

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



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

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

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. Pintér Erika
egyetemi tanár
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet
Pécsi Tudományegyetem

Köszönöm Pintér Erika megtisztelő bírálatát! Mindenekelőtt szeretném leszögezni, hogy számomra nagy megtiszteltetés olyan bizottság előtt ismertetni eredményeimet, amelyben a szűkebb területen dolgozó (sok vonatkozásban azt megalapozó) nemzetközi viszonylatban is kiemelkedő kutatók képviseltetik magukat.

Válaszaim a bíráló kérdéseire, megjegyzéseire:

Mindenekelőtt nagyon sajnálom azon szerkesztési és helyesírási hibákat, amelyek a dolgozatban maradtak.

A tartalmi kérdésekre válaszolva számomra is nagy örömet jelentett az USA-ban, amikor felismertem, hogy a szenzoros neuronok antitrombomodulin stimulációját követő lokális gyulladás első leírása Jancsó és Szolcsányi professzorok 1967-es azóta klasszikussá vált munkájában történt. Ezt bemutattam a disszertációban, azonban valóban kevés figyelmet fordítottam arra, hogy az ezen területen szerzett további adatokat áttekintsem. A bíráló által felvetett, a szenzoros neuronokból kiszabaduló, szisztémásan ható gyulladásgátló hatású anyagok leírása Szolcsányi és Pintér professzorok munkásságához köthető, amennyiben 1988-ban (majd 1996-ben részletesen) leírták, hogy a hátsógyöki ganglionok antitrombomodulin ingerlése során nem csak gyulladásos mediátorok felszabadulása, hanem szisztémás gyulladásgátló anyagok felszabadulása is bekövetkezik, mely gyulladásgátló anyagok egy adott időablakon belül (10-20 percen belül) képesek a másik oldali szenzoros neuronok stimulációjára bekövetkező gyulladásos mediátorok hatásait mintegy felére csökkenteni. 1998-ban ezen gyulladásokeltető anyagot a szomatostatinnal azonosították, és rendkívül ígéretes farmakológiai erőfeszítést tettek a szomatostatinnal ható molekulákkal történő szenzoros neuronális válaszkészség modulációjára. Kimutatták, hogy a szenzoros neuronális válaszok a 4-es típusú szomatostatinnal receptor stimulációján keresztül valósulnak meg, amelynek szelektív modulációja a TT-232 kódjelű, magyar fejlesztésű molekulával ígéretes támadáspontnak bizonyult számos kórállapotban, állatkísérletekben. Jómagam is reménykedve várom, hogy a SST4 szelektív modulációja klinikai kísérletekben is meghozza a régen várt

áttörést a neurogén gyulladásokhoz köthető kórállapotokban, mint a reumás artritisz, allergiás orr- és szem gyulladás, asztma és migrén.

A következő kérdés a resolvinok szerepére utal. A resolvinok az önmagától szűnő gyulladásról (Self-limited resolution of inflammation) kapták nevüket. Az omega-3 telítetlen zsírsavak származékai. Közülük az E-resolvinok az eikozapentoténsavból képződnek. Fontos lehet, hogy a resolvin képződésnek egyik mechanizmusa az aszpirin által acetilált COX-2 általi lipid metabolizmus. Xu és munkatársai 2010-ben mutatták ki, hogy a resolvinok jelentős fájdalomcsökkentő hatással rendelkezhetnek. A Resolvin E1 csökkentette a TNF α és kapszaicin mediált hatásokat egyaránt. Azóta a resolvinok hatékonynak bizonyultak szinte valamennyi neurogén gyulladásal kapcsolatba hozott betegségben preklinikai adatok alapján. Érdekes, hogy a resolvinok közül a D2 például 100 pM-os koncentrációban hatékonyan gátolja a TRPV1-et, ez a hatás azonban közvetett, egy G-fehérje kapcsolt receptor közreműködésével valósul meg (pertussis toxinnal gátolható). Eddig azonosított receptoraik a lipoxin receptor (ALX/FPR2) és az „árva” receptorként ismert GPCR32. Resolvinok képesek ezen receptorok modulálására az alacsony pikomoláris tartományban. Ezek az adatok (1) egyrészt összefüggést mutatnak az előzőekben említett szomatosztatin 4 receptorra ható mechanizmusokkal, amennyiben a neurogén gyulladás mértékének csökkentése hatékony fájdalomcsillapító hatással rendelkezhet, (2) másrészt felveti a resolvinok szerepét a betegségek sokkal tágabb körében, a szívelégtelenségtől kezdve a neuropátiás fájdalomig. A resolvinokat tekintve rendkívül érdekes évtizednek nézünk elébe, amelynek során kiderül, hogy a rendkívül biztató kezdeti kísérletes eredmények emberekben is helytállónak és kellő mértékűnek bizonyulnak-e. Végül (3) a resolvinok rávilágítanak arra is, hogy a TRPV1 aktivitás szabályozása terén korántsem ismerjük valamennyi mechanizmust. A resolvinok például áttörést hozhatnak a TRPV1 deszenzitizációjára irányuló törekvésekben, amennyiben minden eddiginél alacsonyabb koncentrációban hatékony gátlás érhető el. Ígéretes, hogy bizonyos resolvinok már a klinikai vizsgálatokban bizonyították mellékhatás-mentességüket.

A bíráló ezt követően a kísérleteinkben használt arteriolák izolációjára kérdezett rá. Ennek kapcsán helyesen megállapította, hogy az eredményekben bemutatott egér vázizom és koronária erek izolálását a módszerben nem említettem meg, amiért elnézést kérek. Általánosságban elmondható, hogy az izolált erek kanulált érrendszerrel történő vizsgálatának technikai korlátja kettős: (1) egyrészt kell a kellően ügyes kezű kutató, aki a milliméter tizedét sem elérő (tehát szó szerint hajszálvékony) ereket sérülés nélkül tudja izolálni és kanulálni. (2) Másrészt szükség van olyan érterületek azonosítására, amelyek elégazódásoktól lehetőség szerint mentesek, így a kanulálást követően egy zárt intraluminális tér hozható létre. Ezen feltételeknek a vázizom, szívizom, mezenterialis és némely agyalapi érszakasz felel meg. Az izoláció ezen szövetekből jelentősen nem különbözik, az eltérést az jelenti, hogy az egér megfelelő arteriolái nagyjából fele akkora, mint a patkányé. Ennek megfelelően az egér arteriolák használatához olyan nagyszerű munkatársakra

volt szükség, mint Czikora Ágnes, aki a kísérleteket elvégezte a laboratóriumban.

A bíráló következő kérdése az volt, hogy a [^3H]-RTX kötődési kísérleteket miért gerincvelőn végeztük és hogy a gerincvelői preparátumokban a hátsógyöki ganglionok is benne voltak-e? A gerincvelőt könnyű izolálhatósága miatt használtuk. Az állatkísérletekben járatanabb partnereink számára a gerincvelő kimetszése egyszerűbb feladat volt, mint a hátsógyöki ganglionok izolálása, így a kötődési kísérleteket optimalizáltuk az érző neuronok centrális nyúlványaiban expresszáldó TRPV1 kimutatására. Miután ezen jelentősen alacsonyabb TRPV1 expressziós szintű preparátumban is sikerült megbízható eredményeket elérni a kísérleteinkben gyakran használtuk a gerincvelőt.

A következő kérdés a nyúl TRPV1 kapszaicin érzékenysége utalt. A szakirodalomban elérhető néhány közlemény, amely azt sugallja, hogy a nyulak is érzékenyek lehetnek kapszaicinre. Ezek egyike a bíráló által említett közlemény is amelyben paprika port keverték nyulak ételébe és a hatásokat azonosították a kapszaicin általi TRPV1 modulációval. Az általam végzett kísérletek alapján azt tudom mondani, hogy a heterológ módon expresszált TRPV1 esetében a nyulak szekvenciájának megfelelő forma resiniferatoxin kötéssel nem rendelkezik, míg néhány aminosav cseréjével ez a nyúlban expresszáldó TRPV1 is kapszaicin érzékenyvé tehető. A szakirodalomban található, nyúl endogén kapszaicin érzékenysége utaló adatok szerintem TRPV1 független hatásokra utalnak. A hivatkozott esetben például paprika port használtak, aminek számos biológiailag aktív komponense lehet, amelyek a TRPV1 mellett más receptorok modulációján keresztül is hathatnak. A másik fontos lehetőség, hogy a kapszaicin hatásait tekintve sem teljes az egység abban a tekintetben, hogy az anyagcserére gyakorolt hatásait milyen mechanizmussal váltja ki. A szakirodalomban eredetileg TRPV1 deszenzitizációjának tulajdonított zsírban gazdag diéta mellett megfigyelhető csökkent elhízást későbbi kísérletek (a saját kísérleteinket is beleértve) nem erősítették meg. Ennek megfelelően a kapszaicin feltételezett étrendi hatásai kapcsán nem a kapszaicin közvetlenül TRPV1 funkcióra gyakorolt hatásairól van szó.

A következő kérdés az intracelluláris TRPV1 receptorok szerepére utalt. A bírálóval egyetérték abban a tekintetben, hogy az intracelluláris Ca^{2+} raktárak szerepe minimális lehet érző neuronokban. Más sejtek intracelluláris TRPV1 expresszióját tanulmányozva (utalok például a vaszkuláris simaizomsejtekre) azt találták, hogy a TRPV1-nek csak egy kis hányada található a plazmamembránban, túlnyomó többsége intracellulárisnak tűnő lokalizációban van jelen. Ezen extracelluláris receptor populációnak két fontos szerepe lehet: egyrészt valóban szerepet játszhat a Ca^{2+} homeosztázisban az intracelluláris Ca^{2+} raktárakból történő Ca^{2+} felszabadítás révén, mint azt heterológ expressziós rendszerben láttuk, másrészt viszont ez az intracelluláris receptor populáció reprezentálhatja a deszenzitizáldott receptorokat. A deszenzitizáció egyik fontos mechanizmusa lehet a receptorok internalizációja. Az általunk vizsgált CHO sejtekben a heterológ módon expresszált TRPV1 egy része feltehetőleg az endoplazmatikus retikulumban történetesen funkcionális is volt, ami

megkönnyítette jellemzését. Az endoplazmatikus retikulumban expresszáldó TRPV1 szerepet játszhat simaizom sejtek kontrakciójának kiváltásában, azonban erre közvetlen bizonyítékkal nem rendelkezünk. Annyit azért tudunk eddig nem publikált kísérleteinkből, hogy a feszültségfüggő Ca^{2+} csatorna gátlása mellett a kapszaicin által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedés és vazokonstrikció nagyjából 1/3-ával csökken. Ez arra utal, hogy a plazmamembránon, feszültségfüggő Ca^{2+} csatornákon át történő Ca^{2+} beáramlás a kapszaicin konstrikció nagyjából 1/3-áért felelős. A maradék kétharmad beáramolhat a TRPV1-en keresztül és az intracelluláris raktárakból is felszabadulhat TRPV1 függő módon, de erre kísérletes adatunk még nincs. Összefoglalva: az intracelluláris TRPV1 funkciójára nincs evidencia, elképzelhető, hogy ez mindössze egy heterológ expressziós rendszerek alkalmazásával összefüggő műtermék. Egy dologra, amely szenzoros neuronokon is megfigyelhető, mégis utaltak ezek az eredmények: a TRPV1 membrán környezete befolyásolja a receptor farmakológiai tulajdonságait. Ezen membrán környezet általi aktivitás szabályozásnak aztán tőlünk függetlenül szép funkcionális jelentőségű példáit adták a TRPV1 PIP2 általi regulációja, illetve a Szolcsányi professzorék által leírt koleszterin-szfingomielin-gangliozid függő TRPV1 aktivitás moduláció.

A következő kérdés a TRPV1 vanilloidokkal (konkrétan kapszaicinnal, vagy resiniferatoxinnal) történő deszenzitizációjára utal és azt feszegeti, hogy ez a deszenzitizáció tekinthető-e a nem-neuronális receptorok létének ismeretében is érző-neuronokra specifikusnak. A válasz egyértelműen igen. Saját közben publikálásra került eredményeink teljes mértékben támogatják Kun és munkatársai adatait: mi azt találtuk, hogy újszülöttkori kapszaicin kezelés határása a TRPV1-et expresszáló hátsó ganaglionokban található idegsejtek száma drasztikusan csökken, míg a vaszkuláris simaizomban a TRPV1 expressziós szintje nem változik a kezelés után 10 héttel. Ezzel összhangban voltak funkcionális adataink is, amennyiben a kapszaicin kezelt állatokban jelentősen kisebb irritatív hatással volt a kapszaicin, míg a vaszkuláris konstrikcióban nem találtunk eltérést a két csoport között. Kun és munkatársai hasonló megfigyeléseket tettek a bőr különböző sejtjeiben expresszáldó TRPV1 vonatkozásában. Összességében az a kép rajzolódik ki, hogy az osztódásra kevésbé képes neuronok tartós nagyfokú TRPV1 ingerlésre elhalnak, míg az osztódásra képes sejtek ezt a kezelést jobban tolerálják.

A következő kérdés a TRPV1-en történő molekulafejlesztés sikerére utalt, összhangban a másik két bíráló kérdésével. A kifejlesztett antagonisták jelentős részére szabadalmi oltalmat kértek. Tudomásommal egyedül a JYL-1421 kódjelű vegyülettel folytattak klinikai kipróbálásokat, azonban *in vivo* stabilitása (a kapszazepinhez hasonlóan) nagyon alacsonynak bizonyult. Ennek megfelelően próbáltunk olyan molekulákat szintetizálni, amelyek esetében az „A” és „B” régiókban található metabolikusan labilis csoportokat kicseréltük. Sajnos a második generációs TRPV1 ligandok vonatkozásában nincsenek adataim, a klinikai kipróbálások nemzetközi regiszterébe mindenesetre nem került velük kapcsolatos gyógyszerkísérletre utaló adat.

A bíráló utolsó kérdése arra irányult, hogy a vaszkuláris TRPV1-re specifikus ligandok fejlesztésére történt-e próbálkozás. A válasz az, hogy sajnos, nem. Magam részéről azért tartottam ezt a próbálkozást reménykeltőnek, mert a szenzoros neuronokra ható TRPV1 ligandok fejlesztése során számos TRPV1-en aktív molekulát azonosítottak. Ezen molekulák között minden bizonnyal akad olyan megfelelő affinitású molekula, amely jelentősen eltérő hatékonysággal hat a szenzoros neuronokban és a simaizomsejtekben expresszáldó receptorokon. Ami azt illeti, az optimális molekula olyan lenne, amelynek szenzoros neuronokon elhanyagolható hatása van, míg a vaszkuláris simaizomokban található receptorokat nagy hatékonysággal gátolja, vagy kicsiny deszenzibilizációval aktiválja.

Még egyszer köszönöm a megjegyzéseket, kritikákat és a bátorító szavakat, a számomra nagyon gondolatébresztő bírálatot.

Debrecen, 2014. április 7.

Üdvözléssel:

Tóth Attila