

Válasz Prof. Jancsó Gábor egyetemi tanár opponensi véleményére

Köszönöm Professzor Úrnak értekezésem alapos bírálatát, a releváns és megfontolandó kritikai észrevételeket, a felvetett kérdéseket és megjegyzéseket, valamint a dicséreteket.

1.) Egyetértek Opponens Úr azon kritikai megjegyzésével, amely a „Történeti bevezetés” c. fejezetben szereplő mondatra („*A neurogén gyulladást és az ezt közvetítő gyulladáskeltő neuropeptideket a 70-es évek végén fedezték fel, és ezzel új korszak kezdődött a kapszaicin-kutatások történetében...*”) vonatkozik. Ez a kettős kijelentést tartalmazó megfogalmazás így valóban nem szerencsés és ilyen formában nem helytálló. Természetesen nem azt szándékoztam ezzel mondani, hogy a neurogén gyulladás *jelenségét* fedezték fel a 70-es évek végén, hiszen azt már Bruce 1910-ben leírta, és annak részletes feltárásához Jancsó Miklós kapszaicin-deszenzibilizációs kísérletei nyitottak utat már az 1950-es években. Elektromos idegingerléssel kiváltott neurogén gyulladás direkt bizonyítékáról az első nemzetközi közlemény 1967-ben jelent meg (Jancsó és mtsai. 1967. Br. J. Pharmacol.). A 70-es években a mediátorok azonosításával indultak meg a vizsgálatok a neurogén gyulladás *mechanizmusára vonatkozóan*. Elgondolkodtató azonban, hogy a gyulladással kapcsolatos többezer oldalas monográfiákban- mint pl. a három kötetes Zweichfach, Grant és McCluskey szerkesztésében megjelent *The Inflammatory Process* (Academic Press, New York and London, 1973), valamint a hat évvel később Vane és Ferreira által szerkesztett kétkötetes *Inflammation/ Anti-Inflammatory Drugs* (Handb. Exp. Pharm. 50/I és II; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1979) kiadványokban- a „neurogén gyulladás” tárgyszó nem szerepel. A pro-inflammatorikus szenzoros neuropeptidok felfedezése és hatásainak sokoldalú leírása után ennek az évtizednek a végére került be a szakmai köztudatba és vált széles körben elfogadottá, hogy a vazodilatációval és plazmafehérje-kiáramlással járó folyamatot ezek a szenzoros idegelemekből stimuláció hatására felszabaduló peptid-mediátorok közvetítik. A Pubmed adatbázis alapján nyilvánvaló, hogy abban az időben valóban új korszak kezdődött a kapszaicin-kutatások történetében, hisz a „capsaicin” kulcsszóval megjelent közlemények száma 1978-tól óriási, ugrásszerű növekedést mutatott: 1978-ban összesen 95 közlemény található ilyen kulcsszóval, 1983-ban már 383 (ami csaknem 4-szeres növekedés 5 év alatt), 1988-ban pedig már 1137. A jelenleg már 10.000-nél is több kapszaicinnal kapcsolatos közlemény közül a doktori értekezésnél előírt terjedelmi korlátok miatt kénytelen voltam a teljesség igénye nélkül azokra hivatkozni, amelyek a munkámhoz legszorosabban kapcsolódnak. Mivel ennek nem volt célkitűzése a kapszaicin hatásmechanizmusának vizsgálata, hiányoznak a referencialistából alapvető fontosságú, de a bemutatott kísérletekhez lazábban kapcsolódó publikációk.

2.) 1. témakör: Légúti gyulladásmodellekben végzett kísérletek

a) „Az éterrel történő altatás nem a legszerencsésebb választás, hiszen az éter jelentős, részben neurogén gyulladást vált ki; így az adott kísérletben az LPS-t már a gyulladásban lévő légutakba juttatták be.”

Valóban régóta ismert, hogy az éter belélegzése neurogén gyulladást vált ki a légutakban, (Lundberg és mtsai. 1983. Acta Physiol. Scand.; Martling és mtsai. 1984. NS Arch. Pharmacol.), amely azonban rövid időn (1 órán) belül elmúlik, és nem interferál a 24 óra múlva vizsgált LPS hatással. Kontrollként ugyanilyen altatásban PBS-sel kezelt egereket használtunk, amelyekben 24 órával a beadás után nem tapasztaltunk gyulladással kapcsolatos paramétereket. Azt a felvetést azonban jogosnak tartom, hogy az éter-okozta akut neurogén gyulladás befolyásolhatja az LPS penetrációját és ennek következtében a későbbi gyulladással kapcsolatos folyamatok súlyosságát. Éppen ezért mérlegeltünk egyéb altatási lehetőségeket is, azonban más anesztetikumokkal kapcsolatban ugyancsak több technikai nehézség és bizonytalansági faktor merült fel. A ketamin rövid hatású, de izomgörcsöt okoz (xilazinnal együtt alkalmazva a konvulzív hatás kivédhető, de izomrelaxáció úgy sem érhető el), a pentobarbital esetében az ébredés elhúzódó, nehézkes, a nyákszékreció stimulációja kifejezett. Az izoflurán (és egyéb inhalációs altatók) TRPA1 aktiváló, TRPV1 szenzitizáló és neurogén gyulladást keltő hatásaira is vannak adatok (Matta és mtsai. 2007. PNAS). Mivel az intranazális LPS beadáshoz mindenképp olyan rövid időtartamú altatás szükséges, amely izomrelaxációt is okoz, hogy az alkalmazott 60 µl oldat minél mélyebbre jusson a légutakba (az egereket a nyakbőrrel két ujjal fogjuk, függőleges helyzetben a fejük így hátrahajlik, az instilláció után még egy percig ilyen pozícióban maradnak), éterrel altattak erre a célra más csoportok is, többek között az általunk használt referenciaközleményekben (Okamoto és mtsai. 2003. Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.; Wu és mtsai. 2010. Respir. Res.).

b) „Az alveoláris makrofág-invázió kimutatására talán alkalmasabb módszer lett volna a bronchoalveoláris lavage alkalmazása, amellyel pontos kvantitatív adatokat lehetett volna nyerni.”

AZ LPS-sel kiváltott légúti gyulladás alapvetően egy intersticiális gyulladás (pneumonitisz), amely nem a bronchiolusok/bronchusok lumenére, hanem a perivaszkuláris, peribronchioláris térre lokalizálódik. Mivel azonban az egyik vizsgált szövettani paraméter az eozinofil citoplazmájú aktivált makrofágok infiltrációja az alveoláris terekbe és vannak irodalmi adatok is erre vonatkozóan, a modell beállításakor végeztünk bronchoalveoláris mosást (BAL) is, citospin preparátumon és flowcitométerrel is próbáltuk meghatározni a sejtszámokat. Sajnos azonban az eredmények rendkívül nagy szórást mutattak és megbízhatatlannak bizonyultak, valószínűleg annak köszönhetően, hogy a technikai részletek pontos betartása ellenére sem tudtuk alaposan kimosni az alveolusokból a sejteket, a bronchiolusokban pedig (ahogy a szövettani kép is mutatja) nincsenek számottevő mennyiségben. A dolgozatban még nem szereplő, de másfél éve már laborunkban alkalmazott dohányfüsttel kiváltott krónikus bronchitisz modellben nagyon jól tudjuk ilyen célra használni a BAL-t flowcitométeres analízissel.

Mivel azonban a gyulladás intenzitásának megítélésére ez az egyik paraméter a 4 morfológiai értékelési szempont közül, valamint a tüdőhomogenizátumokból MPO aktivitás-mérést is végeztünk (amely ugyan priméren a sokkal nagyobb számban jelenlévő neutrofil sejtek mennyiségére utal, de a makrofágokban is megtalálható enzim), ezek a megközelítések véleményem szerint e modellben meggyőzőnek és megbízhatónak tekinthetők.

3.) 2. témakör: Ízületi gyulladásmoდეllekben végzett kísérletek

a) Professzor úr hiányolja, hogy az eredmények leírása során nem jelöltem meg a felhasznált állatok számát, ami az alkalmazott módszerek esetében fontos lett volna.

Az eredmények bemutatásakor itt a szövegből és ábra-magyarzatokból is sajnálatos módon valóban kimaradt az állatszámok pontos ismertetése, ezt a hiányt a védéskor pótolom. Mentségemül szolgáljon, hogy a „Kísérleti modellek, vizsgálati módszerek” ide vonatkozó ismertetésénél két helyen is szerepel, hogy minden csoportban 6-12 állatot használtunk (a 68. oldal alján és a statisztikai értékelés bemutatásakor 71. oldalon). Kezelések esetén a 12 elemszámok általában az oldószeres kontroll csoportokra vonatkoztak, a kezeltékben 6-8 állatot használtunk. A kísérleteket e krónikus modellekben blokkosítva végeztük, általában 18-20 állatot használtunk egy sorozatban, ennél több egy napon nem mérhető az időigényes funkcionális tesztek miatt. Egyszerre minden kezelési csoportba tartozó állatot vizsgáltunk és velük párhuzamosan oldószereseket is a szisztémás hiba csökkentése céljából, ezért volt nagyobb elemszámú kontroll.

b) „Hogyan egyeztethetők össze a patkányban nyert kísérleti eredmények azokkal a korábbi megfigyelésekkel, amelyek szerint a kapszaicin előkezelést követően a szintén CFA-val kiváltott artritiszes tünetek jelentősen mérséklődtek (J. Physiol. 1995)?”

Lucy Donaldson és munkatársai a Professzor Úr által idézett közleményben 1) nem az általunk használt modellben vizsgáldták, hanem a CFA-t közvetlenül a bokaizület közelébe injektálták intradermálisan, valamint 2) nem szisztémás, hanem a n. ischiadicus körüli *perineurális kapszaicin* előkezelést alkalmaztak. Mivel mi a reumatoid artritisz modelljében kívántuk vizsgálatainkat végezni, a CFA-t a talpba és a faroktöbe adtuk, a szisztémás tünetek elősegítésére továbbá a következő napon még egy faroktöbe történő ismételt injekciót alkalmaztunk. Ez a kezelési protokoll jól definiált poliartritist vált ki patkányban, bár az intraplantáris kezelés oldalán kétségtelenül súlyosabbak a gyulladáso paraméterek. Ezzel szemben az ő modelljük monoarthritisnek tekinthető, így eltérő eredményeink magyarázatául egyrészt a két folyamat különböző pathomechanizmusa szolgálhat. Másik magyarázat lehet az is, hogy mi szisztémás RTX előkezelést alkalmaztunk, amely testszerte funkcióképtelenné teszi az idegvégződéseket, míg ők csak az adott ízület körüli kapszaicin-érzékeny peptiderg afferenseket károsították. Valószínű tehát, hogy szisztémás gyulladáso reakció és ennek következtében a kapszaicin-érzékeny idegvégzödések testszerte történő aktivációja szükséges ahhoz, hogy a szomatosztatin megfelelő mennyiségben felszabaduljon e rostokból és ellensúlyozni tudja a lokálisan felszabaduló tachykininek és CGRP pro-inflammatorikus és pro-nociceptív hatásait.

Figyelembe kell azonban venni azt is, hogy a szisztémás előkezelésként alkalmazott kapszaicin (ill. RTX) eltérő dózisa (Colpaert és mtsai. 1983. Life Sci.; Garrett és mtsai. 1997. Neurosci. Lett.) különböző mértékben károsíthatják az idegvégzödések működését. A kapszaicin és az RTX továbbá más kötőhelyen, eltérő mechanizmussal aktiválja a TRPV1-et, és bár a következmény a deszenzibilizáció szempontjából hasonló, lehetséges, hogy más tekintetben vannak eltérések. A pro-inflammatorikus neuropeptideket és a szomatosztatint expresszáló kapszaicin-érzékeny neuronok két külön populációt képeznek (Gamse és mtsai. 1981. N.S. Arch. Pharmacol.). Elképzelhető tehát, hogy az általunk használt nagy dózisú RTX a szomatosztatint tartalmazó populációra kifejezettebb hatást gyakorol. Mindenesetre saját vizsgálatainkban az előkezelés után a plazma szomatosztatin-szerű immunreaktivitása tartósan és jelentősen csökkent. Eredményeink tehát bizonyították az összefüggést e szenzoros rostokból a szisztémás keringésbe kerülő szomatosztatin koncentrációjának emelkedése és a gyulladásgátló/antihyperalgetikus hatások között.

c) „Az sst₄ génhiányos egerekkel a CFA modelben végzett kísérleti eredmények bemutatásánál az állatszámok ugyancsak nincsenek feltüntetve. Így nehéz megállapítani,

hogy a 9 mérési pontból mindössze kettőben statisztikailag szignifikánsnak bizonyult ödéma és hiperalgéria különbségeknél van-e biológiai jelentősége.”

Ezekben a kísérletekben 8 vad típusú és 6 sst₄ génhiányos egeret használtunk, a standard hibák mindenütt kicsik. A teljes 21 napos kísérleti periódusra vonatkoztatva valóban nem mondható el, hogy a két állatcsoport között jelentős eltérés lenne akár a duzzadás, akár a hiperalgéria és a spontán terhelés-csökkenés tekintetében. Azonban ha a lefolyást figyelembe vesszük csak az első hetet értékeljük (és ezért fontos az egyes mérési pontokra is megnézni külön az eredményeket), akkor egyértelmű, hogy a gyulladás korai szakaszában nemcsak statisztikailag, de biológiailag is jelentős a különbség. Mindemelllett a dolgozatban az eredmények értékelésekor (87. és 89. oldal, és az azóta megjelent közleményben is: Helyes és mtsai. 2009. PNAS) óvatosan interpretáljuk ezeket az adatokat és arra következtetünk, hogy ebben a modellben az sst₄ receptor mellett más sst receptorok is részt vesznek a szomatosztatin gyulladásgátló és anti-nociceptív, anti-hiperalgetikus hatásainak közvetítésében.

d) Eredményeink alapján a szomatosztatin szint a CFA gyulladás 21. napja után jelentősen csökkent, ezzel szemben a lábödéma és a hiperalgéria ezt követően sem fokozódott, hanem csökkent. Ennek magyarázatául az Arthr. Rheum. közleményünkben is azt vetettük fel, hogy a szenzoros idegvégződés a gyulladás citotoxikus hatásának következtében károsodtak. Opponens Úr hiányolja, hogy erre vonatkozóan azonban nem próbáltunk meg bizonyítékot szerezni, annál is inkább, hogy irodalmi adatok alapján a gyulladt szövetben a szenzoros neuropeptidok mennyisége inkább nő, mint csökken (J. Comp. Neurol. 1994).

A kapott peptidmérési eredményeink magyarázata valóban teoretikus, érdekes lenne precíz fénymikroszkópos vagy elektronmikroszkópos módszerekkel megvizsgálni ebben a modellben, hogy mi történik a szenzoros idegvégzésekkel a krónikus gyulladással járó folyamat késői fázisában. Mivel ilyen szintű morfológiai vizsgálatokra munkacsoportunk nincs berendezkedve, ezért a dolgozat diszkussziójában elméleti fejtegetést végeztünk erre vonatkozóan. Az általunk alkalmazott krónikus gyulladásmodellben a 21. nap után a szöveti destrukció még tovább fokozódik, ezért adatok alapján a feltételezés logikusnak tűnik. Ezzel összhangban egyébként krónikusan gyulladt emberi gyomorhártyában több csoport is csökkent szomatosztatin-szinteket talált (Kaneko és mtsai. 1992. Dig. Dis. Sci.; Götz és mtsai. 1995. Scand. J. Gastroenterol.). Nahin és Bryers fentiekben idézett közleményében az adjuváns artritisz modellben 6 nappal a gyulladás kiváltása után találták a fokozott CGRP expressziót, ebben a korai stádiumban az idegvégzések gyulladással járó mediátorokkal történő stimulációja dominál.

Arra vonatkozóan, hogy a 30. napra a csökkenő szomatosztatin-szint ellenére a duzzadás és a hiperalgéria nem fokozódott, hanem csökkent a következő magyarázatok lehetségesek:

- A késői stádiumban ezekben a gyulladással járó paraméterekben valószínűleg számos, gyulladással járó sejt által közvetített komplex mechanizmus, neuro-immun interakció is részt vesz citokineken, kemokineken és egyéb gyulladással járó mediátorokon keresztül. A szomatosztatin egy fontos, de korántsem kizárólagos gátló mediátor, amelynek jelentősége a duzzadásban és hiperalgériában ekkorra már csökken.

- Csökken a pro-inflammatorikus SP és CGRP mennyisége is amelyek ugyancsak szerepet játszanak ezekben a folyamatokban, csak korábbi stádiumokban valószínűleg kisebb jelentőséggel bírnak, mint a szomatosztatin-közvetítette gátlás (ld. következő pontra adott válaszom). E peptidok koncentrációit meg is mértük az ízületi homogenizátumokból, az elküldött Arthr. Rheum. cikk első verziójában szerepelt, azonban az egyik bíráló javaslatára az eredmények interpretálásának könnyítése céljából nem került közzésre.

e) „Hogyan magyarázható, hogy a végződésekből a gyulladáshoz vezető mediátorok által felszabadított pro-inflammatorikus peptidok, amelyek ugyancsak a kapszaicin-érzékeny rostokból szabadulnak fel, gyulladáskeltő hatása nem érvényesül?”

Mind a gyulladáskeltő, mind a gyulladásgátló peptidok felszabadulnak az aktivált kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből, ezek hatása párhuzamosan érvényesül adott szövetben, amely a folyamatot természetesen mindkét irányba befolyásolhatja. Az eredő hatás attól függ, hogy melyeknek van nagyobb vagy döntő jelentősége az adott pathomechanizmusban. Az ízületi gyulladásban nyilvánvalóan van szerepe a P-anyagnak és a CGRP-nek is, erre vonatkozóan számos irodalmi adat, sőt újabb saját kísérleti adatunk is rendelkezésre áll tachykinin knockout egerekkel és antagonistákkal. A szomatosztatin gátló hatásának azonban nagyobb jelentősége van ebben a komplex, jelentős mértékben nem-neurogén, immunmechanizmusokat magába foglaló folyamatban, a szenzoros idegvégződés szerepe tehát összességében protektív.

f) „A jelölt feltételezi, hogy a szomatosztatint tartalmazó afferensekben nem a TRPV1, hanem a TRPA1, bradykinin, illetve purin receptorok expressziója dominál. Erre az elvégzett vizsgálatok nem szolgáltatnak bizonyítékot.”

Teljes mértékben egyetértek ezzel a kritikai megjegyzéssel, e teóriát a diszkusszióban valóban csupán két funkcionális eredményünkre alapoztam: 1) szisztémás RTX előkezelést követően, amely a kapszaicin-érzékeny idegvégződés egészének funkció-kiesését okozta, csökkent a plazma szomatosztatin szintjének emelkedése és fokozódtak a gyulladáshoz vezető paraméterek, 2) TRPV1 receptor génhiányos egerekben e csatorna hiánya azonban ezzel szemben csökkentette a gyulladást és a hiperalgéziát. Munkacsoportunk szövettani lehetőségei és tudása jelenleg nem alkalmas idegvégződéseken precíz ko-lokalizációs vizsgálatok elvégzésére és konkrét irodalmi adatot sem találtam erre vonatkozóan. Mindenképp érdekes lenne azonban ilyen irányú vizsgálatokat végezni a jövőben hipotézisünk igazolására.

4.) 3. témakör: a kapszaicin-érzékeny idegvégzések, a TRPV1 és sst₄ receptorok, valamint a PACAP-38 szerepének vizsgálata a nocicepcióban és antinocicepcióban

a) Professzor Úr hiányolja az egységes koncepciót, esetlegesnek tartja a korábbi vizsgálatok, irodalmi adatok ismertetését. A neuropátiás fájdalom összefüggéseit vizsgáló kísérletekből hiányolja továbbá a termális hiperalgéria vizsgálatát, és a sokoldalú metodikai megközelítést, a megfigyelt hatások mechanizmusának mélyebb tisztázását. Felveti, hogy érdekes lett volna a TRPV1 receptor szerepének diszkutálása a diabéteszes mechanikai hiperalgéria mechanizmusában, különösen, mert ez az ioncsatorna mechanikai ingerekre nem érzékeny.

Ez a témakör az első kettővel szemben valóban nem a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégzéseknek betegségmodellekre alapuló gyulladáshoz vezető folyamatokban betöltött szerepének részletes vizsgálatára irányul, hanem e nociceptor-populáció és az ezen expresszálandó receptorok jelentőségének feltérképezését célozza különböző nocicepció modellekben. Igyekeztem azért egységes gondolatmenetre felfűzni azokat az értékes kísérleti eredményeket, amelyeket 5 közlemény formájában publikáltunk a fájdalomkutatás vezető folyóiratában, a Pain-ben (2005 és 2009), a Eur. J. Pharmacol.-ban (2004 és 2006), és a Life Sci.-ben (2007). A kapcsolódási pont a nocicepció-antinocicepció vizsgálata, bár kísérleteink nem a mechanizmusok mélyebb elemzésére, hanem e folyamatokban érdekes mediátorok és potenciálisan hatékony célmolekulák szerepének vizsgálatára irányultak.

Szolcsányi Professzor nagy neurofarmakológia munkacsoportján belül az elmúlt 10 évben a kutatási területek és projektek szétváltak, jelen doktori értekezésemben a sajátomnak tekinthető eredmények szerepelnek, amelyeket az én irányításommal, PhD hallgatóimmal, posztdoktori munkatársaimmal és diákköröseimmel végeztünk. A fájdalomfolyamatok molekuláris mechanizmusainak vizsgálata -különös tekintettel a termonocicepcióra- Pethő Gábor kollégám területe.

A már említett terjedelmi megszorítások miatt itt sem kerülhetett sor a korábbi eredmények teljesség igényével történő ismertetésére.

A neuropátiás fájdalom vizsgálatára irányuló kísérletekben a termonocicepcióra és a termális hiperalgéziára vonatkozóan azért nem mutattam adatokat, mert ezekben a krónikus modellekben az általunk használt emelkedő hőmérsékletű forró lap módszerrel nem találtunk küszöbcsökkenést. A klasszikus konstans hőmérsékletű forró lapon latenciaidő-méréssel nyert eredményeink pedig -amelyre vonatkozóan vannak adatok az irodalomban- olyan nagy szórást mutattak e modelljeinkben, hogy az ezeket az adatokat nem tartottuk megbízhatónak értékelhetőnek. Mindenesetre más szerzők ezzel a módszerrel TRPV1 knockout egerekben alapállapotban is hosszabb termonociceptív latenciaidőről (Davis és mtsai. 2000. Nature) és csökkent hő-hiperalgéziáról számolnak be a streptozotocinnal kiváltott metabolikus (Pabbidi és mtsai. 2008. Mol. Pain) és a ciszplatinnal indukált toxikus neuropátia modellekben (Ta és mtsai. 2010. Mol. Pain) egyaránt. Caterina és mtsai. (2000. Science) azonban nem találtak különbséget TRPV1 génhányos egerekben az alap hőmérsékleti nocifenzív viselkedési latenciában, valamint az idegkötéssel kiváltott mononeuropátia modellben sem hő- sem mechanikai hiperalgézia vonatkozásában (ez utóbbi összhangban áll a mi adatainkkal). Abban viszont egységesek a TRPV1 hiányos egerekkel nyert eredmények, hogy az akut gyulladáshoz termális hiperalgézia (carrageenin, CFA) közvetítésében jelentős szerepe van a TRPV1 csatornának. Újabban több adat is bizonyította, hogy neuropátiában hideg-allodínia jön létre, ezt mi a bemutatott kísérletsorozatban még technikai háttér hiányában 6 évvel ezelőtt nem tudtuk vizsgálni. A jelenleg rendelkezésre álló műszerrel azonban, amely fokozatosan csökkenő hőmérsékletű hideg lapként is tud funkcionálni, erre vonatkozóan a közeljövőben tervezünk kísérleteket. A ciszplatinnal kiváltott toxikus polineuropátia modellben konstans hőmérsékletű hideg lapon vizsgálva a fentiekben említett új közlemény szignifikánsan kisebb hideg-hiperalgéziáról is beszámol TRPV1 génhányos állatokban (Ta és mtsai. Mol. Pain 2010). Bár a hideg-érzékelés és a hideg-fájdalom mechanizmusa pontosan nem ismert, közvetlenül elsősorban a TRPM8 és kisebb mértékben a TRPA1 receptorok aktivációjához köthető, a TRPV1 csatornák közvetetten játszhatnak ebben szerepet (Foulkes és Wood 2007. Channels).

b) A kísérletes diabéteszben és ciszplatin neuropátiában a plazma szomatosztatin-szint emelkedés ugyan statisztikailag szignifikánsnak adódott, Opponens Úr véleménye szerint azonban a 10-12%-os emelkedés nem tűnik nagyon jelentősnek.

A szomatosztatin kismértékű, de statisztikailag éppen szignifikáns emelkedései a szisztémás keringésben ezekben a krónikus modellekben a peptid tónusos kiáramlásra utalnak az idegvégződésekből a hosszantartó (5-7 hét) TRPV1 aktiváció következményeként. Bár a szöveti koncentrációt ezekben a modellekben nem tudjuk pontossággal meghatározni, véleményem szerint a perifériás vér tekintetében még ilyen kismértékű, ám tartós emelkedés is felelőssé tehető a tapasztalt biológiai hatásért a nociceptorok tónusos gátlásán keresztül. A szomatosztatin ilyen hatásaira vonatkozóan Carlton és mtsai. közöltek adatokat (Carlton és mtsai. 2001. J. Neurosci., 2003. Neurosci.). Természetesen nem azt szeretném állítani, hogy kizárólag a szomatosztatin tehető felelőssé

a TRPV1 aktivációval kialakuló anti-hiperalgetikus hatásnak, de legalábbis részben e peptid is szerepet játszik ebben az érdekes ellenregulációs mechanizmusban.

c) A PACAP komplex hatásait bemutató fejezetben kifogásolható, hogy nem tértem ki a hátsógyöki ganglionokban gyulladásszerű és neuropátiás folyamatok során megnyilvánuló messenger plaszticitás esetleges szerepére, amely egyaránt érinti a pro-és antinociceptív hatású szenzoros neuropeptideket.

Jogosnak tartom Professzor Úr kritikai észrevételét, hisz a messenger plaszticitásra vonatkozóan valóban rendkívül gazdag az irodalom, ennek vizsgálata azonban nem képezte a munkánk célkitűzését és a már említett terjedelmi korlátok miatt nem tudtam e témába a diszkusszió szintjén sem elmélyedni.

Számos szerző kimutatta, hogy axonkárosodást követően és adjuváns monoarthritisben a primér szenzoros neuronok sejttestjében gyorsan fokozódik a PACAP-expresszió, sőt olyan nagyobb neuronokban is megjelenik, ahol intakt állapotban nem expresszálódik (Höckfelt és mtsai. 1994. Trends Neurosci.; Mulder és mtsai. 1999. J. Neurobiol.; Jongsma és mtsai. 2001. Eur. J. Neurosci.; Zhang és mtsai. 2006. Neuroscience). Ugyancsak fokozódik egyéb, gátló hatású neuropeptid, a galanin, opioid peptidok és a szomatosztatin expressziója, amelyeknek perifériás idegkárosodás elleni adaptív válaszból, valamint az adott neuron túlélésében és helyreállításában tulajdonítanak jelentőséget. A PACAP szerepe külön érdekes, mert az előzőekben felsorolt gátló peptidokkal ellentétben, ez alapvetően excitátoros az idegsejteken, mégis, valószínűleg fontos szerepet játszik a neuronok túlélésében, differenciálódásában, a periaxonális szövet helyreállításában. Ezzel szemben idegkárosodásban és gyulladásban a pro-inflammatorikus/pro-nociceptív hatású CGRP és a SP mRNS mennyisége és az immunreaktív sejtek száma általában egyaránt csökken, ami ugyancsak a védekező mechanizmus része lehet (Höckfelt és mtsai. 1994. Trends Neurosci.; összefoglaló: Jancsó 1992. Exp. Physiol.).

5.) A 4. témakört (A szelektív sst₄ receptor agonista J-2156, a PACAP-38 és az endomorfín-1 hatásainak hátterében álló mechanizmusok vizsgálata akut gyulladásmoделlekben) Opponens Úr egy „gyári jelentéshez” hasonlítja és túl tömörnek, deskriptívnek tartja a vizsgált vegyületek hatásainak ismertetését.

Bár alapvetően fiziológiai/patofiziológiai érdeklődésű kutatónak tartom magam, mégiscsak farmakológus vagyok és ennek megfelelően gyógyszeres szemlélettel rendelkezem. A klasszikus farmakológiai vizsgálatok sokszor mechanisztikusak, jól definiált modell-rendszerekben vegyületek precíz teszteléséről szólnak. Munkám alapvető célkitűzése betegségmodellek segítségével gyulladásszerű és fájdalommal járó folyamatok pathomechanizmusának megértése, amely segítségével új gyógyszer-célpontok azonosíthatók és gyógyszerfejlesztési irányokat indíthatunk el. Ennek része az ebben a témakörben bemutatott sst₄ receptor-szelektív agonista hatásainak vizsgálata. Kétségteljesen ez a fő, legjobban alátámasztott és legelőrébb tartó téma, a szomatosztatinon kívül egyéb potenciális mediátorok is érdekelnek, mivel a neurogén gyulladás a több évtizedes erőfeszítések ellenére terápiásan még mindig nehezen kontrollálható probléma. Alaposan valóban nem mélyedtem el a „mechanizmusok vizsgálatában”, ezt a kifejezést nem a molekuláris folyamatokra, inkább a neurogén- és nem neurogén hatásmechanizmusok vizsgálatának megjelölésére szántam.

„A PACAP-38 perifériás in vivo gátló hatásait részben az érzőidegekre kifejtett, peptid-felszabadulást gátló hatásnak tulajdonítja, amelynek mechanizmusát azonban nem tudta tisztázni. Professzor Úr véleménye szerint nem zárható ki, hogy a PACAP más, ismert

nem idegi hatásai (pl. szisztémás vérnyomásra és szöveti mikrocirkulációra kifejtett hatásai) révén befolyásolja a gyulladással kapcsolatos reakció lefolyását (Eur. J. Pharmacol. 1999). Hasonló megfontolások felmerülnek az endomorfín-1 esetében is (Clin. Exp. Pharm. Physiol. 2002), amely neurogén gyulladást gátló hatása nem meglepő, mert μ -opioid agonisták ilyen hatása régóta ismert (Lembeck és mtsai. Eur. J. Pharmacol. 1982)."

E peptideket azért vizsgáltuk az *in vitro* és *in vivo* kísérleteinkben, mert arra kerestük a választ, hogy a szomatosztatinon kívül a szenzoros rostokból felszabaduló egyéb mediátorok milyen hatást gyakorolnak magukra az idegvégződésekre, illetve az akut neurogén gyulladással kapcsolatos folyamatokra. Azért választottuk ezeket a peptideket, mert mindkettőt kimutatták a kapszaicin-érzékeny afferensekben és igazolták/igazoltuk stimuláció hatására történő felszabadulásukat.

A PACAP általunk leírt gátló hatásainak mechanizmusa nagyon meglepő, érdekes, és az ismert receptorokkal, az azokhoz kapcsolható jelátviteli utakkal nem magyarázható. Saját módszertani lehetőségeink jelenleg nem alkalmasak arra, hogy azonosítsuk a funkcionális eredmények alapján valószínűsíthető gátló receptort vagy az ismert receptorok gátló jelátviteli folyamatokhoz kapcsolt splice variánsát. Mivel más rendszerekben (pl. trofoblaszt sejteken) is találtak hasonló gátló hatásokat, kollaborációs lépéseket tettünk már ebbe az irányba. Bár ez endomorfín-1 esetében a receptorális mechanizmus, a G_i -proteinhez kapcsolt szignál-transzdukciós folyamatok, és a μ receptor agonista Met-enkefalinamidra vonatkozó régebbi adatok alapján eredményeink valóban nem meglepőek. Azonban az is ismert, hogy ez a 4 aminosavból álló peptid más μ -receptor agonistáktól (pl. enkefalinamid, morfin) eltérő módon kötődik és más mechanizmusokkal aktiválja a receptorokat, ezért számos eltérő hatással is rendelkezik (Mizoguchi és mtsai. 2002. Jpn. J. Pharmacol.). Eredményeink újdonságtartalma tehát e több szempontból is másként viselkedő endogén μ -opioid agonista idegvégződésekre kifejtett hatásának leírása.

A PACAP közvetlenül simaizom-sejtjében emeli a cAMP szintet (Whalen és mtsai. 1999. Eur. J. Pharmacol.), az endomorfín-1 valószínűleg az endothelsejtekben hat és NO termelésen keresztül vált ki értágulatot (Champion és mtsai. 2002. Clin. Exp. Pharm. Physiol.). Számos adat mutatja, hogy i.v. bólus injekcióban, illetve infúzióban adva mindkét peptid rövid ideig tartó, mérsékelt, de szignifikáns vérnyomáscsökkenést eredményez (Gardiner és mtsai. 1994. Br. J. Pharmacol.; Champion és mtsai. 1996. Ann. NY Acad. Sci.; Liu és mtsai. 1998. Peptides; Czaplá és mtsai. 1998. Life Sci.; Whalen és mtsai. 1999. Eur. J. Pharmacol.; Reglődi és mtsai. 2000. Stroke; Ohtaki és mtsai. 2004. Regul. Pept.). *In vivo* kísérleteinkben mi 10 perces i.p. előkezelést alkalmaztunk, így a peptidek plazmakoncentrációjának maximuma és változása nem összehasonlítható az i.v. adással. Altatott egérben a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p. PACAP dózis (melyet a neurogén gyulladással kapcsolatos kísérletekben használtunk) csak minimális, nem szignifikáns mértékben befolyásolta a szisztémás vérnyomást. Mindenesetre ez a hatás valóban befolyásoló faktor lehet az endomorfín-1 és a PACAP nagyobb dózisa esetén.

Az értágító hatásuk miatt e peptidek fokozzák a szöveti mikrocirkulációt, amely természetesen szerepet játszhat az akut gyulladással kapcsolatos folyamat fokozódásában. Ennek ellenére azonban valószínűleg az idegvégződésen történő hatás, a tachykinin- és CGRP felszabadulás-gátlása következtében ezek eredője mégis a plazma-extravazáció csökkenése.

6.) „Mivel magyarázható, hogy az ingerelt végződésekből felszabaduló szomatosztatin éppen ott nem gátolja a gyulladással kapcsolatos peptid-mediátorok felszabadulását, ahol a legnagyobb koncentrációban van jelen, nevezetesen az ingerelt végződés közelében?”

Természetesen nem gondolom, hogy az ingerelt idegvégződésből felszabaduló szomatosztatin lokálisan ne gátolná ugyanannak a végződésnek a működését és a gyulladáskeltő peptid-mediátorok felszabadulását, ilyen kijelentést nem tettem. Sőt, az sst receptor-izgatás magának a szomatosztatinnak a felszabadulását is képes gátolni, erre adatokat is szolgáltatunk az *in vitro* trachea-perfúziós rendszerben szintetikus agonisták segítségével (Helyes és mtsai. 2001., 2006. Br. J. Pharmacol.; disszertáció 133. o.). A neurogén gyulladás, amit antidrómos vagy ortodrómos ingerlésre látunk az innervációs területen az a serkentő és gátló mechanizmusok eredője. Azzal, hogy a szisztémás hatást hangsúlyoztam, azt szerettem volna nyomatékosítani, hogy ezen túlmenően- ellentétben a döntően az innerváció helyén maradó tachykininokkal és CGRP-vel- a szomatosztatin bejut a keringésbe és a test távolabbi pontjain is kifejti hatásait.

7.) *Opponens Úr véleménye szerint a vérben/plazmában mért szomatosztatin helyett sokkal meggyőzőbb lett volna, ha a szomatosztatin felszabadulását izolált preparátumban (pl. Reeh-féle bőr-ideg preparátumban) bizonyítjuk. Ilyen kísérleti elrendezésben (orto- vagy antidrómos) ingerlésre felszabaduló szomatosztatin igen nagy valószínűséggel csak az idegekből származhat.*

Egyetértek abban, hogy *in vitro* elrendezésben egyértelműbben bizonyítható, hogy a szomatosztatin a kapszaicin-érzékeny idegvégzésekkel szabadul fel. A 15 éve általunk beállított és azóta rutinszerűen használt izolált patkány trachea preparátumon ezért számos kísérletben bizonyítottuk a szomatosztatin felszabadulását az érzőideg-végzések szelektív kémiai (10^{-7} M kapszaicin, 10^{-10} M RTX), illetve elektromos ingerlésével (10 Hz, 0.1 ms, 40 V, 120 s; 1200 imp). E paraméterek bizonyítottan specifikusak az idegvégzésekben lokalizálódó gyors Na^+ - csatornák aktiválására (Birmingham és Wilson 1963. Br. J. Pharmacol). A trachea nagyon jó modellszervnek bizonyult peptid-felszabadulási vizsgálatokhoz, mert gazdag kapszaicin-érzékeny innervációval rendelkezik, és a végzések közel vannak a felszínhez, így könnyen stimulálhatók (dolgozat 128. o).

Azzal, hogy az *in vivo* kísérleti elrendezésekben a plazmában mértük a szomatosztatin koncentrációt az volt a célunk, hogy az élő állatban- kezdetben pontosan tervezett egyszerű protokollok szerinti stimulációk után (Szolcsányi és mtsai. 1998a,b. Br. J. Pharmacol., amely közlemények még a PhD dolgozatom egyik pillérét képezték), majd komplexebb betegségmodellekben próbáljunk közvetlen, meggyőző biokémiai bizonyítékot szolgáltatni a szenzoros eredetű szomatosztatin felszabadulására és a szisztémás keringésbe jutásra. Újabban emberi patofiziológiai állapotokban (műtéti trauma, szepszis) is leírtuk az állatkísérletekben bizonyítottához hasonló szomatosztatin-mediált ellenregulációs mechanizmust (Sütő és mtsai. 2010. Peptides). Az *in vitro* és *in vivo* modellek nem egymást helyettesítik, hanem kiegészítik, és a következtetést erősítik.

8.) *„A TRPV1 receptor szerepe a különböző gyulladással és fájdalommal járó kórképek pathomechanizmusában meglehetősen komplex. Bár aktivációja elsősorban pro-inflammatorikus és pro-nociceptív hatásokat fejt ki, az értekezés érdekes, új megállapítása, hogy légúti gyulladásban és polineuropátiás állapotokban a csatorna aktiválása protektív hatással rendelkezik. Jelentheti-e ez azt, hogy ezekben a kórállapotokban a jövőben sor kerülhet TRPV1 agonisták terápiás alkalmazására?”*

Az elmúlt évtizedben 55 gyógyszergyár indított gyógyszerfejlesztési projekteket TRPV1 receptoron ható ligandok fejlesztésére elsősorban új analgetikum-csoport irányába, ezek többsége antagonistákra irányul. A preklinikai vizsgálatokra eddig kb. 1 milliárd dollárt költöttek, amire a gyógyszerkutatás történetében nem volt példa (Wong és Gavva, 2009. Brain Res. Rev.; Gunthorpe és Chinz, 2009. Drug Discov. Today). Bár számos

antagonistával kapcsolatban legnagyobb problémaként a hipertermizáló mellékhatás jelentkezett, több fejlesztési vonal már a klinikai vizsgálatok késői fázisaiban van.

A TRPV1 csatornán ható első gyógyszerkészítmény azonban agonista, maga a kapszaicin, amelyből a 8%-os koncentrációt tartalmazó tapasz, Qutenza (NGX-4010) néven néhány hónapja került forgalomba. A helyi érzéstelenítővel előkezelt területen fél-egy órán át kell rajtahagyni a tapaszt, és ez az egyszeri alkalmazás 3 hónapig csökkenti a neuropátiás fájdalmat. Hatékonyágát multicentrikus, randomizált, kettős-vak klinikai vizsgálatok bizonyítják posztherpeszes neuralgiás (402 beteg; Backonja és mtsai. 2008. *Lancet Neurol.*) és HIV-asszociált szenzoros neuropátiás (307 beteg; Simpson és mtsai. 2008. *Neurology*) betegcsoportokban. Jancsó Professzor és munkatársai által leírt és részletesen tanulmányozott perineurális (1987. *Acta Physiol. Hung.*), illetve Tony Yaksh csoportja által vizsgált intratekális (1979. *Science*) kapszaicin-alkalmazás ugyancsak potenciális terápiás lehetőségeket jelenthet krónikus fájdalomállapotokban, ilyen irányú klinikai fejlesztésekről azonban nincs tudomásom. Szintetikus TRPV1 agonisták a WL-1001 és WL-1002 (Winston Labs), amelyeket oszteoartritiszes fájdalom helyi kezelésére, valamint orrspray-ben trigeminus neuralgiára és migrén-profilaxisra fejlesztenek jelenleg preklinikai fázisban (Jara-Oseguera és mtsai. 2008. *Curr. Mol. Pharmacol.*; Knotkova és mtsai. 2008. *J. Clin. Pain*). A lokálisan alkalmazott nagy dózisu agonista-kezelés az idegvégződés deszenzibilizációját, hosszan tartó funkció-kiesését okozza, ezt igazolja a Qutenza tapasz esetében is biopsziás mintákon Kennedy és mtsai. közleménye (2010. *Pain*). Agonisták esetében azonban a deszenzibilizáló hatáson kívül a másik lehetséges mechanizmus, hogy a TRPV1 tartós, tónusos aktivációja krónikus gyulladáshoz és fájdalomállapotokban gátló mediátorok (mi elsősorban a szomatosztatin szerepét bizonyítottuk) felszabadulását eredményezi. A mi közleményeink után több más munkacsoport is bizonyította a TRPV1 aktiváció protektív hatását nocicepció, gyulladás és szepsziszmodellekben (összefoglaló: Alawi és Keeble 2010. *Pharmacol. Ther.*). Ezt az elméletet támasztja alá a régóta ismert és alkalmazott kapszaicines bedörzsöléssel kiváltott ellenirritáció jelensége. Bár ilyen irányú konkrét gyári feljesztésekről jelenleg nem tudok, véleményem szerint a TRPV1 tónusos aktivációját okozó agonisták, amelyek nem váltanak ki fájdalmat és csípő érzést, ugyancsak ígéretesek lehetnek szisztémás alkalmazásban is. Ennek realitását indokolja, hogy korábban patkány n. ischiadicus antidrómos elektromos ingerlése során bizonyítottuk, hogy a szomatosztatin már 0.1 Hz-cel történő stimulációnál is felszabadul a kapszaicin-érzékeny végződésből, amikor a gyulladáskeltő peptidok még nem (Szolcsányi és mtsai. 1998b. *Br. J. Pharmacol.*). Elképzelhető tehát, hogy kémiai úton is lehet úgy aktiválni a TRPV1 csatornát, hogy lokális irritáció, neurogén gyulladás és fájdalom csak minimális mértékben jelentkezzen, de a szomatosztatin (és esetleges egyéb gátló mediátorok) felszabaduljanak az afferensekből.

Végezetül még egyszer köszönöm Professzor Úrnak a dolgozatom bírálatába fektetett munkáját, hasznos és elgondolkodtató kérdéseit, felvetéseit, megjegyzéseit. Remélem, válaszaimat elfogadhatónak találja.

Pécs, 2010. augusztus 13.

Dr. Helyes Zsuzsanna

Válasz Prof. Matesz Klára egyetemi tanár opponensi véleményére

Először is nagyon köszönöm Professzor Asszonynak az értekezésem alapos értékelését, az elgondolkodtató kérdéseket, a kritikai megjegyzéseket és természetesen a dicsérő szavakat.

1.) „11. oldal: A tartós vagy ismételt TRPV1 aktiváció hatására kialakuló folyamatok (mitochondrium duzzadás, idegvégződés működő képtelenné válása) reverzibilis folyamatok-e, továbbá ezek a folyamatok mennyiben érintik a szenoros neuron közvetlen és közvetett centrális kapcsolatait?”

A TRPV1 receptor agonisták (kapszaicin, resiniferatoxin: RTX) nagy dózisainak ismételt alkalmazása után kialakuló deszenzibilizáció mechanizmusainak és következményeinek tekintetében alapvetően különbséget kell tennünk a) újszülött- és felnőttkorban, valamint b) lokális és szisztémás úton történő alkalmazások között. Újszülöttkori szisztémás előkezelés egyértelműen irreverzibilis sejtpusztulást eredményez a végződések degenerálódás (Jancsó és mtsai. 1977. Nature; Patterson és mtsai. 1992. Pain), amelyet idegnövekedési faktor (NGF) adásával ki lehet védeni (Szőke és mtsai. 2002. Neuroscience). Ezeknek a folyamatoknak az elemzésére most nem térek ki, mivel a jelen disszertációban ilyen előkezelést nem alkalmaztuk. A felnőttkori szisztémás kapszaicin, illetve RTX kezelés hatásai dóziszfüggőek és ennek alapján 4 stádiumra/fázisra oszthatók (összefoglaló: Szolcsányi 1993. *Capsaicin in the Study of Pain*, ed. Wood J):

1) Excitáció, aktiváció: A Na^+ és Ca^{2+} ionok beáramlása következtében depolarizáció és szenoros neuropeptid-felszabadulás jön létre másodpercek alatt, a hatás az aktivációt követően másodpercek/percek alatt megszűnik.

2) Szenoros neuron-blokkoló hatás: Az idegvégződés deszenzitivizációja jön létre különféle stimulusokkal szemben, azonban nincs jelentős peptid-depléción a perifériás végződésből. Ultrastrukturális változások tapasztalhatók a sejttest és a végződés szintjén egyaránt (pl. mitokondriumduzzadás, vakuolizáció), de nincs sejtpusztulás, degeneráció. Ez az állapot órák, illetve napok alatt helyreáll, tehát ilyenkor a folyamat egyértelműen reverzibilis.

3) Hosszantartó, szelektív neurotoxikus hatás: Az idegvégződés ingerelhetőségének teljes megszűnése (kémiai, hő, és mechanikai stimuláció hatása egyaránt kiesik), az axonális transzport gátlása, a neuropeptid-tartalom deplécióna jön létre, amely NGF-fel kivédhető. A sejttestek megtartottak, de a mitokondrium-duzzadás kifejezett, azonban mind a perifériás, mind a centrális idegvégzések degenerálódnak. E morfológiai eltérések tartós funkcionális károsodással is járnak a sejttest és a végzések szintjén egyaránt, amelyek percekben belül elkezdődnek, hetekig/hónapokig tartanak, bizonyos folyamatok tekintetében reverzibilisek, másokra irreverzibilisek. Egy hét múlva például nem alakul ki neurogén gyulladás (vazodilatáció, plazmafehérje-kiáramlás) a bőrben a perifériás végződés mustárolaj, kapszaicin vagy antidiómos elektromos idegingerlés hatására, ami néhány hónappal az előkezelés után teljesen helyreáll. A hőregulációs zavar azonban ezzel szemben nem normalizálódik (Jancsó-Gábor és mtsai. 1970. J. Physiol.). Forró ingerekkel a végződés 3-4 hét múlva nem aktiválható, kémiai ingerek többségével (pl. magával a kapszaicinnal) még 2 hónap múlva sem. Deszenzibilizált állatokban ezért a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

kapszaicin szembe cseppentése nem vált ki jellegzetes törölő/vakaró viselkedési reakciót (wiping teszt; kemonocifenzív reakció). A dolgozatban bemutatott kísérletekben mi is ezt az egyszerű tesztet használtuk a szisztémás RTX előkezelés hatásosságának ellenőrzésére. A kémiai ingerelhetőség tekintetében érdekes még megjegyezni, hogy a xilollal kiváltott nocifenzív reakció 150 mg/kg szisztémás kumulatív dózis után 25 nappal már visszatért, 400 mg/kg után azonban nem. Valószínű tehát, hogy a kapszaicin-érzékeny neuronpopuláció perifériás és centrális végződése a nagy dózisú kapszaicin-kezelés hatására elpusztulnak (Szolcsányi 1987. Acta Physiol. Hung.; Chung és mtsai. 1990. Brain. Res.).

4) Teljes, irreverzibilis sejtpusztulás: *in vivo* újszülöttkori kezelés után, *in vitro* nagy koncentrációjú kapszaicin tartós alkalmazását követően jön létre (Jancsó és mtsai. 1977. Nature; összefoglaló: Jancsó és mtsai. 1978. Acta Physiol. Hung.).

Az általunk alkalmazott szisztémás, felnőttkori előkezelés esetében a tartós, szelektív neurotoxikus hatás érvényesül, amely az általunk vizsgált néhány hetes időintervallumban nem reverzibilis változás.

A pszeudounipoláris szenzoros neuron centrális végződéseit ezek a változások hasonlóképpen érintik, mint a perifériás végződéseket. Ennek következtében a gerincvelői hátsó szarv szuperficiális rétegeiben a primér afferens markerek (tiamin monofoszfátáz, béta glicerofoszfátáz, CGRP, SP) számottevő csökkenése (Bucsics és mtsai. 1988. J. Neurosci. Methods; Chung és mtsai. 1990. Brain. Res) és a végzések degenerációja tapasztalható (Jancsó 1978 Cell. Tissue Res.; Hiura és mtsai. 1990. Arch. Histol. Cytol.).

2.) „14. oldal: Vannak-e mennyiségi és minőségi különbségek a hízósejtekből felszabaduló mediátorok között a különböző fajokban? Ha vannak ilyen különbségek, ez azt jelentheti, hogy ezeknek a mediátoroknak a szerepe a gyulladási érválaszban fajoként különböző lehet. Emberben például a hízósejtek szerotonin-tartalma csekély.”

A hízósejtek szerepére vonatkozóan nagyon kevés, csak közvetetten kapcsolódó saját kísérletet végeztem, mindössze a dextránnal kiváltott nem-neurogén gyulladásmódelben (IV. témakör, 131. o.). E sejtekkel kapcsolatos irodalom viszont óriási, és egyértelműen bizonyítja, hogy a belőlük felszabaduló mediátorok minőségében és mennyiségében, valamint a felszabadulás mechanizmusában és a mediátorok patofiziológiai jelentőségében számottevő faji különbségek tapasztalhatók. Különösen sok eltérés van az ember és a rágcsálófajok között, de egér és patkány hízósejtek is számos különbséget mutatnak. Ezen túlmenően még azonos fajon belül is jelentős heterogenitást találtak fejlődéstani, morfológiai, biokémiai, immunológiai és funkcionális tekintetben egyaránt a szerv- és szöveti lokalizációtól függően (gasztrointesztinális/ peritoneális/ tüdő/ bőr stb., illetve rágcsálókban a két fő típus, a nyálkahártya és kötőszöveti típusok között). A gasztrointesztinális traktusban lévő mukózális hízósejtek pl. kisebbek, kevésbé granuláltak, kevesebb hisztamin és elhanyagolható szerotonin-tartalommal rendelkeznek, és nehezebben aktiválhatók, mint a légutakban lévők (összefoglalók: Welle 1997. J. Leukoc. Biol.; Moon és mtsai. 2010. Mucosal Immunol.; Forsythe és Ennis, 2000. Inflamm. Res.). Különböző patofiziológiai állapotokban az aktivált hízósejtek, és gyógyszerekre (kromoglikátok, steroidok, foszfodiészteráz-gátlók, stb.) adott válaszkészség tekintetében ez a heterogenitás még tovább fokozódik és a kép még bonyolultabbá válik.

A hízósejtekre irányuló kísérletekben évtizedeken keresztül technikai okokból az egyszerűen izolálható és tenyésztendő egér peritoneális makrofágokat használták, a rendkívül gazdag és sokoldalú irodalmi adat nagy része ezekből származott. A legnagyobb probléma, hogy az ezekből nyert eredményekből levont következtetéseket általános érvényűnek tartották, pedig emberben nincs is ilyen sejtpopuláció. Hasonló probléma a hízósejt-funkciókra vonatkozó *in vivo* állatkísérletek (pl. az akut vaszkuláris reakció)

eredményeinek interpretálhatósága. Ezek alapján óvatosságra intenek ezen adatok emberi patofiziológiai folyamatokra történő extrapolációjával és a hízósejteket befolyásoló terápiás lehetőségekkel kapcsolatban. Az utóbbi években ezért az emberi makrofág-kultúrákon végzett vizsgálatokat részesítik előnyben.

A hízósejtek granulumaiból felszabaduló legfontosabb mediátorok biogén aminok (hisztamin, szerotonin), proteoglikánok (heparin, kondroitin-szulfát E), hidrolázok, oxidatív enzimek, proteázok (triptáz, kimáz, karboxi-peptidáz, katepszin G). A *de novo* membránlipidekből szintetizálódó gyulladáshoz vezető mediátorok a PGD₂, LTC₄, LTD₄ és a PAF. A species-különbségekre vonatkozóan rengeteg közlemény található, ezek felsorolása helyett két nagyon jól felépített új összefoglalóra hivatkozom, amelyek bemutatják a legfontosabb eltéréseket az emberi és egér/patkány hízósejtek mediátorai között (Bischoff 2007. *Nature Rev. Immunol.*; Moon és mtsai. 2010. *Mucosal Immunol.*).

- Emberben mindegyik hízósejt-típus tartalmaz heparint és triptázt, kimázt azonban csak egyik alpopuláció, ez alapján csoportosíthatók. Rágcsálókban ezzel szemben egyértelműen elkülöníthető a nyálkahártya és a kötőszöveti típus: csak az utóbbi heparintartalmú és triptázok helyett más proteázokat szekretálnak.

- A kötőszöveti hízósejtek több mint 15-20-szor több hisztamint termelnek, mint a nyálkahártyában lévők. Jelentős species-különbséget találtak patkány és emberi hízósejtekből a hisztamin felszabadulás tekintetében mechanizmusában is.

- A triptázok tekintetében is számottevő különbség van az ember és az egér között mind az enzimtípusok között, mind a különféle stimulusokkal (interferon, retinolsav, forbolészter) történő indukálhatóságban (Huang és mtsai. 1993. *Scand. J. Immunol.*).

- A proliferációhoz és differenciálódáshoz is eltérő folyamatok és faktorok szükségesek: emberben az őssejt faktor és az IL-4, rágcsálókban az IL-3 (Welle 1997. *J. Leukoc. Biol.*; Bischoff 2007. *Nat. Rev. Immunol.*).

Újabban elérhető egy online adatbázis az emberi és az egér hízósejtek stimuláció után történő génextpressziós változásaira vonatkozóan (Mast-cell microarray data), amely alapvetően új hipotéziseket vetett fel. E rendkívül hasznos adatbázist a jövőben proteomikai és teljes sejteken végzett *in vitro* vizsgálati adatokkal, *in vivo* sejt imaging-gel, mediátor-és sejtjelöléssel, hízósejt deficiens állatmodellekkel kiegészítve a hízósejt-kutatás új dimenziókba helyeződhet.

3.) „15. oldal: Milyen irodalmi adatok vannak arra vonatkozóan, hogy a szomatosztatin befolyásolja a lokomotoros aktivitást? Közvetlenül hat a motoros rendszer valamelyik központjára, vagy pedig a formatio reticularison keresztül?”

Bár saját kísérleteinkben nem vizsgáltuk a szomatosztatin lokomotoros aktivitást befolyásoló hatásait, erre vonatkozóan elsősorban egy görög kutatócsoport (Thermos és mtsai.) szolgáltatott számos adatot az utóbbi 5 évben. Az agytörzsben is több fajban kimutatták a szomatosztatint, kötőhelyeit, és specifikus receptorait, azonban elsősorban légzés-szabályozás és egyéb vegetatív működések, alvás-ébrenlét és szomatoszenzoros működésekkel hozták összefüggésbe (Taber-Pierce és mtsai. 1985. *Neuroscience*; Carpentier és mtsai. 1996. *Brain Res.*; Schulz és mtsai. 2000. *J. Physiol. Paris*). A lokomotoros aktivitásra kifejtett hatásokban nem zárható ki ugyan a formatio reticularis befolyásolása, valószínűleg sokkal nagyobb jelentősége van azonban extrapiramidális rendszerhez tartozó különböző agyi régiókban kifejtett közvetlen hatásoknak. Az eredmények agyterülettől függően eltérőek, lokomotoros aktivitást csökkentő és fokozó hatásokat egyaránt leírtak patkányban. Szomatosztatin infúzió a ventrális pallidumba, nucleus accumbensbe, és a substantia innominatába gátolta a lokomotoros működéseket (Marazioti és mtsai. 2005. *Psychopharmacology*). Mivel a GABA-B receptor antagonisták

(bicucullin és phaclofen) felfüggesztették a szomatosztatin-okozta lokomotoros csökkenést, a GABAerg rendszer részvételére következtettek (Marazioti és mtsai. 2009. Neuropeptides). Ezzel szemben, maga a szomatosztatin, valamint, sst₂ és sst₄ agonisták striátumba, illetve a globus pallidusba történő bilaterális infúziója dózis-függő módon fokozta a spontán lokomotoros aktivitást. A globus pallidusba történő infúzió hatására a striátumban szignifikánsan emelkedett dopamin-szinteket mértek. A globus pallidusban a szelektív sst₁ receptor agonista hasonló hatásokat váltott ki, sst₁ és sst₂ antagonisták pedig kivédtek a szomatosztatinnal kiváltott lokomotoros aktivitást. Ezzel szemben azonban a striátumban az sst₁ aktiváció hatástalannak bizonyult ugyan, de az AMPA és NMDA glutamát receptorok blokkolása csökkentette a szomatosztatin lokomotoros stimuláló hatásait (Marazioti és mtsai. Psychopharmacology 2008; Santis és mtsai. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2009).

Valószínűleg e specifikus, de eltérő hatások eredőjének köszönhetően a szomatosztatin intracerebroventrikuláris injekciója nem váltott ki robosztus hatást a spontán lokomotoros aktivitásra. Egy idei közlemény alapján ez a kezelés az 1 órás vizsgálati periódusnak csak az első 10 percében okozott szignifikáns csökkenést, és az explorációs viselkedést sem befolyásolta (Semenova és mtsai. 2010. Neuropeptides).

4.) „29. oldal: Vizsgálták-e az extraepithelialis nyáktermelő mirigyek változását vagy csak a kehelysejteket?

Hogyan történt a szemikvantitatív szövettani értékelés, milyen nagy volt a vizsgált terület, hogyan történt ennek kiválasztása? Mit jelent a 0-2 ig terjedő skála az egyes vizsgálat képletek esetében? Lásd még a 34. oldalt, a kehelysejtek számáról és a granulociták mennyiségéről, felszaporodásáról írt részt is.”

A légúti gyulladásmoделlekben a folyamat súlyosságának szemikvantitatív megítélésére az irodalomban általánosan használt paramétereket és pontrendszert használtuk, ebben csak a bronchioláris kehelysejt-szám változásának vizsgálata szerepel. Jelen intersticiális gyulladás esetében a gyulladáshoz markereket a kis légutakban vizsgáltuk és a bronchiolusokra és kisebb bronchusokra fókuszáltunk, ahol egértüdben nem találhatóak extraepithelialis nyáktermelő mirigyek (egérben csak a tracheában van porc, a bronchusokban nincs, így nem lehet biztonsággal elkülöníteni a bronchiolusokat a bronchusoktól, a hengerhám normálisan egymagsoros mindenütt). Ilyenek csak a tracheában és a fő bronchusokban láthatók elszórtan, ezeket nem vizsgáltuk.

A bal tüdőt használtuk szövettani értékelésre, a jobb tüdő felső részét MPO mérésre, az alsót citokin-meghatározásra. A paraffinba ágyazott tüdőkből 5 különböző mélységből (csúcs, felső 1/3 alatt, közepén, alsó 1/3, bázis) 5-7 µm vastag metszetek készültek, ezeket minden paraméterre külön pontozta a „vak” módszerrel értékelő patológus kolléga és az öt értékből egy adott mintára átlagot számoltunk.

Az egyes pontszámoknak megfelelő szövettani kép a következő volt (ezek pontos ismertetése az eredeti közleményeinkben, illetve az idézett cikkekben szerepel, a disszertációban terjedelmi korlátok miatt nem részleteztem):

Az LPS modellben (Zeldin és mtsai. 2001. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.):

(1) Perivaszkuláris ödéma

0: nincs

1: enyhe-mérsékelt, a perivaszkuláris terek kevesebb, mint 25%-ára terjed ki

2: közepes-kifejezett, a perivaszkuláris terek több, mint 25%-át, de kevesebb, mint 75%-át érinti

3: súlyos, a perivaszkuláris terek több, mint 75%-ára kiterjed

(2) Perivaszkuláris/ peribronchioláris akut gyulladáshozos reakció

0: nincs

1: enyhe akut gyulladás, a perivaszkuláris ödémás területen 5 neutrofil granulocitánál kevesebb látható 400X-os nagyítással

2: mérsékelt akut gyulladás, a perivaszkuláris terekről a peribronchioláris terekre is ráterjed, átlagban 5 neutrofilnél több látható 400X-os nagyítással

3: súlyos akut gyulladás a perivaszkuláris és peribronchioláris terekben egyaránt, a bronchiolusok körüli terek számos neutrofil sejttel infiltráltak

(3) Nyáktermelő goblet sejtek felszaporodása a bronchiolusokban

0: nincs, vagy elszórtan 1-2

1: kevés (2-4) PAS-pozitív sejt néhány (2-4) bronchiolusban (teljes metszetre nézve)

2: sok (5-nél több) nyáktermelő sejt a bronchiolusok többségében

(4) Makrofágok/ mononukleáris sejtek beáramlása az alveoláris terekbe

0: elszórtan 1-2 rezidens makrofág

1: eozinofil citoplazmájú aktivált makrofágok az alveoláris terek 25%-ánál kisebb területen

2: az alveoláris terek 25%-ánál nagyobb területen van sejtinfiltráció

Az ovalbumin modellben (Underwood és mtsai. 1995. Eur. Respir. J. és Lee és mtsai. 2006. FASEB J. alapján):

(1) granulocita-infiltráció (elsősorban eozinofil) a bronchiolusokba és peribronchioláris/perivaszkuláris terekbe

0: nincs

1: kismértékű sejtbeáramlás, elsősorban a bronchiolusokba és a kisebb bronchusokba, elszórtan 1-2 sejt megfigyelhető körülöttük is, azonban nincs tüdőparenchima-károsodás

2: mérsékelt sejt-infiltráció, ami már a bronchiolusok és erek körüli területre is kiterjed (1-5 sejt látható a struktúrák többségében), minimális szöveti károsodás (atelektázias területek, kötőszöveti felszaporodás jelei láthatók a teljes metszet <10%-ában)

3: közepes mértékű sejtinfiltráció (több, mint 5 sejt) a perivaszkuláris és peribronchioláris terek többségében, mérsékelt szövetkárosodás jelei a vizsgált terület 25-30%-ában láthatók

4: számos granulocita- sőt makrofág és limfocita- beáramlása a parenchimába a metszet teljes területén; súlyos, kiterjedt atelektázia, kötőszövetfelszaporodás, emfizéma (ilyet nem tapasztaltunk a mi kísérleteinkben)

(2) nyálkahártyaödéma, nyáktermelés

0: normál, egyrétegű, egymagsoros hengerhám a bronchiolusokban, kompakt nyálkahártya-rétegek, minimális nyák a felszínen

1: alacsony fokú, diffúz ödéma a lamina propriában (hipodenz, megvastagodott réteg)

2: közepes mértékű ödéma, mérsékelt nyáktermelés-fokozódás (a bronchiolusok <10%-ában eozinofil massa látható)

3: kifejezett ödéma, jelentősen fokozódó nyáktermelés (a bronchiolusok 10-30%-ában a és a bronchusokban is eozinofil massa látható, helyenként nyákkal teljesen kitöltöttek)

(3) bronchioláris/bronchiális epitélkárosodás

0: nincs

1: minimális epitélréteg-károsodás, néhány bronchiolusban helyenként szabálytalan alakúvá válnak, ellapulnak, leválnak a hámsejtek

2: mérsékelt hámréteg-pusztulás, a teljes metszetre nézve a bronchiolusok/bronchusok több, mint 25%-ában, nagyobb, mint 10% kiterjedésben látható epitelsejtpusztulás

3: súlyos károsodás, amely a bronchiolusok több, mint 25%-át érinti 10%-nál nagyobb mértékben, a sejtek közötti kapcsolatok megszűnnek.

5.) „29. oldal: Teljes biztonsággal állítható-e hogy a SP és a CGRP kizárólag szenzoros neuropeptid? Irodalmi adatok szerint ugyanis, legalábbis a nagy nyálmirigyek esetében, a SP és a CGRP megtalálható a szimpatikus és a paraszimpatikus rostokban is.”

Természetesen sem a SP, sem a CGRP nem tekinthető kizárólag szenzoros rostokra specifikusnak, sőt, még szoros értelemben véve kizárólag „neuropeptidnek” sem. A neuropeptid kifejezést először David de Wied használta a 70-es évek elején olyan peptidszerkezetű mediátorokra vonatkozóan, amelyek az agyban előfordultak, de endokrin hatásokkal nem rendelkeztek. Az eredeti definíció alapján idegsejtek által termelt és idegelemekeken ható kémiai szignálmolekulák speciális csoportját értették alatta, bár ezzel kapcsolatban nem volt egységes az irodalom. Iversen azt az álláspontot képviselte, hogy minden neuronból származó peptid mediátor neuropeptidnek tekinthető függetlenül a hatásától. Mára a definíció lazábbá vált, a kategória kitért, az emlős genomában több,

mint 70 neuropeptid-gént ismerünk. Ezek szerkezeti tulajdonságaik alapján legalább 10 alcsoportra oszthatók, receptoraik gyakran átfedéseket mutatnak. Jelenleg már neuropeptidként tartjuk számon az eredetileg nem neuronális eredetű peptid-mediátorok, pl. kemokinek és növekedési faktorok jelentős részét is (összefoglaló: Burbach 2010. Eur. J. Pharmacol.). Ennek analógiájára a „szenzoros neuropeptid” elnevezést az érzőneuronokban expresszálódó és a végződéseikből felszabaduló neuropeptidek megjelölésére használják, függetlenül attól, hogy azokat más neuronok vagy egyéb sejtek is tartalmazzák vagy sem. Számos bizonyíték van arra, hogy ezek a peptidek a vegetatív rostokban (Marley és Livett 1985. Crit. Rev. Clin. Neurobiol.; Bacon és Smith 1988. J. Aut. Nerv. Syst.), sőt nem neurális elemekben, epithel és endothelsejtekben (Linnik és Moskowitz 1989. Peptides; Hasting és Hua 1995. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.), gyulladásos- és immunsejtekben (Weinstock és mtsai. 1988. J. Immunol.), valamint neuroendokrin sejtekben (Springer és mtsai. 2003. Pulm. Pharmacol. Ther.) is megtalálhatók és szerteágazó funkcionális jelentőséggel bírnak (összefoglalók: Nelson and Bost 2004. Front. Biosci.; Brain és Cox 2006. Br. J. Pharmacol.).

6.) „43. oldal és a hozzá tartozó I/19. ábra: Mit jelent a megvastagodott epithel? Erre vonatkozóan történtek mérések?

53. oldal: A nyáktermelés növekedését mérték-e, vagy ez csak szubjektív megítélés?”

A megvastagodott epithel kifejezést arra vonatkozóan használtam, hogy az ép egér bronchiolusokban normálisan egyrétegű egymagsoros hengerhám a gyulladt szövetben szabálytalanná, többmagsorossá, illetve többrétegűvé válik, mikrométeres mérések nem történtek. Hasonlóképpen szubjektív volt a nyáktermelés növekedésének megítélése a nyáktartalmú bronchusok/bronchiolusok arányának és a lumenben látható eozinofil massa mennyiségének alapján.

7.) „45. oldal: A mikroszkópos felvételen a nagyítás miatt nehéz megítélni, hogy milyen struktúrákban van immunpozitivitás.”

Teljesen egyetértek Professzor Asszony e kritikai észrevételével, szerencsésebb lett volna egy nagyobb nagyítású kisebb részletet bemutatni az immunfestett metszetekből az adott struktúrákra fókuszálva, ezt az előadásomban igyekszem így bemutatni.

8.) „59. oldal: Van-e arra valamilyen funkcionális magyarázat, hogy egérben a neutrofil granulocitákon megtalálható a sst₄ receptor, míg az emberi granulocitákon nem?”

Erre az érdekes megfigyelésre jelenleg sajnos nem tudok semmilyen konkrét funkcionális magyarázatot találni. Kevés és ellentmondásos irodalmi adat áll rendelkezésre a szomatosztatin granulocita-funkciókat befolyásoló hatásairól. Vannak közlemények, amelyek a szomatosztatin és analógjai kemotaxist és reaktív oxigén szabadgyök-termelést gátló hatását bizonyítják patkányban (Kolasinski és mtsai. 1992. Arth. Rheum.; Partsch és Matucci-Cerinic 1992. Inflammation; Sener és mtsai. 2005. Peptides). Az emberi tüdőben nyert eredményeink mindenesetre összhangban vannak azzal a korábbi eredménnyel, amely a perifériás vérben lévő granulocitákon –a limfocitákkal és monocitákkal ellentétben- nem igazolta az sst receptorok jelenlétét (Hiruma és mtsai. 1990. Immunology). Bár egér és patkány granulocitákra nem találtam ilyen adatot, mindkét speciesben a perifériás vér mononukleáris sejtjei, a lép, a tímusz és a nyirokcsomók sst₄ receptor mRNS expressziót mutatnak. Más sst receptorokra vonatkozóan azonban e két rágcsáló faj között is van különbség: egérben elsősorban az sst₂, patkányban az sst₃ dominál (ten Bokum és mtsai. 1999. J. Endocrinol.; 2000. Eur. Cytokine Netw.). Számos példa van arra, hogy alapvető különbségek vannak a rágcsáló és az emberi immunrendszer

felépítésében és működésében, pl. egérben a késői típusú hiperszenzitív reakció Th2 limfocita dominanciájú, emberben priméren Th1 (Zhang és mtsai. 2009. PLoS One).

9.) „71. oldal: Hogyan definiálták, milyen kritériumai voltak a csont és a porckárosodásnak és milyen módszerrel határozták meg annak mértékét?”

A patkány és egér artritisz-modellekben is referencia-közlemény (Weinberg és mtsai. 2003. Arthr. Rheum.) alapján végeztük a szemikvantitatív morfológiai értékelést. Itt sem történtek mikrométeres mérések vagy pontos sejtszámolás, az egyes paraméterek megítélésében –bár itt is „vak” módszerrel, a kísérletektől független patológus kolléga értékelt- szubjektív faktorok is szerepet játszottak.

A **porckárosodás** mértékére vonatkozóan

0: normál vastagságú, szabályos, sorba rendezett porcsejtek

1: enyhe dezorientáltság, szabálytalan felszín

2: mérsékelt porcréteg-károsodás

3: teljesen lepusztult porcréteg, szabaddá váló csontstruktúra

A **csonterózió** értékelése

0: normál csontstruktúra, nincs erózió

1: elszórtan enyhe kortikális csontvesztés

2: a trabekuláris csontállomány mérsékelt pusztulása néhány helyen

3: súlyos, kifejezett és jelentős kiterjedésű csontpusztulás

10.) „98. oldal: Van-e olyan neuropatológiai vagy neurofiziológiai eltérés akár a szenzoros neuronok, akár a központi idegrendszer területén, amely az egyes neuropátiás állapotokat (diabeteses, toxikus, traumás, fantomfájdalom) megkülönbözteti egymástól?”

A különféle etiológiájú perifériás neuropátiák az idegkárosodás mechanizmusában eltérőek, a gerincvelőben és az érzőkéregben létrejövő centrális szenzitizáció azonban több szempontból hasonló. **Trauma** következtében általában egy ideg sérül, amely a károsodás mértékétől és lokalizációjától függően lehet szenzoros, motoros vagy kevert. Az amputáció utáni csonkfájdalom és fantomfájdalom is lokalizált, több szempontból is hasonlóságot mutat a traumás mononeuropátiával. Funkcionális MRI vizsgálatokkal az utóbbi időben bizonyítékokat szolgáltatottak, hogy ezekben az állapotokban jelentősen átrendeződik a kérgi szomatotopos lokalizáció, az elsődleges érző-régiókban, sőt alapvetően nem fájdalomérző területeken is fokozódik az aktivitás, továbbá csökken a leszálló gátló pályarendszer működése (Maihöfner és mtsai. 2010. Schmerz). A sérülés területén és közvetlen közelében nő feszültségfüggő Na^+ - és Ca^{2+} -csatornák száma, megváltozik az eloszlásuk és csökken az aktivációs küszöbük, amely az idegrostok kóros ingerelhetőségéhez vezet. A szövetkárosodás következtében felszabaduló mediátorok (prostaglandinok, leukotriének, bradikinin, citokinek pl. TNF- α stb.) hatására szenzitizálódnak a perifériás végződéses. Hasonló mechanizmusok játszanak szerepet a neuroma területén az érzőidegvégződések tartós excitáció-fokozódásában, amelyek trauma és amputáció után is jellemzők. A komplex patofiziológiai változások nemcsak a károsodott perifériás végződéseket érintik, hanem a hátsó gyöki ganglionokban a sejtestjeiket és a gerincvelői hátsó szarvban a centrális végződéseit is. Az axotomizált neuronokban számos plaszticitás-változás következik be a neuropeptidekben is, pl. fokozódik a PACAP, galanin és a szomatosztatin, de csökken a CGRP és SP mennyisége (Jancsó 1992. Exp. Physiol.; Hökfelt és mtsai. 1994. Trends Neurosci.; Zhang és mtsai. 2006. Neuroscience), upregulálódik a nitrogén-monoxid szintáz. A primér afferens neuronok pusztulása következtében a gerincvelőben deafferenciációs hiperszenzitivitás jön létre („long-term potentiation”). Molekuláris mechanizmusok szintjén az ismételt, ill. tartós fájdalmas stimulusok és abnormális aktiváció olyan intracelluláris jelátviteli utakat indít be (pl. a protein kináz C aktivációján keresztüli foszforilációs folyamatokat), amelyek számos mediátor expressziójának

változásához vezet és jelentős faktora a ganglionokban és a központi idegrendszer több területein megfigyelhető plaszticitásnak. Bár ezek a folyamatok a sérülés következtében kialakuló funkcionális károsodások helyreállításában is fontosak, a szenzitizáló hatások miatt spontán neuropátiás fájdalom és hiperalgézia kialakulásához is vezetnek (Zimmermann, 2001. Eur. J. Pharmacol.).

A **metabolikus** (leggyakoribb a diabétesz) és **toxikus** hatások következtében szisztémás idegkárosodás alakul ki, amely a korai stádiumban elsősorban szenzoros rostokat érinti (ekkor dominál a fájdalom), de később autonóm (vegetatív) és motoros tünetek is előfordulnak. A károsító tényezők közül jelentős az oxidatív stressz, a szorbitol és a homocisztein-szint emelkedése, valamint az NO-, NGF- és IGF-szint csökkenése, melyek eredményeként glikozilációs végtermékek keletkeznek, károsodik az endotél-funkció és a K^+/Na^+ ATP-áz működése. A legfontosabb tényezők az ideg-regenerációs képesség csökkenése, ill. a kóros regenerációs törekvések mind az idegvégződés, mind a sejttestek szintjén (pl. szimpatikus rostok benövése a ganglionokba: „sprouting”; Yasuda és mtsai. 2003. Progr. Neurobiol.). Egy egészen új közlemény toxikus neuropátiában a mitokondriumok szerkezeti- és funkcionális károsodásáról számol be a perifériás érzőrostokban (Bennett, 2010. Oncologist).

11.) „116. oldal: Van-e arra valamilyen kísérleti adat, hogy a szisztémás keringésbe bejutott szomatosztatin fájdalomcsillapító hatása milyen neuronon vagy neuroncsoportokon keresztül érvényesül?”

Bár saját kísérleti adataink erre vonatkozóan nincsenek, a szisztémás keringésbe jutó szomatosztatin analgetikus hatását kizárólag a perifériás érzőideg-végződéseken tudja kifejteni, mivel még a 14 aminosavas formája sem képes bejutni a központi idegrendszerbe (Meisenberg és Simmons 1983. Life Sci.). Saját korábbi *in vitro* és *in vivo* eredményeink bizonyították, hogy a szomatosztatin és szintetikus analógjai gátolják a kapszaicinnal kiváltott szenzoros neuropeptid-felszabadulást, a neurogén gyulladást, akut nocifenzív reakciókat, valamint a mechanikai és termális hiperalgéziát (Helyes és mtsai. 2001. és 2006. Br. J. Pharmacol.; Helyes és mtsai. 2000. Neurosci. Lett.; Pintér és mtsai. 2002. N. S. Arch. Pharmacol.; Sándor és mtsai. 2006. Eur. J. Pharmacol.; összefoglaló: Pintér és mtsai. 2006. Phram. Ther. Rev.). Más szerzők (Corsi és mtsai. 1997. Anaesth. Analg.; Eschaliér és mtsai. 1991. Eur. J. Pharmacol.; Carlton és mtsai. 2001. J. Neurosci., 2003. Neurosci.) a mi eredményeinkhez hasonlóan ugyancsak funkcionális bizonyítékokat szolgáltatottak arra, hogy a szomatosztatin **a kapszaicin-érzékeny primér afferenseken** hatva perifériás mechanizmussal gátolja a nociceptív folyamatokat. Carlton és mtsai. (2001. Pain) immunhisztokémiával kimutatták az sst receptorok expresszióját a dermisz-epidermisz junkcióban lévő mielinizálatlan C-rostok végződéseiben patkány lábháti bőrben. Heppelmann és Pawlak (1997. Pain, 1999. Neurosci. Lett.) pedig elektrofiziológiai bizonyítékot szolgáltatott patkányban a szomatosztatin gátló hatására ép és gyulladt térdízületben egyaránt az afferensek mechanoszenzitivitására is. Mindezen adatok alapján a szomatosztatin a periférián azonnali (gyors, fázisos) és hosszantartó (tónusos) gátló hatást is kifejti **a C- és A δ -típusú polimodális nociceptorokra** és a magas küszöbű **mechanonociceptorokra** is. Bár a mechanizmus pontosan nem ismert, egy régebbi elmélet valószínűsítette a μ -opioid receptorokkal való interakciót (Rezek és mtsai. 1978. Can. J. Physiol. Pharmacol.; Gulya és mtsai. 1986. Life Sci.), amit azonban számos közlemény vitatott (Chrubashik és mtsai. 1984. Lancet). Újabban viselkedési és egy rost elvezetéssel nyert elektrofiziológiai adatok bizonyították, hogy a szomatosztatin fázisos és tónusos gátlást fejt ki a TRPV1 csatornák aktivációjára/szenzitizációjára a kapszaicin-érzékeny

végződéseken (Carlton és mtsai. 2004. Pain; saját összefoglalónk erre vonatkozóan: Pintér és mtsai. 2006. Pharm. Ther.).

12.) „128. oldal: Vannak-e arra vonatkozóan irodalmi adatok, hogy az *in vitro* trachea modell, ahol a perifériás végződést megfosztották a neuron többi részétől, mennyiben felel meg az *in vivo* állapotnak?”

A szenzoros neuronok izolált tracheából történő felszabadulásának vizsgálatát mi dolgoztuk ki, a bemutatott modell saját összeállításunk, a kérdésre vonatkozó irodalmi adatot nem ismerek. Rendszerünkben a kimetszett tracheát 1 órán keresztül oxigenizált Krebs-oldattal áramoltatjuk át, hogy a mechanikai hatásból származó tényezőket kiküszöböljük, ezt követően végezzük a 24 perces kísérletet. Ez alatt a mindössze másfél óra alatt az izolált tracheában lévő perifériás ideg-végzések működőképesek és teljes mértékben ingerelhetőek maradnak. A belőlük történő peptid-felszabadulás jól reprodukálhatóan, centrális hatásoktól mentesen, reflex-mechanizmusoktól függetlenül precízen vizsgálható. Természetesen –mint minden izolált-szervi modellrendszer- ez nem a fiziológias állapotot, nem az *in vivo* körülményeket tükrözi, hanem egy mesterséges preparátum, amelynek előnye, hogy egy jól definiált elrendezésben mechanisztikus módon tesztelhető az idegvégződés működése és a rajta ható vegyületek hatása minden komplex befolyásoló tényező nélkül.

13.) „35. oldal: A szövettani ábrákon nincs lépték, csak a mikroszkópos nagyítás van feltüntetve, és ez a későbbi képek nagy részén is így van. Miután a mikroszkópos felvételt tetszőlegesen lehet nagyítani és kicsinyíteni, egy adott ábrán a kalibrációs vonal ad igazán információt. További megjegyzés, hogy a szövettani képeken a részletek nehezen ismerhetők fel, például az I/16. ábrán nem látszanak a kehelysejtek, vagy az I/19-es ábrán az immunpozitív sejtek közül is legfeljebb az endothel azonosítható. Ez a megjegyzés több későbbi képre is vonatkozik.”

Teljes mértékben egyetértek Opponens Asszony e kritikai megjegyzéseivel. Sajnos a lépték valóban lemaradt a szövettani képekről, ami megnehezíti a méretek megítélését, valamint a képek mérete/minősége ugyancsak nem megfelelő a pontos értelmezéshez és az immunpozitivitás megítéléséhez. Egyetlen melegségemül az szolgálhat, hogy a disszertáció terjedelmi korlátjai miatt kénytelen voltam a fotókat lekicsinyíteni, az eredeti közleményekben, különösen az elektronikus változatban e szövettani ábrák sokkal jobb felbontásban szerepelnek. E hiányosságokat, hibákat a védéskor bemutatott képeken igyekszem pótolni.

Még egyszer szeretném megköszönni Opponens Asszonynak a dolgozatomban a bírálatába fektetett energiát és időt, valamint a kérdéseket, amelyek az irodalmi adatok alaposabb és mélyebb átböngészésére késztettek. Remélem, válaszaimat megfelelőnek találja.

Pécs, 2010. augusztus 13.

Dr. Helyes Zsuzsanna

Válasz Prof. Sperlágh Beáta egyetemi tanár opponensi véleményére

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Opponens Asszonynak a disszertációm rendkívül precíz bírálatát, munkám elismerését és a dicséretet, valamint a felvetett kérdéseket, megjegyzéseket és kritikai észrevételeket.

1.) „Az értekezésben bemutatott eredmények igen fontos, perdöntő részért képezik a TRPV1, illetve $ss4$ receptor knockout egereken végzett kísérletek. Ehhez képest viszonylag kevés figyelmet szentel a jelölt a fenti egerek genotípusának és fenotípusának leírásának, továbbá egyáltalán nem emlékezik meg az egerek genotipizálásáról, holott a genotípus ellenőrzése alapvető követelmény ilyen eredmények prezentációja során...A knockout egerekkel nyert eredmények értelmezésekor érdemes lett volna a diszkusszióban kitérni az esetleges problémákra e modellrendszerekkel kapcsolatban.”

A TRPV1 és $ss4$ receptor knockout egerek genotípusának és fenotípusának bemutatása, a genotipizálás leírása azért nem került bele a disszertációba, mert- ahogy Opponens Asszony is megjegyezte bírálatában- a dolgozat így is meghaladja a doktori értekezéseknél javasolt terjedelmet, és ezek az információk az eredeti közleményekben többnyire szerepelnek (Szabó és mtsai. 2005; Bölskei és mtsai. 2005; Helyes és mtsai. 2009). Egyetértek azonban azzal, hogy mivel ezekkel az egerekkel végzett kísérleteink jelentős részét képezik a bemutatott eredményeknek, ez a részlet mindenképpen fontos.

Mindkét knockout egér a C57Bl/6 törzsből származik. A TRPV1 génhiányosak tenyészegyedeit homozigótaként a Charles-River Hungary Kft.-n keresztül a Jackson Laboratories-től vásároltuk, és mivel ezek már 10 generáción keresztül visszakeresztették a C57Bl/6 törzsbe, vad típusú kontrolloknak ezeket használtuk (ezért is használtam a dolgozatban a TRPV1^{-/-} és WT megjelölést). A tenyésztés saját intézeti állatházunkban történt, a bemutatott kísérletekben az első 2-3 generációból származó állatokat használtuk. A genotípust természetesen farokmintákból PCR-ral ellenőriztük. Az $ss4$ knockout egereket Cambridge-ben Piers Emson és munkatársai állították elő, akiktől kollaborációs együttműködés keretein belül kaptunk heterozigóta állatokat, amelyeket már 8 generáción keresztül visszakeresztettek az eredeti C57Bl/6 törzsbe. Ezekből a heterozigótákból ugyancsak az intézeti állatházunkban történt a homozigóta $ss4^{+/+}$ és $ss4^{-/-}$ vonalak kitenyésztése, majd azok továbbtenyésztése. A genotipizálást minden esetben elvégeztük. Mivel az *in vivo* kísérletekhez nagyszámú (6-10), hasonló korú és nemű egerek kellettek, nem tudtuk megoldani, hogy egy kísérletsorozatban csak alomtestvéreket használjunk. Néhány akut kísérletben azonban összehasonlítottuk az alomtestvérekkel és a hasonló korú, de nem testvér-kontrollokkal kapott eredményeket, amelyek nem mutattak eltéréseket. Mivel a mi eredményeink az első publikált adatok ezekkel az egerekkel, a disszertáció benyújtása óta megjelent közleményünkben (Helyes és mtsai. 2009. PNAS) az $ss4^{-/-}$ egerek előállításának és genotipizálásának minden részlete szerepel. Ebben a publikációban található továbbá az alomtestvérekkel való összehasonlítás is a carrageeninrel kiváltott akut gyulladásmodellben.

A TRPV1 knockout egereknél szaporodási, élettartambeli, vagy egyéb szembetűnő fenotípus-különbséget- másokhoz hasonlóan, akik ezeket az egereket egyéb modellekben vizsgálták- nem tapasztaltunk. Az sst_4 génhiányosoknál az élettartamban ugyan nem láttunk eltérést, azonban kissé csökkent szaporodási tendencia volt megfigyelhető, bár erre vonatkozóan statisztikai analízist nem végeztünk. Érdekes azonban, hogy az $sst_4^{-/-}$ egerek szőrzete világosabb barna, mint a $sst_4^{+/+}$ kontrolljaiké, amire eddig még nem tudunk magyarázatot találni. Jelentős viselkedési vagy habitusbeli különbségeket egyik csoport esetében sem észleltünk.

Teljesen egyetérték azzal a felvetéssel is, hogy a knockout egerekkel végzett kísérleteknél az eredményeket óvatosan kell interpretálnunk. Egy receptor vagy mediátor génjének kiütése sokféle ellenregulációs mechanizmust indíthat el az állatok fogantatásától fogva, amelyek persze nem kiszámíthatóak és nem-specifikus módon befolyásolhatják az eredményeket. Az általunk használt receptor knockout egereknél természetesen nem lehet kizárni egyéb rokon szerkezetű vagy működésű receptor up- vagy downregulációját, esetleg ezeken keresztül ható endogén mediátorok mennyiségének változását vagy affinitás-változását egyéb receptoraik iránt. *In vivo* kísérletekben egy receptor adott patofiziológiai folyamatban betöltött szerepének vizsgálatára ugyanakkor két lehetőségünk van. Az egyik a receptor antagonistával való kezelés, a másik a génhiányos egér. Antagonistákkal kapcsolatban probléma, hogy sokszor (pl. az sst_4 receptor esetében is) nem áll rendelkezésre antagonisták, vagy amennyiben igen, annak specificitása, szelektivitása, és/vagy kinetikája nem megfelelő. Krónikus kísérletekben továbbá probléma lehet a tolerancia kialakulása, továbbá a tartós kezelés technikai nehézségei és költsége. Ez a farmakológiai eszköz tehát egy receptor szerepének *in vivo* vizsgálatokor legalább annyi bizonytalansági faktort és problémát jelenthet, ezért véleményem szerint a génhiányos egerekkel nyert adatok értékesek. A legmegbízhatóbb kétség kívül az lenne, ha génhiányos egerek mellett az utóbbi években már egyre gyakrabban használt „knock-down” állatokkal és farmakológiai módszerekkel (antagonistákkal és agonistákkal) is tudnánk vizsgálatokat végezni, ezek mindenképpen egymást kiegészítő és adott következtetéshez egymást megerősítő eszközök. TRPV1 receptor knock-down egerekkel ezért már munkacsoportunkban is folynak összehasonlító vizsgálatok.

2.) „Az immunhisztokémiai vizsgálatok során ellenőrizték-e az sst_4 receptor ellenes antitest specificitását $sst_4^{-/-}$ egereken?”

Korábban évekig próbálkoztunk immunhisztokémiai vizsgálatokkal több sst_4 receptor ellenes antitesttel (pl. Santa Cruz, Lifespan) sikertelenül egér és emberi szövetminták esetében is. A jelenleg használt emberi antitest (MBL) specificitását csak 1) a primér antitest higításaival ugyanott detektálható, de halványuló, majd megszűnő immunpozitivitással és 2) a primér antitest nélkül alkalmazott szekunder antitest melletti festődés hiányával tudtuk igazolni. Az egér antitest (Alomone Labs.) esetében viszont ezeken a módszereken kívül a specificitás igazolására 1) a cég által küldött kontroll antigénnel az antitestet preadszorbeáltattuk, ami a metszeten történő immunreakciót megakadályozta, és 2) megcsináltuk a receptor-hiányos egerek hipofízis- és tüdőmintáin is az immunfestést, amely egyik szöveten sem adott pozitív jelet. Ezeket a negatív kontroll metszeteket a védésen bemutatom.

3.) *Opponens Asszony hiányolta a szenzoros neuropeptidek szerepének bemutatásakor a peptidfelszabadulás és elimináció lehetséges mechanizmusainak bemutatását.*

A nagy molekulású peptid-transzmitterek a neuronok sejttestjében lévő durva felszínű endoplazmatikus retikulumokban szintetizálódnak, a Golgi rendszerben módosuláson

mennek keresztül, majd az idegvégződésben lévő nagy, denz vezikulákban (75-110 nm) tárolódnak. Innen szabadulnak fel **exocitózissal** Ca^{2+} - koncentráció emelkedést okozó különféle stimulusok hatására. E folyamat akciós potenciál kialakulásától független, nem elég hozzá az extracelluláris térből történő Ca^{2+} -beáramlás, hanem az intracelluláris raktárakból való mobilizációnak és a ryanodin receptorok aktivációjának van döntő szerepe (Ouyang és mtsai. 2006. PNAS). A jól ismert Ca^{2+} -szignálhoz kötött mechanizmusok mellett újabb adatok különféle kinázok által szabályozott exocitózis-faktorok és a szinaptobrevin I szerepét igazolták az exocitózis folyamatában (Meng és mtsai. 2007. J. Cell Sci.). Adott vezikulában gyakran több neuropeptid együtt tárolódik és együttesen szabadul fel, de van példa nem-peptid mediátorokkal való ko-lokalizációra is. A kémiai szinapszisokban a neuropeptidok a klasszikus transzmitterekkel (pl. acetilkolin, monoaminok) szemben nem akkumulálódnak. E folyamatok mechanizmusára vonatkozóan számos adat áll rendelkezésre, amelyek bizonyítják, hogy a nagy vezikulák exocitózisa morfológiailag nem specializálódott területeken történik, még akkor sem, amikor jellegzetes szinapszisok is jelen vannak. Ez a nem-szinaptikus transzmisszió lehetővé teszi a peptid-mediátorok nagyobb távolságokra történő diffúzióját, melynek során interakciókba is léphetnek egymással és egymás hatásait, felszabadulását módosíthatják (Thureson-Klein és mtsai. 1986. Scan. Electron. Microsc.; Zhu és mtsai. 1986. Neuroscience; Zupanc 1996. Micron).

E neuropeptidok eliminációját egyéb peptid-hormonokhoz, citokinekhez és kemokinekhez hasonlóan a szövetekben és a keringésben egyaránt cink-metalloproteázok végzik, mint pl. a neutrális endopeptidáz (NEP), az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE), dipeptidil-karboxipeptidázok és aminopeptidázok (Marks és mtsai. 1981. Adv. Biochem. Psychopharmacol.; Scholzen és Luger 2004. Exp. Dermatol.). Elsősorban a dipeptidil-peptidáz IV felelős a PACAP/glucagon családba tartozó peptidok lebontásáért (Augustyns és mtsai. 2005. Curr. Med. Chem.). A központi idegrendszerben a P-anyagra relatíve specifikus, membránhoz kötött endopeptidázokat azonosították (Bergmann és Bauer 1986. NIDA Res. Monogr.).

4.) „A disszertációban több helyen is olvasható (pl. a 12. és 65. oldalakon), hogy „Jelenleg egyetlen olyan gyógyszer csoport sem áll rendelkezésre, amely hatékonyan gátolná e betegségek neurogén gyulladási komponensét”. Ennek ellentmondóan, a 19. oldalon a következő állítás található „Régi megfigyelés, hogy a morfin és az enkefalinamid gátolja a neurogén gyulladást, azonban nem befolyásolja a nem-neurogén gyulladási folyamatokat”. Hogyan oldható fel ez az ellentmondás?”

A neurogén gyulladási folyamatokat hatékonyan és szelektíven gátló gyógyszer csoport valóban nem áll rendelkezésünkre, a szelektivitás jelentőségét kellett volna hangsúlyoznom ebben a kijelentésben. A 19. oldalon ennek látszólag valóban ellentmond a morfin és az enkefalinamid hatásaira vonatkozó megállapítás, amely önmagában helytálló. Bár ezeknek az opioidoknak a neurogén gyulladást gátló hatása bizonyított, a klinikai gyakorlatban ezt nem tudjuk kihasználni alacsony hatékonyságuk és szelektivitásuk hiánya miatt. Olyan dózisban kellene őket erre a célra alkalmazni, hogy a számos súlyos mellékhatásuk következtében nem lehet ilyen irányú terápiás felhasználásukkal számolni.

5.) „Nem világos, hogy a kísérletekben intranazális LPS-sel kiváltott légúti gyulladás melyik emberi tüdőben is előforduló patofiziológiai folyamatot modellezi. Helyesebb lenne továbbá erre a gyulladási modellre, melyet a szerző hol akutnak, hol szubakutnak nevez, egy konzekvens elnevezést alkalmazni.”

Bakteriális endotoxinok mindenütt megtalálhatók a környezetünkben, a levegőben, a házi porban, és a cigarettafüstben egyaránt, szerepüket légúti allergiás és krónikus gyulladásos folyamatok (asztma és COPD) kialakulásában, fellángolásában és súlyosabbá válásában egyaránt számos adat bizonyítja (összefoglalók: Kharitonov és Sjöbring 2007. Contrib. Microbiol.; Liebers és mtsai. 2008. Arch. Toxicol.). Az emberi tüdő gyulladásos megbetegedései során az egyes patofiziológiai folyamatok (pl. a makrofágok és neutrofil granulociták aktivációja, a belőlük történő mediátor-felszabadulás) párhuzamba állíthatók a modellként használt LPS-sel kiváltott légúti gyulladással, azonban a mechanizmusok és a folyamat dinamikája- mint az állatkísérletes modellek jelentős részénél általában- nem feleltethetők meg teljesen egymásnak. Modellválasztásunk alapja ebben az esetben az volt, hogy ez 1) egyszerűen és gyorsan kivitelezhető, jól reprodukálható, 2) nincs jelentős különbség a gyulladásos folyamat kialakulásában és intenzitásában az egyes egértörzsek és nemek között (ellentétben pl. az ovalbumin modellel, amely csak SPF körülmények között tenyésztett Balb/c egerekben működik), és 3) széleskörű irodalmi adatok vannak a folyamat jól definiálható pathomechanizmusára, kialakulására és lefolyására vonatkozóan. Az LPS-hatást a Toll-like receptor 4 (TLR4) és a CD14 szignalizáció közvetíti, amely p38 MAPK aktiváción keresztül váltja ki számos gyulladásos mediátor termelődését (Togbe és mtsai. 2007. J. Int. Exp. Pathol.).

Egyetértek Opponens Asszony megjegyzésével, hogy erre az órák alatt kialakuló és általunk a 24 órás időpontban vizsgált reakcióra helyesebb lett volna a felváltva használt „akut” és „szubakut” kifejezések helyett konzekvens elnevezést alkalmazni, talán az első lett volna megfelelőbb. Mentségemül talán az szolgálhat, hogy ezzel kapcsolatosan az irodalom sem egységes, nincs jól definiált határ, és mindkét megnevezés előfordul.

6.) „A légzésfunkciós vizsgálatok során alkalmazott carbachol koncentrációja meglepően magas (5.5-22 mM), és jóval meghaladja a muszkarin receptorokon mutatott affinitását. Mi a magyarázat ezen magas dózisok használatára és mi a biztosítéka annak, hogy ezek specifikus hatások?”

Valószínűleg nem egyértelműen fogalmaztam a légzésfunkciós vizsgálatok módszertani leírásánál, ezért félreérthető volt e vizsgálat kivitelezése. Az 5.5-22 mM nem a légtérben lévő carbachol-koncentrációra vonatkozik, hanem a porlasztóba pipettázott 50 µl oldat koncentrációjára. A készülék ezt porlasztja be 50 s alatt a teljes test pletizmográf 127 cm³ térfogatú kamrájába (9 cm magas, 4.5 sugarú kör alapterületű henger), tehát a 1.5 percig tartó inhalációs periódus során az egerek által belélegzett, és a légutak muszkarin receptorai közelében lévő koncentráció sokkal alacsonyabb. Ezeket a koncentrációkat irodalmi adatok (Finney és Forsberg 1994. J. Appl. Physiol.; Lai és mtsai. 2004. Chin. J. Physiol.) alapján, számos előkísérlet-sorozat után választottuk ki.

7.) „Az I/4., I/14. valamint a III/5. ábrák aláírása és az ábrán történő szignifikancia-jelölés nem egyértelmű.”

Egyetértek ezzel a kritikai észrevétellel, valóban nem egyértelműek, hogy a csillag, illetve kereszt jelölések milyen összehasonlításokra vonatkoznak. Elnézést kérek a pontatlanságért, a védeken szereplő ábrákon e hibákat javítom.

8.) „Mi az oka a különböző kísérletsorozatok között ugyanazon kezelés hatására a tüdőminták mieloperoxidáz-aktivitásában az abszolút értékekben mért kb. 4-szeres eltérésnek (a változás iránya és mértéke azonos)?”

A két fejezet között a tüdő-homogenizátumokban mért mieloperoxidáz enzimaktivitások abszolút értékei közti különbségek a spektrofotometriás méréshez használt eltérő MPO

standardokból adódnak. Korábban, így még a TRPV1 knockout egerek vizsgálatára irányuló 2006-ban végzett kísérletsorozatban, magunk készítettünk MPO standardot: osztriga-glikogént injektáltunk egérbe i.p., majd 24 h múlva a peritoneális tér atmoszárával nyertük a neutrofil sejteket. Ezeket Bürker kamrában számoltuk és a sejtszámokhoz rendeltük a spektrofotométerrel meghatározott színreakciókat (Bánvölgyi és mtsai. 2004. Neuroscience; ez a leírás sajnos a disszertációban a metodika ismertetésénél kimaradt). A későbbi kísérletekben (így az sst₄ génhányos egerek tüdőmintáinál) már készen vásároltuk a humán MPO standardot (Sigma), és annak alapján számoltunk. Így a folyamat technikailag sokkal egyszerűbb és gyorsabb, a későbbiekben pedig majd jobban összehasonlíthatóak lesznek az adatok. A különböző standardokkal kapott eltérő abszolút értékek azonban az eredmények értelmezését lényegében nem befolyásolják, mivel mindig egy kísérletsorozatban belül történik az összehasonlítás és minden alkalommal használunk PBS-sel kezelt intakt kontrollokat is.

9.) „A krónikus artritisz modell kísérletsorozatainak megbeszélése során a szerző arra feltételezésre jut, hogy míg a gyulladáskeltő neuropeptidok felszabadulása e modellben feltehetően TRPV1 receptor mediált, a gyulladásgátló szomatosztatin felszabadulásában egyéb mechanizmusok játszanak szerepet. Ezt az elképzelést kézenfekvőnek tűnne letesztelni a TRPV1^{-/-} egerek szomatosztatin plazmakoncentrációjának vizsgálatával. Történt-e ilyen vizsgálat, és ha igen, milyen eredménnyel?”

Az a következtetésünk, hogy a gyulladásgátló szomatosztatin felszabadulása a gyulladáskeltő neuropeptidokkal ellentétben priméren nem TRPV1 receptor-mediált csak funkcionális eredményeinkre alapult. 2003-ban, amikor ezeket a kísérleteket végeztük, a szomatosztatin RIA módszerünk érzékenysége még kisebb volt, mint jelenleg. Minimum 1-1.5 ml plazmára volt szükségünk ahhoz, hogy az eredmények benne legyenek a standard görbében, egerek esetében ezért akkoriban nem tudtunk plazmakoncentrációkat mérni. Néhány éven belül technikai módosításoknak köszönhetően sikerült 500 µl plazmából is megbízhatóan mérni e peptidet, az első ilyen eredményeket az egér neuropátia-modellekben kaptuk (Bölcskei és mtsai. 2005. Pain). A J. Pharmacol. Exp. Ther. közleményünk megjelenését követően már nem végeztünk több kísérletet ebben a krónikus CFA modellben. Köszönöm Professzor Asszony javaslatát, teljes mértékben egyetértek a felvetéssel, mindenképp érdemes megismételni ezeket a kísérleteket, és közvetlen bizonyítékot szolgáltatni az ízületi gyulladás esetén erre a teóriára.

10.) „A II/23.A. és B. ábrákon bemutatott adatok ellentétben állnak a szövegbeli interpretációjukkal. Nem világos továbbá, hogy mi a magyarázata a különböző gyulladásgátló vegyületek eltérő hatásának a TRPV1^{-/-} állatokban.”

Sajnálatos módon az Origin programmal készült ábra Word file-ba illesztésekor a szimbólumok összekeveredtek. Ez a hiba a dolgozat többszöri átolvasása ellenére is elkerülte a figyelmemet, elnézést kérek érte.

Miután az első kísérletsorozatban bizonyítottuk, hogy a TRPV1 receptor aktivációja fokozza a krónikus ízületi gyulladást és hiperalgéziát, a COX gátló indometacinnal, a LOX gátló NDGA-val, a bradykinin B1 receptor antagonistá desArgHOE-140-nel és a B2 blokkoló HOE-140-nel azért végeztük el a kísérleteket párhuzamosan TRPV1 hiányos és a vad típusú egerekben, hogy e modellben azonosítsuk ezt az ioncsatornát aktiváló, illetve szenzitizáló mediátorokat. Eredményeink azt mutatták, hogy WT egerekben a B1 antagonistá nem befolyásolta a duzzadást, szövettani károsodást és a hiperalgéziát, tehát e receptornak nincs jelentősége a krónikus artritiszben. Ezzel szemben a B2 antagonistá, valamint a COX és a LOX gátló vegyületek egyaránt szignifikánsan csökkentették

mindhárom gyulladáshoz vezető paraméter, ami arra utal, hogy a bradykininnek a B2 receptoron keresztül, valamint a prosztaglandinok és leukotriének fontos szerepet játszanak az az ízületi gyulladás súlyosbodásában. Ez önmagában nem meglepő, viszont az az eredmény, hogy a TRPV1^{-/-} csoportban a LOX gátló és a B2 antagonisták gátló hatása nem volt megfigyelhető, azt bizonyítja e modellben, hogy

1) a gyulladt szövetben a LOX enzim által termelt leukotriének és a TRPV1 receptor aktivációján keresztül fejtik ki hatásukat (a LOX termékek TRPV1 aktiváló hatására vonatkozó irodalmi adatok összefoglalása: Starowicz és mtsai. 2007. Pharmacol. Ther.; Szolcsányi 2004. Neuropeptides)

2) a gyulladt ízületben termelődő bradykinin a szenzoros idegvégződésen lokalizálódó B2 receptoron keresztül szenzitizálja a TRPV1 csatornát az egyéb gyulladáshoz vezető mediátorokkal és pl. protonokkal szemben (arra, hogy a B2 receptor-aktiváció PLC jelátviteli úton és a Trk A-n keresztül szenzitizálja a TRPV1 receptort in vitro adatot Chuang és mtsai 2001. közölték a Nature-ben; összefoglaló: Mizumura és mtsai. 2009. Exp. Brain Res.).

A COX gátlás a TRPV1 hiányos csoportban is kifejtett gyulladáscsökkentő és anti-hiperalgikus hatásokat, azonban kisebb mértékűeket, mint a WT egerekben. A duzzadásgátlás továbbá csak a 11. naptól kezdődően volt szignifikáns. Mindez arra utal, hogy a COX enzimek által termelt prosztaglandinok nem elsősorban a TRPV1 receptor szenzitizációján keresztül fokozzák ugyan a gyulladást, azonban a krónikus folyamat késői fázisában e csatornának is van szerepe a duzzadás és a hiperalgia fokozódásában.

Ez a magyarázat a disszertációban valóban nem kellően precíz és részletezett, a „Megbeszélés, következtetések” fejezetben nem helyeztem erre megfelelő hangsúlyt, igyekszem a védéskor majd ezt pótolni.

11.) „Hogyan magyarázhatók a dóziszfüggést nem mutató, illetve harang alakú dózis-hatás összefüggést mutató gyógyszerhatások? Ha elfogadjuk a szerző által nyújtott magyarázatot miszerint nagyobb dózisban a J2156 már gátolja az endogén szomatosztatin felszabadulását is a kapszaicin-érzékeny idegvégződésekben, akkor az sst₄ agonisták nagyobb dózisban funkcionális antagonistaként viselkedhetnek. Nem fogja-e ez korlátozni a jövőbeli alkalmazhatóságukat, mint gyulladásgátló gyógyszer?”

Dóziszfüggő hatás hiánya, illetve harang alakú dózis-hatás görbék peptidok, de pl. 5-HT, opioid és kannabinoid receptorokon ható nem-peptid struktúrájú vegyületek esetén is gyakran megfigyelhetők. Az a magyarázat, amelyet az sst₄ receptor agonistával az *in vivo* (elsősorban neurogén gyulladás) modellekben kapott eredményekre a disszertációban és a Br. J. Pharmacol.-ban megjelent eredeti közleményünkben is felvettem, arra alapoztam, hogy e vegyület az izolált trachea perfúziós rendszerben a gyulladáskeltő SP és CGRP felszabadulását kisebb koncentrációkban gátolta, mint a gátló hatású szomatosztatinét. A J2156 hatáserőssége a szomatosztatin-felszabadulásra kb. 10-20-szor kisebb volt, mint a másik két peptidére. Lehet azonban a receptor-kötődés és a G-protein aktiváció szintjén is magyarázatot találni e jelenségre. Újabb, még nem közölt adataink sst₄ receptort expresszáló transzfektált sejtvonalon azt mutatták, hogy mind peptid, mind nem-peptid szerkezetű agonisták nagyobb koncentrációi (100 µM) kisebb mértékű receptor kötődést és aktivációt eredményeztek. Ennek oka lehet mikroaggregátumok keletkezése, amely megakadályozza a kötőhelyhez való kapcsolódást, de nem specifikus, nem-receptorális hatások is elképzelhetők. Nem zárható ki azonban egyéb kinetikai ok sem, nagyobb dózisok esetén a töményebb oldatok i.p. felszívódása csökkenhet. Mindenesetre hasonló eredményeket kaptunk korábban peptid szerkezetű sst₄ agonistákkal, pl. a heptapeptid TT-232-vel is (Helyes és mtsai. 2001. Br. J. Pharmacol.; Pintér és mtsai. 2002. N. S. Arch. Pharmacol.). Sst₄ agonisták potenciális klinikai alkalmazása során ezért azt az optimális

terápiás dózis-tartományt kell majd meghatároznunk, amelyben a maximális gyulladásgátló hatás érvényesül.

12.) „A gyógyszerjelölt molekulák vizsgálatakor nem minden alkalommal alkalmaztak referenciavegyületet. Míg szigorúan alapkutatói célú kísérleteknél ez nem feltétlen szükséges, bár ott is hasznos, a jövőben gyógyszerként fejleszteni szándékozott ligandok potenciálját illetően alapvető fontosságú, hogy „többet tudnak-e” a jelenleg használt gyógyszereknél.”

Teljes mértékben egyetértek azzal, hogy nemcsak gyógyszergyári szemléletű kutatásban, hanem alapkutatóban is sok esetben fontos pozitív kontrollok, referenciavegyületek vizsgálata. Azonban a disszertációban bemutatott kísérleteinkben, amikor potenciális gyógyszerjelölt vegyületek hatásait vizsgáltuk (sst₄ receptor agonisták: TT-232, J-2156) alapvetően azért nem alkalmaztunk referenciavegyületet, mert 1) a neurogén gyulladási folyamatok csökkentésére jelenleg nem áll rendelkezésre hatékony gátlószer (COX-gátlók nem hatékonyak), valamint 2) nincs hasonló mechanizmusú ill. támadáspontú vegyület, amellyel össze lehetne hasonlítani a hatás mértékét. Korábbi kísérletekben használtunk referenciavegyületeket ezekben a modellekben, gyulladási folyamatok esetében a diclofenacot és meloxicamot, neuropátia-modellekben baclofent (Helyes és mtsai. 2001. Br. J. Pharmacol.; Pintér és mtsai. 2002. N. S. Arch. Pharmacol.). Azokra az adatokra hivatkoztunk az újabb közleményeinkben is az eredmények interpretálásakor.

13.) „Kíváncsi lennék a jelölt véleményére azzal kapcsolatban, hogy a szenzoros neuropeptidok jelátvitelének befolyásolásán kívül még milyen egyéb célpontok fejlesztésében lát fantáziát gyulladási betegségekből, illetve hogyan látja a TRPV1 ligandok, mint új gyógyszer-csoport jövőjét.”

Gyulladási betegségek potenciális jövőbeli terápiájában az általunk vizsgált szenzoros neuropeptidok hatásainak befolyásolásán kívül természetesen még más mechanizmusok is szóba jönnek, azonban ezek elsősorban a gyulladási folyamatok nem-neurogén komponenseire fókuszálnak. A periférián ható, kvaterner nitrogént tartalmazó szintetikus κ - és μ -opioid receptor agonisták gyulladásgátló hatását már több évtizede vizsgálják, számos közlemény és összefoglaló született az ezekben rejlő potenciális gyógyszerfejlesztési perspektívákról (Stein és mtsai. 2001. Z. Rheumatol.; Walker 2003. Adv. Exp. Med. Biol.; Aldrich és McLaughlin 2009. AAPS; Lang és mtsai. 2010. Ann. NY Acad. Sci.). Ilyen vegyületekkel végzett klinikai vizsgálatokról azonban nincs tudomásom, és egy ideje összefoglaló alapján ezek nem szerepelnek a legígéretesebbnek tartott irányok között. Az **A2A adenosin receptor** Gs proteinhez kapcsolt receptor, amely aktivációja cAMP fokozódást okoz. Ez a mechanizmus egyrészt a gyulladási sejtek (neutrofilek, hízósejtek, makrofágok) aktivitását, mediátor-termelését és felszabadulását csökkenti, másrészt simaizom relaxációt is okoz, ami asztmában különösen ígéretes lehet. Az A2A agonisták továbbá gyulladásgátló hatásuk mellett állatkísérletekben anti-hiperalgetikus és antinociceptív hatásokkal is rendelkeznek, ez további előnyt jelenthet ízületi gyulladás kezelésében. Hipotenzív hatásukat azonban potenciális mellékhatásként kell mérlegelni (Akkari és mtsai. 2006. Top. Curr. Med. Chem.; Cristalli és mtsai. 2009. Handb. Exp. Pharmacol.) Ilyen vegyületek néhány éve már fázis II. klinikai vizsgálatokba kerültek, de az eddigi eredmények nem egyértelműen pozitívak (Brown és mtsai. 2008. Br. J. Pharmacol.). A **P2X** ioncsatornához kapcsolt purinoceptorok (P2X1R-P2X7R) az antidepresszáns és fájdalom-csökkentő gyógyszerfejlesztési irányokon kívül krónikus gyulladási folyamatokban is ígéretes célpontok lehetnek. P2X7R antagonisták és egyéb P2X receptor-gátlók reumatoid artritisz terápiára Fázis I. és II. klinikai vizsgálatok alatt

állnak (Romagnoli és mtsai. 2008. Expert Opin. Ther. Targets; Gunosewoyo és Kassiou 2010. Exp. Opin. Ther. Pat.). **Kemokin receptor 9 (CCR9) gátló** kismolekula klinikai III. fázisban van Crohn betegségben, további kemokin receptor blokkolók is preklinikai fejlesztés alatt állnak egyéb autoimmun és gyulladásos kórképek kezelésére (Proudfoot és mtsai. 2010. Expert Opin. Invest. Drugs). Több **p38 MAPK gátló** vegyület klinikai farmakológiai II. fázis vizsgálatok alatt áll reumatoid artritiszes és pszoriázisos betegekben, a mellékhatások miatt sajnos egy sem kerülhetett még III. fázis vizsálatokba (Cohen 2009. Curr. Opin. Cell. Biol.).

Kannabinoid vegyületek, elsősorban CB2 receptor-szelektív nem pszichoaktív szintetikus agonisták a gyulladáskeltő citokin-kaszád hatékony gátlóinak bizonyultak, artritisz és gyulladásos bélbetegségek állatkísérletes modelljeiben ígéretes eredményeket kaptak (Klein és Newton 2007. Adv. Exp. Med. Biol.). Számos membránalkotó többszörösen telítetlen bioaktív lipid, mint a többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA), az epoxieicosatriensav (EET), a szfingolipid ceramid, a szfingozin 1-foszfát és a szfingozilfoszforilkolin gyulladásgátló hatásairól ugyancsak számos közlemény beszámol az utóbbi években (összefoglaló: Huwiler és Pfeilschiffer 2009. Pharmacol. Ther.). Az utóbbi években elindult peroxiszóma proliferációt aktiváló receptor (**PPAR- α** és **PPAR- γ**) agonisták fejlesztése, melyek csökkentik a gyulladáskeltő hatású mediátorok génexpresszióját és a gyulladásos sejtek számos funkcióját (Belvisi és Mitchell 2009. Br. J. Pharmacol.; összefoglaló: Dinarello 2010. Cell.). Végül új alapkutatói irányt képvisel a **Wnt/beta-catenin** jelátviteli útvonal farmakológiai eszközökkel történő befolyásolása is gyulladáscsökkentő céllal (Takahashi-Yanaga és Sasaguri 2007. J. Pharmacol. Sci.).

TRPV1 receptoron ható ligandok fejlesztésére az elmúlt évtizedben 55 gyógyszergyár indított gyógyszerfejlesztési projekteket elsősorban analgetikus indikációkat célozva, ezek többsége antagonistákra irányul. A preklinikai vizsgálatokra eddig kb. 1 milliárd dollárt költöttek, amire a gyógyszerkutatás történetében nem volt példa (Wong és Gavva 2009. Brain Res. Rev.; Gunthorpe és Chinz 2009. Drug Discov. Today). Bár számos antagonistával kapcsolatban legnagyobb problémaként a hipertermizáló mellékhatás jelentkezett, több fejlesztési vonal már a klinikai vizsgálatok késői fázisaiban van.

A TRPV1 csatornán ható első gyógyszerkészítmény azonban agonista, maga a kapszaicin, amelyből a 8%-os koncentrációt tartalmazó tapasz, Qutenza (NGX-4010) néven néhány hónapja került forgalomba. A helyi érzéstelenítővel előkezelt területen fél-egy órán át kell rajtahagyni a tapaszt, és ez az egyszeri alkalmazás 3 hónapig csökkenti a neuropátiás fájdalmat. Hatékonyságát multicentrikus, randomizált, kettős-vak klinikai vizsgálatok bizonyítják posztherpeszes neuralgiás (402 beteg; Backonja és mtsai. 2008. Lancet Neurol.) és HIV-asszociált szenzoros neuropátiás (307 beteg; Simpson és mtsai. 2008. Neurology) betegcsoportokban. Szintetikus TRPV1 agonisták a WL-1001 és WL-1002 (Winston Labs), amelyeket oszteoartritiszes fájdalom helyi kezelésére, valamint orrsprében trigeminus neuralgiára és migrén-profilaxisra fejlesztenek jelenleg preklinikai fázisban (Jara-Oseguera és mtsai. 2008. Curr. Mol. Pharmacol.; Knotkova és mtsai. 2008. J. Clin. Pain). A lokálisan alkalmazott nagy dózisú agonista-kezelés az idegvégződés deszenzibilizációját, hosszan tartó funkció-kiesését okozza, ezt igazolja a Qutenza tapasz esetében is biopsziás mintákon Kennedy és mtsai. közleménye (2010. Pain). Agonisták esetében azonban a deszenzibilizáló hatáson kívül a másik lehetséges mechanizmus, hogy a TRPV1 tartós, tónusos aktivációja krónikus gyulladásos és fájdalomállapotokban gátló mediátorok (mi elsősorban a szomatosztatin szerepét bizonyítottuk) felszabadulását eredményezi. Saját eredményeink mellett több más adat is TRPV1 aktiváció protektív hatását bizonyítja (összefoglaló: Alawi és Keeble 2010. Pharmacol. Ther.). Ezt az elméletet támasztja alá a régóta ismert és alkalmazott kapszaicines bedörzsölés és az

ellenirritáció jelensége. Bár ilyen irányú konkrét gyári feljesztésekről jelenleg nem tudok, véleményem szerint a TRPV1 tónusos aktivációját okozó agonisták, amelyek nem váltanak ki fájdalmat és csípő érzést, ugyancsak ígéretesek lehetnek szisztémás alkalmazásban is. Ennek realitását indokolja, hogy korábban patkány n. ischiadicus antidrómos elektromos ingerlése során bizonyítottuk, hogy a szomatosztatin már 0.1 Hz-cel történő stimulációnál is felszabadul a kapszaicin-érzékeny végződésből, amikor a gyulladáskeltő peptidok még nem (Szolcsányi és mtsai. 1998. Br. J. Pharmacol.). Elképzelhető tehát, hogy kémiai úton is lehet úgy aktiválni a TRPV1 csatornát, hogy lokális irritáció, neurogén gyulladás és fájdalom csak minimális mértékben jelentkezzen, de a szomatosztatin (és esetleges egyéb gátló mediátorok) felszabaduljanak az afferensekből. Bár még alapkísérletes stádiumban van a TRPV1 csatorna aktiválhatóságának befolyásolása pl. a receptor körüli lipid raftok módosításán keresztül (Sántha és mtsai. 2010. Pain; Szőke és mtsai. 2010. Eur. J. Pharmacol.), a jövőben ez is érdekes megközelítés lehet gyógyszerfejlesztési szempontból (Jancsó és mtsai. 2008. Br. J. Pharmacol.).

14.) „A IV/1. táblázatban az alapértékhez viszonyított szignifikancia nincs feltüntetve a naloxon+ EM-1 oszlophoz viszonyítva, ami az eredmények interpretálásához fontos.”

Köszönöm Opponens Asszony észrevételét, egyetértek abban, hogy e statisztikai összehasonlítás jelölése fontos lett volna az eredmények értelmezéséhez, elnézést kérek a hiányosságért. Naloxon jelenlétében az EM-1 peptid-felszabadulást gátló hatása elmaradt, az alapértékhez viszonyítva a P-anyag esetében a szignifikancia $*p < 0.05$, a CGRP esetében $**p < 0.01$.

15.) „A IV/19. ábra nem az EM-1 hatását mutatja a mustárolajjal kiváltott fűlduzzadásra, ahogy az ábramagyarázatban és a szövegben szerepel, hanem a J-2156 hatását ábrázolja a lábduzzadásra.”

Erre a helyre sajnos figyelmetlenségem miatt véletlenül rossz ábrát illesztettem be, elnézést kérek a hibáért. Természetesen a védésen az EM-1 hatását szemléltető ábrát fogom bemutatni.

Még egyszer szeretném megköszönni Professzor Asszonynak a dolgozatom bírálatába fektetett alapos munkáját, és bízom benne, hogy elfogadja a válaszaimat.

Pécs, 2010. augusztus 13.

Dr. Helyes Zsuzsanna