

DEBRECENI EGYETEM
Általános Orvostudományi Kar
Kardiológiai Intézet
Igazgató: Prof. Dr. Édes István egyetemi tanár
Tel. / Fax: 52-255-928

Klinikai Fiziológiai Tanszék
Tanszékvezető: Prof. Dr. Papp Zoltán egyetemi tanár
pappz@med.unideb.hu
Tel. / Fax: 52-255-978



UNIVERSITY OF DEBRECEN
Faculty of Medicine
Institute of Cardiology
Director: Prof. Dr. István Édes M.D., Ph.D., D.Sc.
Phone / Fax: 36-52-255-928

Division of Clinical Physiology
Head of division: Prof. Dr. Zoltán Papp M.D., Ph.D., D.Sc.
pappz@med.unideb.hu
Phone / Fax: 36-52-255-978

Hungary, 4032 Debrecen, Móricz Zsigmond krt. 22., e-mail: klinfiz@med.unideb.hu

Prof. Dr. Ferdinandy Péter
egyetemi tanár
Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet
Semmelweis Egyetem

Mindenekelőtt tisztelettel köszönöm Ferdinandy Péter biztató szavait, kritikai megjegyzéseit és kérdéseit!

A disszertációban nem szereplő további első- és utolsó szerzős közleményeimmel kapcsolatban azok disszertációból kihagyásának oka az, hogy a szívizom kontraktilitás biokémiai alapjai, a vesefunkció megtartásának genetikai háttere kevésbé illeszkedett a disszertáció által megcélzott témakörbe.

A bírálónak teljesen igaza van abban a tekintetben, hogy a preklinikai gyógyszerfejlesztés folyamatának teljes vertikumát felölelő munka nagy kihívás volt, és abban is, hogy a molekulafejlesztést követő szerveket, élő állatokat felölelő kutatásokban nem a hagyományos fájdalomcsillapítás volt a cél. Ennek talán prózai oka, hogy itthon a Debreceni Egyetem Kardiológiai Intézetében helyezkedtem el. Azt is be kell őszintén vallanom, hogy eleinte itt is a neuronális TRPV1 által mediált vazodilatatív hatás vizsgálata volt az elsődleges célom. A dilatatív hatás azonban nehezen tettenérhetőnek bizonyult izolált ereken. Sőt, bizonyos erek esetében következetesen teljes vazokonstriktiót váltott ki a TRPV1 stimulálása. Ez a konstriktív hatás adott munkát számomra az elmúlt évtizedben és vezetett el ezen disszertáció elkészítéséhez.

A részletes bírálatban kapott kérdésekre válaszolva: talán túlzás volt a szakmai indíttatás ilyen jelentős szerepben való említése. A disszertáció írása során szükségszerűen számot vettem a múltammal és ezen mérföldkövek bemutatását fontosnak tartottam.

A bíráló felidézte azt a megállapításomat, hogy a kapszaicin hatékonysága a TRPV1-en visszavethette a receptoron történő gyógyszerfejlesztést. Ezen kijelentést én úgy értettem, hogy a TRPV1-en ható, kapszaicin kötőhelyhez kötődő ligandok fejlesztése ugyan kitűnően alkalmas a receptor aktivitás szabályozására, de ez nem biztos, hogy ez egybeesik a receptor élettani szabályozásának mechanizmusával. Ezt a megállapítást három érv támogathatja. (1) A TRPV1 kapszaicin kötőhelyén ható molekulák klinikai sikere erősen kétséges. A hipertermia komoly mellékhatásnak bizonyult, amely jelentősen megkérdőjelezte a klinikai bevezetést. Ennek kapcsán megemlíteném, hogy

Szolcsányi professzor Úr még a receptor kutatásának hajnalán, az 1970-es évek közepén leírta a kapszaicin receptor hőháztartásban betöltött szerepének jelentőségét, azonban a knock out egérmodell nem megfelelő originális jellemzése ezen eredményeket a klinikai mellékhatások megjelenéséig jelentősen háttérbe szorította. A lényeg, hogy a kapszaicin kötőhelyen ható antagonisták nem várt (szerintem on-target) mellékhatással rendelkeznek. (2) Elképzelhető, hogy a TRPV1 fájdalom kialakulása szempontjából releváns élettani szabályozása nem a kapszaicin kötőhelyen valósul meg. Ezt alátámaszthatja az a tény, hogy a TRPV1 konzervált szekvenciája mellett a nyulak és madarak kapszaicin-érzéketlensége nem jelenti azt, hogy ezek a receptorok ezen élőlényekben nem funkcionálisak. Számomra ez inkább azt támogatja, hogy a TRPV1 élettani szerepét tekintve a kapszaicin kötőhely vanilloidkötésben fontos térszerkezete kevésbé jelentős. (3) A TRPV1 az utóbbi évtized kutatásai során egy olyan multimodális receptornak bizonyult, amelynek aktivitását számos fizikai és kémiai hatás modulálhatja. Ezen hatások közül a kapszaicin kötőhely általi moduláció csak az egyik lehetőség. Élettani körülmények között ez a modalitás kisebb jelentőségű lehet, míg a farmakológiai erőfeszítések túlnyomó többsége erre irányult. Lehet, szerencsésebb lett volna más regulációs mechanizmust tekinteni a gyógyszerfejlesztés alapjának, ami elvezethetett volna mellékhatás nélküli fájdalomcsillapítók azonosításához.

A Scotland és munkatársai által írt közlemény bemutatásakor valóban elírtam a vazokonstriktív hatást vazodilatációra, jöllehet a hivatkozás bemutatásakor egyértelműen a konstriktív hatásra utaltam.

A 19. ábra esetében valóban lehetett volna informatívabb és a 27. ábrán sem jelöltem a paneleket, továbbá a módszerek fejezetben is bemutathattam volna valamennyi, a disszertációban előforduló módszert. Mindezen hiányosságokat sajnálom.

Válaszok a konkrét kérdésekre:

1. kérdés: Sikerült-e klinikailag hatékony molekulákat terveznünk a molekuláris farmakológiai programban? Mindhárom bíráló közös kérdése ez. A kérdésre a rövid válasz az, hogy tudtommal nem. Ugyanakkor szeretném hangsúlyozni, hogy a ligandok jelentős részében szabadalmi bejelentés történt, amelynek hasznosításáról nincsenek információim. További ipari alkalmazást jelenthet, hogy a metodika, a szerkezeti információ egyaránt segíthette mások erőfeszítéseit. Ennek megítélésakor érdemes azt is figyelembe venni, hogy nagyon kevés originális molekula kerül klinikai alkalmazásra napjainkban, nagyon keveseknek adatik meg az, hogy közvetlenül hozzájárulhassanak a gyógykezelés fejlődéséhez ilyen módon.

2. kérdés: Az eddig ismert modalitások és a TRPV1 antagonisták hipertermiás hatásának összefüggése: A TRPV1 hipertermiás hatásainak oka és mechanizmusa szerintem még mindig kevésbé értett terület. Jómagam is részt vettem egy olyan molekula in vitro vizsgálatában (JYL-1421), amelynek tulajdonságait ezen modalitásra épülő elmélet alátámasztására hozzák fel.

Ugyanakkor a saját kísérleti eredményeim szerint ez a molekula nem olyan hatásokkal rendelkezik, mint amit tulajdonítanak neki. Ílymódon nemhogy támogatná, hanem cáfolja a vele kapcsolatban megalapozott elméletet.

3. kérdés: Összefüggés a TRPV1 ligandok hatás-kinetikája és penetranciája között. A TRPV1-re gyakorolt agonista hatás kinetikájában a penetrancia szerintem csak az egyik fontos tényező, de emelett szerepet játszanak további tulajdonságok, mint a ligandok „érzékenysége” a receptor foszforilációját tekintve, azon membrán tulajdonságai, amibe a TRPV1 beilleszkedik és a TRPV1 más fehérjékkel történő interakciója is. Egyszerűen fogalmazva nem kérdés számomra, hogy a kapszaicin kötőhely eléréséhez a molekulának a membránba történő beépülése, penetranciája szükséges, azonban ez csak egy szükséges, de sokszor nem elegendő feltétele a TRPV1 aktiválásának.

4. kérdés: A parciális agonizmus-antagonizmus hiánya a gyógyszerfejlesztési stratégiákból. Hitem szerint ennek egyik oka a gyógyszerfejlesztés folyamatában keresendő: olyan molekulákra könnyű a nagyszámú molekula tesztelést megvalósítani, amelyek tiszta agonista, vagy antagonistá tulajdonságokkal rendelkeznek. A másik, hogy ezen ligandok élettani hatásainak megjósítása talán egyszerűbbnek tűnhet. A TRPV1 esetében azonban hitem szerint a receptor stimulációjának egészséges körülmények között megfigyelhető mértékben történő rögzítése megoldást jelenthetne a hipertermia és a fájdalomcsillapításban is, hiszen az egészséges állapotban nincs se hipertermia, se fájdalom. Ennek megfelelően a mellékhatások megjelenése nélkül lehetne a TRPV1 túlzott aktivációjának következményeként megjelenő fájdalmat csökkenteni.

5. kérdés: Az anandamid és a TRPV1 összefüggései. Az anandamid élettani hatásai a TRPV1-re vitatott területnek tekinthetőek. Egyfelől az anandamid kétségtelenül képes hatni a TRPV1-re, azonban az anandamid hatásainak kifejtéséhez a koncentrációjának a mikromoláris tartományban kell lennie. Adataink szerint az anandamid ebben az esetben egy részleges agonista-antagonista hatást vált ki, amelynek során a TRPV1 ráadásul gyorsan deszenzitizálódik, nem csak anandamidra, hanem a teljes agonista kapszaicinre is. Ez a részleges antagonizmus felveti, hogy megfelelő anandamid koncentrációk mellett a TRPV1 egyéb útvonalakon keresztüli aktiválhatósága csökkenhet. Ettől függetlenül pedig az is fontos elem, hogy az anandamid a TRPV1-et expresszáló sejtek jelentős részében más kannabinoid receptorokon keresztül megvalósuló hatással is befolyásolhatja a TRPV1 működését. Összességében azt mondanám, hogy az anandamid biztosan hat a TRPV1-et expresszáló sejtekre, amely hatás még a TRPV1 válaszkészséget is érintheti, azonban ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy a hatás közvetlenül a TRPV1-re hatva valósul meg.

6. kérdés: A bíráló észrevette, hogy a TRPV1 knock out egerek esetében a kapszaicin a mikromoláris tartományban dilatatív hatással van. A disszertáció benyújtását követően egyik kísérletsorozatban a kapszaicin hatásait tanulmányoztuk a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornára, és azt találtuk, hogy a

kapszaicin a csatornát ebben a koncentráció tartományban (nagyjából 3 mikromoláris EC_{50} értékkel) gátolja. Ez teljességgel összhangban van azzal, hogy a TRPV1-et nem expresszáló sejtekben ez a Ca^{2+} csatorna gátló hatás vált láthatóvá és dilatációhoz vezetett.

7. kérdés: Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció meghatározása izolált ereken. Az ereken történő intracelluláris Ca^{2+} koncentráció meghatározás a tenyésztett sejtekhez hasonlóan FURA-2 fluoreszcencia intenzitás változásának mérésén alapult. Az izolált ereket 10 mg/ml BSA jelenlétében a KREBS oldatban töltöttük 45-70 percig, majd a kísérleteket mosás után végeztük. A fluoreszcens mikroszkóp felbontása sajnos nem engedte meg a sejtenkénti analízist, így az adatokat az érfalban bekövetkező fluoreszcencia intenzitások arányaként adtuk meg.

8. kérdés: A TRPV1 stimuláció vazokonstriktív hatásainak mechanizmusa. A TRPV1 vazokonstriktív hatásának magyarázatául adataink szerint elégséges az intracelluláris Ca^{2+} emelkedése, a kontrakció során nem figyeltünk meg változást a kontrakció intracelluláris Ca^{2+} érzékenységeiben. Ilyen tekintetben a TRPV1 aktiválása során megfigyelt vazokonstriktív nagyban hasonlított a magas extracelluláris K^+ alkalmazásakor látható válaszokra. A TRPV1 aktiválódását követően tehát a csatornán keresztül Ca^{2+} ionok áramlanak be a simaizomsejtekbe, amelyek erre konstriktív választolnak. Érdekes talán megjegyezni, hogy az aktivált TRPV1-en keresztül Na^+ ionok is beáramlanak, amelyek a Ca^{2+} -mal együtt depolarizációt is okozhatnak, mely depolarizációs hatás a feszültségfüggő csatornák, elsősorban a feszültségfüggő Ca^{2+} csatorna megnyílásához is vezethet, ami további Ca^{2+} beáramlással járhat. Eredményeink szerint ez a folyamat is jelentősen hozzájárulhat a vazokonstriktív hatásához.

9. kérdés: Milyen kórállapotokban lehet jelentős a TRPV1 aktiválásakor megfigyelhető vazokonstriktív? Azt gondolom, hogy olyan körülmények között, amikor az értónus emelésére lenne szükség és a hagyományos kezelési lehetőségek eredménytelenek. Ilyen lehet például a sokk, amikor a hipotenzió csökkentésére optimálisnak tűnik egy olyan szer, ami nem befolyásolja a szívritmust közvetlenül és nincs szüksége a betegség által érintett intracelluláris jelátviteli útvonalakra. Ebben az esetben a receptoron keresztül közvetlenül belépő Ca^{2+} alkalmas lehet arra, hogy a simaizomsejtekben szelektíven emelje a Ca^{2+} koncentrációt és fokozza az értónust. Ehhez persze a simaizomsejteken specifikusan ható agonistákra lenne szükség.

A kérdések megválaszolás után még egyszer köszönöm Ferninandy Péter bírálatát és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását!

Debrecen, 2014. április 7.

Üdvözléssel:

Tóth Attila