

Válasz Dr. Széll Márta bírálataira

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

A Szövegezéssel kapcsolatos kritikai megjegyzéseket hálásan köszönöm; valóban, az említett részeknél a megfogalmazásokba hiba csúszott, melyekért elnézést kérek. A tézises formátumú Doktori mű összeállításakor megpróbáltam messzemenően alkalmazkodni a forma igen szigorú terjedelmi korlátaival; így habár a megjelölt 32 referencia közül 24 összefoglaló publikáció, valóban lehetett volna néhány további review cikket is megemlíteni.

1. kérdés: *A 4.4 alfejezetben a Jelölt az általa vizsgált rendszerek humán betegségeiben felfedhető eltérő kifejeződési mintázatait taglalja, majd arra a megállapításra jut, hogy a TRPV1, a CB1 molekulák, illetve a PKC rendszer egyes izoformái meghatározó szereppel bírnak az általuk vizsgált kórképekben. Jelölt véleménye szerint az általa vizsgált molekulák elsődleges kóroki szerepet töltenek be a betegségeiben, vagy a betegségeiben detektált eltérő mértékű és/vagy mintázatú expresszió már a kialakult kóros folyamatok másodlagosan vezetnek a Jelölt és munkatársai által detektált eltérésekhez?*

Válasz: Amint azt a Boros Imre professzor úrnak adott válaszaiban is részleteztem, az idézett mondat (a tudatosan alkalmazott feltételes mód, valamint egy általános üzenetre való törekvés ellenére is) valóban túl „erősen” és félreérthetően fogalmaz; így a „kialakulás” kifejezés patognomikus szerepet is sugallhat, mely kijelentés természetesen nagyon elhamarkodott lenne.

A fenti gondolt mentén felmerült „Tyúk vagy a tojás?” kérdés – miszerint a TRPV1 és CB1 molekulák a daganatok (és egyéb betegségek) esetében primer kóroki szereppel bírnak, és/vagy a kifejeződésükben bekövetkező módosulások a betegség progressziója során másodlagosan alakulnak ki – ugyanakkor igen izgalmas témakört feszeget.

Úgy vélem, hogy a CB1 és TRPV1 molekulák részvételét feszegető kérdés minden kétséget kizáróan egyelőre nem válaszolható meg, ami főként a téma és a kutatási terület relatíve „fiatal” (így gyakran ellentmondásokkal tarkított) voltának köszönhető. Így az alábbiakban a legfontosabb tudományos eredményeket foglaltam össze, 3 tematikai csoportba osztva azokat:

- Farmakológiai hatások: A CB receptorokon, valamint a TRPV1-en ható természetes és szintetikus agonisták potenciális antiproliferatív hatását igen nagyszámú tenyésztett humán daganatos sejtvonalon vizsgálták/vizsgáltuk. A kísérletes eredmények szinte minden esetben igen jelentős növekedésgátlásra utaltak, függetlenül az „eredeti” sejtípustól. A celluláris kísérletek emellett feltárták a fenti hatásokat mediáló receptorális és intracelluláris jelátviteli útvonalak számos komponensét is (pl. intracelluláris Ca^{2+} -akkumuláció, kinázrendszerek aktiválódása, reaktív oxidatív és nitroztatív elemek felszaporodása, pro-apoptotikus kaspázok aktivitásának fokozódása,

génexpressziós változások, stb.). Mivel az *in vitro* sejtes eredmények a legtöbb esetben *in vivo* is reprodukálhatók voltak – azaz kannabinoid és vanilloid vegyületek, intratumoralisan és/vagy szisztémásan adagolva, hatásosan gátolták az immunhiányos egerekben indukált daganatok növekedését –, így a molekulákat mint „potenciális daganatellenes terápiás célpontokat” említi a tudományos terület.

- Expressziós változások: Ezt a nézetet erősíti az is, hogy számos daganatféleség esetében (pl. CB1: prosztatata cc., asztrocitóma, limfóma; CB2: glioblasztóma multiforme; TRPV1: prosztatata cc, squamosus cc, vastagbél cc) a receptorok fokozott expresszióját írták le. Fontos ugyanakkor két további eredménycsoport ismertetése is: i) A fenti adatokkal szöges ellentétben több munkacsoport számolt be a receptorok kifejeződésének csökkenéséről más daganatos szövetekben (pl. CB1: glioblasztóma multiforme; TRPV1: hólyag cc.). ii) A sejtvonalakon végzett kísérletek emellett számos esetben nem tudták igazolni a receptorok specifikus részvételét az antiproliferatív hatás kifejtésében (annak ellenére, hogy több „receptor-independens” jelátviteli mechanizmust is azonosítottak). Mindezen adatok arra utalnak, hogy a fent részletezett expressziós változások megléte, valamint a specifikus antiproliferatív hatás korántsem általános érvényű, és jelentős mértékben függ az adott sejt és szövet (valamint egyes esetekben az alkalmazott kannabinoid/vanilloid ligand) jellegzetességeitől.
- Kóroki szerep: Úgy gondolom, hogy a fenti receptorok által beindított mechanizmusok elméletileg a tumorgenezis többlépcsős folyamatsorának (iniciáció – promóció – progresszió – invázió – disszemináció) minden elemében résztvehetnek. Ennek ellenére a legkevesebb „megalapozott” adattal a molekulák pathogenetikai szerepről rendelkezünk. Érdekes megfigyelést tettek ugyanakkor a TRPV1 vizsgálatok. Az egyik „klasszikus” kétlépéses bőr karcinogenezis modellt (iniciáció: 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, DMBA; promóció: az általános PKC aktivátor 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA) alkalmazva Bode és mtsai (Cancer Res., 2009) ugyanis kimutatták, hogy a TRPV1 génhiányos állatokban mind a kialakult daganatok száma, mind a mérete jelentősen fokozódott a vad típusú állatokban mértékhez képest. Kimutatták azt is, hogy a fokozott tumorgenezis hátterében feltehetően az epidermal growth factor receptor (EGFR) mediált jelátviteli folyamata kóros fokozódása áll. Ezzel jó összhangban Li és mtsai (Carcinogenesis, 2011) hasonló modellt alkalmazva megállapították, hogy a TRPV1 antagonistá AMG9810, az EGFR/Akt/mTOR szignalizáción keresztül, ugyancsak fokozta a daganatképződést. Mindezen adatok arra utalnak, hogy (legalábbis ebben a rendszerben) a TRPV1 aktivitása véd a tumorgenezis kialakulásától, így a TRPV1, valamint a hozzá kapcsolódó jelátviteli folyamatok „loss-of-function” változása szereppel bírhat bizonyos daganatok kialakulásában.

Megjegyzendő végezetül, hogy (a fentiekkel ellentétben) több PKC izoform (pl. cPKC α , nPKC ϵ , aPKC ζ , PKD) szerepéről nagyszámú adattal rendelkezünk különféle hematológiai malignitások (pl. leukémiák, limfómák) és szolid tumorok (pl. bőr és prosztatata cc.) esetében (összefoglalva pl. Podar et al., Expert Opin. Investig. Drugs, 2007; Breitkreutz et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 2007; Redig & Plataniias, Leuk. Lymphoma, 2008)

2. kérdés: A 4.4.4. alfejezetben a Jelölt ismerteti, hogy a PKC izoformák expressziós eltéréseit csak az SLE-ben szenvedő betegek mononukleáris sejtjeiben tudták detektálni, sem Sjögren-szindrómában, sem Kevert Kötőszöveti Betegségben szenvedők esetében nem tudták ugyanezeket a változásokat kimutatni. Van-e olyan pathogenetikai különbség a fenti betegségek között, amelyhez kötni tudná az általuk detektált eltérést?

Válasz: Az SLE-ben szenvedők mononukleáris sejtjein végzett vizsgálataink megkezdését több korábbi eredmény indokolta:

- SLE-s betegek T-sejtjeiben Tada és mtsai (Clin. Immunol. Immunopathol., 1991) csökkent PKC aktivitást mutattak ki (habár nem jellemezték a PKC izoenzimeket);
- Felmerült továbbá, hogy az SLE-s T-sejtekben kimutatott kórosan csökkent T-sejt receptor (TCR) ζ lánc expresszió, valamint az ehhez kapcsolt patológias jelátviteli kaskád (pl. intracelluláris Ca^{2+} -akkumuláció, kóros cAMP reguláció, transzkripciók faktorok abnormis poszttranszlációs módosítása, jelentősen lecsökkent IL-2 termelés, stb.) kialakulásának hátterében a fenti PKC defektus állhat (Juang et al., J. Immunol., 2002);
- Klinikus kollaborátoraink (a Sipka professzor úr által vezetett laboratórium) korábban kimutatták, hogy SLE-s betegek perifériás monocitáiban a kontrollhoz képest jelentősen csökkent arachidonsav-felszabadulás volt mérhető PKC aktivátorok alkalmazásakor (Sipka et al., J. Rheumatol., 2001).

Ezen kiindulópontok alapján mi elsősorban az SLE-s perifériás sejtek PKC izoformamintázatára voltunk kíváncsiak, így az SS-ban, illetve a MCTD-ben szenvedők sejtjeit mintegy „autoimmun betegség kontrollként” alkalmaztuk.

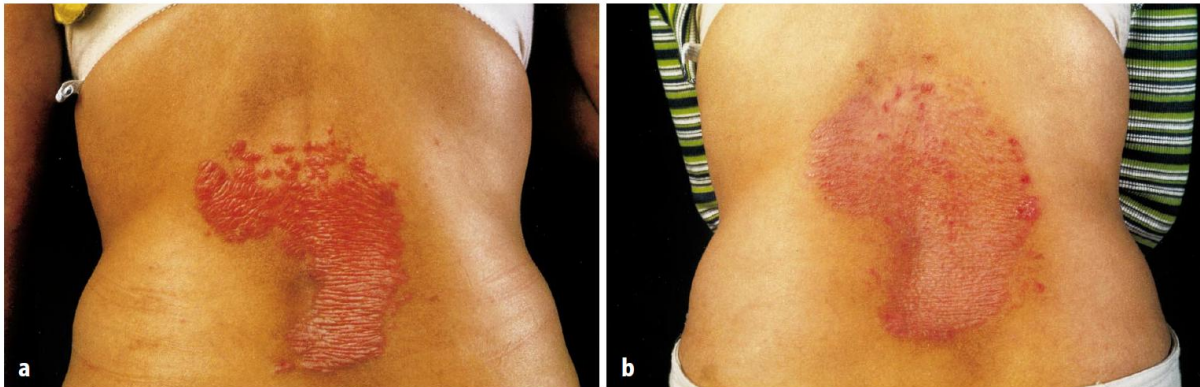
A három különböző autoimmun betegség nagyon komplex patogenezisében (pl. genetikai predispozíció, autoreaktív T-sejt aktiváció, poliklonális B-sejt aktiváció, autoantitestek képződése, kóros citokintermelés, stb.) számos átfedő elem található. Így habár nem kizárt, hogy ez érintheti a PKC rendszert is, nem találtam semmiféle irodalmi adatot a PKC rendszer és az SS/MCTD, valamint a perifériás mononukleáris sejtek kapcsolatáról. Úgy tűnik tehát, hogy a fenti korábbi adatok, valamint saját eredményeink az SLE-re specifikusaknak mondhatók.

3. kérdés: A Jelölt az 5.3. alpontban felveti a TRPV1 agonisták alkalmazását hiperproliferatív bőrbetegségekben, pl. pikkelysömörben. A pikkelysömör kapszaicines krémmel történő kezeléséről az elmúlt években jelent meg néhány közlemény, kérem röviden foglalja össze a kezeléssel kapcsolatosan kapott adatokat!

Válasz: A múlt század vége óta számos tanulmány jelent meg a kapszaicin-tartalmú krémek alkalmazásáról a pikkelysömör kezelésében (a legfontosabbak: Bernstein et al., J. Am. Acad. Dermatol., 1986; Ellis et al., J. Am. Acad. Dermatol., 1993; Reimann et al., Hautartz, 2000). A klinikai kísérletek során 0,025% – 0,1% kapszaicin-tartalmú krémet alkalmaztak, naponta 2-6 alkalommal, heteken-hónapokon keresztül. Az eredmények szinte kivétel nélkül azt sugallták, hogy a kapszaicin-kezelés – mely a betegekben a terápia előrehaladtával egyre csökkenő intenzitású csipő, égető fájdalmat váltott ki – jelentős mértékben lecsökkentette vagy megszüntette a

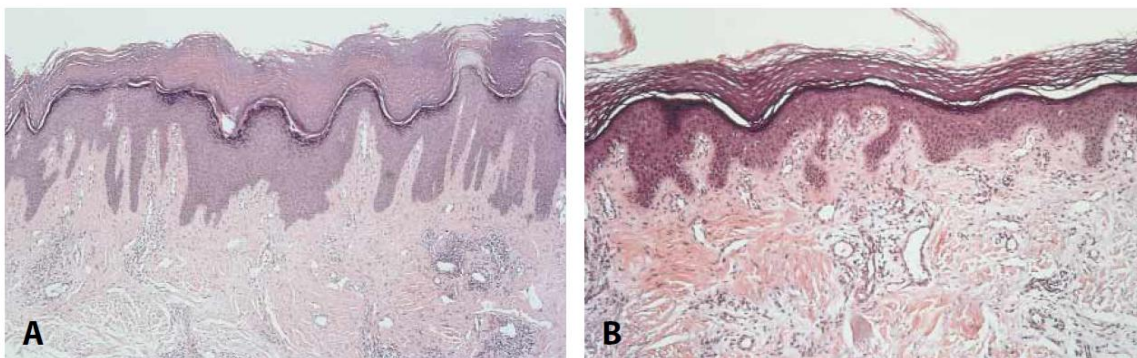
(gyakran igen súlyos fokú) viszketést és az esetegesen meglévő fájdalmat. A hatás hátterének vizsgálatakor bebizonyosodott, hogy a kapszaicin hatására depletálódtak a pruriceptív és nociceptív szenzoros afferensek P-anyag raktárai, mely az idegrostok deszenzibilizációjának (így a viszketés- és fájdalomérzés megszűnésének) jele.

Több munkacsoport emellett beszámolt arról is, hogy a „krónikus” kapszaicin-kezelés hatására nemcsak a szenzoros tünetek, hanem a psoriasis súlyosságát jelző elváltozások (pl. a psoriasisos bőrtünet kiterjedése; az erythema, a gyulladásos infiltráció és a hámlás mértéke) is javultak (**1. ábra**).



1. ábra Kapszaicin-kezelés hatása psoriasisban
Psoriasisos bőrtünet a 10 hónapos kapszaicin-kezelés előtt (A) és után (B).
Reinmann et al. (2000), Hautartz 51:164-172

Fontos megjegyeznünk, hogy hasonló terápiás hatékonyságot írtak le (Stander et al., JAAD, 2001) egy másik (ugyancsak intenzív viszketéssel, valamint hyperplasiával és az epidermis kóros orthokeratosisával jellemzett) bőrbetegségben, a prurigo nodularisban (**2. ábra**), ahol a TRPV1 fokozott kifejeződését írták le a beteg bőrben (Stander et al., Exp. Dermatol., 2004).



2. ábra Kapszaicin-kezelés hatása prurigo nodularisban
Prurigo nodularis szövettani képe nem kezelt (A) és kapszaicin krémmel 4 hónapig kezelt (B) bőrterületen.
Stander et al. (2001), JAAD 44:471-478

Egyelőre nem rendelkezünk *in vivo* bizonyítékokkal, hogy ezen „jótékony” változások a neurogén válasznak (illetve a válasz megszűnésének) köszönhetők, avagy a kapszaicin a bőr TRPV1-et kifejező nem-neuronális sejteit izgatva fejt ki hatását. Az *in vitro* sejtes rendszerekben kapott adataink ugyanakkor ezen utóbbi lehetőség

fontosságát emelik ki. Kimutattuk ugyanis, hogy az epidermalis keratinocytákon kifejeződő TRPV1 aktiválása (feltehetően fokozott Ca^{2+} -influx következményeként) meggátolta a sejtek növekedését és apoptózist indukált (II. közlemény; Tóth et al, J. Invest Dermatol. 2011). Humán monocyta-eredetű dendritikus sejtek vizsgálatakor emellett megállapítottuk, hogy a TRPV1 stimulációja kapszaicinnal meggátolta a sejtek differenciálódását, valamint érését és aktivációját (V. közlemény). Mivel a pikkelysömör pathogenesisében egyaránt szerepet játszik az epidermalis keratinocyták „hyperproliferációja” és az antigén-prezentáló sejtek által vezérelt kórosan fokozott immunválasz, ezért nem kizárt, hogy a kísérleteink során kapott „anti-proliferatív és anti-inflammatorikus” kapszaicin-válaszok szereppel bírhatnak a terápiás hatékonyság kialakításában.

4. kérdés: Az 5.6. alfejezetben leírásra került, hogy a dendritikus sejteken kapott eredményeik alapján a Jelölt szerint a TRPV1 aktivitását fokozó szereknek potenciális gyulladásgátló hatása is lehet. Elképzelhetőnek tartja-e, hogy a dendritikus sejtek TRPV1 aktivitás módosításának a tumor immunterápiában is lehet szerepe a jövőben?

Válasz: Bizonyos (nagyon limitált mennyiségű) kísérletes adatok arra utalnak, hogy a TRPV1-nek esetlegesen szerepe lehet a tumorelles immunterápiában. Basu és mtsai (PNAS, 2005) ugyanis egereken végzett *in vivo* kísérletekben kimutatták, hogy a TRPV1 aktiválása kapszaicinnal fokozta a dendritikus sejtek érését, valamint az antigénprezentáló és ko-stimulátor molekulák kifejeződését. Más kísérleteikben ugyanők a kapszaicin intratumorális adagolásának hatását elemezték egerekben indukált rosszindulatú daganatok (fibrosarcoma) növekedésére (Beltran et al., J. Immunol., 2007). Megállapították, hogy a kapszaicin jelentős mértékben lecsökkentette nemcsak az injektált, hanem a nem-injektált daganatok növekedési ütemét, mely hatást feltehetően az antigénprezentáló sejtek és a T-sejtek aktivitásának TRPV1-mediált fokozódása váltotta ki.

Amint ahogy azt fent részleteztük, a humán dendritikus sejteken végzett saját kísérleteink ezzel teljes mértékben ellentétes eredményeket szolgáltatnak (azaz a TRPV1 aktiváció gátolta a tumorelles immunválasz központi „karmestereinek” tekinthető dendritikus sejtek immunválaszát). Ismerve a tudományos területen végzett kísérletek számának robbanásszerű növekedését, természetesen nem tartom kizártnak a TRPV1 szerepének felfedezését a humán tumor immunterápiában. Ugyanakkor (a legoptimistább) véleményem szerint ehhez nagyon-nagyon hosszú és rögzös út vezethet ...

5. kérdés: Végezetül arra szeretném kérni a Jelöltet, hogy értelmezze egy 2008-ban megjelent közleményben (Pecze L, Szabó K, Széll M, Jósvay K, Kaszás K, Kúsz E, Letoha T, Prorok J, Koncz I, Tóth A, Kemény L, Vizler C, Oláh Z. Human keratinocytes are vanilloid resistant. PLoS One. 2008;3(10):e3419. Epub 2008 Oct 14) taglaltakat, miszerint a humán keratinociták ugyan kifejezik a TRPV1-et, de az funkcionálisan inaktív és maguk a keratinociták vanilloid rezisztensek.

Válasz: Saját kutatási eredményeinkhez (II. közlemény; Tóth et al., J. Invest. Dermatol., 2011) hasonlóan több munkacsoport (pl. Inoue et al. BBRC, 2002;

Southall et al., JPET, 2003; Lee et al., Exp. Dermatol., 2008) is leírta a TRPV1 funkcionális kifejeződését normál humán epidermalis (NHEK), valamint humán immortalizált HaCaT keratinocytákban. Bebizonyosodott az is, hogy a TRPV1 specifikus aktivációja olyan változásokat indít be a sejteken, mint pl. Ca^{2+} -influx, a proliferáció gátlása, az apoptózis indukciója, változás a citokintermelésben és a mátrix metalloproteináz-1 expresszióban, stb. Az említett cikk, ezzel ellentétben, arról számol be, hogy ezen sejtek (főként a HaCaT keratinocyták) elsősorban a domináns negatív TRPV1b splice variánst fejezik ki, így a vanilloid vegyületekkel történő kezelés hatására nem változnak a sejtek biológiai folyamatai.

Mivel nem ismerem teljes részletességgel az említett cikkben bemutatott kísérletek körülményeit (valamint, mivel mind a Tisztelt Bíráló, mind jómagam „személyesen is érintettek vagyunk” ...), így nem vállalkozhatok az adatok mélyreható értelmezésére. Így csupán saját gondolataimat foglalom össze az egymásnak ellentmondó adatokról.

„Tisztán teoretikus” véleményem szerint a különbségek lehetséges okait az alábbi két csoportba sorolhatjuk:

- Talán a legnehezebben magyarázhatók a Ca^{2+} -imaging kísérletek során kapott ellentmondásos adatok, főként a csatorna-aktivitást legmeggyőzőbben igazoló patch-clamp kísérletek hiányában. Úgy vélem, hogy az említett cikkben a kapszaicin és resiniferatoxin hatástalanságának oka sok tényezőtől fakadhat:
 - A NHEK tenyészetek esetében mindenképpen figyelembe veendő a különböző donorokból indított tenyészetek inter-individuális heterogenitása. Ez egyébként igaz lehet a HaCaT sejtvonalra is, annak ellenére, hogy az említett cikk szerzői szinkronizálták a sejtenyészeteket.
 - Már Denda és mtsai (BBRC, 2001) is kimutatták, hogy a TRPV1 kifejeződése a NHEK-on inhomogén megoszlást mutat (ezt egyébként mind NHEK-on, mind HaCaT sejteken saját kísérleteink is megerősítették). Így nem kizárt, hogy egy adott tenyészetben olyan sejtek dominálnak, melyek TRPV1 expressziója a detekciós küszöb környékén fluktuál.
 - Az expressziós heterogenitás emellett kiterjedhet a tetramer TRPV1 csatorna alegység-összetételére is. Azaz lehetséges, hogy adott tenyészetek adott sejtjein pl. a domináns negatív TRPV1b splice variánst alkotja a csatornát, míg más tenyészetekben a „klasszikus” TRPV1.
 - A nem-neuronális sejteken általában (így a keratinocytákon is) nemcsak inhomogén, de sokkal alacsonyabb is a TRPV1 kifejeződése, mint a kontrollként alkalmazott szenzoros neuronokon. Így feltehetően csak nagyobb (pl. $>5\text{-}10\text{ }\mu\text{M}$ kapszaicin) vanilloid koncentrációk (és feltehetően hosszabb ideig alkalmazva) válhatnak ki mérhető Ca^{2+} -jeleket.
 - Nem ismert továbbá a keratinocytákon kifejeződő TRPV1 csatorna farmakológiai és elektrofiziológiai tulajdonsága sem; így amennyiben az aktivációs kinetika sokkal lassabb, mint a szenzoros neuronokon, így a rövid (néhány perc hosszú) vizsgálati idő elégtelen lehet a Ca^{2+} -influx megbízható detektálásához.

- Talán könnyebben magyarázhatók a vanilloid vegyületek citotoxikus hatásainak leírásában bemutatott ellentmondások. Úgy vélem, hogy ez a koncentráció és időfüggés „tipikus esete”. A szenzoros neuronokon a vanilloid vegyületek valóban percek alatt képesek (feltehetően intracelluláris Ca^{2+} -akkumuláció révén) citotoxicitást indukálni. Ezen rövid kezelés (sőt még a 24 órás vanilloid alkalmazás) nem elegendő ugyanakkor az igen erőteljes „ Ca^{2+} -handling” mechanizmusokkal rendelkező keratinocyták életképességének csökkentésére. Saját eredményeink szerint legalább 36-48 óráig alkalmazott kapszaicin-kezelés „kumulálódó hatása” képes szignifikáns apoptózis, illetve nekrozis beindítására.

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

Debrecen, 2011. április 23.

Bíró Tamás