találhatóak, melyek lipid- és fehérje összetételben, struktúrában eltérnek a plazmamembrán egyéb régióitól. Ilyen mikrodomének a lipid tutajok (raftok) melyek mérete 10-200 nm. A komponensek nagyobb aggregátumokat „platformokat” képezhetnek, melyek kisebb mozgásokat végeznek, úgymond úszkálnak a plazmamembránban, innen a tutaj elnevezés. A lipidek tehát nem random helyezkednek el a

plazmamembránban, hanem fokozott lokális rendezettséget mutatnak a fehérjékkel együtt melyeket körbevesznek, míg a plazmamembrán egyéb területei a rendezetlen fázist teszik ki a lipid raft modell szerint. A lipid komponensekhez a proteinek transzmembrán proteinként, intracelluláris proteinként, vagy glikozil-foszfátidil-inozitol (GPI)-kapcsolt proteinként kötődhetnek (**2. ábra**). A lipid raftok sűrűsége alacsonyabb, telített lipidekben, koleszterinben, szfingolipidekben és proteinekben gazdagabbak, mint a környező membránrégiók. Jellegzetességük, hogy 4 °C-on Triton X-100 detergensben oldhatatlanok, innen ered az az elnevezés, hogy detergens-oldhatatlan-glikolipid-gazdag komplex. E tulajdonságnak köszönhető, hogy a lipid raft régiókat ki tudják vonni a plazmamembrán nem-raft régiói közül, így lehetővé válik az itt található proteinek és lipidek azonosítása. A lipid raftokban a koleszterin egyenletesen oszlik el, a lipid kettős réteg azonban aszimmetrikus elrendezésű, az intracelluláris oldalon glicerofosfolipidekben, az extracelluláris oldal szfingolipidekben (szfingomielin és glikoszfingolipid) gazdag. A koleszterin kulcsfontosságú a raftok szerkezetének kialakításában és funkciójában, ha csökken a plazmamembrán koleszterin tartalma, az a raftok szétesését, funkcióvesztést okoz, megszűnik a detergens-oldhatatlanság is.



**2. ábra: A lipid raftok szerkezete** (Waheed és Freed, 2010 alapján). A foszfolipidek (sötétkék, barna) és a koleszterin (sárga) a membrán mindkét oldalán megtalálhatóak, míg a szfingolipidek (lila) az extracelluláris oldalon. A raftokban a lipidek hosszú láncú és telített zsírsavakat tartalmaznak (lila, barna), míg a nem-raft régióban rövidebbek és telítetlenek (kék). A raft domének kétszeresen acilált (zöld) és GPI-kapcsolt (barna) proteineket, míg a nem-raft régiók transzmembrán- (világoskék) és prenilált fehérjéket asszociálnak. GPI-kapcsolt: glikozil-foszfátidil-inozitol-kapcsolt, GLP: glikoszfingolipid.

### 1.5.1. A lipid raftok élettani szerepe

A lipid raftoknak fontos szerep jut a lipidek és a fehérjék sejtfelszíni eloszlásának szabályozásában. Platformot biztosítanak a jelátvitel szempontjából fontos molekuláris kölcsönhatások kialakulásának, fontos szabályozó szerepeük van a membrántranszport folyamatokban, sejtmigrációban, a patogén baktériumok és vírusok fertőzési mechanizmusában. A TRP receptor család számos tagjáról írták le, hogy ezekben a régiókban

képez jelátvitelt. Amikor a TRPV1 receptor és a lipid raftok kapcsolatát kezdtük kutatni, két egymásnak ellentmondó közleményt találtunk ebben a témában, az egyik szerint a TRPV1 receptor aktivációja függ a raftok működésétől, a másik szerint független. Mára a kutatócsoportunk is számos közleménnyel járult hozzá annak bizonyításához, hogy a TRPV1 és más TRP receptorok működése is szorosan összefügg a lipid raftokkal (1-15). A raftok fontos szerepet töltenek be a neurotranszmitterek felszabadulásában és a szinaptikus funkciókban.

### 1.5.2. A lipid raftok farmakológiai vizsgálati lehetőségei

A lipid raftok alternatív utat jelenthetnek a receptormolekulák és ezen keresztül a jelátviteli utak befolyásolásában, így ezek kutatása fontos terepe a farmakológiai alap kutatásoknak. Két fő irány létezik arra, hogy a lipid raftok összetételét megváltoztassuk, így azok diszrupcióját okozzuk. Az egyik lehetőség a lipid raft fontos összetevőinek depletálása, a másik a raft komponensek felépülésének gátlása. A lipid raft károsítás standardja a plazmamembrán koleszterin tartalmának depletálása MCD-vel, a ciklodextrin (CD) a koleszterinnel inklúziós komplexet képez és így depletálja azt a plazmamembránból. Ez azonban a plazmamembránon átjutva a belső membránokat is károsítja. Az SM-áz a plazmamembrán szfingomielin tartalmát hidrolizálja foszfokolinná és ceramiddá. A glikoszfingolipid szintézis is gátolható myriocinnel, mely a szerin-palmitoil-transzferáz enzimet gátolja. Ez utóbbi két kezelés csak a plazmamembránt érinti. Az alap kutatásban alkalmazott leggyakoribb lipid raft károsító szereket és lehetséges hatásmechanizmusukat az **1. táblázatban** mutatjuk be, részletesen egy review közleményben írtunk ezekről (1).

Kísérletesen bizonyított lipid raft károsítók		
Anyag	Célmolekula	Hatásmechanizmus
Ciklodextrinek	Koleszterin	Komplex képzés, deplécio a plazmamembránból
Karboxamido szteroidok		
Szfingomielináz	Szfingomielin	Hidrolízis
Myriocin		Szintézis gátlása (szerin-palmitoil-transzferáz enzim gátlásán keresztül)
D-threo-1-fenil-2-dekanoilamino-3-morfolino-1-propanol	Gangliozid	Szintézis gátlása (glükoszilceramid-szintáz gátlásán keresztül)
Feltételezett lipid raft károsítók		
Anyag	Célmolekula	Hatásmechanizmus
Resolvin D1 és D2	Koleszterin	Szintézis gátlása ( $\beta$ -hydroxi $\beta$ -metilglutaril- CoA reductáz enzim gátlásán keresztül)
Sztatinok (Simvastatin, Lovastatin)		
Apolipoprotein A1-kötő fehérje		
Fumonizin B1	Ceramid	Szintézis gátlása (savas szfingomielináz enzim gátlásán keresztül)
D609		Szintézis gátlása (ceramide-szintáz enzim gátlásán keresztül)

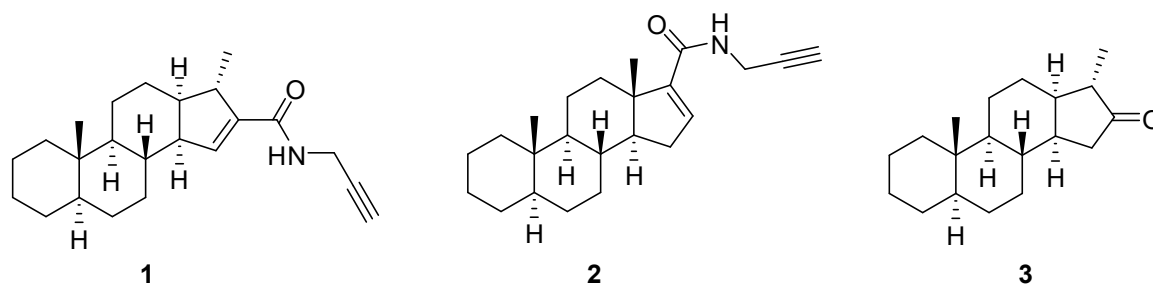
**1.táblázat: Az alap kutatásban alkalmazott leggyakoribb lipid raft károsító szerek** (Nehr-Majoros és mtsai, 2024 (1)).

### 1.5.3. A lipid raftok szerepe a TRP ioncsatornák működésében

A lipid raftok TRP ioncsatornák működésében betöltött szerepének feltérképezését célzó korai kísérletek ellentmondásos eredményeket szolgáltatottak. Ezek a vizsgálatok *in vitro* sejtes környezetben tanulmányozták a lipid raft diszrupció hatásait és főként az MCD-vel kiváltott koleszterin depléciora fókuszáltak. A koleszterin deplécio MCD kezeléssel nem volt hatással a hő által kiváltott ionáramokra TRPV1-transzfectált HEK293 sejteken. Ugyanakkor gátló hatásról számoltak be a kapszaicin és protonok által kiváltott TRPV1 aktivációra DRG

neuronokon. A koleszterin depléció nem befolyásolta a  $^3\text{[H]RTX}$  TRPV1 receptorhoz való kötődését C6 glioma sejteken. Az MCD kezelés a TRPM8 receptor hőaktivációs küszöbét megemelte. A TRP Canonical 1 (TRPC1) és TRP Canonical 3 (TRPC3) receptorok aktivációját ugyanakkor csökkentette.

Számos endogén szteroid képes kötődni a TRPV1 kationcsatornához és gátolni azt. A vérben található dehidroepiandroszteron (DHEA) csökkentheti a kapszaicin által kiváltott áramokat DRG neuronokban. Nem világos, hogy a szteroidok közvetlenül a TRPV1 receptor kapszaicin-kötő doménjéhez kötődnek-e, vagy a TRPV1 allosztérikus modulátorai. Kísérleteinkbe szteroid vegyületeket (C1, C2, C3) is bevontunk, melyeket Skodáné Dr Földes Rita Professzorasszony a Pannon Egyetem Szerves Kémiai Szintézis és Katalízis Kutatócsoport vezetője irányításával szintetizáltak. Ezen vegyületek hatását is vizsgáltuk a TRPV1, TRPA1, TRPM8 és TRPM3 ioncsatornák aktivációjára. A C1 és C2 N-(prop-2-inil)-karboxamidocsoporttal rendelkeznek, a vegyületek szerkezetében rejlő fő különbség a C1 anyag C és D gyűrűinek természetellenes cisz átmenetében rejlik. A C1 szintézise során a C3, egy 16-keto-18-nor-13 $\alpha$ -szteroid volt a kiindulási anyag (az N-(prop-2-inil)-karboxamidocsoport nélkül). A három szteroid összehasonlítása lehetővé teszi a karboxamidocsoport jelenlétének, valamint a szteroidváz szerkezetének és a gátlásra gyakorolt hatásának vizsgálatát. (3. ábra).



3. ábra: A TRP ioncsatornák gátlására tesztelt C1, C2 és C3 szteroidok szerkezete (Sághy és mtsai, 2018)

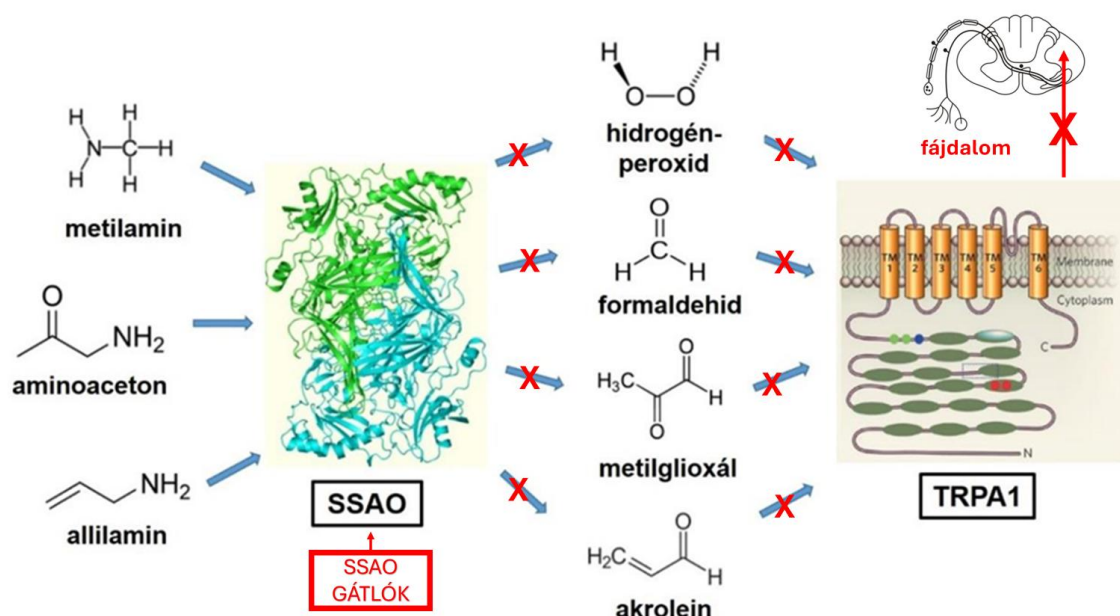
#### 1.5.4. CD-k szerepe a lipid raft kutatásban és a gyógyszeres terápiában

A CD-k  $\alpha$ -D-glükopiranoz egységekből felépülő nem redukáló ciklikus oligoszacharidok. Natívan leggyakrabban előforduló formáikban 6, 7 vagy 8 glükopiranoz egység kapcsolódik egymáshoz gyűrű formát kialakítva  $\alpha$ -1,4 glikozidos kötéssel, melyeket alfa-, béta vagy gamma-CD-nek nevezünk. Egyedi szerkezettel rendelkeznek, csonkakúp alakúak, külső felületük hidrofil, belső üregük hidrofób tulajdonságú, ez lehetővé teszi a CD-k zárványkomplex képzését vízben alacsony oldhatóságú molekulákkal. Ennek köszönhetően a CD-k a gyógyszeriparban használatosak vivőanyagként vagy mint szolubilizáló, stabilitást vagy biológiai hasznosulást növelő vegyületek. A természetben előforduló molekulákhoz a glükopiranoz gyűrű egyes alkotóelemeire funkció csoportokat kapcsolva kémiai és biológiai hatás vonatkozásában is eltérő származékokat kapunk. Néhány származék a gyógyszeriparban már önállóan is használatos, mint hatóanyag, aktívan kutatják a CD-k újabb indikációs lehetőségeit. A lipid raft kutatásban széleskörűen alkalmazott MCD kezelés hatásos

a plazmamembrán koleszterin tartalmának depléciója tekintetében, hatással bír az érintett sejtek molekuláris működésére, így számos ioncsatorna aktivációjára is.

### 1.6. Az SSAO szerepe a gyulladásban és a fájdalomban

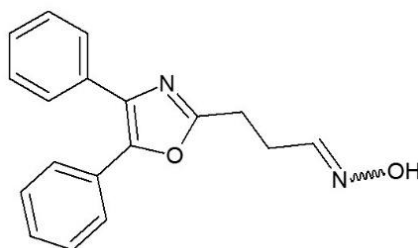
Az SSAO, másik nevén vaszkuláris adhéziós protein-1 (VAP-1), vagy amin oxidáz réztartalmú enzim 3 (AOC3) az amin oxidázok családjába tartozó enzim. Primér aminok oxidatív dezaminációját végzi, mely során a megfelelő aldehid, ammónia és hidrogén-peroxid keletkezik. Fiziológias szerepének feltérképezése folyamatosan zajlik, az egyik legfontosabb funkciójára akkor derült fény, amikor igazolták a leukocita adhézióban és extravazációban szerepet játszó VAP-1 klónozása során a két molekula szekvencia azonosságát. Így aztán nem meglepő, hogy jelentős SSAO aktivitást írtak le számos gyulladásos patofiziológias állapotban. Miután az endogén (pl. metilamin, aminoaceton) és exogén (pl. allilamin) aminok lebontása során képződött termékek, a hidrogén-peroxid, formaldehid, metilglioxál és akrolein ismert TRPA1 aktivátorok, így kutatócsoportunk vezető tagja, Helyes Zsuzsanna akadémikus vetette fel, hogy nemcsak a gyulladásban, hanem a nocicepcióban betöltött szerepét is érdemes vizsgálni (4. ábra). Az SSAO gátlásának tehát terápiás értéke lehet, az elmúlt 15 évben számos kis molekulájú SSAO-gátló molekulát fejlesztettek ki terápiás céllal melyek kísérletes vagy klinikai alkalmazásának több gátja is volt. A nem megfelelő szelektivitás alkalmatlanná teszi a vegyületeket gyógyszerfejlesztésre, hiszen ezek más amin oxidázokat (pl. MAO) is gátoltak vagy a kedvezőtlen fizikokémiai tulajdonságok, mint pl. a rossz oldhatóság vagy a toxicitás.



**4. ábra: A TRPA1 és az SSAO kapcsolata:** Az endogén és exogén aminok lebontása során képződött hidrogén-peroxid, formaldehid, metilglioxál és akrolein aktiválják az elsődleges érzőidegvégződéseken expresszáldó TRPA1 ioncsatornákat (Magyar és mtsai., 2011 alapján)

### 1.6.1. Egy új ígéretes SSAO gátló oxim vegyület, az SZV-1287

Korábban leírták már néhány oxim vegyület növényi, bakteriális és állati eredetű réztartalmú amin oxidáz enzimekre, illetve humán szérum SSAO-ra kifejtett gátló hatását, oxim vegyületek közül eddig még nem kerültek klinikai vizsgálatra. A Semmelweis Egyetem Szerves Vegytani Intézetének kémikusai Mátyus Péter vezetésével kifejlesztettek egy új SSAO gátló vegyületet, az SZV-1287 kódnevű, 3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl)propanal oximot, melyet munkacsoportunk szabadalmaztatott (**5. ábra**). Az a különleges tulajdonság, amely megkülönbözteti ezt a vegyületet a többi SSAO-gátlótól, az, hogy egy új, innovatív gyógyszertervezési stratégia alapján tervezték, amelyet metabolizmus-aktivált többcélú terápiának (MAMUT) neveznek. Ez egy olyan „aktív prodrug” mely önmagában is SSAO-gátló hatású, szájon át adagolva a gyomor savas pH-ján COX-gátló metabolit, oxaprozin oxim analógja képződik belőle. A molekula szelektíven ható, több támadáspontú gyulladáscsökkentővé válhat. Az SZV-1287 szerkezeti képlete nagy fokú hasonlóságot mutat olyan oxim vegyületek szerkezeti képletével, amelyekről már bizonyított, hogy a TRP ioncsatornák aktivációját gátolják. Ezen irodalmi adatok ismeretében indokolt volt a vegyület TRPV1 és TRPA1 ioncsatorna aktivációra kifejtett hatását *in vitro* tesztekben is megvizsgálni. A molekulával végzett *in vitro* és *in vivo* kísérleti eredményeink alapján a kutatócsoportunk szabadalmat nyújtott be az SZV-1287 vegyületre, gyulladásgátló és analgetikus hatását bizonyítottuk krónikus arthritisz modellben, preklinikai vizsgálatát egy GINOP pályázat keretei között végeztük.



5. ábra: Az SZV-1287 szerkezeti képlete

## 1.7. A szomatosztatin és az SST4 receptor jelentősége gyulladás és fájdalom folyamatokban

### 1.7.1. A szomatosztatin

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések aktiválódását követően a perifériás idegvégződésekben nemcsak gyulladáskeltő, hanem gyulladásgátló neuropeptidok is felszabadulnak; ezek közül a gyulladás és a fájdalom szabályozásában a szomatosztatinnak tulajdonítják a legnagyobb jelentőséget. A keringésbe jutó szomatosztatin a saját receptorain keresztül az egész szervezetben, távoli szövetekben is képes szisztémás gyulladáscsökkentő és analgetikus hatást kifejteni. A szomatosztatinnal rokonságot mutató neuropeptidet, a kortisztatint (CST) 1996-ban klónozták; ez a peptid a szomatosztatinhoz hasonlóan ugyanazokon a receptorokon fejti ki hatását. A szomatosztatin expresszióját a hipotalamuszban, az amygdalában, a hippocampusban, a szeptumban és különböző kérgi területeken is

kimutatták. Az agyban gátló neuromodulátorként működik, és főként GABAerg neuronokban termelődik. Részt vesz a motoros működések, a szenzoros feldolgozás, az alvás, a fájdalom, valamint a tanulás és memória szabályozásában. Gátolja a tumorsejtek proliferációját, jelentős immunmodulátor, csökkenti a T-limfociták interleukin (IL)-2, IL-4, IL-10 és interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) termelését, a B-sejtek IgA-, IgM- és IgE-szekrécióját, a neutrofil granulociták kemotaxisát, valamint a makrofágok fagocitózisát. A szomatosztatin elsősorban a TRPV1 receptort expresszáló, kapszaicin-érzékeny érzőneuronokban termelődik és ott raktározódik. Állatkísérletes és klinikai eredmények egyaránt bizonyítják, hogy az exogén szomatosztatin hatékonyan enyhíti a különböző fájdalomtípusokat. Munkacsoportunk pedig számos bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből felszabaduló szomatosztatin a véráramba kerülve szisztémás gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatást fejt ki.

### **1.7.2. A szomatosztatin receptorai**

A szomatosztatin sokféle hatását saját receptorain keresztül közvetíti. Öt G<sub>i</sub>-proteinhez kapcsolt szomatosztatin receptort ismerünk egérben, patkányban, illetve emberben SST1, SST2, SST3, SST4 és SST5 néven. Szomatosztatin analóg-kötő képességük alapján két csoportra oszthatók. Az SST2, SST3 és SST5 receptorok nagy affinitással kötnek oktapeptid analógokat (pl. az oktreotidot), ezek a SRIF1 (somatotropin release inhibiting factor) csoportba tartoznak, míg az SST1 és SST4 receptorok alacsony oktapeptid analóg-kötő képességgel rendelkeznek, ezek a SRIF2 csoportba tartoznak. Az endokrin hatást a SRIF1 csoportba tartozó receptorok közvetítik. Saját eredményeink bizonyítják, hogy a gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatás az SST1 és SST4 receptorokhoz köthető a periférián. Az első *in vivo* vizsgálatokat SST4 génhíányos (SST4<sup>-/-</sup>) egerekkel munkacsoportunk végezte és bizonyította, hogy e receptornak protektív szerepe van mind akut gyulladással járó folyamatokban, mind krónikus ízületi gyulladás során. Az SST4 receptor hiánya esetén szignifikánsan nagyobb mértékű mechanikai hiperalgéziát (fájdalomküszöb-csökkenést) láttunk az akut és a krónikus modellben is, valamint szignifikánsan nagyobb lábduzzadást tapasztaltunk az akut modellben a gyulladás korai stádiumaiban, gyulladásos citokinek koncentrációja szignifikánsan nagyobb volt génhíány esetén. Az eredményeink alapján pedig az SST4 receptor új célpont lehet fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő gyógyszer fejlesztés tekintetében. A szomatosztatin központi idegrendszeri mechanizmussal kialakuló gátló hatásainak széles irodalma van. Szisztémásan, sőt lokálisan alkalmazott szomatosztatin is analgetikus hatásokkal rendelkezik. Az emberi ízületbe adott szomatosztatin pedig gátolta a gyulladásos fájdalmat. Az SST4 jelenlétét a fájdalomjelátvitel szempontjából kulcsfontosságú perifériás és centrális területeken is igazolták: primer afferens neuronok, DRG-k, a gerincvelő dorzális szarva, a szomatoszenzoros kéreg, hippocampus, amygdala és a periakveduktális szürkeállomány (PAG).

### **1.7.3. A CST és szerepe a nocicepcióban és gyulladásos folyamatokban**

A szomatosztatinhoz szerkezetileg nagyon közel álló neuropeptid a CST, agykérgi expressziójáról és neuronális aktivitást gátló hatásáról kapta a nevét. A 14 (CST-14) és 17 (CST-17) aminosavat tartalmazó formái egérben fordul elő. A CST képes mind az öt ismert SST receptorhoz kötődni, neuronális aktivitást gátló hatása megegyezik a szomatosztatinéval.

Perifériás hatásait tekintve a CST-14 rendkívül hatásos gyulladásgátló a szomatosztatin 14-hez hasonlóan, gátolja a gyulladáskeltő citokinek (IL-2 és IFN $\gamma$ ) felszabadulását, a Th1 sejtek proliferációját és elősegíti a gyulladást gátló mediátorok (IL-10, IL-1Ra) termelését. Habár a CST gátló hatása jól ismert a gyulladással járó folyamatok sejt szintjén, nagyon keveset tudunk az érzőidegekre, neurogén gyulladásra és hiperalgéziára gyakorolt hatásairól.

#### **1.7.4. A szomatosztatin SST4 receptoron ható szelektív agonisták, saját szabadalmaztatott kismolekulás pirrolo-pirimidin vegyületeink**

Az érzőideg-végződéses és gyulladással járó sejtek SST4 receptorain szelektíven ható szintetikus agonisták fejlesztése új terápiás lehetőséget jelenthet a gyulladással járó fájdalomcsillapítás területén. A szelektív agonisták nagy előnye, hogy a szomatosztatin SST2, SST3 és SST5 receptorain kifejtett endokrin hatásokat nem közvetítik.

Ilyen agonista a ciklikus heptapeptid szerkezetű TT-232, amely mind az SST4, mind az SST1 receptorokon agonista hatást fejt ki. A stabil, nem peptid vegyület, az NNC 26-9100 egy nagy szelektivitású és nagy affinitású SST4 receptor agonista. Az SST4 receptor szelektív „szuperagonistájaként” ismert J-2156 nagy affinitással kötődik az SST4 receptorhoz. A Juvantia Pharma (Turku, Finnország) szintetizálta a vegyületet, amely egy nem-peptid agonista. A J-2156 a natív szomatosztatin kötődési affinitását jelentősen meghaladó, nanomólos affinitással kötődik az emberi SST4 receptorhoz és közel 400-szoros szelektivitást mutat az SST4-hez, ha az emberben megtalálható másik négy szomatosztatin receptorhoz viszonyítjuk. A G-protein aktivációs funkcionális tesztben mely a guanozin-5'-O-[ $\gamma$ -tio]trifoszfát (GTP $\gamma$ S) - kötődést jelzi, 2,5-ször erősebb kötődést tudtak kimutatni, mint a natív szomatosztatin esetében, e tulajdonságai miatt kapta a már említett „szuperagonista” jelzést. A J-2156 antinociceptív és gyulladásgátló hatásait kutatócsoportunk is vizsgálta, akut és krónikus egérmodellekben az agonista hatékonyan gátolta az akut gyulladással járó mechanikai hiperalgéziát, szenzoros neuropeptid felszabadulást és a krónikus fájdalmat. Emellett egér viselkedésvizsgálatokban szorongáscsökkentő és antidepresszáns hatása volt. Ezek a modellek transzlációs szempontból relevánsak. Azonban a receptor 3 dimenziós (3D) szerkezetével kapcsolatos információk hiánya miatt a racionális gyógyszertervezés nem volt lehetséges. A három referencia vegyület kizárólag parenterális úton adható, ami hátrányos a gyógyszerfejlesztés szempontjából. Ahhoz, hogy krónikus kezelésre használhatóak legyenek, fontos szempont a szájon át való (per os) alkalmazhatóság. Szükség van tehát az SST4 receptoron ható per os alkalmazható kis molekulájú agonista fejlesztésre, és az ezeken alapuló gyógyszerfejlesztési munkálatokra. A Pécsi Tudományegyetem által szabadalmaztatott új, kis molekulájú potenciálisan SST4 agonistáink (4-fenetilamino-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-származékok) per os aktív vegyületek melyeket a Vichem majd később az Avicor Kft szintetizált. Ezeket a vegyületeket vizsgáltuk széles körben az *in silico* vizsgálatokkal kezdve, az *in vitro* sejt szintű vizsgálatokon át az *ex vivo* majd az *in vivo* fájdalommodellekig. A vizsgálatok szempontjából alapvető fontosságú volt az SST4 receptor 3D szerkezetének megalkotása, a szintetikus agonisták kötődési tulajdonságainak jellemzése. Ezen új platform segítségével saját, szabadalmaztatott új kis molekulájú SST4 agonistáink kötődési tulajdonságait tudjuk jellemezni *in silico*. Az *in silico* kötődést mutató molekulák receptoraktivációs potenciáljának a vizsgálatát az SST4 receptort stabilan expresszáló membránkészítményeken, valamint az akut neurogén gyulladással és krónikus neuropátiás fájdalom *in vivo* állatmodelleiben tudjuk vizsgálni.

## **II. CÉLKITŰZÉSEK, SPECIFIKUS FELADATOK**

### **II.1. LIPID RAFTOK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA TRP IONCSATORNÁK AKTIVÁCIÓJÁBAN, GYULLADÁSBAN, FÁJDALOMBAN**

A TRP ioncsatornák aktivációja szempontjából releváns régiókat azonosították, azonban kevés tudomásunk van arról, hogy a mikrokörnyezet megváltoztatása milyen hatást gyakorol az ioncsatornák működésére. Kísérleteinkben erre kerestük a választ, az alábbi célokat foglalmaztuk meg:

1. A lipid raft diszrupció következményeinek felderítése a termoszenzitív TRP ioncsatornák aktiválhatóságára *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* körülmények között.
2. Szerkezet-hatás összefüggések vizsgálata különböző struktúrájú CD származékokkal történő kezelés után.
3. A lipid raft károsító anyagok hatásának vizsgálata a membránpolaritásra és membránfluiditásra.
4. A lipid raft károsító anyagok fájdalomcsillapító és gyulladásgátló hatásainak meghatározása *in vivo* állatkísérletes modellekben.

Ezek érdekében vizsgáltuk a lipid raft károsító anyagok hatását a TRP ioncsatornák kémiai úton kiváltott aktivációjára érző neuronokon, perifériás érzőideg-végződéseken és TRPV1 vagy TRPA1 receptor-expresszálo sejteken. Ezek a vegyületek a lipid raft vizsgálatok esetén standardnak számító MCD (a szerkezet-hatás vizsgálatok során ezt RAMEB-el jelöljük, mint random metilált CD) a szfingomielin hidrolízist katalizáló SM-áz vagy a glikoszfingolipid felépülésért felelős myriocin, vagy karboxamido csoportot tartalmazó új, szintetikus szteroid vegyületek. Összehasonlítottuk a lipid raft károsító kezelések hatását TRP ioncsatornák és feszültségfüggő ioncsatornák esetén *in silico* és *in vitro* és *ex vivo* vizsgálatok segítségével. Megvizsgáltuk endogén TRPV1 és TRPA1 antagonistá resolvinok hatását az ioncsatorna aktivációra, vizsgáltuk a resolvinok potenciális lipid raft károsító hatását. Végül gyulladás és fájdalom egérmódeljeiben vizsgáltuk a lipid raft károsító anyagokat.

### **II.2. ÚJ SSAO GÁTLÓ OXIM VEGYÜLETÜNK, AZ SZV-1287 HATÁSMECHANIZMUSÁNAK *IN VITRO* VIZSGÁLATA**

Az SZV-1287 közvetlen TRPV1 és TRPA1 receptorokra kifejtett hatásának vizsgálata érző neuronokon, perifériás érzőideg-végződéseken és TRPV1 vagy TRPA1 receptort expresszálo sejteken.

### **II.3. TERMÉSZETES ÉS SZINTETIKUS POTENCIÁLIS SST4 RECEPTOR AGONISTÁK VIZSGÁLATA**

Mivel az SST4 receptor bizonyítottan megfelelő gyógyszer-célpont fájdalomcsillapító és gyulladásgátló gyógyszer fejlesztésére, és a szomatosztatin maga nem alkalmas, mint gyógyszerjelölt, ezért célul tűztük ki további szomatosztatin analógokat vizsgálni.

1. A CST-14 peptid SST4 kötődésének és aktivációjának vizsgálata receptort expresszáló membránpreparátumon és sejteken, érzőideg-végződéseken, valamint hatásainak meghatározása gyulladás és fájdalom állatkísérletes modelljeiben.
2. A racionális gyógyszertervezés és gyógyszerfejlesztés eszköztárának igénybevételével új, szabadalmaztatott kismolekulás pirrolo-pirimidin vegyületeinket vizsgálata *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* modellekben.

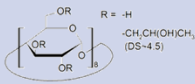
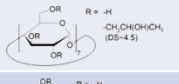
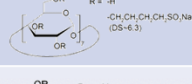
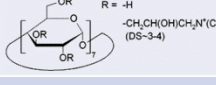
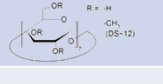
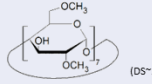
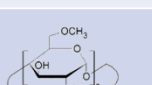
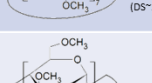
### III. KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

#### 3.1. Primer sejtenyészet és sejtvonalak

A kísérletekhez patkány és egér TG neuron tenyészetet készítettünk, 2-5 napos tenyészeteket használtunk. TRPV1 és TRPA1 receptort expresszáló sejt vonalakat is használtunk.

#### 3.2. Anyagok

A kísérletekben használt CD származékok a CycloLab Ciklodextrin Kutató-Fejlesztő Kft.-től származtak, melyek szerkezetét és tulajdonságait az 2. táblázat foglalja össze. A karboxamido szteroid anyagok szintézisét Skodáné Dr. Földes Rita munkacsoportja a Pannon Egyetemen szintetizálta (4). A kísérletekhez használt egyéb anyagokat az egyes módszerek leírásánál, vagy az eredmények ismertetésénél mutatom be.

CD származék	Rövidítés	Összegképlet	Szerkezeti képlet, szubsztitúciós fok (degree of substitution, DS, n)	Kémiai karakter
(2-Hidroxipropil)-gamma - ciklodextrin	HPGCD	$C_{48}H_{80-n}O_{40} \cdot (C_3H_7O)_n$	 R = -H -CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub> (DS=4.5)	Nem metilezett, nemionos
(2-Hidroxipropil)-béta-ciklodextrin	HPBCD	$C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_3H_7O)_n$	 R = -H -CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub> (DS=4.5)	Nem metilezett, nemionos
Szulfobutiléter-béta-ciklodextrin nátrium sója	SBECD	$C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_4H_8O_3SNa)_n$	 R = -H -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na (DS=6.3)	Nem metilezett, anionos
(2-Hidroxi-3-N,N,N-trimetilamino)propil-béta-ciklodextrin	QABCD	$C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_6H_{15}ONCl)_n$	 R = -H -CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Cl (DS=3.4)	Nem metilezett, kationos
Random metilezett béta-ciklodextrin	RAMEB	$C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (CH_3)_n$	 R = -H -CH <sub>3</sub> (DS=1.2)	Metilezett, nemionos
Heptakis(2,6-di-O-metil)-béta-ciklodextrin	DIMEB-50	$C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (CH_3)_n$	 (DS=1.4)	Nem metilezett, nemionos, izomer tisztaság: ~ 50%
Heptakis(2,6-di-O-metil)-béta-ciklodextrin	DIMEB-95	$C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (CH_3)_n$	 (DS=1.4)	Nem metilezett, nemionos, izomer tisztaság: ~ 95%
Heptakis(2,3,6-tri-O-metil)-béta-ciklodextrin	TRIMEB	$C_{63}H_{112}O_{35}$	 (DS=2.1)	Metilezett, nemionos

**2. táblázat:** A vizsgált ciklodextrin származékok jellemzői (CycloLab Ciklodextrin Kutató-Fejlesztő Kft.)

### **3.3. *In vitro* vizsgálati módszerek és modellek**

A vizsgálathoz a CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega)-t használtuk a gyártó protokolljának megfelelően. Mitokondriális funkció vizsgálatához MitoTracker™ Red CMXRos fluoreszcens festést alkalmaztunk. Fluoreszcens kalciummérést alkalmaztunk TG neuronokon és TRP ioncsatornákat expresszáló CHO sejteken. Radioaktív  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  felvétel vizsgálatokat végeztünk TRP ioncsatornákat expresszáló CHO sejteken. Membránpolaritás és membránfluiditás vizsgálatokat végeztünk fluoreszcencia spektroszkópiával Laurdan fluoreszcens festéssel TRP ioncsatornákat expresszáló CHO sejteken és TG neuronokon. A koleszterin depléció nyomon követésére koleszterin-kötő fluoreszcens festéket, filipint alkalmaztunk. Kompetitív receptor kötődési vizsgálatokat végeztünk [ $^{125}\text{I}$ -Tyr $^{11}$ ]SST-14-el, és receptor aktivációs vizsgálatot végeztünk [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S kötődési teszttel SST4 és SST1 receptorokat expresszáló CHO sejteken.  $\beta$ -arresztin vizsgálatot végeztünk PathHunter assay-vel SST4-expresszáló CHO sejteken. CGRP felszabadulást mértünk radioimmunoassay (RIA) módszerrel izolált patkány trachea érzőideg-végződéseiből. Kolorimetriás koleszterintartalom-mérést végeztünk CD előkezelés után egérfül vagy talpbőr mintákon ab65359 Abcam Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation Assay kittel. Gyulladásos citokineket mértünk a talpbőr homogenizátumokból ELISA módszerrel.

### **3.4. *In silico* vizsgálati módszerek és modellek**

*In silico* vizsgálatokat végeztünk a CD-koleszterin kötődés vizsgálata esetén, a Maestro, az AutoDockTools programokkal. A Wrap'n'Shake módszer Wrapper részét alkalmaztuk koleszterin molekulák monomolekuláris rétegének felépítésére a célfelületeken. A dokkolási számításokat az AutoDock 4.2.6 programmal végeztük minimalizált és kiegyensúlyozott koleszterin és a CD-k felhasználásával. *In silico* vizsgálatokat végeztünk az SST4 és ligandjai vizsgálata esetén, szintén a Maestro programmal. Az SST4 receptor szerkezetét homológiamodellezéssel hoztuk létre, a  $\beta$ 2-adrenerg receptor aktív formáját felhasználva templátként. A dokkolást az AutoDock 4.2.6 programmal végeztük.

### **3.5. *In vivo* vizsgálati módszerek és modellek**

Kapszaicin-okozta akut kemonociceptív reakciót vizsgáltunk egerekben, kapszaicin szembe cseppentése után számoltuk a teljes manccsal végzett szemtörölések számát. Vizsgáltuk az RTX-indukálta termális hiperalgéziát emelkedő hőmérsékletű forró lapon a hőküszöb megállapításával és a mechanikai allodíniát dinamikus plantáris eszteziométerrel (DPA) a mechanociceptív küszöb meghatározásával. Formalin által kiváltott akut gyulladásos fájdalom modellben vizsgáltuk az egereket, a formalint a talpba injektálva a kialakuló nocifenzív reakciókkal töltött időt mértük. Icilint vagy PS-CIM-0216 elegyét az egerek talpába injektálva mértük a kiváltott akut nocifenzív fájdalomreakció idejét. Az MO-okozta akut vazodilatációt vizsgáltuk egerek fülén a bőr véráramlásának monitorozásával, az egerek fülének vastagságát mikrométerrel mértük. Ezekben a modellekben a lipid raft károsító anyagok hatásait vizsgáltuk. MO-val kiváltott akut neurogén gyulladást vizsgáltuk patkány lábhati bőrében. A plazmafehérjekiáramlás mértékét az Evans kék akkumulációval határoztuk meg. Szomatosztatin, CST-14 és saját kismolekulás potenciális SST4 agonistáink hatását mértük a modellben. Karragénnel kiváltott mechanikai hiperalgéziát és akut lábduzzadást mértünk egerekben szomatosztatin vagy CST-14 beadása után. A lábak térfogatának mérését

pletizmométerrel, a mechanikai allodíniát DPA-val mértük. Az ülőideg lekötésével kiváltott neuropátiás mechanikai hiperalgéziát patkányokban analgézias mérőberendezéssel mértük, saját kismolekulás potenciális SST4 agonistáinkat per os adagoltuk. Az állatokat a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének állatházában tenyésztettük és tartottuk. A szükséges etikai engedéllyel rendelkezünk.

## **IV. EREDMÉNYEK**

### **IV. 1. A LIPID RAFTOK VIZSGÁLATA**

#### **4.1.1. A koleszterin depléció hatásának vizsgálata**

##### **Az MCD-okozta koleszterin depléció gátló hatást fejt ki a TRP ioncsatornák működésére TG neuronokon és TRPV1 ioncsatornát expresszáló sejtvonalon és érzőideg-végződéseken**

Patkány TG neuron tenyészetben a TRP receptor aktivációt fluoreszcens  $[Ca^{2+}]_i$  méréstechnikával detektáltuk. Kvantitatív értékelésre a  $Ca^{2+}$  válaszok maximum értékét használtuk. A reagáló sejteket a fluoreszcencia arány érték növekedése ( $R \geq 0,1$ ) alapján azonosítottuk. A kapszaicin (330 nM) adását követően 10 másodpercen belül  $Ca^{2+}$ -beáramlás volt megfigyelhető, kontroll körülmények között a kapszaicinnal kiváltott  $Ca^{2+}$ -beáramlást a sejtek kb. 60 %-ában detektáltunk. A 3 és 10 mM MCD kezelés szignifikánsan csökkentette a kapszaicin-okozta és OLDA-okozta TRPV1 aktivációt, ám nem hatott az RTX-, AEA- és a savas pH-okozta  $Ca^{2+}$ -akkumulációra TRPV1-et expresszáló CHO sejtvonalon. TG neuron tenyészetben a kapszaicin és az RTX által kiváltott  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedést egyaránt csökkentette az MCD (2).

A perifériás érzőideg-végződéseken lokalizálódó TRP receptorok vizsgálata során a receptor aktiváció folyamán felszabadult CGRP koncentrációkat RIA módszerrel határoztuk meg. A TRPV1 receptorokat kapszaicinnal (100 nM) aktiváltuk, ez CGRP felszabadulást váltott ki izolált patkány trachea perifériás érzőideg-végződéseiből. Emelkedő koncentrációjú MCD kezelés koncentrációfüggő módon csökkentette a felszabaduló CGRP mennyiségét (2).

Az MCD hatását vizsgáltuk TRPA1, TRPM8 és TRPM3 ioncsatorna aktivációra is. Az AITC-re adott válasz körülbelül fél percig tartott, és hosszabb latencia (30 sec) után alakult ki. Kontroll körülmények között az AITC által kiváltott  $Ca^{2+}$ -beáramlást a sejtek kb 25%-ánál detektáltunk. Az MCD csökkentette az AITC-okozta (TRPA1 aktiváció) kalciumbeáramlást a neuronokba, a reagáló sejtek arányát és az R értéket szintén csökkentette. A TRPM8 agonista icilinre reagáló kontroll sejtek aránya és az R érték szignifikánsan csökkent 1 mM MCD-vel történő inkubációt követően, 3 mM MCD kezelés eltörölte a válaszokat (3). Az előkezelésnek egyáltalán nem volt hatása a PS által kiváltott (3) és a CIM-0216 (8) által kiváltott TRPM3 receptor aktiválhatóságára.

### **Az MCD kezelés depletálja a plazmamembrán koleszterin tartalmát és növeli a membrán fluiditást**

Az MCD kezelés (10 mM) jelentősen csökkentette a plazmamembrán koleszterinkötő filipin jelölődését mind TG neuronokon, mind TRPV1 receptor-expresszáló CHO sejteken (3). A Laurdan emissziós spektrumának vizsgálata a plazmamembrán fluiditásának és rendezettségének meghatározására alkalmas módszer, és jól használható a rendezett (kontroll) és rendezetlen (MCD-kezelt) membrán fázisok közti átmenet jellemzésére. Az MCD kezelés hatására olyan membrán domének depletálódnak, melyekben a molekulák hidratáltsági szintje alacsony. Ez a tulajdonság a rendezett folyékony doménekre („liquid ordered domain”) jellemző, amelyek a lipid raftok megfelelői. A spektrális változások egyértelmű bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az MCD kezelés a lipid raftok diszrupcióját okozza (3).

#### **4.1.2. A szfingomielin depléció hatásának vizsgálata**

##### **Az SM-áz-okozta szfingomielin depléció gátló hatást fejt ki a TRP ioncsatornák működésére TG neuronokon és TRPV1 ioncsatornát expresszáló sejtvonalon**

A kapszaicin által kiváltott TRPV1, az AITC- és formaldehid-indukálta TRPA1 és az icilin-indukálta TRPM8 receptor aktivációt az SM-áz kezelés koncentrációfüggő módon gátolta, a kezelés szignifikánsan csökkentette az agonista-érzékeny sejtek arányát, valamint az R értékek is szignifikánsan csökkentek neuronokon (3). A továbbiakban vizsgáltuk a SM-áz hatását a PS-indukált TRPM3 receptor aktivációra, a kezelés azonban nem csökkentette szignifikánsan a reagáló sejtek arányát és a reakció nagyságát (3). Az SM-áz gátló hatással volt a kapszaicin okozta  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -akkumulációra TRPV1 receptor-expresszáló CHO sejteken, viszont nem befolyásolta az RTX-okozta  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvételt (2). A SM-áz kezelés (10 mUN) gátolta a mind a kapszaicin-, mind az AITC-indukálta CGRP felszabadulást az idegvégződésekből (3).

##### **A glikoszfingolipidek felépülésének gátlása myriocinnel csökkenti a TRP ioncsatornák működését TG neuronokon, TRPV1 és TRPA1 ioncsatornát expresszáló sejtvonalon**

A myriocin gátló hatással volt a kapszaicin okozta  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -akkumulációra TRPV1 receptort expresszáló CHO sejteken (2). Szignifikánsan csökkentette a kapszaicin-, AITC-, illetve az icilin-szenzitív neuronok arányát, valamint az R értéket (2, 3). A PS-szenzitív sejtek arányát és az R értéket sem változtatta meg a myriocin kezelés (3).

#### **4.1.3. Karboxamido-szteroid vegyületek hatásának vizsgálata**

##### **A karboxamido-szteroid C1 vegyület gátló hatást fejt ki a TRPV1, TRPA1, TRPM8 és TRPM3 ioncsatorna aktivációra, koleszterint depletál a lipid raftokból, és befolyásolja a membránpolaritást**

Miután több szteránvázis vegyületről bizonyosodott be, hogy azok hatással vannak a TRP ioncsatornák aktivációs tulajdonságaira, így egy karboxamido-szteroid vegyület (C1) TRP ioncsatorna aktivációra kifejtett hatását vizsgáltuk meg először sejtes vizsgálatokban. Vizsgáltuk egy ugyanolyan karboxamido csoportot, de más síkban tartalmazó vegyületet (C2)

és magát a szterán vázat (C3) is hatás szempontjából. Már 10  $\mu$ M karboxamido-szteroid kezelés szignifikánsan csökkentette a kapszaicin-okozta (TRPV1 aktiváció) kalciumbeáramlást a neuronokba, a raciométrikus értéket szintén csökkentette (4).

Receptor-expresszálo sejt vonalakon a vegyületek koncentrációfüggő TRPA1 és TRPV1 receptor aktivációt gátló hatását bizonyítottuk (5), a legjelentősebb gátlást a C1 okozta. A C1 gátolta az AITC-vel kiváltott TRPA1, az icilinnel kiváltott TRPM8, valamint PS-al kiváltott TRPM3 receptor aktivációt (5). Filipin-festéssel igazoltuk a vegyületek koleszterin-depletáló hatását, mely a C1 vegyületnél volt a legnagyobb mértékű (5). Fluoreszcencia spektroszkópiával bizonyítottuk, hogy a C1 vegyület megváltoztatja a Laurdan energiasémáját, mely a membrán rendezett és rendezetlen fázisainak arányának megváltozását jelzi (5).

#### **4.1.4. A lipid raft diszruptió hatása a sejtmembrán polarítására és fluiditására**

##### **Az SM-áz és Myr hatása a membránpolarításra**

A membránpolaritás vizsgálatakor felvett gerjesztési (300-420 nm között) és emissziós (380-600 nm között) spektrumok a 30 mU SM-áz kezelés hatására is csak minimálisan változtak. A 100 nM myriocin kezelés azonban jelentősen és a teljes hullámhossz tartományban megváltoztatta a gerjesztési és emissziós spektrumokat, amelyből arra lehet következtetni, hogy megváltozott a membránpolaritás és a mikrokönyezet -zártabbá vált a membrán- a kontroll mintához képest.

##### **A lipid raft diszruptió hatással van a sejtmembrán fluiditására**

Az általános polarizáció meghatározásához a kezelt (30 mU SM-áz, 100 nM myriocin, 10 mM MCD és 100  $\mu$ M C1) és kezeletlen mintákból nyert fluoreszcencia lecsengés integrálásával kapott intenzitásértékeket vettük alapul, minden egyes esetben a saját kontrollhoz hasonlítva a kapott eredményeket (6). A myriocin kivételével minden esetben megállapítható, hogy a kezelés hatására a GP függvények értéke csökkent, ez a színekép vörös irányba történő eltolódására utal. A vörös tartomány felé való eltolódás egyértelműen bizonyítja a membrán rendezett állapotából a rendezetlen fázisba való átmenetnek, tehát az anyagok kisebb-nagyobb mértékben megváltoztatják a membrán mikrokönyezetét. Az SM-áz, myriocin és C1 esetében megnövekedett a membrán mikroviszkozitása, míg az MCD esetén jelentősen csökkent (6).

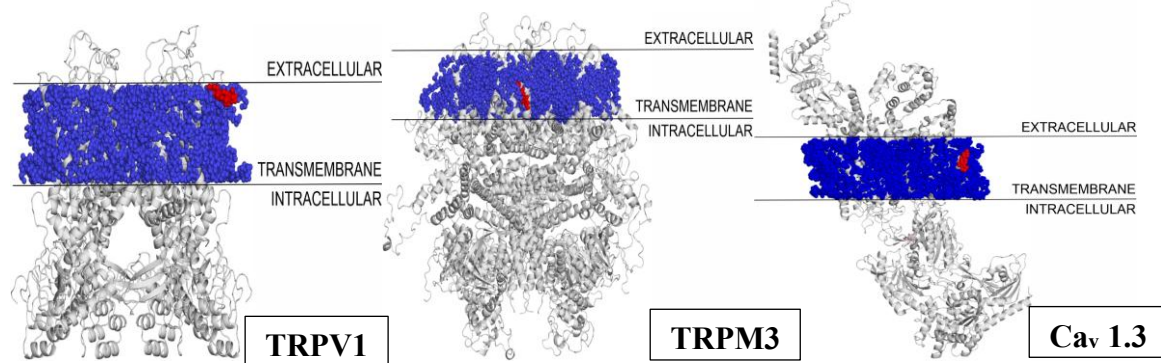
#### **4.1.5. Az RvD1 és RvD2 TRPV1 és TRPA1 aktivációra és a lipid raftok integritására kifejtett hatásának vizsgálata**

Az RvD1 és RvD2 koncentrációfüggő gátló hatást fejtett ki TG neuronokon mind a TRPV1, mind a TRPA1 ionsatornák aktivációjára (7). Hasonlóképpen, nanomólos koncentrációban gátló hatásúak voltak a TRPV1-et vagy TRPA1-et expresszálo CHO sejteken mért  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -akkumulációra (7). Érzőideg-végződéseken gátolták a CGRP felszabadulást TRPV1 és TRPA1 aktiváció után is (7). Fluoreszcens spektroszkópia segítségével sikerült megbizonyosodnunk, hogy mind az RvD1 mind az RvD2 hatással van a lipid raftok összetételére, a Laurdan

mikrokörnyezetét mindkét anyag megváltoztatja. A lipid raftok megbontásáról viszont már tudjuk, hogy TRP ioncsatorna gátló hatású, így az RvD1 és RvD2 hatásmechanizmusában is biztosan szerepet játszik a lipid raft károsítás (7).

#### 4.1.6. A lipid raft károsító anyagok feszültségfüggő ioncsatornák aktivációjára gyakorolt hatásának vizsgálata

A TRP ioncsatornák mellett a neuronális sejtek membránjainak raft régióiban számos feszültségfüggő ioncsatorna jelenlétét is leírták. A továbbiakban azt is megvizsgáltuk, hogy az MCD és a SM-áz hatással van-e a KCl által kiváltott kevert ioncsatorna aktivációra, valamint a feszültségfüggő L-típusú  $Ca^{2+}$ -ioncsatornák aktivációjára TG neuronokon és perifériás érzőideg-végződéseken. Sem az MCD sem a SM-áz nem gátolta sem a veretaridin, sem az FPL64176 által kiváltott feszültségfüggő L-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák aktiválhatóságát TG neuronokon (8). KCl-indukált  $[Ca^{2+}]_i$  növekedést a TG sejtek több mint 90 %-a mutatott, az SM-áz kezelés nem gátolta a sejtek KCl érzékenységét. Az MCD gátolta a TRPV1 ioncsatorna aktiváció által közvetített, de nem gátolta az elektromos téringerlés által közvetített CGRP felszabadulást a perifériás érzőideg-végződésekből (8). Az *in silico* modellezéssel próbáltuk az MCD hatásmechanizmusát feltárni. A koleszterin TRPV1, TRPM3 és  $Ca_v$  1.3 fehérjékhez való kötődési módjait térképeztük fel. A TRPM3 szerkezetét stabilizáló koleszterinmolekulák száma és a köztük lévő kötések affinitása lényegesen nagyobb, mint a TRPV1 és a  $Ca_v$  1.3 esetében. A TRPM3 esetében a koleszterin-kötések a felszíntől rejtett transzmembrán hélixekben vannak. A  $Ca_v$  1.3 esetében a koleszterin szintén az ioncsatorna transzmembrán régiójában van jelen, hasonlóan a TRPM3-hoz, igaz ezek lazábban kötött molekulák. A TRPV1 esetében a koleszterin kötés a felszínen látható extracelluláris részen lokalizálódik, amely a CD molekulák számára könnyen hozzáférhető. Továbbá a  $Ca_v$  1.3 viszonylag nagy extracelluláris része is akadályozza a transzmembrán régióhoz való hozzáférést. Így a  $Ca_v$  1.3 koleszterin-kötési módja nem olyan könnyen hozzáférhető, mint a TRPV1 esetén (8) (6. ábra).



6. ábra: A TRPV1, TRPM3 és  $Ca_v$ 1.3 transzmembrán régiója koleszterin molekulákkal bevonva a Wrap'n'Shake módszerrel. Az ioncsatornák szürke rajzként, a koleszterin molekulák kék gömbökként láthatók, reprezentatív koleszterin molekulát piros színnel jelöltük az extracelluláris oldalon lévő felületen.

#### 4.1.7. Koleszterin deplécio hatásának vizsgálata a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktiválhatóságára *in vivo* állatmodellekben

**Az MCD és a C1 csökkenti a kapszaicin által kiváltott kemonociceptív reakciót**

Az MCD és a C1 anyaggal történt 30 perces előkezelés (az állatok szemébe cseppentéssel) szignifikánsan csökkentette a kapszaicin által kiváltott szentörlések számát az első órában, valamint a C1 a második órában is hatásosnak bizonyult (9).

#### **Az MCD nem volt hatással az RTX-indukálta akut mechanikai allodíniára és termális hiperalgéziára, a C1 csökkentette a mechanikai allodíniát**

Az RTX injektálása után 30, 60, illetve 90 perccel a mechanikai fájdalomküszöb értéke a fizioiógias sóoldattal előkezelt csoportban jelentősen csökkent. Az RTX hatására kialakuló mechanikai allodíniát, illetve termális hiperalgéziát az MCD előkezelés a fizioiógias sóoldattal előkezelt csoporthoz viszonyítva nem volt képes szignifikánsan befolyásolni. 100  $\mu$ M C1 nem befolyásolta az RTX hatására kialakuló hőküszöb változást a fizioiógias sóoldatos előkezeléssel összehasonlítva, azonban szignifikánsan csökkentette az RTX által kiváltott mechanikai allodíniát a vizsgálat 60. és 90. percében a fizioiógias sóoldattal történő előkezeléssel szemben (9).

#### **Az MCD és a C1 gátolta a formalin-indukálta akut gyulladási fájdalom**

A formalin teszt első fázisában, amikor a TRPA1 receptorok közvetlen kémiai ingerlése miatt kialakuló akut fájdalom monitorozható, sem az MCD sem pedig a C1 anyag nem befolyásolta a fájdalomelhárító viselkedéssel töltött idő hosszát. Azonban a teszt második fázisában, amikor a perifériás neurogén gyulladási folyamatok tartják fent a fájdalmat, mindkét anyag szignifikánsan csökkentette a fájdalomreakció időtartamát (9).

#### **A koleszterin depléció MCD-vel csökkenti a fájdalmat a TRPM8 ioncsatornát involváló akut fájdalom modellben, TRPM3 ioncsatornán keresztül kialakuló fájdalom ellen a C1 is hatástalan**

Kutatócsoportunk új állatkísérletes modelleket állított be az akut fájdalom vizsgálatára a TRPM8 ioncsatorna aktivátor icilin talpba injektálásával és a TRPM3 ioncsatorna aktivátor PS és CIM-0216 vegyületek együttes talpba injektálásával (10). Mindkét esetben a fájdalomreakciók idejét mértük másodpercben. MCD előkezelés csökkentette az icilin-okozta fájdalomreakció idejét, a C1 anyag hatástalan volt (10). A TRPM3 ioncsatorna aktivációt involváló állatkísérletben csak a C1 anyagot teszteltük, mivel csak a C1 anyag volt képes *in vitro* körülmények között csökkenteni a TRPM ioncsatorna aktiválhatóságát. Azonban *in vivo* a C1 anyag nem volt fájdalomcsillapító hatású a modellben (10).

#### **4.1.8. Szingolipid depléció hatásának vizsgálata a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktiválhatóságára *in vivo* állatmodellekben**

##### **Az SM-áz és a myriocin csökkenti a kapszaicin által kiváltott kemonociceptív reakciót**

Az SM-áz esetében kontrollként fizioiógias sóoldattal, a myriocin esetében DMSO-val kezeltük az állatok szemét, annak érdekében, hogy lássuk, hogy tapasztalható-e bármilyen deszenzibilizáló hatás, azonban ilyet nem tapasztaltunk. Viszont mindkét anyag szignifikánsan csökkentette a kapszaicin által kiváltott szentörlések számát az első órában, valamint a myriocin a második órában is hatásosnak bizonyult (11).

### **Az SM-áz csökkenti az RTX-indukálta akut mechanikai allodíniát és termális hiperalgéziát, a myriocin csökkenti a termális hiperalgéziát**

Az SM-áz előkezelés szignifikánsan gátolta az RTX adását követő termális hiperalgézia kialakulását az összes mérési pontban a fiziológias sóoldattal szemben és szignifikánsan gátolta a mechanikai hiperalgézia kialakulását a vizsgálat 30. percében a fiziológias sóoldattal szemben. A myriocin előkezelés hatására szignifikánsan csökkent a termális hiperalgézia az RTX adását követő 10. és 20. percen a fiziológias kontrollcsoporttal összehasonlítva, ugyanakkor az előkezelés nem befolyásolta az RTX-kiváltotta mechanikai allodíniát (11).

### **Az SM-áz gátolja a formalin-indukálta akut gyulladási fájdalmat**

A formalin teszt első fázisában, amikor a TRPA1 receptorok közvetlen kémiai ingerlése miatt kialakuló akut fájdalom monitorozható, sem az SM-áz sem pedig a Myriocin nem befolyásolta a fájdalomelhárító viselkedéssel töltött idő hosszát. A neurogén gyulladási fázisban, az SM-áz szignifikánsan csökkentette a fájdalomreakció időtartamát (11).

### **A szfingolipid depléció SM-ázzal csökkenti a fájdalmat a TRPM8 ioncsatornát involváló akut fájdalom modellben**

Az akut fájdalom vizsgálata a TRPM8 ioncsatorna aktivátor icilin taplba injektálásával történt a modellben. Az SM-áz előkezelés csökkentette az icilin- okozta fájdalomreakció idejét a vizsgált időintervallumban, a myriocin ellenben hatástalan volt (11).

### **4.1.9. Különböző CD származékok szisztematikus *in vitro* vizsgálata a koleszterin deplécióra, sejtek életképességére, mitokondrium funkcióra, membrán polarításra és TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktiválhatóságára**

Korábbi kísérleteinkben tehát a lipid raft kutatás standard molekulája, az MCD lipid raft károsító, így TRP ioncsatorna aktivációt csökkentő vegyületnek bizonyult. Az MCD azonban jelentősen citotoxikus, így szükséges lenne hasonló koleszterin-depletáló hatású, de a sejteket kevésbé károsító CD származékok vizsgálatára. Kísérleteinkben 8, eltérő kémiai szerkezettel rendelkező CD származékot vizsgáltunk biztonságossági, a membrán szerkezetére kifejtett strukturális, illetve receptor aktivációra kifejtett funkcionális hatásuk szempontjából. Az eddigi kísérletekben használt MCD szerkezetileg megegyezik a következő két fejezetben, és a 12, 13 közleményben használt RAMEB-bel.

### **A metilezett és nem-metilezett CD származékok eltérően hatnak a CHO sejtek viabilitására**

A CD származékokat növekvő koncentrációkban vizsgáltuk az élő sejtek által termelt ATP mennyiségét detektáló CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assayben (1. ábra). A nem-metilezett CD származékok (HPGCD, HPBCD, QABCD, SBECD) 10 mM koncentrációig nem okoztak viabilitás csökkenést, a gamma származék HPGCD biztonságosan alkalmazhatónak bizonyult még ennél magasabb koncentrációkban is. A metilezett származékok azonban már

alacsonyabb koncentrációban citotoxikusnak mutatkoztak (az alábbi sorrendben: DIMEB-95>DIMEB-50>TRIMEB>RAMEB) (12).

### **Bizonyos nem-metilezett CD származékok növelik, a metilezett származékok csökkentik a CHO sejtek mitokondriális funkcióját**

A MitoTracker Red™ CMXRos fluoreszcens festék intenzitása, mely az aktívan működő mitokondriumokat festi, a nem metilezett származékok közül a HPGCD, a HPBCD és a QABCD esetében 10 mM-os koncentrációban szignifikánsan emelkedett értéket adott. A nem-metilezett származékokat a viabilitást még nem befolyásoló koncentrációban alkalmazva is - a DIMEB-50 kivételével - csökkent fluoreszcencia intenzitást tapasztaltunk, ami a kezelt sejtek mitokondriális diszfunkciójára, csökkent mitokondriális aktivitására utal (12).

### **A vizsgált CD származékok közül a DIMEB-50 jelentősebb mértékben, a többi származék kevésbé járul hozzá a membrán rendezetlen állapot felé történő alakulására**

A natív CHO sejtek membránjának a mikro környezet polaritására és rendezettségére érzékeny Laurdan festékekkel való jelölése alapján a kezeletlen kontroll és a CD származékokkal kezelt minták között a Laurdan molekula emissziós intenzitás adatainak átlagában a DIMEB-50 adta a legalacsonyabb értékeket (12). A DIMEB-50 kezelés után tehát a membránba épült Laurdan „rendezetlenebb” környezetébe jobban beférkőzhetnek a vízmolekulák, amelyek kioltják a fluoreszcenciát. A többi CD származék esetében is látható a rendezetlen membránstruktúra felé való eltolódás, ám kisebb mértékben.

### **A CD származékok csökkentik a membrán koleszterin tartalmát**

A CD származékok koleszterin depletáló hatását CHO sejteken vizsgáltuk Filipin III koleszterinkötő fluoreszcens festékekkel, mely a plazmamembránban és a perinukleáris kompartmentekben egyaránt mutatta a koleszterin jelenlétét. A CD származékok mindegyike szignifikánsan csökkentette a Filipin III festék jelét, tehát a koleszterint depletálta (12).

### **A CD származékok csökkentik a TRPA1 és TRPV1 receptorok aktivációját receptorokat expresszáló CHO sejteken**

A  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvétel mérés során a vizsgált sejtek együttes válaszreakcióját mértük a TRPV1 receptort aktiváló kapszaicin (100 nM) vagy a TRPA1 receptort aktiváló AITC (200  $\mu\text{M}$ ) hatására. A vizsgált CD származékok koncentrációfüggő módon képesek csökkenteni a receptor-expresszáló CHO sejtek TRPV1 vagy TRPA1 receptor aktivációját a DIMEB-50 kezelés kivételével a TRPA1 receptor aktivációra vonatkozóan (12).

#### **4.1.10. Különböző CD származékok szisztematikus *in vivo* vizsgálata fájdalom és gyulladás modellekben**

Az előzőekben ismertetett eredményekkel bizonyítottuk, hogy a CD származékok képesek kivonni a koleszterint a membrán lipid raftjaiból csökkentve a receptor aktivációt, *in vivo* fájdalomcsillapító hatásokat sejtetve. Az állatkísérletekben már csak 3 szerkezetileg eltérő CD származékot hasonlítottunk össze, a véletlenszerűen metilezett béta-CDt, a RAMEB-et amely metilezett és neutrális, egy hidroxipropil béta-CD-t, a HPBCD-t, amely nem metilezett

neutrális és a szulfobutil-éter-béta-ciklodextrin nátriumsót, az SBECD-t, mely egy anionos CD. Ezek már használatosak hatóanyagként és/vagy segédanyagként gyógyszerekben, hatásukat teszteltük a TRPV1-et és TRPA1-et involváló gyulladás és fájdalom modellekben egerekben.

### **A vizsgált CD származékok mindegyike gátolja a formalin-indukálta akut gyulladási fájdalmat**

A formalin teszt első fázisában, amikor a TRPA1 receptorok közvetlen kémiai ingerlése miatt kialakuló akut fájdalom monitorozható, egyik CD származék sem befolyásolta a fájdalomelhárító viselkedéssel töltött idő hosszát. A teszt második fázisban, amikor a perifériás neurogén gyulladási folyamatok tartják fent a fájdalmat, az összes vizsgált CD szignifikánsan csökkentette a fájdalomreakció időtartamát (13).

### **A CD származékok csökkentették az RTX-indukálta akut mechanikai allodíniát, de nem befolyásolták a termális hiperalgéziát**

Mindhárom szerkezetű CD előkezelés szignifikánsan gátolta az RTX adását követő mechanikai allodíniát a vizsgálat 30. percében. RAMEB és SBECD kezelés után ez a hatás a 90. percben is megvolt. A HPBCD csak a 30. percben volt képes gátolni a mechanikai allodíniát. Ugyanakkor egyik vizsgált CD származék sem befolyásolta az RTX injekció által kiváltott termális hiperalgéziát (13).

### **A CD-származékok csökkentik a TRPA1 aktiváció által kiváltott akut neurogén értágulást a bőrben**

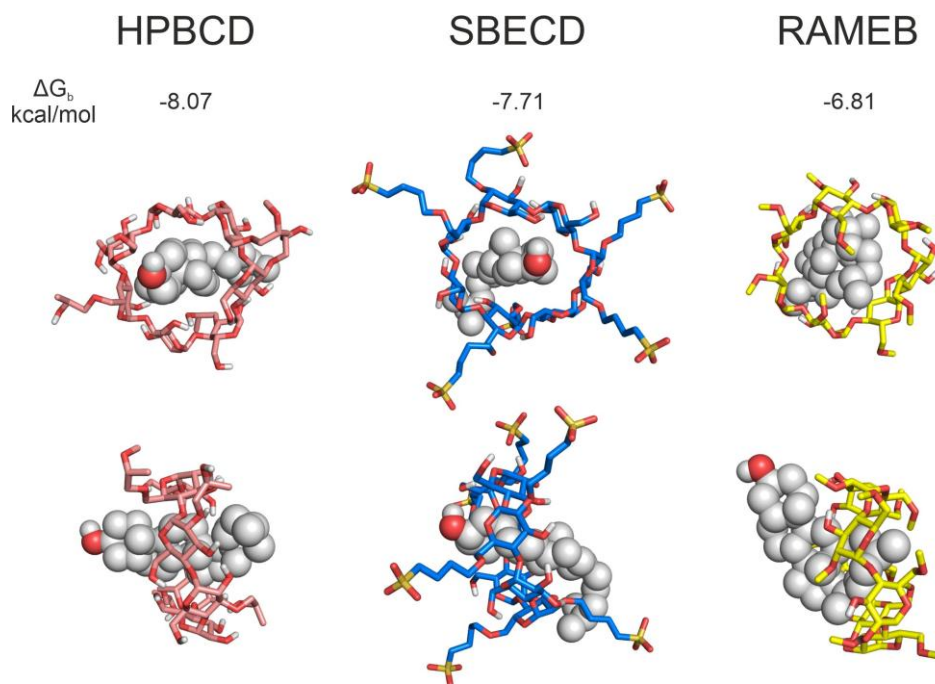
Az egerek fülét a CD-vel kezeltük elő, így vizsgáltuk a hatásukat a TRPA1 receptor agonista MO által kiváltott akut bőrgyulladásban. MO hatására a bőr vérperfúziója jelentősen megemelkedett, melyet mindhárom CD előkezelés képes volt csökkenteni. (13).

### **A CD-kezelés csökkenti a talpi bőr és a fül teljes koleszterintartalmát**

A CD-származékok helyi alkalmazást követő *in vivo* koleszterincsökkenésének megfigyelésére az egér talpi bőrének és fülszöveinek teljes koleszterintartalmát 30 perccel az intraplantáris injekció, illetve a fül felszínére történő kenés után mértük. Mind az egér talpi bőrében, mind a fülszövetben a teljes koleszterintartalom szignifikánsan csökkent 3 mM RAMEB, 10 mM HPBCD és 10 mM SBECD kezelés után (13).

### **A RAMEB, HPBCD és SBECD eltérő koleszterin-kötődési tulajdonságokkal rendelkezik**

A CD származékokkal kapott számos *in vitro* és *in vivo* eredmény háttérében álló mechanizmusok feltérképezése érdekében *in silico* próbáltuk modellezni a hatást. A koleszterin-kötődési mód nagyon hasonló volt a HPBCD és az SBECD esetében, a koleszterin a CD-k hidrofób üregének közepén dokkolt. A RAMEB esetében a koleszterin szteroid része nem teszi lehetővé a ligandum mélyebb kötődését. RAMEB esetében a koleszterin fent említett kötődési módja lehetővé teszi egy további RAMEB kapcsolódását a szteroid részéhez, ami egy stabilabb 2:1 sztöchiometrikus RAMEB:koleszterin komplex kialakulásához vezet (7. ábra) (13).



**7. ábra: A szubsztituált CD–koleszterin komplexek felülnézeti és oldalnézeti képe.** A koleszterin szürke színnel, gömb ábrázolásban látható, a CD-k pálcás megjelenítésűek, a jelölő színek a következők: HPBCD - piros, SBECD – kék, RAMEB – sárga. Az ábrán feltüntettük a különböző CD származékokhoz számolt kötődési szabadenergia ( $\Delta G_b$ ) értékét.

## IV. 2. AZ SZV-1287 SSAO GÁTLÓ VEGYÜLETÜNK *IN VITRO* VIZSGÁLATA

### Az SZV-1287 gátolja a TRPA1 és TRPV1 receptor által közvetített $Ca^{2+}$ -beáramlást TG neuronokban

A TRPA1 agonista AITC-re és a TRPV1 agonista kapszaicinre reagáló neuronok százalékos arányát fluoreszcens  $Ca^{2+}$ -beáramlás mérésével határoztuk meg kezeletlen neurontenyészeteken. Az SZV-1287 hatására szignifikánsan és koncentráció-függő módon csökkent a  $Ca^{2+}$ -beáramlás TG neuronok citoplazmájába. Annak felderítésére, hogy az SZV-1287 hatása a TRPA1 és TRPV1 aktivációra az SSAO gátló hatásához kapcsolódik-e, egy szerkezetében jelentősen eltérő referencia SSAO gátló vegyületet, az LJP 1207-et alkalmaztuk. Az LJP 1207 azonban nem volt hatással a receptor aktivációra. (15).

### Az SZV-1287 csökkenti a TRPA1 aktiváció-indukálta CGRP-felszabadulást perifériás érzőideg-végződésekből

Az SZV-1287 koncentráció-függő módon, szignifikánsan gátolta az AITC aktiváció által kiváltott CGRP felszabadulást, de csak a legmagasabb vizsgált koncentrációban, 1000 nM-ban. A TRPV1 aktiválása 100 nM kapszaicinnal történt, a felszabaduló CGRP mennyiségét az SZV-1287 nem csökkentette jelentősen. (15).

### **Az SZV-1287 gátolja az AITC és a kapszaicin által indukált $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlást és $^{45}\text{Ca}^{2+}$ izotóp felvételt TRPA1 és TRPV1 expresszálo CHO sejtekbe**

Az SZV-1287 növekvő koncentrációjának 60 perces előinkubálását követően a TRPV1-et vagy TRPA1-et expresszálo CHO sejtek stimuláció hatására történő  $\text{Ca}^{2+}$ -felvétele jelentős mértékben csökkent. Az SZV-1287 (100 nM-10  $\mu\text{M}$ ) a  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  izotóp felvételét koncentrációfüggő módon, szignifikánsan csökkentette (15).

### **Az SZV-1287 gátolja az alacsony pH-okozta TRPV1 receptor aktivációt érző neuronokon**

Mivel az SZV-1287 antagonizálja a TRPV1 receptort, ami potenciálisan hipertermiához vezethet, vizsgáltuk az SZ-1287 protonok általi TRPV1 aktivációra gyakorolt hatását, amelynek blokádját elsősorban felelős ezért a mellékhatásért (16). A 10  $\mu\text{M}$  SZV-1287 előkezelés az alacsony pH-érték adagolására reagáló neuronok számának jelentős csökkenését okozta. Az R érték jelentős csökkenését figyeltük meg 1 és 10  $\mu\text{M}$  SZV-1287 kezelés után is.

## **IV. 3. POTENCIÁLIS SST4 RECEPTOR AGONISTÁK VIZSGÁLATA**

### **4.3.1. A CST-14 és a szomatosztatin összehasonlító vizsgálata**

#### **A CST-14 kötődik SST1 és SST4 receptorokhoz**

A CST-14 SST4 és SST1 receptorokhoz való kötődési képességét a [ $^{125}\text{I}$ -Tyr $^{11}$ ]SST-14 leszorítási tesztben vizsgáltuk. A növekvő koncentrációban (1 nM-10  $\mu\text{M}$ ) alkalmazott CST-14 mind az SST4-et expresszálo CHO sejtekről (CHO-SST4), mind az SST1-et expresszálo CHO sejtekről (CHO-SST1) koncentrációfüggő módon leszorította a 10 nM radioaktívan jelölt szomatosztatint. A CST-14 és a szomatosztatin hasonló affinitást mutatott a receptorokhoz (17).

#### **A CST-14 és a szomatosztatin G-protein aktivációt okoz**

A ligand-stimulált [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$  kötődési tesztel vizsgáltuk a szomatosztatin és CST-14 által kiváltott SST1 és SST4 receptorokhoz kapcsolódó G-protein aktivációt, mely arányos az agonistával kiváltott GTP bekötéssel a G-proteinek  $\alpha$  alegységén. Mindkét peptid emelkedő koncentrációja fokozott, koncentrációfüggő [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$  kötődést eredményezett. Az érték amivel jellemezhetünk egy ligand aktivációt, az a maximális aktiváció értéke, a [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$  kötődés fokozódásának a bazális aktivitáson túli százaléka. A két peptid hasonló hatékonyságú volt, szomatosztatin kezelésnél a maximális aktiváció 218% és 204% voltak a CHO-SST4 és CHO-SST1 sejteken. A CST-14 megfelelő értékei 223 és 218% voltak (17).

#### **A szomatosztatin és CST-14 gátolja a szenzoros neuropeptid-felszabadulást az érzőidegvégződéseken**

A nedves szövettömegre vonatkoztatott CGRP felszabadulás megemelkedett az 1  $\mu\text{M}$  kapszaicin stimuláció hatására. Mind a szomatosztatin, mind a CST-14 szignifikáns mértékben gátolta a kiváltott CGRP felszabadulást. A koncentráció növelésével a hatás egyik esetben sem fokozódott, sőt szomatosztatin esetében a legnagyobb gátlást a legkisebb koncentráció eredményezte. Egyik peptid sem befolyásolta a bazális CGRP felszabadulást.

### **A szomatosztatin és CST-14 hatása az MO-val kiváltott akut neurogén gyulladásra patkány lábháti bőrén**

Mind a szomatosztatin, mind a CST-14 szignifikánsan csökkentette az MO által kiváltott plazmafehérje-kiáramlást 20 perccel a helyi alkalmazását követően. Ez az akut válasz tisztán neurogén folyamatnak tekinthető (Inoue és mtsai. 1997; Bánvölgyi és mtsai. 2004), mert az MO ebben az 1%-os koncentrációban szelektíven aktiválja a TRPA1 ioncsatornákat a szenzoros idegvégződéseken (Jordt és mtsai. 2004), A szomatosztatin 60%-os, a CST-14 sokkal nagyobb, majdnem 80%-os gátló hatást fejtett ki (17).

### **A szomatosztatin és CST-14 csökkenti a karragénal kiváltott mechanikai hiperalgéziát, akut lábduzzadást, valamint a gyulladást citokin-termelést egérben**

Jelentős mechanikai hiperalgéziát és lábduzzadást mérünk a kontroll, fiziológiás sóoldattal kezelt egércsoportban 3% karragén intraplantáris injekciójának hatására. 100 µg/kg i.p. szomatosztatin kezelés a 4. órában szignifikánsan gátolta a hiperalgéziát, míg a CST-14 kezelés a 2-23 óráig terjedő mérési pontokban mindenhol gátló hatást mutatott. A lábduzzadást hasonló mértékben, kb. 30-35%-kal csökkentette mindkét peptid a 6 órás időpontban (61. ábra). A karragén kezelés szignifikáns IL-1β és TNFα felszabadulást okozott a kontroll csoport talpbőrén, 100 µg/kg i.p. szomatosztatin és CST-14 szignifikánsan csökkentette az IL-1β szintézist, a TNFα szintézist csak a CST-14 mérsékelte szignifikánsan (17).

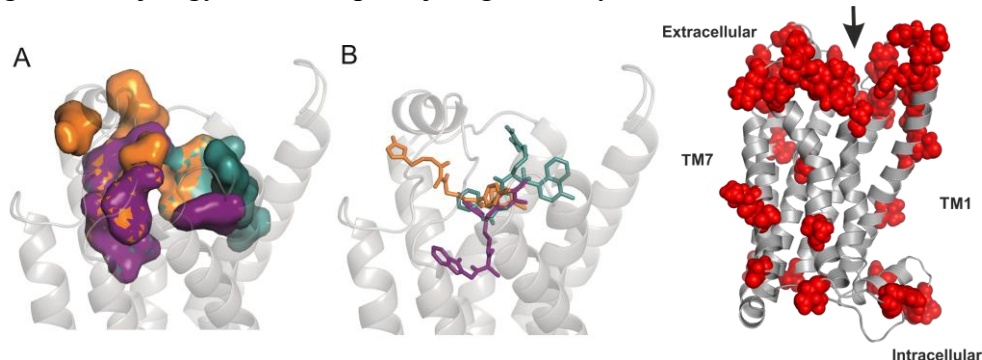
#### **4.3.2. Saját, SST4-es receptoron ható molekulák fejlesztése**

Erős proof-of-concept bizonyítékokat szolgáltatunk transzlációs szempontból releváns, kifejezett neuropátiás komponenssel rendelkező krónikus fájdalommodellekben SST<sup>-/-</sup> egerek és referenciaként alkalmazott SST4 agonisták bevonásával. Az értekezéshez kapcsolódó közleményekben bemutattuk az SST4 receptor 3D szerkezetét és szintetikus agonistáinak kötődési sajátosságait, majd erre a platformra támaszkodva *in silico* jellemeztük szabadalmaztatott új kismolekulás SST4 agonistáink (4-fenetilamino-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin származékok) kötődését. Továbbá meghatároztuk ezen vegyületek receptoraktiváló képességét CHO-SST4 membránpreparátumokon, valamint vizsgáltuk hatásukat patkány akut neurogén gyulladás és krónikus neuropátiás fájdalom modelljeiben is.

#### **Modelleztük és validáltuk az SST4 receptor 3D szerkezetét és meghatároztuk az új ligandumaink potenciális kötőhelyeit**

A SRIF2 szomatosztatin-alcsaládba tartozó SST4 receptor szerkezetét felépítettük. Az SST4 aminosavsorrendjét az SRIF1 alcsalád reprezentatív tagjával, az SST2 receptorral állítottuk párhuzamba, mivel a két receptor szintetikus referenciaagonistákra adott kötődési tulajdonságai jól elkülöníthetők. A szekvenciaillesztést követően az SST4 és SST2 között 42%-os azonosságot számoltunk, azokat a pozíciókat, ahol a két fehérje aminosavai sem hasonlóak, sem azonosak nem voltak, a 8. ábrán piros gömbökkel jelöltük. A ligandumokat magas affinitású (H), és alacsony affinitású (L) kategóriába soroltuk. A magas affinitású csoporton belül két kötődési módot különítették el, H1 és H2 kötődési módot. A dokkolási számítások nem

mutattak különbséget a kötési energiában a magas és alacsony affinitású ligandumok között, ugyanakkor a H és L csoportok között markáns eltérés volt megfigyelhető a kötődési mintázatokban (**8. ábra**). Az általunk vizsgált új molekulák is mindkét alzsebbe (H1 és H2) kötődtek. A vizsgált ligandumok között szerepelt a jól ismert "szuperagonista" J-2156 is. A dokkolási kísérletek alapján az új ligandumok ugyanazokat az interakciókat mutatták, mint a korábban leírt ligandumok. A J-2156 a várakozásoknak megfelelően a H2 zsebet foglalta el, csakúgy, mint **compound 1, 2, 3** (**8. ábra**). Az **1-5** vegyületek számított kötési energiája jobb vagy legalábbis hasonló volt a J-2156-éhoz. A **3-5** vegyületek megfeleltek a Lipinski-féle „Rule of Five” (RO5) gyógyszerjellemző kritériumainak, míg az **1-2** vegyületek molekulatömege kissé meghaladta az 500-as határértéket. A **4 és 5** vegyület mutatta a legjobb farmakokinetikai (PK) jellemzőket a RO5 paraméterei és a BOILED-Egg modell alapján, amely a lipofilitás és polaritás alapján jósolja a vér-agy gát és a bélrendszeri felszívódás valószínűségét. Összességében az új vegyületek PK profilja legalább olyan kedvező, mint a J-2156-é (**18**).



**8. ábra.** Az SST4 receptor kötőhelyeinek általános és ligandspecifikus bemutatása. Az SST4 receptor kötőhelyei (szürke) színekkel (A) és pálcikákkal (B) vannak jelölve: lila a gyenge (L), narancssárga a nagy (a H1 alzseb előnyben részesítve), és türkiz a nagy affinitású ligandumok (a H2 alzseb előnyben részesítve). Utolsó ábrán az SST4 receptor vázlata, piros gömbökkel az SST2 receptorral nem azonos szekvenciák.

#### Az SST4-kötődést kísérletesen igazoltuk

A **compound 1** a szuperagonista J-2156-hoz hasonlóan a H2 kötőzseb jellegzetes ligandumának bizonyult. Kompetíciós kötődési vizsgálatban **compound 1** 100 nM–100  $\mu$ M tartományban koncentrációfüggő módon leszorította a jelölt szomatosztatin-14-et az SST4 receptorokról (**18**).

#### Az új SST4 ligandumok receptorhoz kapcsolt G-protein aktivációt mutatnak

A ligandumok által stimulált [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S kötődés a receptor agonisták által a GDP-GTP kicserélődési reakciót tükrözi a G-proteinek  $\alpha$ -alegységein. Az összes vegyület koncentrációfüggő [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S kötődés fokozódást eredményez. Valamennyi vegyület erőteljes és hatékony SST4 receptor agonistának tekinthető (**18**).

#### Az SST4 agonistáink gátolják az akut neurogén gyulladást és anti-hiperalgézias hatásuk van traumás neuropátia patkánymodelljében

Kontroll, vivőanyaggal kezelt állatokban az 1%-os MO helyi alkalmazása 20 perc elteltével akut neurogén plazmafehérje-extravazációt okoz. A 100  $\mu$ g/kg dózisban az új vegyületeink

mindegyike szignifikánsan, mintegy 40–60%-kal mérsékelte ezt az akut neurogén gyulladási választ, a legerősebb gátlást a **compound 1** vegyület váltotta ki. Az ülőideg részleges lekötése 7 nappal a műtét után csökkenést idézett elő a mechanonociceptív küszöbértékben, ami mechanikai hiperalgéziát jelez. A 100 µg/kg dózisban alkalmazva a vegyületeinket, a hiperalgéziát a **compound 1, 3 és 4** 28–62%-kal csökkentette, a **compound 2** bizonyult a leghatékonyabbnak, teljes mértékben megszüntette a hiperalgéziát. A **compound 5** nem fejtett ki számottevő analgetikus hatást (**18**), a mechanikai hiperalgézia csökkentő hatást újabb hatagonista esetén is sikerült kimutatnunk (**19, 20**).

### **Négy vegyületről igazoltuk, hogy kis fokú β-arresztin 2 kötődést mutatnak**

További 4 ligandum esetén megvizsgáltuk, hogy az agonisták képesek-e β-arresztin 2 kötődést kiváltani a kemilumineszcencián alapuló PathHunter tesztben. Az új ligandok egyike sem idézett elő kimutatható β-arresztin 2 kötődést (0.001 nM-10 µM tartományban). Ezzel szemben a referenciaanyagok (NNC 26-9100, J-2156) jelentős β-arresztin 2 aktivációt okoztak (**19**).

## **V. MEGBESZÉLÉS**

### **V. 1. A MEMBRÁN LIPID RAFTOK SZEREPE A TRP IONCSATORNÁK AKTIVÁCIÓJÁBAN**

#### **A lipid raft diszrupció gátló hatást fejt ki a TRPV1, TRPA1 és TRPM8 ioncsatornák működésére, de nincs hatással a TRPM3 ioncsatorna aktivációra**

Vizsgálati eredményeink elsőként szolgáltak bizonyítékkal arra, hogy a lipid raftok kulcsfontosságú alkotóelemeik, például a koleszterin, a szfingomielin vagy a gangliozidok farmakológiai úton történő károsítása gátolja a TRPV1, TRPA1 és TRPM8 ioncsatornák különböző agonisták által előidézett nyitási tulajdonságait. A lipid raft diszrupció a Ca<sup>2+</sup>-beáramlási választ mind natív érző neuronokon, mind TRPV1-et expresszáló sejtvonalon, valamint érzőideg-végződéseken is szignifikánsan csökkentette (**2,3**).

A Ca<sup>2+</sup> válaszok gátlását mások is leírták más célmolekulákkal MCD előkezelés után, vagy SM-áz kezelés után, vagy myriocin inkubálás után. A kezelések hatásainak összehasonlítása natív sejtekben és TRPV1-transzfektált CHO sejtekben eltérőbb képet mutatott. CHO sejteken végzett vizsgálatban az RTX hatását az MCD nem gátolta. Valószínűleg a kötőhely hozzáférhetősége, amely kritikus az RTX hatásához, elegendő a kötődéshez egy overexpresszáló sejtvonalban, még koleszterinhiányos környezetben is. Ezzel szemben a natív TG sejtekben az RTX és a kapszaicin hatását hasonlóan gátolta a koleszterinhiány (**2**). Az extracellulárisan alkalmazott SM-áz kezelés a TRPV1-et expresszáló CHO ismét csak a kapszaicin hatását gátolta, az RTX-ét nem. Mindazonáltal a TG sejtekben, a transzfektált sejtvonallal ellentétben, a TRPV1 és más TRP csatornák közötti kölcsönhatást is figyelembe kell venni. A kapszaicin és az RTX hatásai egyformán jól gátolhatók voltak, amikor a CHO sejteket egy éjszakán át inkubáltuk olyan táptalajban, amely a lipid raft bioszintézis inhibitorát, myriocint tartalmazott. Az inhibitorok hatásai közötti különbségek vagy az RTX kötődésével

vagy a sejtek hosszabb idejű kitettséggel függenek össze, amelyek mélyebb változást okozhatnak a lipid raftban (2).

Az MCD, a myriocin és az SM-áz hatását további, a fájdalom érzékelésében részt vevő termoszenzitív TRP receptorok esetében is vizsgáltuk, és elsőként bizonyítottuk, hogy a fent leírt módszerekkel létrehozott lipid raft diszrupció szignifikánsan és koncentrációfüggő módon csökkentette a TRPA1 és a TRPM8 ioncsatorna nyitási valószínűségét, ugyanakkor hatástalan volt a TRPM3 ioncsatorna működésére (3). Az MCD kezelés koleszterin depletáló hatását két *in vitro* kísérlettel támasztottuk alá, a koleszterin-kötő filipin csökkent jelenlétével a kezelés után, és fluoreszcencia spektroszkópia módszerével membránpolaritás-szenzitív próba segítségével. Leírtuk, hogy a TRPM3 receptor működését a lipid raft diszrupció nem befolyásolta érzőneuronokon (3). Ez annyira nem meglepő, a jelenségre magyarázat lehet a TRPM3 speciális szerkezete, különleges sajátossága, hogy jelenleg ismeretlen járulékos fehérjékkel stabil negyedleges szerkezet kialakítására képes és ebben a formában rezisztens a lipid raft diszrupcióra és szerkezete feszültségfüggő ioncsatornák szerkezetéhez hasonlatos. A lipidek jelentőségét a TRP ioncsatornák konformációváltozásaiban aktív, inaktív vagy deszenzibilizált állapotok között CryoEM vizsgálatok támasztották alá. Ezek az adatok megerősítették hipotézisünket, hogy a csatornák aktiválódását és gátlását a közvetlen fehérje-lipid hidrofób kölcsönhatások befolyásolják. *In silico* modellezéssel sikerült a TRPV1 és a TRPM3 ioncsatorna koleszterinkötési módját leírni (8). A TRP ioncsatorna plazmamembránban elfoglalt pozíciójának megváltozása a kötőhelyeket elérhetetlenné teszi az agonista vegyületek számára TRPV1 esetén (2). A TRPV1 ioncsatorna esetén az ioncsatornához lazábban kötött koleszterin molekulák találhatóak, ezek jól hozzáférhetőek a CD molekulák számára, és könnyen képeznek komplexeket velük. A koleszterin eltávolítása a TRPM3 membránjáról nem eredményezte az ionvezető képesség csökkenését, mivel a TRPM3 ioncsatornához erősen kötött koleszterin molekulák csatlakoznak a transzmembrán hélixekben, amelyeket nehezebb komplexképződéssel eltávolítani (8).

Kimutattuk, hogy az érzőideg-végződéseken az SM-áz már alacsonyabb koncentrációban is gátolja a TRPV1 és a TRPA1 receptorok aktivációját, mint a sejttesteken. Elsőként bizonyítottuk, hogy a lipid raftok érzőideg-végződéseken is fontos szerepet töltenek be a vizsgált receptorok aktiválhatósága tekintetében (2, 3). Bizonyítottuk, hogy az SM-áz a belső membránok összetételét nem változtatja meg, hatása csak a plazmamembránban érvényesül. Bizonyítottuk, hogy az SM-áz TRPV1 és TRPA1 ioncsatorna aktivációt gátló hatását nem a hidrolízis termékek okozzák.

### **A karboxamido-szteroid C1 vegyület mind a 4 vizsgált TRP ioncsatorna aktivációját gátolja**

Bizonyítottuk, hogy a C1 karboxamido-szteroid vegyület jelentősen gátolja a TRPV1, TRPA1, TRPM8 és TRPM3 kationcsatornák nyitási tulajdonságait primer szenzoros neuronokon és receptor-expresszálo sejt vonalakon (4, 5). A C1 10  $\mu$ M koncentrációban csökkentette a TRPV1 aktiváció által kiváltott átlagos fluoreszcencia-növekedés csúcsát a szenzoros neuronokban, és csökkentette a  $^{45}$ Ca-felvételt a TRPV1 receptort expresszálo sejtekben. Az karboxamido

csoportot eltérő pozícióban tartalmazó C2 szintén jelentősen csökkentette a TRPV1 ioncsatorna-aktivációt, de a karboxamido csoport nélküli C3 enyhe gátló hatást gyakorolt a TRPV1 ioncsatornákra. Kimutattuk, hogy a karboxamido csoport jelenléte, valamint a szteroid váz alakja és a karboxamido csoport helyzete fontos a TRP ioncsatornákra gyakorolt gátló hatás kialakulásához. Kiemelkedő eredmény, hogy egyedül a C1 karboxamido szteroid vegyületünk volt képes a TRPM3 ioncsatorna aktivációra gátló hatást kifejteni, és 10  $\mu$ M koncentrációban ugyanolyan hatást fejt ki, mint az MCD 1000-szer nagyobb koncentrációban. Ezért a jelenlegi kísérletek egyik fő eredménye, hogy az új C1 vegyületünk különösen hasznos kísérleti eszköz a koleszterin depléció hatásának vizsgálatára (4, 5).

### **A lipid raft károsító anyagok eltérő hatással vannak a membránpolaritásra és membránfluiditásra**

A lipid raftok farmakológiai manipulációja új megközelítést tett lehetővé a membránok mikrokozmetének és az ott elhelyezkedő fehérjék funkcionális sajátságainak vizsgálatára. A fluoreszcens Laurdan festék a lipid környezet és a fluiditás kísérletes értékelésére alkalmas, amelynek gerjesztési és emissziós spektrumában bekövetkező változások a membrán aktuális hidratáltságára, vagyis a rendezett (liquid-ordered) és rendezetlen (liquid-disordered) fázisok arányára engednek következtetni. További információt kaphatunk a membrán fluiditásáról az időbontott emissziós spektrum lecsengéséből számítható paraméterek, a GP, CoG és trot vizsgálata során. Első vizsgálatainkban igazoltuk, hogy az MCD és a C1 vegyület megváltoztatja a sejtmembrán polaritását (3, 5). A fluiditás vizsgálatok a GP értékek SM-áz, MCD és C1 kezelés után vörös irányú eltolódást mutattak, ami arra utal, hogy a membrán a kevésbé rendezett fázis felé tolódott (6). Eredményünk összhangban áll más membránanalitikai módszerekkel kapott megfigyelésekkel. A myriocin esetében ezzel ellentétes, kék irányú eltolódás volt megfigyelhető, ami a membrán rendezettebb állapotát jelzi. A CoG időbeli változásának sebessége a mikroviszkozitást tükrözi, ami az MCD hatására alacsonyabb, az SM-áz, myriocin és C1 kezelést követően nagyobb lesz.

### **A resolvin D1 és D2 megbontják a lipid raftok integritását**

Elsőként szolgáltatunk bizonyítékot arra, hogy a resolvinok a neuronok mellett az érzőidegvégződéseken is gátolják a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktiválódását a lipid raftok módosításával (7). A TG neuronokon végzett eredményeink megerősítik, hogy az RvD2 nanomoláris koncentrációban hatékony gátlószere a TRPV1 és TRPA1 receptoroknak. A DRG neuronokon végzett korábbi vizsgálatokkal ellentétben mi TG neuronokon kimutattuk, hogy RvD1 kezelés szignifikánsan csökkentette nem csak a TRPA1 de a TRPV1 ioncsatornát is, igaz magasabb, 10 nM-os koncentrációban. Az irodalmi adatokhoz hasonlóan az RvD2 kifejezettebb gátló hatást mutatott mind a TRPV1, mind a TRPA1 ioncsatornákon. Felmerült, hogy RvD1, specifikus GPR-eken keresztül fejtik ki hatásukat, hasonlóan és azonosították is DRV1/GPR32 nevű RvD1 receptort, valamint a GPR18-at mint RvD2 receptor és a resolvinok ezeken keresztül fejtik ki gátló hatásukat. Ugyanakkor a TRPV1- és TRPA1-expresszázó CHO sejteken is gátolták az ioncsatornák aktivációját 5-10 nM-os koncentrációban. Ezek a CHO sejtek nagy valószínűséggel nem tartalmazzák a resolvin receptorokat, ezért a két molekula gátló hatása

receptorfüggetlen, és minden valószínűség szerint a membrán mikrokörnyezetének megváltoztatásával magyarázható. Az eredmények, miszerint a PTX előkezelés nem befolyásolta a magasabb 10 nM RvD1 és RvD2 dózisok gátló hatását a TRPV1 és TRPA1 ioncsatorna aktivációjára TG neuronokban, szintén a G-proteintól független gátlási módra utalnak. Fluoreszcens spektroszkópiával igazoltuk, hogy az RvD1 és RvD2 koleszterin depléciót idéz elő, amely a folyadék-rendeztett fázisból rendezetlen fázisba való átmenetet okoz, így a lipid raftok szétesését okozzák (7).

### **A lipid raft diszrupció nem érinti a feszültségfüggő ioncsatornák működését**

Első vizsgálatainkban ezen a területen KCl alkalmazásával bizonyítottuk, hogy az enzim nem befolyásolja a feszültségfüggő kalcium csatornák működését (2). A KCl-indukált  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedés hátterében feszültségfüggő kálium és kalcium csatornák is szerepet játszanak. Az SM-áz által nem gátolt csatornákon megvalósuló összeadódó  $Ca^{2+}$  áram következtében emelkedett  $[Ca^{2+}]_i$ -t detektáltunk. Vizsgáltuk a lipid raft károsító kezelések (MCD, SM-áz) feszültségfüggő L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornákra kifejtett hatását is. A kezelések nem gátolták az FPL 64126 vagy veratridin által kiváltott feszültségfüggő L-típusú  $Ca^{2+}$  csatorna aktiválódását sem érző neuronokon sem érzőideg-végződéseken (8). Az MCD-kezelés nem gátolta az elektromos téringerlés által kiváltott CGRP felszabadulást az érzőideg-végződéseken sem. Elsőként szolgáltatunk bizonyítékot *in silico* modellezéssel arra, hogy a TRPV1 és TRPM3 és a Cav 1.3 feszültségfüggő L-típusú  $Ca^{2+}$  ioncsatornák aktiválódását eltérően befolyásolja a plazmamembránban körülöttük lévő koleszterin tartalma, míg a TRPV1 működését jelentősen befolyásolta az utóbbiakat nem. Az *in silico* vizsgálatokban a Cav 1.3 feszültségfüggő L-típusú  $Ca^{2+}$  ioncsatornák esete a TRPV1 és a TRPM3 között helyezkedik el, mivel a lazán kötött koleszterinmolekulák nagy csoportja az ioncsatorna transzmembrán régiójában található, az extracelluláris felszín előtt rejtve és így ezeket is nehezebb komplexképződéssel eltávolítani (8). Következésképpen a lipidmembrán környezet modulálja a TRPV1 ioncsatornák működését, de nem befolyásolja a TRPM3 csatornákét és a feszültségfüggő L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornákét.

### **A lipid raftok károsítása fájdalomcsillapító és gyulladásgátló hatáshoz vezet egérmodellekben**

A lipid raftok szerkezetének és integritásának vizsgálata, farmakológiai módosíthatóságának feltérképezése intenzíven kutatott terület. Az eredmények többsége *in vitro* rendszerekben született, és több esetben ellentmondásos. Kutatócsoportunk elsőként számolt be a lipid raft károsító anyagok *in vivo* fájdalomcsillapító és gyulladásgátló hatásáról (9, 10, 11).

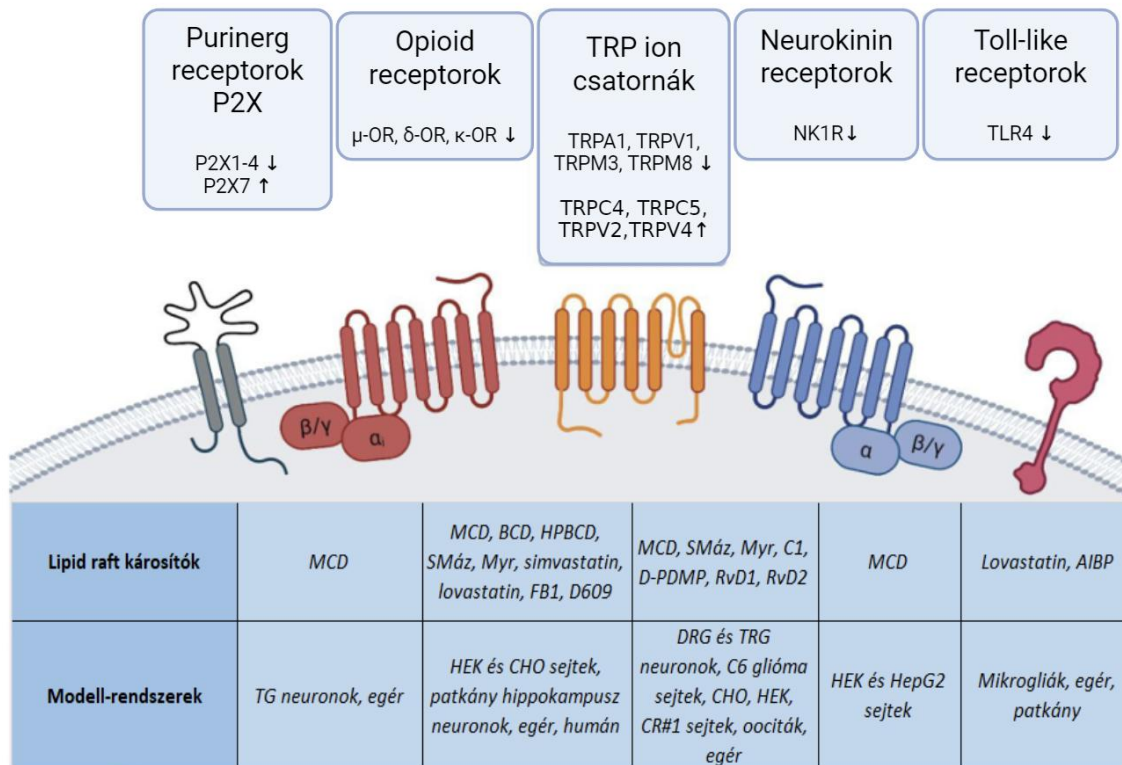
A koleszterin depléció C1-el és az MCD-vel egyaránt mérsékli a TRPV1- és TRPA1-aktiváció által kiváltott akut nocifenzív viselkedést, továbbá a C1 gátolta a TRPV1-stimuláció által indukált mechanikai allodínia kialakulását is (9). Mind a C1, mind az MCD szignifikánsan csökkentette a kapszaicin becseppentése által kiváltott szemtörlések számát. Ezenfelül a C1 szignifikánsan csökkentette az RTX által előidézett mechanikai allodíniát, amely centrális szenzitizációs mechanizmusokat is érint, ugyanakkor gátló hatása a túlnyomórészt perifériás szenzitizáció következtében kialakuló termális hiperalgéziára nem bizonyult statisztikailag

szignifikánsnak. Ezzel szemben az MCD nem befolyásolta az RTX által kiváltott nocifenzív reakciókat. Mindkét vegyület gátolta a formalin által kiváltott akut neurogén gyulladáson alapuló nocifenzív választ a második, neurogén gyulladáson alapuló fázisban. Bár több, és saját *in vitro* eredmény is igazolta, hogy a lipid raftok bontása befolyásolja a TRP ioncsatornák aktivációját (2, 3, 5), mindössze néhány, újabb *in vivo* vizsgálat áll rendelkezésre. Az MCD által indukált koleszterin depléció antinociceptív hatást váltott ki RTX-indukált mononeuropátiás egérmodellben a PIP2 hidrolízisének keresztül. Az MCD egyaránt csökkentette a CFA által indukált termális hiperalgéziát és mechanikai allodíniát patkányban. Feltételezhető, hogy az MCD megköti a prosztaglandinokat, így csökkentve a gyulladáson alapuló fájdalmat, ami új gyulladáscsökkentő és analgetikus lehetőséget kínálhat. A jelen *in vivo* adatok elsőként szolgáltatnak bizonyítékot arra, hogy az új C1 vegyület - a TRPV1 és TRPA1 körüli lipid raftok módosítása révén - antinociceptív és antihyperalgéziás hatást fejt ki. Mindkét csatorna aktivációja által kiváltott nocifenzív reakciókban megfigyelt maximális gátlás hasonló volt az MCD hatásához, ám 150-szer alacsonyabb koncentráció mellett. Ezenfelül a C1 hatásosnak bizonyult az RTX által kiváltott mechanikai hyperalgézia mérséklésében is, amelyre az MCD nem volt hatással. Összegzésként kijelenthetjük, hogy az új C1 vegyület értékes kísérleti eszköz a koleszterin depléció állatmodellekben való tanulmányozásához, és egyben új lehetőségeket nyithat meg az analgetikum-fejlesztésben.

Kutatócsoportunk elsőként igazolta, hogy a szfingomielin lebontása, illetve a szfingolipidek *de novo* szintézisének akadályozása hatékonyan mérsékli a TRPV1 és TRPA1 aktiválhatóságát, és ezzel antinociceptív hatást fejt ki (11).

Az első *in vivo* eredményeket közöltük azzal kapcsolatban, hogy az SM-áz és az MCD analgetikus hatást fejt ki az TRPM8 agonista icilin által kiváltott fájdalomra (10). Az icilin beadását követően mérhető nocifenzív viselkedés időtartamát mindkét vegyület szignifikánsan csökkentette. Korábbi *in vitro* vizsgálatainkban csak a karboxamido-szteroid C1 vegyület volt képes csökkenteni a PS által aktivált TRPM3 ingerelhetőségét natív TG neuronokon (5), *in vivo* nem fejtett ki analgetikus hatást a PS + CIM-0216 indukált fájdalommodellben.

Összefoglalva, az egérmodellekben nyert eredmények jelentős bizonyítékkal szolgálnak arra, hogy a lipid raftok megbontása *in vivo* antinociceptív, és gyulladásgátló hatást fejt ki. Bár a pontos mechanizmus még nem ismert, nagy valószínűséggel a lipid raftok integritásának megbomlása következtében a receptorok membránon belüli pozicionálása módosul, ami bizonyos kötőhelyek hozzáférhetőségét csökkenti és így a csatornák aktivációjának csökkenéséhez vezet. Ezt támasztják alá korábbi *in vitro* eredményeink is (2), melyekben kimutattuk, hogy a kapszaicin és az RTX által kiváltott TRPV1 aktiváció eltérő módon gátolható raft-károsítással, ami összefüggésben áll az aktiváció szempontjából kritikus aminosavpozíciókkal és a receptor-expresszió szintjével. Ezek az eredmények mind arra utalnak, hogy a TRP ioncsatornák és a plazmamembrán lipid komponensei közötti hidrofób kapcsolatok célzása potenciális perifériás analgetikus stratégiát jelenthet. Ismereteinket a fájdalommal összefüggő receptorok és a lipid raftok kapcsolatáról két review közleményben foglaltuk össze (1, 14) (9. ábra).



9. ábra: Fájdalommal összefüggő receptorok vizsgálata a lipid raft kutatásban, az alkalmazott lipid raft károsítókkal és modellrendszerekkel (Nehr-Majoros és mtsai, 2024).

### Különböző CD származékok szisztematikus *in silico*, *in vitro* és *in vivo* vizsgálata sejtek életképességére, mitokondrium funkcióra, membrán polarításra és TRPV1 és TRPA1 ioncsatorna funkcióra

A CD származékok szerkezet-hatás összefüggéseit nyolc, szerkezetében eltérő CD-származék sejtekre gyakorolt hatásával elemeztük. Meghatároztuk minden vizsgált CD-származék azon koncentrációját, amely még nem befolyásolja a sejtek életképességét. Ez a hatás erősen szerkezetfüggőnek bizonyult (12). A metilezett származékok alacsonyabb koncentrációban már csökkentették a sejtek életképességét, legkevésbé a RAMEB, a nem metilezett béta-származékok (HPBCD, SBECD, QABCD) kevésbé citotoxikusak, a gamma-származék HPGCD egyáltalán nem toxikus. Mások is leírták, hogy a metilcsoportok jelenléte növeli a citotoxicitást, amelyet a számuk és pozíciójuk tovább befolyásol. Vizsgálva a CHO sejtek mitokondriális működését, azt találtuk, hogy a 10 mM HPGCD, HPBCD és SBECD növelte a mitokondriális aktivitást. Ezzel szemben a RAMEB, a DIMEB-95 és a TRIMEB csökkentette. Minden vizsgált CD-származék jelentősen csökkentette a membránkoleszterin mennyiségét, az ionos származékok (SBECD és QABCD) kissé erősebb hatást mutattak az alkalmazott koncentrációkban, mint a metilezett származékok (RAMEB, DIMEB-95, TRIMEB). A hidroxipropilált származékok (HPGCD, HPBCD) szintén hasonló koleszterin depléciós képességgel rendelkeztek. A CD-koleszterin kölcsönhatás pontos mechanizmusa és sztöchiometriája továbbra is aktív kutatás tárgyát képezi. Az állandósult fluoreszcencia-emissziós és anizotrópia spektrumokból egyértelműen megállapítható volt, hogy a DIMEB-50- és RAMEB-kezelések a membrán rendezettségének jelentős csökkenését okozták. Ezek az adatok megegyeznek

korábbi, lipid raft-károsítókkal kapott eredményeinkkel (MCD, C1, myriocin, RvD) (3, 5, 6, 7). Elsőként igazoltuk, hogy a vizsgált CD-származékok koncentrációfüggően gátolják a TRPV1 és TRPA1 ioncsatornák aktivációját receptorokat expresszáló CHO sejteken. Általánosságban elmondható, hogy a metilezett CD-származékok erőteljesebben gátolták a TRP ioncsatornákat. Ezek az eredmények alátámasztják korábbi megfigyeléseinket, koleszterin depléción jelentősen csökkenti a TRP ioncsatorna aktivációt *in vitro* és *in vivo* egyaránt (2, 5, 9). Úgy véljük, hogy a TRP ioncsatornák gátlása vagy a csatornák membránbeli pozíciójának megváltozásából fakad, ami bizonyos kötőhelyeket elérhetetlenné tesz az agonisták számára, vagy pedig közvetlen fehérje-lipid hidrofób kölcsönhatások módosulásából. Emellett más ioncsatornák esetében (például TASK-1, TASK-3, Kv1.3) is felvetették a receptorok és CD-származékok direkt interakcióját, így ennek vizsgálata a TRP ioncsatornák esetében is indokolt.

A továbbiakban három ígéretes, szerkezetükben különböző CD hatását elemeztük, ezek a véletlenszerűen metilezett és neutrális  $\beta$ -CD, a RAMEB, a nem metilezett és neutrális (2-hidroxiopropil)- $\beta$ -CD HPBCD, valamint az anionos szulfobutil-éter  $\beta$ -CD nátriumsó, az SBECD a TRPV1- és TRPA1-aktiváció által kiváltott gyulladáscsökkentő és fájdalom modellekben egerekben (13). Kimutattuk, hogy mindhárom CD kezelés után csökkent a TRPA1 agonista formalin által kiváltott akut szomatikus nocifenzív reakció időtartama. Mindhárom CD-kezelés csökkentette az MO által kiváltott véráramlás-fokozódást egérfülből (13). A CD előkezelések szignifikánsan csökkentették az RTX által kiváltott mechanikai allodíniát, míg nem érintették a termális hiperalgéziát, ez klinikailag előnyös lehet, mivel a TRPV1 és TRPA1 hőérzékenysége miatt ez komoly kockázatot jelent (pl. égési sérülések). Egy másik vizsgálatban korábban kimutatták, hogy lokális és szisztémás RAMEB kezelés csökkentette a Komplet Freund adjuváns által kiváltott termális és mechanikai hiperalgéziát.

*In silico* vizsgálataink (13) feltárták, hogy a metilált RAMEB koleszterin-kötési módja bizonyos eltéréseket mutat a nem metilált HPBCD és SBECD kötési módjához képest, stabilabb 2:1 RAMEB:koleszterin komplexet tud létrehozni, a másik két származék 1:1 arányú komplexet képez, ez egybevág irodalmi adatokkal. Önmagukban is kedvező farmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek több kórállapotban (pl. lizoszomális tárolási betegségek, neurodegeneratív kórképek). Ugyanakkor analgetikus és gyulladáscsökkentő potenciáljuk továbbra is kevésbé feltárt.

Eredményeink megerősítik, hogy a lipid raftok integritásának megbontása különösen a koleszterin eltávolítása révén jelentősen befolyásolja a TRP ioncsatornák működését, és a CD-származékok megfelelő eszköznél bizonyulnak e folyamat vizsgálatára. Mivel a különböző CD-származékok kémiai szerkezetének eltérései számottevő biológiai hatáskülönbségeket eredményeznek, a megfelelő származék megválasztása kulcsfontosságú. Kimutattuk, hogy a metilcsoportok száma és pozíciója jelentősen befolyásolja mind a koleszterin depléción mértékét, mind a citotoxicitást. Ugyanakkor a kevésbé toxikus, nem metilezett CD-származékok is hatékonyan csökkentik a TRP-csatorna aktivációját lipid raft bontás révén. Bár a CD-kezelések potenciális szisztémás toxicitását figyelembe kell venni, elsősorban lokálisan alkalmazható, perifériás analgetikumként komoly gyógyszerfejlesztési potenciállal

rendelkezhetnek, különösen krónikus fájdalommal járó kórképekben, ahol ezen ioncsatornák túlaktivációja kulcsszerepet játszik.

Az új fájdalomcsillapítók fejlesztésének nehézségei és kihívásai miatt az alternatív gyógyszerfejlesztési lehetőségek egyre inkább előtérbe kerülnek. Számos *in vitro* és *in vivo* lipid raft kutatási eredmény alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a membrán lipidösszetételének és szerkezetének szfingolipid- vagy koleszterin-csökkentéssel történő célzása modulálhatja a termo- és mechanoszenzációban kulcsszerepet játszó receptorok működését. A lipid raftot károsító vegyületek a plazmamembrán lipid raft régióiban található összes receptor és jelátviteli molekula működését befolyásolják. Nagy kihívás egyetlen sejt típusra vagy receptorra szelektív hatást elérni. Ez terápiás lehetőségeik komoly korlátozó tényezője. Nem szelektív hatásuk miatt ezek a vegyületek inkább helyi készítményekként alkalmazhatók a klinikumban. Ezen kihívások és nehézségek ellenére úgy véljük, hogy ez a megközelítés jövőbeli perspektívákat nyithat meg a krónikus gyulladásos, neuropátiás vagy daganatos fájdalom terápiájában, legfőképpen a periférián hatva.

## **V. 2. AZ ÚJ SSAO-GÁTLÓ OXIM VEGYÜLET, AZ SZV-1287 KÖZVETLEN TRPA1 ÉS TRPV1 ANTAGONISTA HATÁSAI**

Jelenleg nem állnak rendelkezésre olyan perifériásan ható analgetikumok, amelyek közvetlenül gátolni tudnák a nociceptor-aktivációt, és ezáltal fájdalomcsillapító hatást eredményeznének. Ezért a TRPA1 és TRPV1 ioncsatornák működési sajátosságainak, aktivációs mechanizmusainak jobb megismerése többek között a gyógyszerfejlesztés szempontjából is kiemelten fontos. E célból vizsgáltuk SSAO-enzim gátlására kifejlesztett SZV-1287 vegyületünket, hogy lássuk milyen hatást fejt ki a TRPA1 és TRPV1 aktivációjára natív érző neuronok sejttestjén, perifériás érzőideg-végződéseken, valamint TRPA1 és TRPV1 receptort expresszáló CHO sejt vonalakon. Elsőként igazoltuk, hogy a SZV-1287 mindkét kationcsatornán kifejezett antagonistát hatást fejt ki (15). A különböző szerkezetű referencia SSAO-gátló, az LJP 1207 nem befolyásolta a TRPA1 és TRPV1 aktivációját, ami arra utal, hogy a SZV-1287 ezen hatásai függetlenek az SSAO-gátlástól.

Az SZV-1287 szignifikánsan, koncentrációfüggő módon gátolta a TRPA1-receptor aktiváció által kiváltott CGRP-felszabadulást, azonban a sejttesteken tapasztaltakkal ellentétben a TRPV1-receptor aktiváció esetében ez a gátlás nem volt szignifikáns. Bár további vizsgálatok szükségesek a sejttesteken és idegvégződéseken észlelt TRPV1-aktiváció-okozta különbségek pontos molekuláris mechanizmusainak feltárásához, feltételezésünk szerint a sejttestben a kapszaicin viszonylag csekély  $Ca^{2+}$ -beáramlást vált ki, amelyet az ER gyorsan felvesz a citoplazmából. Ezzel szemben ugyanez a mértékű receptoraktiváció az idegvégződésben már elegendő lehet a CGRP-felszabadulás kiváltásához, mivel ott nincs jelen ER vagy Golgi-apparátus. Ezt a koncepciót alátámasztják korábbi kísérleteink is, amelyekben eltéréseket írtunk le a TRPV1 kapuzási mechanizmusában e struktúrák között (1). Egyes adatok arra is utalnak, hogy kapcsolat lehet a COX-aktivitás, a prosztaglandinok és a TRPA1 aktiváció között.

Mivel az SZV-1287 bejut az agyba és TRPV1 antagonistá hatással rendelkezik, megvizsgáltuk termoregulációs biztonságosságát. Közismert, hogy a TRPV1 receptorok kulcsszerepet játszanak a termoregulációban, és számos TRPV1 antagonistá fejlesztése mind a preklinikai, mind a klinikai fázisban kudarcot vallott hipertermiás hatásuk miatt. Ezért a gyógyszerhatóságok előírják az új TRPV1 antagonisták hipertermia preklinikai vizsgálatát. Mivel a TRPV1 aktiváció protonmódjának blokkolása elsősorban felelős ezért a hatásért, először az SZV-1287 proton által indukált TRPV1 aktivációra gyakorolt hatását vizsgáltuk (16). Az SZV-1287 szignifikánsan csökkenti a protonok által indukált TRPV1 által közvetített kalciumbeáramlást TG neuron tenyészetben, hasonlóan a kapszaicin által kiváltott válaszokhoz (16), ami növeli a hipertermia potenciális kockázatát. Viszont az SZV-1287 két különböző kísérleti paradigmában sem befolyásolta jelentősen a mély testhőmérsékletet.

Összefoglalva, az SZV-1287 TRPA1- és TRPV1-antagonista hatása szenzoros neuronokon hozzájárulhat a vegyület kutatócsoportunk által leírt fájdalomcsillapító és gyulladásgátló hatásaihoz *in vivo* állatmodellekben. Ebben a kutatásban az előzőekben leírt *in vitro* vizsgálatokkal vettem részt. Azonban kutatócsoportunk széles körű *in vivo* vizsgálatokat folytatott és folytat jelenleg is a vegyülettel. Leírtuk, hogy új, többcélpontú gyógyszerjelöltünk, az SZV-1287 gátolja a neuropátiás mechanikai hiperalgéziát egerekben. Gyorsan behatol az agyba, ami legalább részben egy központi hatásmechanizmusra utal, amely részt vesz fájdalomcsillapító hatásában. Hőszabályozó biztonságosságát igazoltuk annak ellenére, hogy képes antagonistálni a TRPV1 receptort (15). A kutatócsoport szabadalmában az SZV-1287 neuropátiás körülmények között kifejtett fájdalomcsillapító hatására összpontosít. Különböző krónikus ízületi gyulladás modellben bizonyítottuk antihiperalgéziás hatását, és tisztáztuk a TRPA1 és TRPV1 receptorok szerepét a hatásmechanizmusában i.p. beadás után. Az SZV-1287 gyógyszerfejlesztési folyamatát 2016-ban kezdtük meg, fő indikációként a neuropátiás fájdalomra, és nemrégiben benyújtottuk a preklinikai dokumentációt, amely tartalmazza a vegyület és az enteroszolvens készítmény kémiai, analitikai, technológiai, farmakodinamikai, farmakokinetikai és toxikológiai profilját. Sikerült bizonyítani, hogy már egyetlen enteroszolvens kapszulákban történő kezelés után csökkenti a neuropátiás hiperalgéziát. Ez az eredmény összhangban van a korábbi, ugyanebben a modellben i.p. adagolás utáni eredményeinkkel. Jelenleg a Fázis Ia humán klinikai vizsgálat sikerrel lezajlott egészséges önkénteseken.

### **V. 3. AZ SST4 RECEPTORON HATÓ CST-14 ÉS ÚJ, KISMOLEKULÁS AGONISTÁK HATÁSAI**

A CST-14-el végzett összehasonlító kísérleteink eredményei alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a szomatosztatin és a CST az SST1 és SST4 receptorokon nagyon hasonló kötődési profillal és agonista tulajdonságokkal rendelkezik (17). Korábbi adataink bizonyították, hogy a szomatosztatin gyulladásgátló és antinociceptív hatásait elsősorban ezek a receptorok közvetítik. Jelen vizsgálataink újdonsága abban áll, hogy *in vitro* és *in vivo* kísérletekben egyaránt igazoltuk, hogy mindkét peptid jelentősen gátolja a szenzoros neuropeptid CGRP felszabadulását a perifériás érzőideg-végződésekből, mérsékli az ennek következtében kialakuló akut plazmafehérje-extravazációt, valamint csökkenti a hő- és

mechanikai hiperalgéziát. Eredményeinket alátámasztják Capuano és munkatársai 2011-ben publikált adatai is, amelyek szerint a CST és a szomatosztatin érző neuronokon gátolja a kémiai inger által kiváltott CGRP-fel szabadulást. Bár a neurogén gyulladásra és a hiperalgéziára nagyon hasonló mértékű gátló hatást fejtenek ki, a CST-14 a gyulladás sejtes komponenseit tekintve erősebb gátló hatást fejt ki, például az egér talpbőr karragén-indukálta TNF $\alpha$ -szintézisére. A karragén által kiváltott lábduzzanatot és mechanikai hiperalgéziát, amelyek neurogén és nem neurogén komponenseket egyaránt tartalmazznak, a két peptid hasonló mértékben csökkentette. Kimutatták, hogy CST-14 mRNS expressziója szomatosztatin génhiányos állatokban nem növekszik, ami arra utal, hogy a CST nem csupán a szomatosztatin egyik szerkezeti variánsaként fogható fel. Mivel eredményeink szerint a CST az akut neurogén gyulladást és a hiperalgéziát a szomatosztatinhoz hasonló mértékben csökkentette, nagy valószínűséggel a szenzoros idegvégződéseken található SST1 és SST4 receptorok aktivációja játszik szerepet e hatások közvetítésében. Bár a nem szelektív szomatosztatin receptor antagonisták cikloszomatosztatin teljes mértékben kivédte a szomatosztatin hatásait, a CST hatását csak részlegesen blokkolta, ami arra utal, hogy a CST bizonyos gyulladáscsökkentő sejt funkciókat a szomatosztatin receptoroktól eltérő mechanizmusokon vagy más receptorokon keresztül is kifejthet.

A SST4 szomatosztatin receptor homológiamodellezéssel felépített 3D szerkezete új lehetőségeket nyit meg olyan gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatású hatóanyagjelöltek racionális tervezésében, amelyek teljesen új hatásmechanizmussal rendelkeznek (18, 19, 20). A modell segítségével előrejeleztük a szabadalmaztatott új kismolekulás vegyületeink kötődési tulajdonságait, receptoraktiváló képességét SST4-et expresszáló sejtvonalon, valamint *in vivo* gyulladáscsökkentő és antihiperalgéziás hatásait patkánymodellekben. Az új SST4 ligandok tervezése jelentős kihívást jelent, mivel az RNS-szekvenciákon alapuló számításokon túl jelenleg nem áll rendelkezésre kísérletes, atomfelbontású szerkezet a receptorhoz. Ugyanakkor az SST4 agonisták fejlesztése kiemelt jelentőségű, mivel olyan klinikai igényeket céloznak, mint a neuropátiás fájdalom és a neurogén gyulladás – amelyek esetében a jelenlegi terápiák nem kielégítőek. Ennek érdekében építettük fel az SST4 receptor atomfelbontású modelljét homológiamodellezéssel. Az atomfelbontású szerkezet birtokában egy reprezentatív ligandszett segítségével teszteltük a modell hasznosságát a ligandtervezésben, köztük magas és alacsony affinitású vegyületeket, valamint referenciaként a szuperagonista J-2156-ot is. A modell és a dokkolási eljárások képesek voltak szerkezetileg megkülönböztetni a pozitív és negatív kontroll ligandokat, illetve a hozzájuk tartozó magas és alacsony affinitású kötőhelyeket. Ez azt jelzi, hogy a modell kiváló alapot biztosít az új ligandok szerkezeti összehasonlításához és tervezéséhez.

A dokkolási eredmények szerint az SST4 szerkezetében magas és alacsony affinitású kötőhelyek egyaránt találhatóak. A **compound 1** saját molekulánk a magas affinitású H2 kötőzsebbe illeszkedik, hasonlóan a J-2156-hoz. Ugyanakkor a jelölt szomatosztatint csak 22,14%-ban szorította ki, ami magyarázható azzal, hogy a szomatosztatin több kötőhelyhez (L vagy H1) is képes kapcsolódni. Ezt alátámasztja, hogy valamennyi vizsgált vegyület [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-aktivációja hasonló mértékű volt a J-2156-éhoz és az NNC 26-9100-éhoz. Az *in silico* modellezési eredmények a második lépcsőben vizsgált saját kismolekulás vegyületeink

esetén is azt mutatták, hogy a vegyületek hasonló kötődési energiával és a referencia-agonistákhoz átfedő kötőhellyel kapcsolódnak az SST4 receptorhoz.

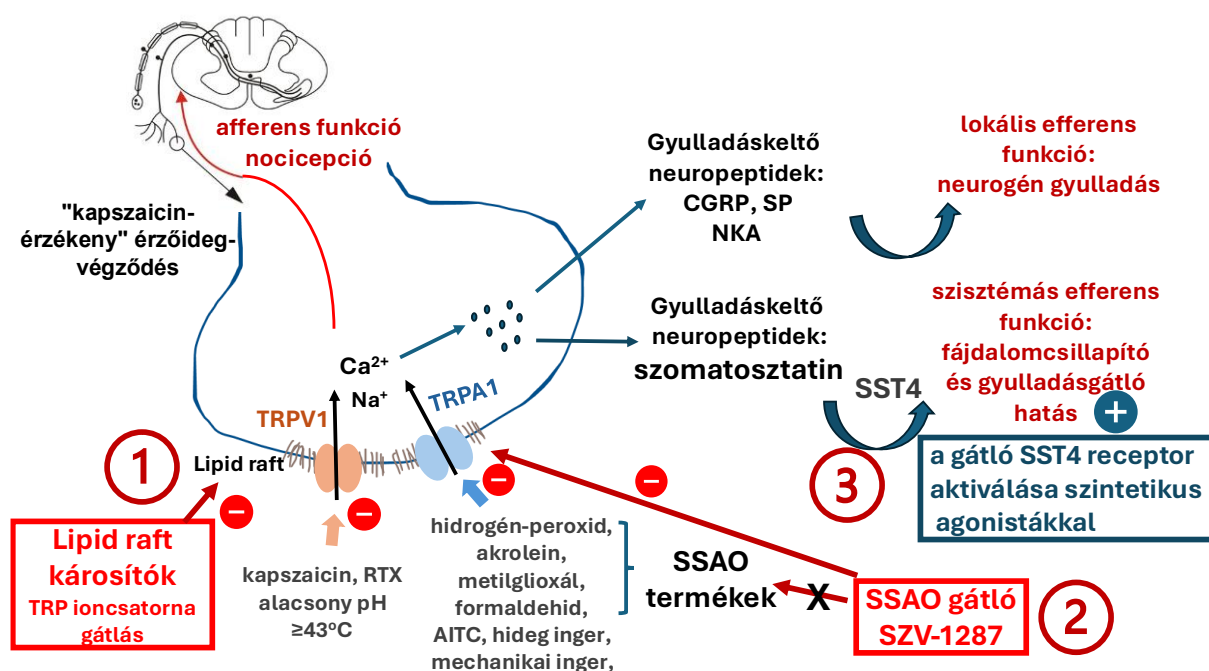
Bár az *in vitro* módszerek egyértelműen igazolják a kötődést és a receptoraktiválást, az SST4 ligandok terápiás jelentősége főként *in vivo* kísérletekben ítéhető meg. Az MO helyi alkalmazása patkányon jól jellemzi az akut gyulladás neurogén komponensét. Legfontosabb *in vivo* eredményeink egyike, hogy a 100 µg/kg dózisban orálisan adott vegyületeink (első sorozat - compound 1-5) 40–60%-kal csökkentette az akut neurogén plazmaextravazációt. Ez alapján ígéretes jelöltek lehetnek akut vaszkuláris gyulladás csökkentésére. A heptapeptid TT-és a nempeptid J-2156 szintén csökkentette az MO által kiváltott extravazációt, míg a diclofenac és a COX-2 gátló meloxicam korábban nem mutattak hatást. Fő hátrányuk azonban, hogy egyik sem adható szájon át. A traumás eredetű neuropátiás fájdalom komplex mechanizmus, amely perifériás és centrális idegrendszeri folyamatokat egyaránt érint. A peptiderg szenzoros idegek aktivációja súlyos fájdalmat, hiperalgéziát, ödémát és gyulladásos kaszkádot indít el – mindez jelenleg kielégítően nem kezelhető. A neuropátiás fájdalom terápiájában az opioidok és a COX-gátlók hatástalanok. A centrális idegrendszerre ható adjuváns fájdalomcsillapítók erős mellékhatásaik miatt problémásak. A neuropátiás fájdalom egyik legszélesebb körben alkalmazott modellje a részleges ülőideg-lekötés. Jelen értekezésben több, szájon át adható, nempeptid SST4 agonista 28–62%-os hiperalgézia-gátlást váltott ki. Bár a J-2156 hatásosságát más modellekben igazolták szájon át az nem alkalmazható. A Lipinski-féle „Rule of Five” (RO5) alapján végzett értékelés egyértelműen megerősítette, hogy ezek a molekulák „drug-like” tulajdonságokkal rendelkeznek. A RO5-t az orálisan alkalmazható gyógyszerjelöltek vízdoldékonyságának és bélrendszeri permeabilitásának előrejelzésére fejlesztették ki. Mivel ezen vegyületek a központi idegrendszert célozzák, és az orális alkalmazhatóság kívánatos, a Lipinski-analízis alapján valószínűsíthető, hogy jó biohasznosulással és a vér–agy gáton való átjutással rendelkeznek.

Összefoglalva, jellemeztük az új, szájon át adható szabadalmaztatott 4-fenetilamino-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin származékok SST4 agonista tulajdonságait *in vitro* receptoraktivációs vizsgálatokban, és bemutattuk gyulladásgátló és antihiperalgéziás hatásaikat patkány neurogén gyulladás és krónikus neuropátiás fájdalom modelljeiben. Eredményeink bizonyítják, hogy az új pirrolo-pirimidin ligandumok „drug-like” tulajdonságú SST4 agonisták, és meggyőző bizonyítékot nyújtanak krónikus neuropátiás fájdalom gátlására. Ennek megfelelően ígéretes kiindulópontot jelentenek egy olyan új analgetikumcsalád fejlesztéséhez, amely valódi megoldást nyújthat egy jelenleg nagyrészt kielégítetlen klinikai igényre, tehát jelentős terápiás potenciált látunk ezekben az SST4 agonistákban. Hatásmechanizmusuk számos vonásában hasonlít az opioid agonistákéhoz: Gi-fehérjéhez kapcsolt, jellemzően preszinaptikus receptorok aktiválásával csökkentik a proinflammatorikus és pronociceptív mediátorok felszabadulását a perifériás és centrális nociceptív végződésekből. Mivel az SST4 nem vesz részt a szomatosztatín endokrin hatásaiban, a mellékhatásprofil kedvezőnek várható. A gyógyszerfejlesztési érdeklődést jól jelzi, hogy a Lilly licencszerződést kötött az SST4 agonista CNTX-0290-re, amelynek II. fázisú klinikai vizsgálata lezárult (<https://centrexion.com>).

## VI. KONKLÚZIÓ ÉS HASZNOSÍTHATÓSÁG

1. A lipid raftok megbontása *in vitro* TRP ioncsatorna aktiváció csökkenéssel és *in vivo* antinociceptív és gyulladásgátló hatással jár. A TRP ioncsatornák és a plazmamembrán lipid komponensei közötti hidrofób kapcsolatok terápiás célpontok lehetnek, lipid raft károsító anyagok topikális alkalmazása perifériás analgetikus stratégiát jelenthet a jövőben.
2. Az SSAO-gátló kismolekulás vegyületünknek, az SZV-1287-nek kettős TRPV1 és TRPA1 gátló hatása van, amely hozzájárulhat *in vivo* fájdalomcsillapító és gyulladásgátló hatásához egérmodellekben. A vegyület Fázis II. vizsgálatát neuropátiás fájdalom indikációval szeretnénk elkezdeni.
3. Kismolekulás receptor agonistáink az SST4-es receptoron hatva gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatást képesek kifejteni. A szabadalmaztatott agonisták preklinikai vizsgálatai jelenleg is folynak.

E három pilléren alapuló kutatási eredményeinket, melyek alátámasztják a kutatási koncepciónkot összefoglalva a **10. ábrán** mutatom be.



**10. ábra: Kutatási koncepciónk** - Fájdalomcsillapító és gyulladásgátló hatás a lipid raft károsító anyagok (1), az SSAO gátló SZV-1287 (2) és az SST4 receptort aktiváló agonisták alkalmazásával (3).

## ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Elsőként írtuk le, hogy mind a koleszterin depléció, mind a szfingomielin depléció gátolja a TRPV1, TRPA1 és TRPM8 ioncsatornák aktivációját érző neuronokon, perifériás érzőideg-végződéseken és TRPV1 vagy TRPA1 receptort expresszáló CHO sejteken. A TRPM3 receptor aktivációját csak a C1 karboxamido-szteroid vegyületünk volt képes gátolni, mely értékes kísérleti eszköz lehet a koleszterin depléció tanulmányozásához. Bizonyítottuk, hogy a lipid raft károsító kezelések ugyanakkor a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  - ioncsatornák működését nem befolyásolják sem érzőneuronokon sem érzőideg-végződéseken. *In silico* bizonyítottuk a különbségeket TRPV1, TRPM3 és Cav 1.3 feszültségfüggő L-típusú  $Ca^{2+}$  ioncsatornák és a lipid raftok koleszterin molekulái között kialakuló kötődési módok között. Bizonyítottuk az endogén TRPV1 és TRPA1 antagonistáknak az ioncsatorna gátlást a lipid raft károsító hatásukkal együtt is elérhetik.
2. Szerkezet-hatás összefüggéseket vizsgáltunk különböző struktúrájú CD származékokkal történő kezelés után. *In silico* modellezéssel jellemeztük a CD-koleszterin kötéseket metilezett és nem metilezett CD származékok esetén.
3. Jellemeztük a lipid raft károsító anyagok hatását a membránpolaritásra és membránfluiditásra.
4. Elsőként írtuk le a lipid raft károsító anyagok fájdalomcsillapító és gyulladásgátló hatásait *in vivo* fájdalom és gyulladás egér modelljeiben. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a receptorműködés szabályozásában fontos szerepet játszanak a hidrofób kapcsolatok. Ezen megfigyelések nyomán felmerül egy alternatív gyógyszerfejlesztési szemlélet, irányvonal lehetősége, melyhez elengedhetetlen a ligandum-receptor interakcióban a hidrofób kapcsolatok vizsgálata.
5. Elsőként írtuk le, hogy az SZV-1287 vegyületünknek kettős, TRPV1 és TRPA1 antagonistáknak hatása van érző neuronokon, perifériás érzőideg-végződéseken és TRPV1 vagy TRPA1 receptort expresszáló CHO sejteken.
6. Bizonyítottuk, hogy a CST-14 molekula kötődik az SST4 receptorhoz, és aktiválja azt, valamint leírtuk gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatásait állatkísérletes modellekben.
7. Bizonyítottuk, hogy saját fejlesztésű, szabadalmaztatott, szájon át adható pirrolo-pirimidin vegyületeink SST4 receptoron keresztül hatnak. Létrehoztuk az SST4 receptor homológia modelljét *in silico*, és ebben tesztelni tudjuk a potenciális SST4 receptor agonista vegyületeket. Bizonyítottuk a vegyületek fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatását neurogén gyulladás és neuropátiás fájdalom *in vivo* állatkísérletes modelljeiben.

## A DOKTORI ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

(Az értekezésben arab számmal vastag betűtípussal hivatkozom rájuk)

1. Nehr-Majoros AK, Király Á, Helyes Z, **Szőke É.**: Lipid raft disruption as an opportunity for peripheral analgesia. *Curr Opin Pharmacol.* 2024, 75:102432. doi: 10.1016/j.coph.2024.102432. (IF: 2,737, Q1, független idéző: 7)
2. **Szoke E**, Börzsei R, Tóth DM, Lengli O, Helyes Z, Sándor Z, Szolcsányi J.: Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. *Eur J Pharmacol.* 2010, 628(1-3):67-74. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.11.052. (IF: 4,619, Q2, független idéző: 73)
3. Sággy É, **Szőke É**, Payrits M, Helyes Z, Börzsei R, Erostyák J, Jánosi TZ, Sétáló G Jr, Szolcsányi J.: Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca<sup>2+</sup>-gating of Transient Receptor Potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals. *Pharmacol Res.* 2015, 100:101-16. doi: 10.1016/j.phrs.2015.07.028. (IF: 4,816, D1, független idéző: 72)  
*megosztott első szerzőség*
4. Szánti-Pintér E, Wouters J, Gömörý Á, Sággy É, **Szőke É**, Helyes Z, Kollár L, Skoda-Földes R.: Synthesis of novel 13 $\alpha$ -18-norandrostane-ferrocene conjugates via homogeneous catalytic methods and their investigation on TRPV1 receptor activation. *Steroids.* 2015, 104:284-93. doi: 10.1016/j.steroids.2015.10.016. (IF: 2,513, Q2, független idéző: 3)
5. Sággy É, Payrits M, Bíró-Sütő T, Skoda-Földes R, Szánti-Pintér E, Erostyák J, Makkai G, Sétáló G Jr, Kollár L, Kőszegi T, Csepregi R, Szolcsányi J, Helyes Z, **Szőke.**: Carboxamido steroids inhibit the opening properties of transient receptor potential ion channels by lipid raft modulation. *J Lipid Res.* 2018, 59(10):1851-1863. doi: 10.1194/jlr.M084723. (IF: 4,743, D1, független idéző: 16)
6. Horváth Á, Erostyák J, **Szőke É.**: Effect of Lipid Raft Disruptors on Cell Membrane Fluidity Studied by Fluorescence Spectroscopy. *Int J Mol Sci.* 2022, 23(22):13729. doi: 10.3390/ijms232213729. (IF: 5,6, D1, független idéző: 21)
7. Payrits M, Horváth Á, Bíró-Sütő T, Erostyák J, Makkai G, Sággy É, Pohóczky K, Kecskés A, Kecskés M, Szolcsányi J, Helyes Z, **Szőke É.**: Resolvin D1 and D2 Inhibit Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Ankyrin 1 Ion Channel Activation on Sensory Neurons via Lipid Raft Modification. *Int J Mol Sci.* 2020, 21(14):5019. doi: 10.3390/ijms21145019. (IF: 5,924, D1, független idéző: 17)
8. Payrits M, Zsidó BZ, Nehr-Majoros AK, Börzsei R, Helyes Z, Hetényi C, **Szőke É.**: Lipid raft disruption inhibits the activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 1, but not TRP Melastatin 3 and the voltage-gated L-type calcium channels in sensory neurons. *Front Cell Dev Biol.* 2024, 12:1452306. doi: 10.3389/fcell.2024.1452306. (IF: 4,3, Q1, független idéző: 2)
9. Horváth Á, Bíró-Sütő T, Kántás B, Payrits M, Skoda-Földes R, Szánti-Pintér E, Helyes Z, **Szőke É.**: Antinociceptive Effects of Lipid Raft Disruptors, a Novel Carboxamido-Steroid and Methyl  $\beta$ -Cyclodextrin, in Mice by Inhibiting Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Ankyrin 1 Channel Activation. *Front Physiol.* 2020, 11:559109. doi: 10.3389/fphys.2020.559109. (IF: 4,566, Q2, független idéző: 9)

10. Horváth Á, Steib A, Nehr-Majoros A, Kántás B, Király Á, Racskó M, Tóth BI, Szánti-Pintér E, Kudová E, Skoda-Földes R, Helyes Z, **Szőke É.:** Anti-Nociceptive Effects of Sphingomyelinase and Methyl-Beta-Cyclodextrin in the Icilin-Induced Mouse Pain Model. *Int J Mol Sci.* 2024, 25(9):4637. doi: 10.3390/ijms25094637. (IF: 4,9, D1, független idéző: 3)
11. Horváth Á, Payrits M, Steib A, Kántás B, Biró-Süt T, Erostyák J, Makkai G, Sággy É, Helyes Z, **Szőke É.:** Analgesic Effects of Lipid Raft Disruption by Sphingomyelinase and Myriocin via Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Ion Channel Modulation. *Front Pharmacol.* 2021, 11:593319. doi: 10.3389/fphar.2020.593319. (IF: 5,988 Q1, független idéző: 9)
12. Nehr-Majoros AK, Erostyák J, Fenyvesi É, Szabó-Meleg E, Szöcs L, Sétáló G Jr, Helyes Z, **Szőke É.:** Cyclodextrin derivatives decrease Transient Receptor Potential vanilloid 1 and Ankyrin 1 ion channel activation via altering the surrounding membrane microenvironment by cholesterol depletion. *Front Cell Dev Biol.* 2024, 12:1334130. doi: 10.3389/fcell.2024.1334130. (IF: 4,3, Q1, független idéző: 3)
13. Nehr-Majoros A, Karakai L, Payrits M, Bencze N, Kemény Á, Sétáló G Jr, Börzsei R, Hetényi C, Helyes Z, **Szőke É.:** Cyclodextrins inhibit TRPV1 and TRPA1 activation-induced nociception via cholesterol depletion. *J Lipid Res.* 2025, 66(7):100844. doi: 10.1016/j.jlr.2025.100844. (IF: 4,1, Q1)
14. Pintér E, Helyes Z, **Szőke É,** Bölcseki K, Kecskés A, Pethő G.: The triple function of the capsaicin-sensitive sensory neurons: In memoriam János Szolcsányi. *Temperature*(Austin). 2022, 10(1):13-34. doi: 10.1080/23328940.2022.2147388. (IF: 0, Q1, független idéző: 1)
15. Payrits M, Sággy É, Mátyus P, Czompa A, Ludmerczki R, Deme R, Sándor Z, Helyes Z, **Szőke É.:** A novel 3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl)propanal oxime compound is a potent Transient Receptor Potential Ankyrin 1 and Vanilloid 1 (TRPA1 and V1) receptor antagonist. *Neuroscience.* 2016, 324:151-62. doi: 0.1016/j.neuroscience.2016.02.049. (IF: 3,277, Q1, független idéző: 19)
16. Horváth ÁI, Szentes N, Tékus V, Payrits M, **Szőke É,** Oláh E, Garami A, Fliszár-Nyúl E, Poór M, Sár C, Kálai T, Pál S, Percze K, Scholz ÉN, Mészáros T, Tóth B, Mátyus P, Helyes Z.:Proof-of-Concept for the Analgesic Effect and Thermoregulatory Safety of Orally Administered Multi-Target Compound SZV 1287 in Mice: A Novel Drug Candidate for Neuropathic Pain. *Biomedicines.* 2021, 9(7):749. doi: 10.3390/biomedicines9070749. (IF: 4,757, Q1, független idéző: 5)
17. Markovics A, **Szoke É,** Sándor K, Börzsei R, Bagoly T, Kemény Á, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z.: 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, 6(1):40-50. doi: 10.1007/s12031-011-9577-4 (IF: 2,891, Q1, független idéző: 26)
18. **Szőke É,** Bálint M, Hetényi C, Markovics A, Elekes K, Pozsgai G, Szűts T, Kéri G, Örfi L, Sándor Z, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z.: Small molecule somatostatin receptor subtype 4 (SST4) agonists are novel anti-inflammatory and analgesic drug candidates. *Neuropharmacology.* 2020, 178:108198. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108198 (IF: 5,251, Q1, független idéző: 4)

19. Kántás B, **Szóke 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.: *In Silico, In Vitro* and *In Vivo* Pharmacodynamic Characterization of Novel Analgesic Drug Candidate Somatostatin SST4 Receptor Agonists. *Front Pharmacol.* 2021, 11:601887. doi: 10.3389/fphar.2020.601887 (IF: 5,988, Q1, független idéző: 4)  
*megosztott első szerzőség*
20. Kántás B, Börzsei R, **Szóke É**, Bánhegyi P, Horváth Á, Hunyady Á, Borbély É, Hetényi C, Pintér E, Helyes Z.: Novel Drug-Like Somatostatin Receptor 4 Agonists are Potential Analgesics for Neuropathic Pain. *Int J Mol Sci.* 2019, 20(24):6245. doi: 10.3390/ijms20246245. (IF: 4,556, Q1, független idéző: 12)

### **Publikációs mutatók (MTMT szerint 2025 november 25)**

Az értekezésben tárgyalt közlemények összesített impakt faktora: **94,605**

Az értekezésben tárgyalt első, utolsó és levelező szerzős közlemények összesített impakt faktora: **79,888**

Összesített impakt faktor: **265,087**

Első, utolsó és levelező szerzős közlemények független idézeteinek száma: **391**

Független idézetek száma: **1237**

Idézetek száma összesen: **1639**

### **ELSŐ/UTOLSÓ SZERZŐS EGYÉB KÖZLEMÉNYEK:**

Hudhud L, Rozmer K, Kecskés A, Pohóczky K, Bencze N, Buzás K, **Szóke É**, Helyes Z.: Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Ion Channel Is Expressed in Osteosarcoma and Its Activation Reduces Viability. *Int J Mol Sci.* 2024, 25(7): 3760. doi: 10.3390/ijms25073760.  
*megosztott utolsó szerzőség*

**Szóke É**, Helyes Z.: Molecular Links between Sensory Nerves, Inflammation, and Pain 2.0. *Int J Mol Sci.* 2023, 24(15): 12243. doi: 10.3390/ijms241512243.

Hudhud L, Chisholm DR, Whiting A, Steib A, Pohóczky K, Kecskés A, **Szóke É**, Helyes Z.: Synthetic Diphenylacetylene-Based Retinoids Induce DNA Damage in Chinese Hamster Ovary Cells without Altering Viability. *Molecules.* 2022, 27(3):977. doi: 10.3390/molecules27030977.  
*megosztott utolsó szerzőség*

Borbély É, Hunyady Á, Pohóczky K, Payrits M, Botz B, Mócsai A, Berger A, **Szőke É**, Helyes Z.: Hemokinin-1 as a Mediator of Arthritis-Related Pain via Direct Activation of Primary Sensory Neurons. *Front Pharmacol.* 2021, 11: 594479. doi: 10.3389/fphar.2020.594479. eCollection 2020.

megosztott utolsó szerzőség

Payrits M, Sággy É, Cseko K, Pohóczky K, Bölskei K, Ernszt D, Barabás K, Szolcsányi J, Ábrahám IM, Helyes Z, **Szoke É**.: Estradiol Sensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in Pain Responses. *Endocrinology.* 2017, 158(10): 3249-3258. doi: 10.1210/en.2017-00101.

Sággy É, Payrits M, Helyes Z, Reglődi D, Bánki E, Tóth G, Couvineau A, **Szőke É**.: Stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 6-38, M65 and vasoactive intestinal polypeptide 6-28 on trigeminal sensory neurons. *Neuroscience.* 2015, 308: 144-56. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.08.043.

Almási R, **Szoke E**, Bölskei K, Varga A, Riedl Z, Sándor Z, Szolcsányi J, Petho G.: Actions of 3-methyl-N-oleoyldopamine, 4-methyl-N-oleoyldopamine and N-oleoylethanolamide on the rat TRPV1 receptor in vitro and in vivo. *Life Sci.* 2008, 82(11-12): 644-51. doi: 10.1016/j.lfs.2007.12.022.

megosztott első szerzőség

**Szoke E**, Czéh G, Szolcsányi J, Seress L.: Neonatal anandamide treatment results in prolonged mitochondrial damage in the vanilloid receptor type 1-immunoreactive B-type neurons of the rat trigeminal ganglion. *Neuroscience.* 2002, 15(3):805-14. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00420-7.

**Szőke E**, Seress L, Szolcsányi J.: Neonatal capsaicin treatment results in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of B cells in the rat trigeminal ganglia. *Neuroscience.* 2002, 113(4): 925-37. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00208-7.

**Szőke E**, Balla Z, Csernoch L, Czéh G, Szolcsányi J.: Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurones. *Neuroreport.* 2000, 11(9):1949-52. doi: 10.1097/00001756-200006260-00028.

**Szőke E**, Seress L, Szolcsányi J.: Reevaluation of the effect of neonatal capsaicin treatment on the basis of morphometrical studies. *Neurobiology (Bp).* 1998;6(4):477-8.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni mindenekelőtt Dr. Szolcsányi János akadémikusnak, aki egyik PhD témavezetőmként, mentoromként irányította kutatómunkámat az első munkanapomtól, lelkesedése és szakmai tudása sokunknak örök példakép, végtelenül sajnálom, hogy nem lehet már köztünk. Köszönettel tartozom Dr. Czéh Gábor professzornak, aki a másik témavezetőm volt és rengeteget tanultam tőle. Elsők között szeretnék köszönetet mondani Dr. Helyes Zsuzsanna akadémikusnak, akinek a támogatását egész pályafutásom alatt érzem, nemcsak közvetlen munkatársként, hanem jó barátnőként, aki az értekezés megírásához is fontos tanácsokat adott. Szintén számíthattam a tanácsaira és ezért köszönetet mondok Dr. Pintér Erika professzornak, aki mindig támogatott és ösztönzött, szeretettel emlékszem Zsuzsival és Erikával az élményekkel teli konferenciákra. Köszönettel tartozom Dr. Seress Lászlónak, akitől munkám elején rengeteget tanultam a szövettan és elektronmikroszkópia rejtelméről. Köszönet Dr. Payrits Majának, Dr. Sággy Évának, Dr. Lina Hudhudnak, védett PhD hallgatóimnak, akik munkája nélkülözhetetlen volt ennek az értekezésnek az elkészüléséhez, ábraanyagához. Maja azóta is nélkülözhetetlen munkatárs. Köszönet jelenlegi PhD hallgatóimnak Nehr-Majoros Andreának, Dr. Király Ágnesnek, Rózsa Enikőnek, akik munkája szintén nagy mértékben járult hozzá ehhez az értekezéshez, és akik nagy szorgalommal dolgoznak jelenleg is a csoportban. Andinak köszönet jó pár ábráért. Köszönet Dr. Csekő Katának, Dr. Pohóczky Krisztinának, Dr. Aczél Tímeának, Dr. Bencze Noéminek több kísérletsorozatban való közreműködésükért, és barátságukért, nap mint nap teszik barátságossá a munkahelyet. Katának köszönöm a számos közös konferenciaszervezést és a vidám napokat az intézetben és, hogy ilyen jó szobatárs.

Köszönet Dr. Börzsei Ritának, Dr. Hetényi Csabának, Dr. Bálint Mónikának az *in silico* vizsgálatokért. Egy-egy projektben való együttműködésért köszönet illeti Dr. Sándor Zoltánt, Dr. Kecskés Angélat, Dr. Horváth Ádám Istvánt, Dr. Tékus Valériát, Dr. Borbély Évát, Dr. Hajna Zsófiát, Dr. Pethő Gábort, Dr. Fülöp Barbarát és Steib Anitát. Szintén köszönöm volt munkatársaim, Dr. Kemény Ágnes, Dr. Bölcskei Kata, Dr. Németh József, Dr. Markovics Adrienn, Dr. Sándor Kata és Dr. Tóth Dániel Márton munkáját és a rengeteg közös emléket. Hálával tartozom Bíró-Sütő Tünde, Perkecz Anikó, Bagoly Teréz és Buzásiné Anna asszisztensi munkájáért az évek során, Anna emlékét örökké őrizni fogom. Disztl Cecíliának külön köszönet a mindennapi rendkívül precíz munkáért.

Szeretném megköszönni azon kollégáim segítségét is, akik kollaborációs munka keretében vesznek részt kutatásainkban. Külön köszönet Skodáné Dr. Földes Ritának és Dr. Szánti-Pintér Eszternek a karboxamido vegyületek szintéziséért. Dr. Mátyus Péternek az SZ-1287-ért, és hogy csatlakozhattam a munkához.

Szerencsés vagyok, hisz a kezdetektől, már 30 éve egy helyen dolgozom és köszönettel tartozom a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézetünk minden további munkatársának, akik segítenek a barátságos és támogató légkör megteremtésében.

Köszönöm a pályázati támogatásokat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatalnak az OTKA pályázatért, valamint a Magyar Tudományos Akadémiának a Bolyai János Kutatási Ösztöndíjért.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok barátaimnak a támogatásukért, a vidám percekért, hogy vannak nekem, köszönet Briginek, Dettinek, Andinak, Szoszínak. Köszönöm szépen családomnak, hogy mindig mellettem vannak, édesanyámnak és lányaimnak, Emesének és Rékának, akik rengeteg energiát adnak a mindennapokhoz.