

Válaszok Dr. Pethő Gábor Professor Úr bírálatára

Tisztelt Professor Úr,

Nagyon köszönöm az Akadémiai Doktori Értekezésem nagyon alapos és kritikus bírálatát.

Válaszaim a formai megjegyzéseire:

Egy Értekezés struktúrája, talán jobban mint más tudományos munka struktúrája, szubjektív. Sajnálom, hogy az általam követett szerkezet nem nyerte el a tetszését. Valóban sok az alfejezeti cím, azonban én úgy gondoltam, hogy ezek a címek segítik az eligazodást és az Értekezés tartalmának megértését. Sajnálom, ha ez nem így történt.

A referenciák alkalmazott formáját is szubjektívnek tartom. Én úgy gondolom, hogy a Tisztelt Bírálóknak könnyebb megítélni a referenciák helyességét, ha fel van tüntetve az első szerző és az évszám (amik alapján a referenciák egy jelentős hányadát felismerhetik), mint ha csak számok szerepelnek a mondatok végén.

Véleményem szerint, az Eredeti Tudományos Felismerések felsorolása az Értekezés elején szintén megkönnyítheti az Értekezés megértését és bírálatát. Elismerem azonban, hogy a rövidítések helyett a teljes neveket kellett volna használni. Elnézését kérem, ha ez a hiányosság nehézséget okozott.

Szintén sajnálom, hogy a számtalan ellenőrzés ellenére formai hibák maradtak a bekötött példányokban. Mind az eredeti dokumentum, mind a PDF file karakterkészlete egységes és ezek a file-k természetesen tartalmazzák az összes ábrát. A hibák feltehetően a nyomtatás során keletkeztek. Ugyan igyekeztem valamennyi kinyomtatott lapot ellenőrizni, ez az ellenőrzés nyilván nem volt sikeres. Elnézését kérem, hogy ezek a hibák a bekötött Értekezésben megmaradtak.

Szintén nagyon sajnálom, hogy helyesírási hibák maradtak a végleges változatban. Sajnos egyik számítógépen sincs magyar szövegszerkesztő, így az elütések és helyesírási hibák felismerése és kijavítása nyilván nem lehetett tökéletes. Az elütésekhez és helyesírási hibákhoz az is hozzájárult, hogy évtizedek óta ez az Akadémiai Doktori Értekezés az első tudományos munkám, amit magyarul írtam. Ugyan számtalan magyar kutató megfordult a laboratóriumomban az évek során, a más anyanyelvű kollegáinkra való tekintettel, a munkanyelv az mindig angol. Hasonlóan, angol neveket használunk a magyarországi kutatókkal folytatott közös munkánk során is. Így, az értekezés írása közben egy sor magyar nevet kellett megtanulnom, amikben nagy valószínűséggel fordulnak elő elütések.

Válaszom a tartalmi értékelésre:

Nagyon köszönöm a Tisztelt Bíráló munkámat méltató megjegyzéseit.

Válaszaim a Tisztelt Bíráló Kritikai megjegyzéseire:

*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.*

Az Akadémiai Doktori Értekezés nyilvános, amit esetleg a területen nem jártas szakemberek is olvasnak. Így, úgy gondolom, hogy a Bevezetésnek elég részletet

kell tartalmaznia, hogy az Értekezés többi része érthető legyen. Az értekezésbe valóban nem kerültek bele a TRPV1 struktúrájára vonatkozó eredmények, de a Bevezetésben bemutatott struktúra egyes elemeire direkt vagy indirekt módon hivatkozok az Értekezés további részeiben.

*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 3.1.1.2.1.1.2. pontban hiányzik a 2-arachidonil-glicerol megemlítése, mint a TRPV1 aktiválására képes endogén ágens.*

Egyetértek, hogy kémiai struktúráját tekintve a piperin nem vanilloid. Elnézését kérem a mondat helytelen megfogalmazása miatt. Szintén sajnálom, hogy a 2-AG nem került említésre az endogén aktivátorok között.

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

Egyetértek a megjegyzéssel.

*A 31. oldalon említésre kerül, hogy a CB1-receptor ligandumkötődés hiányában is mutathat aktivitást, és ennek az alapaktivitásnak a gátlása magyarázhatja egy sor CB1-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.*

Egyetértek. Azonban egy sor, később inverz agonistaként felismert vegyületet antagonistaként fejlesztettek. Így sokan antagonistaként hivatkoznak ezekre a vegyületekre.

*A THC a tetrahidrokannabinol rövidítése (32. oldal). Ugyanítt a szerző kannabidinolt említt, de gyanítom, hogy a kannabidiolra gondolt.*

Elnézését kérem az elütésért, a CBN rövidítés a kannabinol-ra vonatkozik.

*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.*

Elnézését kérem, hogy a transzport irányát nem említettem a fejezet első mondatában. Néhány sorral alább azonban a transzport irányát is megadtam: „Ezekkel az elképzelésekkel ellentétben, illetve inkább ezeket az elképzeléseket kiegészítve, McFarland és munkatársai (McFarland és munkatársai, 2004; McFarland és munkatársai, 2006) adatai a caveolákhoz kötött endocitózis részvételét valószínűsítik az anandamid transzportjában”

*A 3.4. pontban a szerző részletesen jellemzi az elsődleges érző idegsejtet, ám nem közli, hogy ennek a sejtípusnak 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 sejtípus teljes anatómiai és funkcionális leírása az ő munkásságát képezné. Helyesebb lett volna erre a saját munkára review-ként hivatkozni (for rev. see).*

Valóban nincs leírva, hogy az elsődleges érző idegsejtek egy típusa a hátsó gyöki idegsejt, azonban a 3.4. pont első mondata a az AZ ELSŐDLEGES ÉRZŐ IDEGSEJT MORFOLÓGIAI TULAJDONSÁGAI alcím alatt a “A hátsó gyöki idegsejtek a perifériás idegrendszerhez tartozó neuronok”, szavakkal kezdődik.

A bevezetésben természetesen próbáltam a saját összefoglaló közleményeim anyagát is felhasználni. Sajnálom, hogy a hivatkozás módja azt a benyomást keltheti, hogy a sejtípus leírása az én munkásságomhoz kapcsolódik. Természetesen nem volt ilyen szándékom.

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

Egyetértek. Sajnálom, hogy a megfogalmazás arra utal, hogy valamennyi C sejt nociceptív.

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

Amint említettem, egy sor magyar elnevezést kellett megtalálnom és megtanulnom az Értekezés írása közben. A “voltage-gated” fordítása lett a “feszültségkapcsolt”. A kifejezést azonban nem én alkottam, magyar oldalakon is előfordul:  
<https://hun.legatronics.com/sorting-receptor-rer1-controls-purkinje-cell-function-via-voltage-gated-sodium-channels-13019479>.

Elnézését kérem az elütésért.

*Apró hibának minősül a polimodális nociceptorok perifériás végződéseiből felszabaduló ágenseket (pl. neuropeptidek) 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 Tisztelt Bíráló ezen kritikai megjegyzésével nem értek egyet. Egyrészt tudjuk, hogy a perifériás nyúlványokból felszabaduló anyagoknak, mint a SP-nek, CGRP-nek vagy a glutamátoknak vannak receptoraik az elsődleges érző idegsejteken, így a felszabaduló anyagok idegsejteken is hathatnak a perifériás szövetekben is. Másrészt, mivel ugyanazokról a molekulákról van szó, amelyek ugyanezen sejtek gerincvelői végződéseiből felszabadulva transzmitter vagy modulátor szerepet játszanak, úgy gondolom, hogy indokolt mindkét esetben ugyanazt a neurotranszmitter nevet használni.

*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 szövegkörnyezetből 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.*

Nem értek egyet a Tisztelt Bíráló fenti megjegyzésével, az Értekezésben szereplő mondatok megítélésem szerint nem állítják, hogy az axonreflex elengedhetetlen feltétele a neurogén gyulladás létrejöttének, hiszen neuronális aktivitást nem csak érző akciós potenciálokkal, hanem a végződéseken kifejeződő receptorok, mint a TRPV1, vagy TRPA1 aktiválásával is ki lehet váltani:

“A polimodális sejtek perifériás patológiás folyamatokat is befolyásoló funkciójának az alapja, egyrészt, hogy a fájdalmas inger hatására létrejövő neuronális aktivitás a nyúlványok elágazódásainál mindkét irányban képes továbbhaladni. Így a neuronális aktivitás a szöveti sérülést körülvevő területekre, illetve közvetve a szöveti sérülést körülvevő területeket beidegző idegsejtekre is kiterjed (Roosterman és munkatársai, 2006; Geppetti és munkatársai, 2008; Sorkin és munkatársai, 2018). A polimodális fájdalomérző sejtek patológiás folyamatokban való részvételének másik alapja, hogy a neuronális aktivitás a szabad idegvégződésekből átvivő anyagok (glutamát, P, CGRP) felszabadulását váltja ki (Roosterman és munkatársai, 2006; Geppetti és munkatársai, 2008; Sorkin és munkatársai, 2018).”

A kritizált alfejezet célja természetesen nem a neurogén gyulladás történelmi áttekintése és részletes leírása volt, hiszen ilyen irányú munkát az Eredmények-ben nem mutatok be. Céлом az volt, hogy az elsődleges érző idegsejtek funkciót mutassam be a lehető legteljesebb formában. De úgy érzem válaszolnom kell a Tisztelt Bíráló megjegyzésére, miszerint a „axonreflex nem sine qua non-ja” neurogén gyulladásnak. Én alapvető fontosságúnak tartom, hogy egy jelenséget első ízben leíró kutató munkáját idézzük, amikor a jelenséget bemutatjuk. Így, a korrektség jegyében itt meg kell említenem, hogy az axonreflex hiányában kiváltott neurogén gyulladás első leírása Jancsó Miklós nevéhez kötődik (Jancsó, Orvosi Hetilap, 1965, Jancsó és munkatársai, 1968).

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

Igyekeztem a rövidítések teljes nevét egyszer megadni. Az NGF esetében ez a 24. oldalon történt.

*Az 5.2.4. pont leírásából (76. oldal) nem derül ki, hogy milyen módszerrel mérték az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentrációt.*

Valóban nem adtam meg pontosan az alkalmazott módszer nevét, amiért elnézését kérem.

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

A PDF verzióban mindkét ábrán jelen van az X tengely jelölése. Sajnálom, hogy a nyomtatás során ezek elvesztek. Szintén sajnálom, hogy a szignifikancia jelölése hiányzik az ábrából, ezek az eredeti ábrán sem szerepeltek.

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

Elnézését kérem, hogy a koncentráció (500nM) csak a szövegben van megemlítve.

*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 „gyulladáshoz vezető mediátorok jelenlétében”.*

Egyetértek. Az “in vitro gyulladáshoz vezető modellben”, vagy ahogy a Tisztelt Bíráló javasolja, “gyulladáshoz vezető mediátorok jelenlétében” pontosabb megfogalmazás lett volna.

*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 hatásereőség.*

Amint említettem, egy sor számomra ismeretlen magyar kifejezést, nevet kellett használnom, amelyek közül egyesek fordítások. Ez valóban helytelen.

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

Elnézését kérem a hiányosságért, valóban meg kellett volna említeni, hogy a 8-Br-cAMP a PKA aktivátora.

*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).*

Elnézését kérem a hiányosságért. A szövegben, a 135. oldalon szerepelnek a koncentrációk. “Az ACR és COR sejtek elkülönülésének a megerősítésére, 30 µM anandamid és 500 nM kapszaicin adagolás közben mértük a kultúrmédiumban növesztett elsődleges érző idegsejtek intracelluláris calcium koncentrációját”.

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

Egyetértek, hogy legalább egy mondatot utalnom kellett volna a rimonabant hatására, elnézését kérem a hiányosságért.

*Az 5.9. pontban az RTX-előkezelés gátló hatás alapján a szerző arra következtet, hogy az anandamid a TRPV1 aktiválása révén fokozza a hólyagkontrakciókat*

*frekvenciáját. Azonban ő maga is említi a 152. oldalon, hogy az RTX a TRPV1-et expresszálo 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.*

A TRPV1 szerepére vonatkozó kritizált mondat: "Ezek az adatok azt mutatták, hogy egyetértésben az in vitro kísérletek adataival, az anandamid a TRPV1 aktiválása útján excitatórikus hatást vált ki a húgyhólyagban, ami a reflex összehúzódások frekvenciájának a növekedésében nyilvánul meg" a kapszazepinnel és RTX-el végzett kísérletek együttes eredményeire vonatkozik, így úgy gondolom, hogy helyes a következtetés.

Sajnálom, hogy az RTX koncentráció (10nM) csak az Anyagok és Módszerek fejezetbe került említésre.

Válaszaim a Tisztelt Bíráló kérdéseire:

*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 expresszálnak (pl. TRPM3, anoktamin 1). Mi erről a szerző véleménye?*

Míg a feltételezés első pontja, amely szerint valamennyi kapszaicinre érzékeny sejtnek egyben alacsony küszöbű hőérzékenységet is kell mutatnia érvényes, a második rész, ami szerint minden alacsony küszöbű hőérzékenyséű sejtnek egyben kapszaicinre is kell válaszolni, csak valóban akkor érvényes, ha feltételezzük, hogy a TRPV1 az egyetlen alacsony küszöbű hőérzékenységet mutató molekula. Ez a feltételezés ma már nyilvánvalóan nem helytálló, hiszen tudjuk, hogy más molekulák is mutatnak hőérzékenységet a TRPV1-hoz hasonló küszöbértékkel. A kísérlet idején azonban munkahipotézisként elfogadható volt a feltételezés második része is, hiszen akkor csak a TRPV1-ről és a "magas hőküszöbű" receptorról (TRPV2) tudtuk, hogy fájdalmas hőingerrel aktiválhatóak. A TRPV1 génhiányos egereken végzett mérések, ami szerint az "alacsony küszöbű hőérzékenység" megmarad, még nem voltak ismertek.

Ami az egycsatorna mérések eredményét illeti, mai tudásunk alapján a csak hőre válaszoló membránfoltokért valóban a TRPV1 hőküszöbe környékén válaszoló egyéb csatornák, mint a Tisztelt Bíráló által is említett TRPM3 vagy ANO1 vagy akár a TRPV4 is felelős lehet. Ezt valószínűsíti, hogy a kísérletnek ezen részében rutinszerűen nem határoztuk meg az aktiválási küszöböket. A mostani pandémiás időben ezek visszamenőleges meghatározása egy hallgató diplomamunkájának az alapját adhatja.

Míg a más hőérzékeny csatornák jelenlétét valószínűsíthetjük, a csak hőre érzékeny TRPV1 csatornák legalább részbeni felelősségét a hőválaszokért a csak hőre válaszoló membránfoltokban szintén nem vethetjük el, hiszem csak kapszaicinre válaszoló, tehát TRPV1-t nyilvánvalóan kifejező foltokat is találtunk a mintánkban. A közleményünk után a TRPV1 heteromerekről publikált adatok alapján úgy gondoljuk, hogy a hő és a kapszaicin válaszok egycsatorna szinten talált elválásáért a különböző heteromerek lehetnek a felelősek.

*2./ Hogyan magyarázható, hogy a TRPV1 Ca<sup>2+</sup>-permeabilitása kb. kétszer akkora kapszaicinnel történő aktiváláskor, mint hővel történő stimuláció során (70. oldal első bekezdés)?*

Sajnos, mi nem végeztünk olyan kísérleteket, amelyekkel megválaszolhatnám a kérdést. Azonban Caterina és munkatársai (Chung és munkatársai, 2008) kimutatták, hogy a TRPV1 biofizikai jellemzői, ellentétben a legtöbb ion csatorna hasonló jellemzőivel, nem statikusak. Specifikusan, a TRPV1 idő, aktivátor és koncentráció függő változást mutat a Ca<sup>2+</sup> permeabilitásában. Ennek oka a szerzők szerint, hogy a TRPV1 aktivátorok különböző fokban változtatják az ionszűrő szelektivitását, így a csatorna permeabilitását.

*3./ Az 5.15. ábrával kapcsolatban nincs említés arról, hogy a KCl milyen mechanizmussal növeli az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentrációt?*

Sajnálom, hogy a magas koncentrációjú KCl adagolás okát (a "maximálisan" elérhető intracelluláris kalcium koncentráció indukálása) illetve a mechanizmust (az idegsejt membrán nagymértékű kálium permeabilitása és a következményes kálium beáramlás okozta depolarizáció által aktivált feszültségfüggő kalcium csatornák aktiválása), nem említem. Ez a nem szakemberek számára valóban fontos lehet a kísérletek és az eredmények megértéséhez.

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

Végeztünk a Tisztelt Bíráló által hiányolt kísérletet is (Ahluwalia és munkatársai, 2003). Ezeket az adatokat azonban nem tudtam az Értekezésbe beépíteni, ugyanis az azokat leíró közleményünket, annak ellenére, hogy a leírt jelenségek valódiak, létezőek, más csoportok által közvetve megerősítettek, valamint a NAPE-PLD-nek az elsődleges érző idegsejtekben történő kifejeződése által alátámasztottak, vissza kellett vonnunk. Egy Akadémia Doktori Értekezés bírálatára adott válasz, illetve a nyilvános vita nem adhat fórumot a visszavonás okainak részletes ismertetésére. Ezért összegezve, csak annyit említenék, hogy a visszavonásra a University College London és az Imperial College London között, a közlemény első szerzőjére irányuló jogos vagy kevésbé jogos fegyelmi eljárás során kitört vita lezárásának elősegítése okán került sor.

Az említett kísérletben az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szint emelkedését egyrészt kapszaicinnel, másrészt magas koncentrációjú (50mM) KCl adagolással értük el. Az Értekezés 104. oldalán röviden ismertetett eredmény a két egyetem közötti vita közben részben megismételt kísérletekben született.

*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 anandamid szintézishez vezet) a CB1 receptor blokkolása csökkenti az endogén anandamid excitatórikus hatását, azzal magyarázza, hogy feltételezi a CB1 receptor konstitutív excitatórikus hatását a TRPV1-en. A G-proteinhez kapcsolt receptorokra jellemző konstitutív aktivitás lényege azonban az, hogy agonista hiányában mutatnak hatást. Konstitutív CB1 receptor aktivitásra akkor lehetne következtetni, ha anandamid hiányában csökkentené az inverz agonista rimonabant a TRPV1 aktivitását. A szerző által*

*vizsgált rendszerben azonban jelen volt az agonista, az endogén anandamid. Kérem a szerzőt, hogy adjon rövid összefoglalót minden olyan adatáról, amely a CB1-receptor konstitutív aktivációját támasztja alá.*

A CB1 receptor konstitutív aktivitása jól ismert, számos szerző kimutatta. Míg ezt a konstitutív hatást általában gátló jellegűnek tartják, Di Marzo és munkatársai (Hermann és munkatársai, 2003), valamint Fioravanti és munkatársai (2008) eredményei azt mutatták, hogy a TRPV1-on a hatás excitatórikus.

Ezekkel az eredményekkel megegyezően, mi is kimutattuk, hogy a rimonabant (200nM) szignifikánsan csökkenti a kapszaicinnel kiváltott válaszokat (ratiometrikus kalcium szint mérés, capsaicin/KCl control=  $0.78 \pm 0.02$ , rimonabant=  $0.61/0.018$ , Student's t -test,  $p < 0.0001$ , Varga és munkatársai (2014), Értekezés 132. oldal). 2016-ban kimutattuk továbbá, hogy ez a konstitutív excitatórikus hatás csak a sejtek egy részében figyelhető meg, hiszen a rimonabant csak az úgynevezett ACR (anandamid és kapszaicin érzékeny) neuronokban csökkenti a kapszaicinnel kiváltott válaszok amplitúdóját (Chen és munkatársai, 2016, Értekezés 5.63C ábra, 5.64C ábra, 5.65A-C ábra).

A Varga és munkatársai (2014) által közölt adataink, illetve egy későbbi, az Értekezésben nem szereplő, adatunk (Nerandzic és munkatársai, 2018) azt mutatja, hogy a 20:4 NAPE adagolása a kultúrmédiumban növesztett elsődleges érző idegsejtekben és a gerincvelőben is jelentősen, koncentráció- és hőmérsékletfüggő módon megemeli az anandamid koncentrációját. Így joggal feltételezhetjük, hogy a 20:4 NAPE-el kiváltott hatásoknak legalább egy részéért, ha nem is az egészért az endogén anandamid a felelős.

Számos kísérletünk eredménye mutatja, hogy a CB1 receptor aktiválása naiv körülmények között  $1\mu\text{M}$  alatti koncentrációjú exogén anandamiddal gátolja a TRPV1 aktivitását. Így joggal várhattuk, hogy a 20:4 NAPE adagolás hatására szintetizálódó endogén anandamidnak is hasonló hatása lesz.

A várakozással ellentétben azonban, az 20:4 NAPE adagolása excitációt váltott ki. Ez az excitáció már  $100\text{nM}$  20:4 NAPE koncentrációtól megfigyelhető a kobalt jelölés segítségével. Megállapítottuk, minden kétséget kizáróan, hogy ez a 20:4 NAPE indukált excitációt a TRPV1 aktivitása okozza. Kimutattuk továbbá, hogy a CB1 receptor inverz agonistája jelentősen csökkenti a 20:4 NAPE által indukált excitációt.

A fenti adatokat a következőképpen interpretálhatjuk:

1. A CB1 receptor konstitutív aktivitása excitatórikus/szenzitizáló hatású a TRPV1-on hiszen az inverz agonista jelentősen csökkenti a kapszaicinnel kiváltott válaszokat.
2. Ugyan nem vizsgáltuk, hogy a 20:4 NAPE adagolása hogyan hat a forskolin indukált cAMP szint növekedésére, úgy tűnik, hogy a 20:4 NAPE adagolásával feltehetően nem, vagy csak minimális CB1 receptor aktivitás indukálható. Ha ez a feltevés valóban igaz, akkor a CB1 receptor inverz agonista hatása a 20:4 NAPE által indukált excitációra megerősíti a CB1 receptor TRPV1-t szenzitizáló konstitutív aktivitását a kultúrmédiumban növesztett elsődleges érző idegsejtekben.

Egyetértek a Tisztelt Bíráló kritikai megjegyzésével. A kritizált mondatok ("Kimutattuk, hogy a 20:4 NAPE adagolás során a CB1 receptor blokkolása csökkenti az endogén anandamid excitatórikus hatását (Chen és munkatársai, 2016). Ennek az eredménynek a legvalószínűbb magyarázata, hogy a CB1 receptor konstitutív excitatórikus hatást fejt ki a TRPV1-on") valóban értelmezhetetlenek. Sajnálom, hogy az eredményt és a következtetést összekötő kapocs ("feltételezve, hogy a 20:4 NAPE adagolása nem okoz CB1 receptor aktivitást) nem kerültek a



szövegbe. Köszönöm a Tisztelt Bírálónak, hogy felhívta a figyelmemet a hiányosságra.

*6./ Az 5.64. ábra szerint a CB1 receptor hiánya csak kb. 40%-kal csökkentette az anandamiddel kiváltott Ca<sup>2+</sup>-tranzienst. Milyen receptor közvetítette a maradék 60%-os választ?*

Zygmunt és munkatársai (1999) munkájából ismert, hogy heterológ rendszerekben a TRPV1 önmagában képes válaszolni az anandamidra. A munkánk eredményei azt mutatják, hogy natív rendszerben a sejtek egy részében kifejeződő TRPV1 nem aktiválható anandamiddel (COR), míg a sejtek másik részében aktiválható (ACR). Eredményeink azt is mutatják, hogy a CB1 receptor konstitutív aktivitása megemeli a TRPV1 anandamiddel kiváltott válaszait. Ez a szenitizáló hatás vész el például a CB1 receptor inverz agonista jelenlétében, illetve a CB1 génjének a hiányában az ACR sejtekben. Arra vonatkozóan, hogy a CB1 receptor génjének törlése után a megmaradt anandamidra válaszoló TRPV1 milyen strukturális vagy egyéb különbségeket mutat az anandamidra nem válaszoló TRPV1-től, nincs adatunk. Azonban feltételezhető, hogy a CB1 receptor mellett egy másik metabotrop receptor is szerepet játszik a TRPV1 anandamid érzékenységének a szabályozásában. Az első kísérletek során érdekes lenne megnézni más anandamidra válaszoló receptorok, mint a GPR55, vagy más Gi/o-hoz kapcsolódó receptorok, mint a  $\mu$  opioid receptor szerepét.

*7./ A CB1-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 CB1-receptor mRNS-ének jelenléte nem feltétlenül jelenti funkcióképes receptor expresszióját. Emiatt megítélésem szerint a jelölt túl könnyen elvetette azt a lehetőséget, hogy funkcionális CB1-receptor tényleg csak az ACR neuronokban van (lásd 5.8.1.4. pont első bekezdése). Mi erről a szerző véleménye?*

Sajnálom, ha azt a látszatot keltettem, hogy a nem ACR sejtekben kifejeződő CB1 receptorok nem lennének funkcionálisak. Természetesen az mRNA jelenléte, ahogy a Tisztelt Bíráló is megjegyzi, nem jelenti feltétlenül a funkcionális CB1 receptor jelenlétét. Azonban nem gondolom, hogy csak az ACR sejtekben lenne a CB1 receptor funkcionális. Amit az adataink mutatnak, az az, hogy a CB1 receptor TRPV1-t szenitizáló hatása van jelen csak az ACR sejtekben.

*8./ Az in vitro kísérletekben a szerző a kapszazepint 5 vagy 10  $\mu$ M koncentrációban használta. Bár ezeknek a koncentrációknak a TRPV1-szelektivitását is megkérdőjelezték (Docherty et al., 1997), nagyon sok vizsgálatban használták/használják a 10  $\mu$ M kapszazepint a TRPV1 blokkolására. Ugyanakkor a húgyhólyaggal kapcsolatos további kísérletekben a szerző 50  $\mu$ M 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?*

Az endokannabinoidom-on végzett kísérleteink kezdetén a kapszazepin volt az egyetlen, akkor szelektívnek tartott TRPV1 antagonistá. Ugyan a TRPV1 klónozása, majd farmakológiai és biofizikai jellemzése után sorra jöttek a nagyobb hatáserőséggel rendelkező antagonisták, a munkánk nagy részében, az összehasonlíthatóság miatt is, maradtunk a kapszazepin használatánál. A 2010 évek közepén azonban meglepetten tapasztaltuk, hogy 10 $\mu$ M kapszazepin kalcium

tranzieneket indukál a kapszaicin érzékeny kultúrmédiumban növesztett elsődleges érző idegsejtek egy jelentős részében. Forráshiány miatt sajnos nem tudtuk a kísérleteinket folytatni. Azonban Peter Reeh és munkatársai (2016) leírták, hogy a Docherty és munkatársai (1997) által a feszültségfüggő kalcium csatornákon leírt, valamint a Behrendt és munkatársai (2004) által a TRPM8-en leírt hatáson kívül, a kapszazepin a TRPA1-n is hatást fejt ki, aktiválja, illetve gyorsan deszenzitizálja ezt a csatornát. Ezen adatok után már nem használtuk a kapszazepint. Az Értekezésben említett kapszazepinnel végzett kísérletek mind 2016 előttről származnak, amelyekben a kapszazepint a kapszaicin és anandamid TRPV1 által közvetített hatásainak a blokkolására használtuk. Ugyan az anandamid blokkol néhány feszültség függő kalcium csatornát, illetve a TRPM8-t, mivel az excitációs hatás blokkolására használtuk, a kapszazepinnek a nem TRPV1-on kifejtett hatásai nem teszik inkonzultívá az eredményeinket, illetve nem érvénytelenítik az eredményeink interpretációját.

Ami a húgyhólyagon végzett kísérleteinket illeti, ott mind  $10\mu\text{M}$  mind  $50\mu\text{M}$  kapszazepint is használtunk. A magasabb koncentrációt azért alkalmaztuk, mert az antagonistát a hólyag hashártyával borított felszínére cseppentettük, és úgy gondoltuk, hogy az a szövetnedvekben felhígulva esetleg nem jut megfelelő koncentrációban a hólyagot beidegző érző rostokhoz. A gyulladt hólyag összehúzódsági frekvenciáját a  $10\mu\text{M}$  és  $50\mu\text{M}$  kapszazepin ugyanolyan mértékben csökkentette. Így, nagyon kicsi a valószínűsége annak, hogy kapszazepinnek a feszültségfüggő kalcium csatornákon, a TRPM8-en vagy a TRPA1-n kifejtett hatása befolyásolta volna az eredményeinket. Legutóbbi munkánk (Charrua és munkatársai, 2020) eredményei alátámasztják ezt a feltételezést: az SB366791 csökkentette a magas dózisu URB937 által okozott hólyag hiperaktivitást. A magas dózisu URB937 a hólyag hiperaktivitás mellett jelentősen megemelte a hólyag anandamid tartalmát is.

*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 anandamid szint, amely a TRPV1 szenzibilizációjához/aktivációjához szükséges?*

Potenzieri és munkatársai (2009) kimutatták, hogy patkányban az anandamid intraplantáris injekciója a C-rostok koncentráció és TRPV1 függő excitációját, valamint az állatok nocifensív viselkedését váltja ki. McVey és munkatársai (2003) leírták, hogy az anandamid (és a 2-AG) a TRPV1 aktiválásán keresztül neurogén gyulladást vált ki a naiv vékonybélben. Saját (Dinis és munkatársai, 2004) adataink is azt mutatják, hogy az anandamid nem "manipulált" helyzetben koncentráció függően megemeli a húgyhólyag motoros aktivitását.

Ami a kérdés második részét illeti, saját, részben az Értekezésben is bemutatott munkáinkra hivatkozok először: Dinis és munkatársai, 2004, Charrua és munkatársai, 2020. Mindkét munkában kimutattuk, hogy a hólyag gyulladása olyan mértékben emeli meg a szövet anandamid tartalmát, ami elégséges a TRPV1 aktiválásához.

A gyulladás, legalább is a zsigerek gyulladása úgy tűnik együtt jár az anandamid szintézis emelkedésével, legalább is Want és munkatársai (2001) eredményei erre engednek következtetni, hiszen a szeptikus betegek plazmájában az anandamid szint jelentősen (4-szeresére) megnő. D'Agénio és munkatársai (2006) illetve Capasso és munkatársai (2014) a gyulladásos vastagbélben mutatták ki az anandamid szint emelkedését. Ugyanakkor dermatitisben és arthritisben nem találtak anandamid szint növekedést. Összességében, tehát igen, gyulladás során az anandamid szint elérhet olyan magas koncentrációt, amely képes aktiválni a TRPV1-t. Azonban ez az emelkedés a gyulladt szövet típusától függhet.

*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?*

A Tisztelt Bíráló által említett Sativex (Nabiximols) tetrahydrocannabinolt (THC) és cannabidiolt (CBD) tartalmaz. A THC egy sor receptoron és ion csatornán fejti ki a hatását: CB1 receptor, CB2 receptor, GPR55, GPR18, TRPA1, TRPM8, TRPV2. A CBD-nek hasonló célmolekulái vannak. Legjobb tudomásom szerint sem a THC sem a CBD közvetlenül nem aktiválja a TRPV1-t.

A Sativex egy szisztémásan alkalmazott készítmény, míg a TRPV1 tipikus előfordulása (legalábbis, ami a fájdalom létrejöttében fontosnak tartunk) a fájdalomérző elsődleges érző idegsejt. A TRPV1-t kifejező sejtek kifejezik a THC és a CBD majdnem összes célmolekuláit is, azonban azokat a fájdalom információk feldolgozásában résztvevő központi idegrendszeri struktúrák nagy része is kifejezi. Így a THC és CBD hatásainak sem a pontos helye, sem a pontos mechanizmusa nem ismert.

Természetesen, amíg sem a THC sem a CBD *per se* nem aktiválja a TRPV1-t, valamelyik a lebontásuk során keletkező termék képes lehet egy eddig nem ismert TRPV1-t aktiváló hatásra. Azonban a TRPV1 aktiválás nem jelenti, hogy ne lenne egy molekulának fájdalomcsökkentő hatása, hiszem a TRPV1-t aktiváló kapszaicin és resiniferatoxin (RTX) is csökkenti, megszünteti a fájdalmat, az RTX ráadásul ezt a kezdeti fájdalom okozása nélkül teszi. A közelmúltban publikált munkánkban (Goncalves Dos Santos és munkatársai, 2020) például kimutattuk, hogy a metamizol bomlásterméke, a 4-aminoantipyrin (4-AA) egy az anandamidhoz hasonló CB1 receptor – TRPV1 agonista, amelynek prosztaglandin E2 alkalmazása után jelentősen megnő a hatáserőssége a TRPV1-on. Azonban, ellentétben az anandamiddal, a 4-AA a kapszaicinhez és az RTX-hez hasonlóan gyorsan deszenzitizálja a TRPV1-t. A metamizol vagy a 4-AA *in vivo* nem okoz fájdalmi reakciót PGE2 adása után (vagy gyulladásos megbetegedésben), ami valószínűleg annak köszönhető, hogy a 4-AA az RTX-hez hasonlóan megátolja az inaktivált feszültségfüggő nátrium csatornák újra aktiválhatóvá válását.

Amint azt kimutattuk, az anandamid nem deszenzitizálja a TRPV1 (Sousa-Valente és munkatársai, 2014). Így "ideális" endogén agonistája a PKA és PKC által szenzitizálódott TRPV1-nak. A Sativex-ben található exogén kannabinoidoknak viszont úgy tűnik nincs "nem deszenzitizáló aktivitást kiváltó" hatással a TRPV1-on.

Tisztelettel,

Dr Nagy István

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'István' or a similar name, written in a cursive style.