

Válasz Dr. Szalai Csaba bírálataira

Először is hadd köszönjem meg a Tisztelt Bíráló fáradságos munkáját; alapos, minden részletre kiterjedő elemzését; valamint, hogy pozitívan nyilatkozott munkámról.

Elnézést kérek „Megbeszélés” és a „Rövidítések jegyzéke” fejezetek hiánya miatt. Mentségemre szóljon, hogy a tézises formátumú Doktori mű összeállításakor megpróbáltam messzemenően alkalmazkodni a forma igen szigorú terjedelmi korlátaival, mely szükségszerűen „fájdalmas” kompromisszumok megkötéséhez, így bizonyos részek alulreprezentálásához, illetve kihagyásához vezetett. A „Megbeszélés” fejezet elhagyását emellett az is indokolta, hogy a TRP csatornákat és az endokannabinoid rendszert érintő tudományos eredmények száma az utóbbi időszakban olyan robbanásszerű módon emelkedett, ami szinte lehetetlenné tette a saját eredményekkel való összevetést a tézises formátumú műben. Így úgy gondoltam, hogy inkább „Az eredmények hasznosítása” fejezettel helyettesítem a „Megbeszélést”, külön is hangsúlyozva munkánk transzlációs jellegét.

Kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

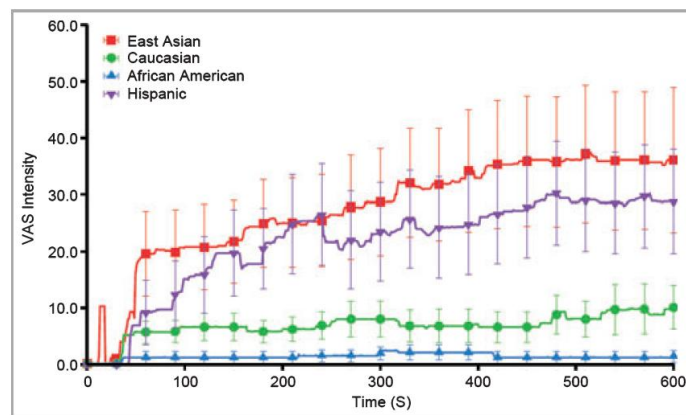
1. kérdés: *Ismert-e a vizsgált 3 rendszerben olyan polimorfizmus, vagy mutáció, amely valamilyen fenotípussal asszociál? Ha igen, milyen fenotípussal?*

Válasz: Igen nagyszámú single nucleotide polymorphism-t (SNP) tártak fel mindhárom rendszer esetében, melyek közül néhányat (teljesen önkényesen kiválasztva) az alábbi táblázatban mutatok be.

Gén	SNP	Fenotípus	Referencia
cPKC α	rs228883, rs1005651, rs228875, rs2244497	↑ BMI (body mass index)	Murphy A. et al. (2009) Am. J. Hum. Genet 85: 87-96
	rs732191, rs9895580, rs4411531, rs8080771, rs11652956, rs7221968, rs7405806, rs11079657	↑ Asthma bronchiale	Murphy A. et al. (2009) Am. J. Hum. Genet 85: 87-96
	rs7342847	↑ Emlő cc	Kelemen L.E. et al. (2009) Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 18:1864-1868
	rs7220007, rs759118, rs887797, rs3764402	↑ Sclerosis multiplex	Saarela J. et al. (2006) PLoS Genet. 2(3):e42
cPKC β	rs16972959	↑ SLE	Sheng Y.J. et al. (2011) Rheumatology 50:682-688
	rs1989647	↑ Partialis epilepsia	Kasperaviciute D. et al. (2010) Brain 133:2136-2147
CB2	rs1049353	↑ Primer biliaris cirrhosis	Floreani A. et al (2010) J. Gastroenterol. 45:68–76
	rs1049353	↓ Colitis ulcerosa	Storr M. et al. (2008) J. Mol. Med. 86:925-936
	rs1049353	↑ Hangulatzavarok	Monteleone P. et al. (2010) Pharmacol. Res. 61:400–404
NAPE-PLD	rs17605251	↑ Obesitas	Wangensteen T. et al. (2011) Obesity (Silver Spring). 19(3):612-617

Gén	SNP	Fenotípus	Referencia
TRPV1	rs4790522, rs4790521, rs402369	↑ Asthma bronchiale	Wang Q. et al. (2009) Wei Sheng Yan Jiu 38:516-521
	rs8065080 („loss-of-function” variáns)	↓ Gyermekkori asthma bronchiale	Cantero-Recasens G. et al. (2010) J.Biol. Chem. 285(36):27532-27535
	rs8065080 („loss-of-function” variáns)	↓ Mechanikus és termális hyperalgesia	Binder A. et al. (2011) PLoS One 6(3):e17387

A fenti táblázatban említett utolsó fenotípushoz kapcsolódóan egy további érdekes megfigyelést tett Prof. Yosipovitch munkacsoportja (Br. J. Dermatol., 2009). Kimutatták ugyanis, hogy az afroamerika populáció tagjaiban a bőrre kent kapszaicin nem vált ki kémiai fájdalmat, valamint hiányzik a kapszaicin-indukálta neurogén gyulladásra jellemző bőrpír (erythma) kialakulása is. Megállapították azt is, hogy igen jelentős különbségek találhatók a kaukázusi és az ázsiai populációk kapszaicin-érzékenysége között (**1. ábra**). Habár egyelőre nem sikerült a jelenség hátterében álló okot azonosítani, a fentiek fényében nem kizárt, hogy a TRPV1 érzékenységét (azaz a csatorna aktiválhatóságát) érintő SNP okozza az igen jelentős különbségeket.



1. ábra Különböző etnikai csoportok eltérő érzékenysége a bőrre kent kapszaicinnal szemben
Wang et al. (2009), Br. J. Dermatol. 162:1023-1029

2. kérdés: A felsorolt hasznosíthatóságok közül történt-e/történik-e konkrét fejlesztés, illetve mikor várható eredmény?

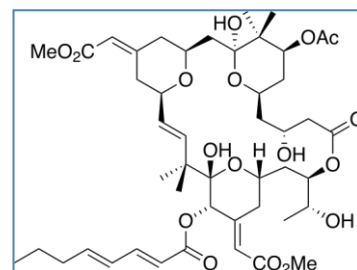
Válasz: Igen, a Doktori mű benyújtása óta több, főként a bőr folyamatait érintő saját fejlesztés indult be. Ezek közül, figyelembe véve a titoktartási és szabadalmi kötelezettségeket, a következő két K+F tevékenységről számolhatók be:

- Jelenleg folyó kutatásaink talán legizgalmasabb eredménye, miszerint számos nem-pszichoaktív (illetve nem-pszichotróp), a *Cannabis sativa* növényből izolált fitokannabinoid vegyület igen jelentős, a kereskedelmi forgalomban jelenleg rendelkezésre álló legkiválóbb szerek hatékonyságát messze meghaladó szebosztatikus potenciállal (azaz a faggyútermelés gátlásával) rendelkezik. Ezek közül az egyikkel a közeli jövőben egy Fázis II. klinikai „pilot” kísérletsorozat indul be, egy adott gyulladásos bőrbetegség kezelését célozva. A study-t egy külföldi gyógyszergyártó cég finanszírozza.
- Külföldi kollaborációs és ipari partnerekkel emellett hamarosan megkezdjük olyan CB1 antagonisták vizsgálatát, melyek nem penetrálnak a vér-agy gáton, így a központi idegrendszeri hatásuk miatt fellépő esetleges mellékhatások –

mint pl. az elmúlt évtized talán egyik legellentmondásosabb gyógyszere, az étvágycsökkentő Rimonabant alkalmazásakor gyakran fellépő súlyos depresszió – megjelenésével nem kell számolnunk. Ezen új vegyületekről előzetes állatkísérletekben bebizonyosodott, hogy orális alkalmazásuk fokozta a szőrnövekedést.

Az általunk vizsgált rendszerek emellett számos, igen jelentős piaci szegmenst birtokló gyógyszeripari cég terápiás „célpontjai”. A teljesség igénye nélkül néhány példa:

- Kapszaicin-tartalmú krémeket világszerte alkalmazzák, mint OTC készítményeket, pl. krónikus ízületi fájdalom kezelésére. Emellett nemrégiben került kereskedelmi forgalomba a Qutenza elnevezésű dermális tapasz (8% kapszaicin tartalommal, az Astellas cég fejlesztette ki), mely postherpeticus neuralgia, valamint egyéb fájdalom szindrómákban alkalmaznak sikerrel. Több világcég dolgozik továbbá a TRPV1-en (és egyéb TRP csatornákon) ható antagonisták fejlesztésével. Ezen szerekkel klinikai Fázis I-III. kísérletek folynak olyan kórállapotok kezelésére, mint pl. fájdalom szindrómák, allergiás rhinitis, irritábilis bél szindróma, hiperreaktív hólyag szindróma, stb.
- Az ECS és a bőr vonatkozásában megemlítendő, hogy egy endokannabinoid (-szerű) anyagot, a N-palmitoil-etanolamint (PEA) tartalmazó krém már kereskedelmi forgalomban van (a GSK-Stiefel forgalmazza, Physiogel AI néven); a terméket száraz, érzékeny, viszkető bőr kezelésére alkalmazzák, illetve ajánlják. Emellett tudomásunk van arról is, hogy két másik nagy gyógyszergyártó-kozmetikai cég olyan kísérleteket folytat, melyek célja az endokannabinoidok bőrben történő szintézisében és lebontásában szerepet játszó enzimek aktivitásának módosítása.
- Az ECS-en ható szerek nem dermatológiai alkalmazásait tekintve fontos emellett hangsúlyozni, hogy a Sativex nevű készítményt (GW Pharma) – amely orobuccalis spray 1:1 arányban tartalmaz tetrahidrokannabinolt és kannabidiolt – az USA-ban, Kanadában, valamint számos európai országban engedéllyel és sikerrel alkalmazzák a sclerosis multiplexhez társuló (és más szerekkel szemben rezisztens) fájdalom kezelésére. Kiterjedt Fázis I-III. klinikai kísérletek folynak továbbá ezen és más kannabinoid vegyületekkel elmegyógyászati (pl. bipoláris zavarok, anorexia nervosa, schizophrenia, OCD) és ideggyógyászati (pl. fájdalom szindrómák, neuropátiák) kórképek, valamint gasztroenterológiai megbetegedések (pl. irritábilis bél szindróma, Crohn-betegség) kezelésére.
- A PKC-rendszeren ható szerek klinikai vizsgálatával kapcsolatban mindenképpen megemlítendő a Bryostatin-1. A makrolid lakton vegyület, melyet George Petit professzor úr az 1960-as években izolált tengeri mohaállatokból (Bryozoa), egyedülálló tulajdonsága, hogy koncentráció-függő módon képes adott PKC izoformák aktiválására; tartós aktivációt követő down-regulációjára (azaz gátlásra); sőt, bizonyos körülmények között képes megvédeni adott izoenzyme(ke)t más „down-regulátorok” hatásaitól. A vegyülethez nagy reményeket fűztek/fűznek, mint potenciális daganatellenes szerhez; sajnálatos módon ugyanakkor a nagyszámú klinikai vizsgálat (pl. emlő cc., ovarialis cc., malignus melanoma, stb. kezelésére) nem igazolta a



várakozásokat. Jelenleg a Bryostatin-1 és egyén daganatellenes szerek kombinált alkalmazásainak vizsgálata zajlik.

3. kérdés: *Egyes vélemények szerint kapszaicin tartalmú ételek fogyasztása eufóriát, vagy fájdalomcsökkenést idéz elő. Igaz-e ez, illetve van-e kapcsolat a TRPV1 és az ECS között?*

Válasz: Habár limitált mennyiségű kísérletes adat áll rendelkezésre, a „capsaicin high” jelenséget valóban a kapszaicin hatására felszabaduló endorfinok okozhatják. Ismerve az endogén opioidok többszintű analgetikus hatásait, természetesen nem zárható ki, hogy az endorfinok résztvesznek a fájdalomcsillapító hatás kialakulásában, főként, ha ez nemcsak a kapszaicin elfogyasztásának helyén (azaz ezesetben a szájban), hanem az egész szervezetben kialakul.

Úgy gondolom ugyanakkor, hogy a főként lokálisan kifejlődő anti-nocicepció létrejöttében elsősorban a TRPV1-et kifejező szenzoros afferensek deszenzibilizációja áll. A TRPV1 aktivációja pl. kapszaicinnal először a szenzoros neuronok excitációját váltja ki, melynek jól ismert tünete a fájdalmas, csípő, égető érzés. Ezt követi a (homológ és/vagy heterológ) deszenzibilizáció, mely főként a neuropeptid raktárak kiürülése, valamint Ca^{2+} -függő intracelluláris szignalizációs útvonalak beindulásának következményeként alakul ki.

A kérdés másik részét kommentálva: igen, a TRPV1 (és feltehetően egyéb TRP csatornák) és az ECS szoros kapcsolatban állnak. Hangsúlyozandó ugyanakkor, hogy e kapcsolat „mikéntje” számos körülménytől függ.

Először Zygmunt és mtsai (Nature, 1999) írták le, hogy az endokannabinoid anandamid (mintegy „endovanilloid” vegyületként működve) képes a TRPV1 aktiválására is (a CB receptorokon mérhető hatásokon túl). Emellett bebizonyosodott az is, hogy az exo- és endokannabinoidok számos egyéb TRP csatorna (pl. TRPV2-V4, TRPM8) működését is befolyásolhatják; talán ennek is köszönhető, hogy ezen TRP csatornákat az utóbbi időben, mint „ionotróp kannabinoid receptorokat” említi a szakirodalom.

Fontos hangsúlyozni továbbá, hogy a CB- és TRPV1-mediált intracelluláris jelátviteli folyamatok gyakran konvergálnak, mely számos sejtféleségben komplex szabályozási mintázatok kialakulásához vezet. Úgy tűnik ugyanakkor, hogy a kölcsönhatás pozitív (azaz serkentés) vagy negatív (azaz gátlás) volta, valamint a kannabinoid vegyületek receptor-specifitása jelentős mértékben függ az adott sejt típusától; a jelenségre jó példa a különféle bőr eredetű sejteken végzett kísérleteink eredménye. Humán szőrtüsző szervkultúrát vizsgálva ugyanis kimutattuk, hogy a TRPV1 és az CB1 aktiválása, additív módon, egyaránt csökkentette a szőrszál növekedését (II. és IX. közlemény a Doktori műben). Ezzel szöges ellentétben humán sebocytákon megállapítottuk, hogy a TRPV1 (és egyelőre még nem publikált eredményeink szerint a TRPV3 és TRPV4) aktiválása jelentősen gátolta a CB2-mediált sebogenezist (IV. közlemény). Végezetül legújabb kísérletes adataink szerint humán epidermális keratinocitákon egy szekvenciálisan aktiválódó $\text{CB1} \rightarrow \text{TRPV1} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$ -influx jelátviteli mechanizmus vesz részt az anandamid proliferációt gátló és sejthalált indukáló hatásában (Tóth et al., J. Invest. Dermatol., 2011).

Összefoglalva úgy vélem, hogy az ECS és a TRP csatornák esetében egymással párhuzamosan működő, egymással számos ponton kapcsolódó és átfedő rendszerekben kell gondolkodnunk, nem elfelejtve az individuális és közös jellegzetességek sejt- és szövetspecifitását.

4. kérdés: *Az általános PKC aktivátor gátolta a vázizomsejtek növekedését és differenciálódását. Obez emberekből alacsony vázizom PKC aktivitást tapasztaltak. Van-e arra valamilyen információ, hogy ez lehet a szervezet egyik válasza a megnövekedett testtömeghez szükséges nagyobb vázizom „előállításához”? Illetve a PKC gátlásával lehet-e nagyobb izomtömeget elérni (pl. időseknél, betegeknél vagy sportolóknál?)*

Válasz: Nagyon izgalmas kérdés, melyre nagyon nehéz (ha lehet egyáltalán) választ adni. Természetesen nem lehet kizárni, hogy a kompenzatorikus izomtömeg-növekedés hátterében a PKC aktivitás módosulása áll. Úgy gondolom ugyanakkor, hogy a „titok” az izoforma-specifikus PKC válaszok „sejt-specifitásának” azonosításában rejtőzhet.

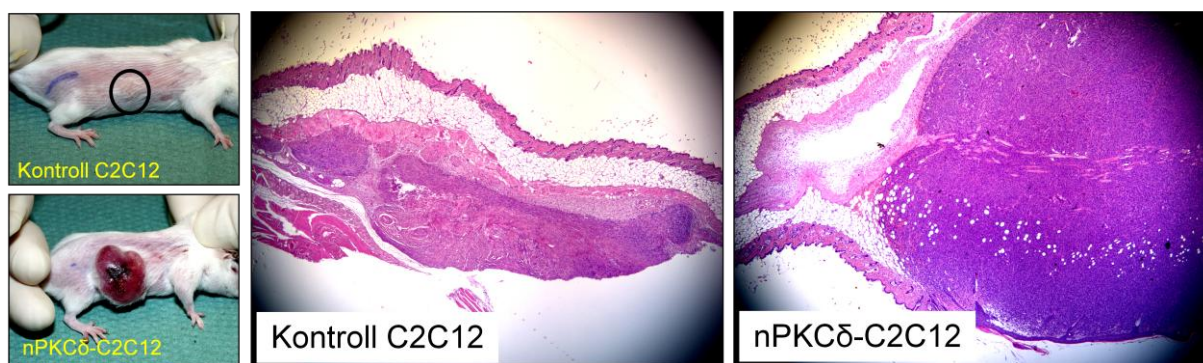
A Tisztelt Bíráló által említett kísérletsorozatban bebizonyosodott ugyanis, hogy habár az általános PKC aktivátor PMA valóban gátolta a humán vázizomsejtek növekedését (XII. közlemény), az nPKC δ aktivitásának szelektív fokozása ugyanakkor jelentősen megnövelte a sejtek proliferációját (XIII. közlemény). Ezen, első látásra talán ellentmondásosnak tűnő eredmény azt sugallja, hogy a PKC aktivátor olyan izoformák aktivitását is fokozta (illetve az nPKC δ aktivitásánál jobban fokozta), melyek a sejtek növekedésének gátlásában vesznek részt. Jelenleg folyó kísérleteink adatai arra utalnak, hogy valóban vannak ilyen PKC izoenzimok a vázizomban; kimutattuk ugyanis, hogy a cPKC α vagy β izoformák aktivitásának fokozása jelentősen lecsökkentette a vázizomsejtek proliferációját (Czifra és mtsai, előkészületben).

Úgy tűnik, hogy hasonló jelenséggel állunk szemben az obezitás – PKC rendszer aktivitása – vázizomtevékenység viszonylatában is. Itani és mtsai (Diabetes, 2000) obez (és gyakran inzulin rezisztenciás állapotú) betegek izomzatában ugyanis lecsökkent nPKC θ , nPKC η és PKC μ (PKD) mennyiséget mértek. Érdekes módon ugyanők ugyanebben a vizsgálatban fokozott cPKC β mennyiséget is detektáltak, míg 1 évvel később fokozott nPKC θ mennyiségről és aktivitásról számoltak be (Metabolism, 2001). Emellett Kim és mtsai (Diabetes, 2003) csökkent aPKC λ/ζ szintet és aktivitást találtak diabéteszes obez emberekből, mely nem volt kimutatható nem-diabéteszes obez páciensekben. Ezen „diverz” adatok birtokában véleményem szerint nem állapítható meg minden kétséget kizáróan, hogy mely izoformák és pontosan hogyan vesznek részt a humán vázizom metabolizmusának szabályozásában.

A kérdés második részére válaszolva: kísérletes adataink szerint nem a PKC gátlásával, hanem egy adott izoforma aktivitásának serkentésével fokozható a vázizomsejtek növekedése, így az izom tömege. Kimutattuk ugyanis (XIII. közlemény), hogy humán vázizomsejteken, valamint C2C12 egér mioblasztokon az IGF-I mitogén hatását az nPKC δ stimulálása (valamint a következményesen

aktiválódó MAPK útvonal) közvetíti. Humán rekombináns IGF-I-et széles körben alkalmaznak növekedési zavarok és izomdisztrófiák kezelésére. Az utóbbi időszakban az IGF-I emellett a feketepiac egyik kedvelt szereplőjévé vált, mint az illegális izomnövelő szerek egyik új típusa.

Egyelőre nem rendelkezünk adatokkal arra vonatkozóan, hogy az nPKC δ *in vivo* is szerepet játszik-e az IGF-I anabolikus hatásának kifejlődésében. Ha ez mégis beigazolódik, akkor előzetes kísérletes eredményeink (Czifra és mtsai, előkészületben) az „IGF-I abúzus” egy további potenciális veszélyére hívják fel a figyelmet. Bebizonyosodott ugyanis, nPKC δ konstitutíven aktív formáját stabilan kifejező C2C12 egér mioblasztok SCID egerekbe történő intradermalis injektálása hatalmas méretű, magas osztódási rátájú (nagy mitózis és Ki67-pozitív sejtszám), környezetüket infiltráló, az injektálás helyén a bőr különböző rétegeinek roncsolódását előidéző, igen rosszindulatú rabdomioszarkomák kialakulását eredményezték (a kontroll C2C12 sejtek benignus rabdomiómákat hoztak létre) (**2. ábra**).



2. ábra Kontroll és az nPKC δ -t stabilan kifejező C2C12 mioblasztok által SCID egerekben indukált tumorok 30 nappal az injektálás után

Végezetül, ismételten megköszönve a Tisztelt Bíráló pozitív bírálatát, tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Debrecen, 2011. április 23.

Bíró Tamás