

Bírálat dr. Nagy István „**Az endovanilloid és endokannabinoid rendszerek szerepe az elsődleges fájdalomérző idegsejtek érzékenységének és aktivitásának szabályozásában**” című MTA-doktori értekezéséről

### **Formai megjegyzések**

Az értekezés érdemi szöveges része 195 oldal terjedelmű: 5 oldalas összefoglalás, 48 oldalas bevezetés, 2 oldalas célkitűzések, 102 oldalas eredményleírás, 27 oldalas megbeszélés és 9 oldalas rövidített módszertani leírás. Ehhez jön a doktori mű alapját képező saját közlemények listája (4 oldal) és a kb. 430 tételt tartalmazó irodalomjegyzék. Az értekezés a tudományos disszertációk szokásos formai követelményeinek megfelel. A dolgozatnak erénye és egyben hátránya is a nagyfokú struktúráltság. Az – egyébként dicséretes – decimális beosztás helyenként 7 szintet foglal magába, ami 200 oldalnál rövidebb mű esetében túlzásnak tűnik. A rengeteg alcím fragmentálttá teszi az írásművet, kissé rontva az áttekinthetőséget. Szintén nehezíti az olvasást, hogy a dicséretesen nagy számú idézet szöveges formában (szerző és évszám) jelenik meg, egyes helyeken akár 14 sornyi (!) hosszúságban (pl. a 181. oldalon). Helyesebb lett volna számokkal végezni a hivatkozást. Kissé szokatlannak találom, hogy az eredeti tudományos felismerések felsorolásával kezdődik az értekezés érdemi része. Ezek áttekintését nehezítik egyrészt a rövidítések, amelyek magyarázata csak az értekezés későbbi részeiben van feltüntetve, másrészt az a tény, hogy az olvasó még semmit sem tud a témáról (legalábbis a szerzőtől). Hasonló megfontolások alapján a rákövetkező Összefoglalás fejezet is inkább az értekezés végére kíváncsokra.

Az értekezés számos oldala (pl. 4–8, 13–14, 39–40, 49–52) kisebb betűmérettel és sorközzel íródott. Három hivatkozott ábra hiányzik (5.11, 5.47, 5.48), a 119. oldal pedig duplikátumban jelenik meg. Az értekezésben számos helyesírási hiba található, pl. *akút* (több helyen), *aminósav* (több helyen), *belül* (több helyen), *tetramér* (több helyen), *jelölt*, *metil*, *allil*, *nitrikoxid*, *kabbaninoid* (több helyen), alsó index elmaradása CB<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> esetében, *hipokampusz*. A disszertációban 45 elütést találtam.

### **A doktori mű fontosabb eredményei és azok értékelése**

Az értekezés nagy mennyiségű (több mint 100 oldal terjedelemben bemutatott), jól dokumentált kísérleti eredményt mutat be logikus struktúrába ágyazva. Az eredmények túlnyomó többsége nívós nemzetközi folyóiratokban jelent meg, ami garancia azok magas minőségére. A felhasznált dolgozatok zömében a jelölt első vagy utolsó szerző, ami jelzi, hogy vezető szerepet játszott azok elkészítésében. A hivatkozott közlemények magas száma

bizonyítja, hogy a szerző jól ismeri témája szakirodalmi háttérét. A doktori mű tárgyalásmódja szabatos, precíz. Minden kísérletsorozat leírásának elején rövid bevezetőben megadja a kísérletek közvetlen előzményeit, majd az eredmények prezentálása után levonja a legfontosabb következtetéseket. Mindez jól követhetővé teszi a dolgozat gondolati vezérfonalát.

Az értekezés témaválasztása korszerű, mivel a tanulmányozott nociceptív primer afferens neuronok perifériás végződéseinek kiemelkedő szerepet játszanak a fájdalom kialakulásában. Ennek ellenére nem rendelkezünk olyan analgetikummal, amely ezen idegelemek szelektív blokkolásával hat. Emiatt felértékelődik minden olyan kutatás, amely ezen nociceptív idegvégzések működését vizsgálja. Az utóbbi két évtizedben sikerült azonosítani az ioncsatornák egy újabb alcsoportját, a termoszenzitív TRP-csatornákat, amelyek kiemelt szerepet játszanak nemcsak a termonocicepcióban, hanem a kémiai ingerekkel keltett fájdalomban is. Ezek sokat vizsgált prototípusa a TRPV1-receptor/csatorna. Harmadrészt ugyancsak viszonylag új felismerés, hogy az endogén kannabinoidok hagyományos (CB<sub>1</sub>- és CB<sub>2</sub>-típusú), G-proteinhez kapcsolt receptoraikon kívül képesek aktiválni a TRPV1-csatornát is. Nagy István munkássága a fentiekben vázolt területhez kapcsolódik: az endogén kannabinoid anandamid hatásait vizsgálta a nociceptív elsődleges érzőneuronokban, különös tekintettel a CB<sub>1</sub> és a TRPV1 által közvetített hatásokra.

A szerző kísérletei úttörőnek számítanak a primer afferens neuronok forró ingerekre adott válaszában vizsgálatában. Kimutatta, hogy a forró ingerekre adott válasz alapján alacsony és magas küszöbű neuronok különböztethetők meg, és hogy az előbbi csoport kapszaicinre is reagál, felvetve annak lehetőségét, hogy az alacsony küszöbű hűválaszért a TRPV1 felelős. A szerző igazolta a TRPV1-receptor expresszióját a primer afferens neuronok sejttestén és perifériás nyúlványain. Kimutatta, hogy a TRPV1 és a CB<sub>1</sub>-receptor jelentős kolokalizációt mutat. Szisztematikus munka eredményeképpen igazolta az endokannabinoid rendszer legfontosabb elemeinek, úgy mint az anandamidot szintetizáló és lebontó enzimek, valamint a CB<sub>1</sub> kannabinoid receptor expresszióját a primer afferens neuronokban. Ezek TRPV1-gyel való kolokalizációjára is talált bizonyítékot. Mindezek alapján jogosan veti fel annak lehetőségét, hogy az elsődleges érzőneuronokból származó anandamid autokrin/parakrin mediátorként hasson mind a CB<sub>1</sub>- kannabinoid, mind a TRPV1-receptoron. Kimutatta, hogy az elsődleges érző neuronok képesek az anandamid szintézisére. Ezután több kísérletes elrendezésben igazolta, hogy az anandamid alacsonyabb koncentrációi a CB<sub>1</sub>-receptor közvetítésével gátolják a TRPV1-et, míg a magasabb koncentrációk szintén a CB<sub>1</sub>-receptor révén serkentő hatásúak a TRPV1-re. Kiemelkedő fontosságú kísérletekben azt találta, hogy gyulladáshoz vezető mediátorok jelenlétében az anandamid TRPV1-gátló hatása gyengül, ellenben TRPV1-aktiváló hatása felerősödik: pl. egy adott koncentráció, amely alaphelyzetben gátló hatású, a gyulladáshoz vezető mediátorok jelenlétében excitátoros hatású. Igazolta, hogy a CB<sub>1</sub>-receptor vélhetően konstitutív aktivitása ill. egyéb mechanizmusok révén szenzitizáló hatást fejt ki a TRPV1-re. Kimutatta, hogy a CB<sub>1</sub>-receptor és a TRPV1 között direkt molekuláris interakció jöhet létre. Az eddig említett kísérletek zömében a primer afferens neuronok sejttestén történtek a mérések. Az utolsó kísérletsorozatban e neuronok axonját és perifériás végződését tartalmazó húgyhólyag falának motoros aktivitását analizálva kimutatta, hogy az anandamid a TRPV1 aktiválása révén fokozza a hólyag motilitását. Igazolta, hogy a hólyag gyulladása anandamid szintézist indukál, és ezen ágens részt vesz a

fokozott hólyagmotilitás kialakulásában. Ezek a kísérletek kiterjesztették az endovanilloid rendszerrel kapcsolatos ismereteket a nociceptív érzőneuron perifériás terminálisaira vonatkozóan.

Megítélésem szerint Nagy István fentiekben összefoglalt eredményei jelentősek, és érdemben gyarapítják ismereteinket az endokannabinoid rendszer működéséről. Kísérleti eredményeinek gyógyszerfejlesztési szempontból is lehet relevanciája analgetikumok fejlesztésének vonatkozásában egyrészt az anandamidot szintetizáló enzimek gátlása, másrészt a CB<sub>1</sub>-receptor közvetítette TRPV1-szenzibilizáció gátlása révén. Az alábbiakban felsorolt kritikai megjegyzéseim nem érintik a dolgozat fő állításainak és következtetéseinek a validitását. A megjegyzések száma ellenére meg vagyok győződve arról, hogy a jelölt értékes munkássággal rendelkezik, és az írásmű megfelel az MTA doktori disszertáció tartalmi követelményeinek is.

## **Tartalmi kritikai megjegyzések**

### Bevezetés

A bevezetést kissé hosszúnak találtam. Pl. a TRPV1-receptor molekuláris struktúrájának közel 7 oldalas leírása feleslegesen hosszú, mivel ilyen irányú (molekuláris) kísérletekről nem esik szó a disszertációban.

A szerző véleményével ellentétben megítélésem szerint a piperin nem tartozik a vanilloidokhoz (17. oldal), mivel nincs meg benne a „3-metoxi, 4-hidroxi-benzol” struktúra. A 3.1.1.2.1.2. pontban hiányzik a 2-arachidonil-glicerol megemlítése mint a TRPV1 aktiválására képes endogén ágens.

A 24. oldalon a szerző polimodális receptorként említi a TRPV1-et. Szerencsésebb lett volna a multimodális jelzőt alkalmazni, mivel a polimodális receptorok a szakirodalomban elfogadott módon a szenzoros idegvégződések egyik csoportját jelentik.

A 31. oldalon említésre kerül, hogy a CB<sub>1</sub>-receptor ligandumkötődés hiányában is mutathat aktivitást, és ennek az alapaktivitásnak a gátlása magyarázhatja egy sor CB<sub>1</sub>-antagonista biológiai hatását. Ez a nézet ellentétben áll a receptorfarmakológia alaptételével, miszerint agonista jelenlététől független, ún. konstitutív receptoraktivitást csak az inverz agonisták képesek gátolni, a tiszta vagy más néven neutrális antagonisták nem.

A THC a tetrahidrokannabinol rövidítése (32. oldal). Ugyanitt a szerző kannabidinolt említi, de gyanítom, hogy a kannabidiolra gondolt.

A 3.3.1.2. pontban az anandamid lehetséges transzportmechanizmusait mutatja be a szerző, de nem említi, hogy milyen irányú (honnan hova?) transzportról van szó? Ugyanez vonatkozik az anandamid lebontására is (3.3.1.3. pont): nincs említés arról, hol zajlanak a vázolt reakciók.

A 3.4. pontban a szerző részletesen jellemzi az elsődleges érző idegsejtet, ám nem közli, hogy ennek a sejttípusnak egy altípusa a korábban is és ebben a pontban is tárgyalt hátsó gyöki idegsejt. A leírás kapcsán konzekvensen csak egy saját összefoglaló közleményére hivatkozik, azt a benyomást keltve, mintha e sejttípus teljes anatómiai és funkcionális leírása az ő munkásságát képezné. Helyesebb lett volna erre a saját munkára review-ként hivatkozni (for rev. see).

Nem érték egyet a szerző azon állításával, hogy a C-neuronok mind nociceptívek (42. oldal); ismertek ugyanis alacsony küszöbű mechanoreceptorok és termoreceptorok is ebben a rostpopulációban.

A 44. oldalon említett „feszültségkapcsolt” ioncsatornák helyes megnevezése feszültségfüggő. A „tetradotoxin” helyes megnevezése tetrodotoxin.

Apró hibának minősül a polimodális nociceptorok perifériás végződéseiből felszabaduló ágenseket (pl. neuropeptidok) átvivő anyagoknak (azaz transzmittereknek) minősíteni. A centrális végződés esetében ezek tényleg neurotranszmitterként vagy neuromodulátorként funkcionálnak, de a perifériás végződésből felszabadulva és nem-neuronális sejtekre hatva inkább mediátoroknak tekinthetők.

A 48. oldalon a szerző a neurogén gyulladás egyik alapjaként említi az axonreflexet, bár sem előbbi, sem utóbbi fogalmat nem mondja ki explicit módon (a szöveggörnyezetből ugyanakkor egyértelműen kiderül, hogy ezekre a fogalmakra gondol). Megjegyzendő, hogy Szolcsányi vizsgálatai igazolták, hogy a neurogén gyulladás az axonális vezetés gátlása esetén is kiváltható, tehát az axonreflex nem *sine qua non*-ja a neurogén gyulladásnak (for rev. see Szolcsányi, 2004). A 49. oldalon definiált neurogén gyulladás mint jelenség kapcsán a szerző három, az utóbbi 4 évben megjelent külföldi szakirodalomra hivatkozik, noha ezt a jelenséget már Jancsó Miklós is vizsgálta a múlt század hatvanas éveiben.

### Eredmények

Az 5.6. ábra kapcsán szó esik az NGF-ről, de a rövidítésének magyarázata hiányzik.

Az 5.2.4. pont leírásából (76. oldal) nem derül ki, hogy milyen módszerrel mérték az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentrációt.

Az 5.40. és az 5.41. ábrán nincs szignifikanciajelzés és hiányzik az X-tengelyen a koncentráció.

Az 5.46. ábrából, illetve annak ábrafeliratából sem derül ki a kapszaicin koncentrációja.

Az 5.7.2.1. pontban a szerző gyulladáshoz vezető körülményekről tesz említést. Önmagában néhány gyulladáshoz vezető mediátor vagy PKA, PKC trkA aktivációt kiváltó ágens adása in vitro rendszerben nem tekinthető ekvivalensnek az akut gyulladáshoz vezető reakcióval, ahol vazodilatáció,

plazmaextravazáció stb. lép fel. Helyesebb lett volna úgy fogalmazni, hogy „gyulladásos mediátorok jelenlétében”.

Több helyen is (pl. 124. oldal utolsó sora) említésre kerül az anandamid TRPV1-en kifejtett „potenciálja”. Véleményem szerint az angol „potency” szó nem megfelelő fordításáról van szó. A helyes magyar megfelelő a hatáserősség.

A szerző nem említi a 8-Br-cAMP hatásmódját (125. oldal).

Az 5.63. és 5.64. ábrán bemutatott eredmények kapcsán hiányzik mind az anandamid, mind a kapszaicin koncentrációja (az ábrán, az ábramagyarázatban és a szövegben sem található).

Az 5.74. ábra kapcsán a szerző nem tárgyalja a rimonabant hatását.

Az 5.9. pontban az RTX-előkezelés gátló hatás alapján a szerző arra következtet, hogy az anandamid a TRPV1 aktiválása révén fokozza a hólyagkontrakciók frekvenciáját. Azonban ő maga is említi a 152. oldalon, hogy az RTX a TRPV1-et expresszáló idegvégződés deszenzibilizációját tudja kiváltani, emiatt megítélésem szerint csak arra lehet következtetni, hogy az anandamid olyan receptor aktiválásával hat, amely a TRPV1-et kifejező idegvégződésen van. Továbbá zavaró, hogy sem a szövegből, sem az ábrákból nem derül ki, milyen koncentrációban adták az RTX-et.

### **Kérdések a doktori művel kapcsolatban**

1./ A 63. oldalon vázolt argumentáció csak abban az esetben érvényes, ha feltételezzük, hogy csak egyfajta, alacsony küszöbű hőérzékeny ioncsatorna létezik, a TRPV1. A 74. oldalon bemutatott kördiagram véleményem szerint úgy is magyarázható, hogy a primer szenzoros neuronokban a TRPV1-en kívül más, alacsony küszöbű hőérzékeny ioncsatornák is expresszálódnak (pl. TRPM3, anoktamin 1). Mi erről a szerző véleménye?

2./ Hogyan magyarázható, hogy a TRPV1  $Ca^{2+}$ -permeabilitása kb. kétszer akkora kapszaicinnal történő aktiváláskor, mint hővel történő stimuláció során (70. oldal első bekezdés)?

3./ Az 5.15. ábrával kapcsolatban nincs említés arról, hogy a KCl milyen mechanizmussal növeli az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentrációt?

4./ Az 5.6.2. pontban miért nem direkt módon emelték a fiziológias szint fölé a  $Ca^{2+}$ -koncentrációt (104. oldal)? A TRPV1 megnyitása nemcsak  $Ca^{2+}$ -, hanem  $Na^+$ -szignált is eredményez más következmények mellett.

5./ Az 5.7.3.4. pontban leírt kísérletek diszkussziója során a 176. oldalon a szerző azt a tényt, hogy a 20:4 NAPE adagolás során (ami endogén anandamidszintézishez vezet) a  $CB_1$  receptor blokkolása csökkenti az endogén anandamid excitatorikus hatását, azzal magyarázza, hogy

feltételezi a CB<sub>1</sub> receptor *konstitutív* excitatórikus hatását a TRPV1-en. A G-proteinhez kapcsolt receptorokra jellemző konstitutív aktivitás lényege azonban az, hogy *agonista hiányában* mutatnak hatást. Konstitutív CB<sub>1</sub> receptor aktivitásra akkor lehetne következtetni, ha anandamid hiányában csökkentené az inverz agonista rimonabant a TRPV1 aktivitását. A szerző által vizsgált rendszerben jelen azonban jelen volt az agonista, az endogén anandamid. Kérem a szerzőt, hogy adjon rövid összefoglalót minden olyan adatáról, amely a CB<sub>1</sub>-receptor konstitutív aktivációját támasztja alá.

6./ Az 5.64. ábra szerint a CB<sub>1</sub> receptor hiánya csak kb. 40%-kal csökkentette az anandamiddal kiváltott Ca<sup>2+</sup>-tranzienst. Milyen receptor közvetítette a maradék 60%-os választ?

7./ A CB<sub>1</sub>-receptor mRNS-e minden ACR neuronban, a COR neuronok zömében, sőt még az NR neuronok felében is kimutatható volt. Az utóbbi két adat fényében valószínűsíthető, hogy a CB<sub>1</sub>-receptor mRNS-ének jelenléte nem feltétlenül jelenti funkcióképes receptor expresszióját. Emiatt megítélésem szerint a jelölt túl könnyen elvetette azt a lehetőséget, hogy funkcionális CB<sub>1</sub>-receptor tényleg csak az ACR neuronokban van (lásd 5.8.1.4. pont első bekezdése). Mi erről a szerző véleménye?

8./ Az in vitro kísérletekben a szerző a kapszazepint 5 vagy 10 µM koncentrációban használta. Bár ezeknek a koncentrációknak a TRPV1-szelektivitását is megkérdőjelezték (Docherty et al., 1997), nagyon sok vizsgálatban használták/használgák a 10 µM kapszazepint a TRPV1 blokkolására. Ugyanakkor a húgyhólyaggal kapcsolatos további kísérletekben a szerző 50 µM kapszazepint alkalmazott (5.75., 5.77., 5.79. és 5.81. ábra). Miért kellett ez a magasabb koncentráció, és történt-e vizsgálat ennek a TRPV1-szelektivitására vonatkozóan, illetve ismeretes-e ilyen adat a szakirodalomból?

9./ A szerző legtöbb kísérletében vagy exogén anandamidot alkalmazott, vagy a szintézis serkentésével, illetve a lebomlás gátlásával megnövelte az endogén anandamid szintjét. Tehát olyan rendszereket vizsgált, ahol mesterségesen megnövelte az anandamid koncentrációját. Egyik kérdésem, hogy ismeretes-e olyan saját vagy irodalmi adat, amely alapján megítélhető, hogy a fenti módokon nem manipulált helyzetben (gyulladásos vagy neuropátiás fájdalom in vivo modelljében) is kialakul-e az anandamid excitátoros, pronociceptív hatása? Másik kérdésem, hogy van-e bármilyen támogató adat arra vonatkozóan, hogy ilyen in vivo modellekben előfordul olyan magas anandamidszint, amely a TRPV1 szenzibilizációjához/aktivációjához szükséges?

10./ Közismert a kannabisz fájdalomcsillapító hatása, főleg neuropátiás fájdalomban. Egy standardizált kivonat, a nabiximols egyes országokban törzskönyvezett készítmény bizonyos típusú neuropátiás fájdalmak kezelésére. A szerző adatai viszont azt sugallják, hogy PKC, PKA aktivációja során – ami neuropátiában is előfordul – az anandamid hatása a TRPV1-aktiváció által közvetített excitáció irányába tolódik el. Hogyan magyarázható az exogén és endogén kannabinoidok hatása közötti ezen ellentmondás?

## Hivatkozott irodalom

Docherty RJ, Yeats JC, Piper AS. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. Br J Pharmacol. 1997 Aug;121(7):1461-7.

Szolcsányi J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. Neuroptides. 2004 Dec;38(6):377-84.

## Új, fontos eredményként a szerző alábbi téziseit fogadom el

1./ Az alacsony és magas küszöbű hőérékeny nociceptív primer afferens neuronok felismerése és elkülönítése, valamint ezen neuronpopulációban az alacsony küszöbű hő- és a kapszaicinérzékenység összefüggésének feltárása egész neuron-, illetve egyedi csatornaszinten.

2./ A CB<sub>1</sub>-receptor, a FAAH, a NAPE-PLD és a kalciumra nem érzékeny anandamidszintetizáló enzimek expressziójának felfedezése a nociceptív primer afferens neuronokban. Ezek közül a CB<sub>1</sub>-receptor, a NAPE-PLD és a kalciumra nem érzékeny anandamidszintetizáló enzimek TRPV1-gyel való kolokalizációjának a feltárása.

3./ Az elsődleges érző neuronokból történő anandamidfelszabadulás kimutatása.

4./ Az anandamid kettős (CB<sub>1</sub>-közvetített gátló és TRPV1-közvetített serkentő) hatásának kimutatása elsődleges érző neuronokban. A CB<sub>1</sub>-receptor közvetítette gátlás gyengülésének, illetve a TRPV1-közvetített excitáció felerősödésének kimutatása gyulladáshoz köthető mediátorok hatására.

5./ Az elsődleges érző neuronokban képződő anandamid TRPV1-közvetített serkentő hatásának felfedezése. A CB<sub>1</sub>-receptor TRPV1-szenzibilizáló hatásának kimutatása. A CB<sub>1</sub>-receptor és a TRPV1 közötti direkt molekuláris interakció felfedezése.

6./ Az anandamid TRPV1-közvetített, húgyhólyagaktivitást fokozó hatásának felfedezése. A ciklofoszfamiddal keltett hólyaggyulladás anandamidszintézist kiváltó hatásának kimutatása, a gyulladás hólyagaktivitást fokozó hatásában az anandamid szerepének a kimutatása.

A doktori műben felsorolt eredményeket hitelesnek és az MTA doktora cím megszerzéséhez elegendőnek tartom, a doktori művet nyilvános vitára alkalmasnak minősítem.

Pécs, 2020. március 17.

Dr. Pethő Gábor  
egyetemi tanár  
az MTA doktora