

Dr. Nagy István

AZ ENDOVANILLOID ENDOCANNABINOID RENDSZEREK SZERPEPE AZ
ELSŐDLEGES FÁJDALOMÉRZŐ IDEGSEJTEK ÉRZÉKENYSÉGÉNEK ÉS
AKTIVITÁSÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN c.

MTA Doktori értekezésének bírálata

A fájdalomcsillapítás története bár egyidős az emberiség történetével, a tényleges fájdalomcsillapítás csak az utóbbi 200 évben valósult meg. A morfin ópiumból történő izolálása csak mintegy kétszáz évvel ezelőtt, az 1800 évek első negyedében sikerült. Sertürmer munkássága eredményeként az első fájdalom mentes műtétet éter narkózisban 1946-ban végezte John C. Warren, és az asprin előállítása is csak alig több mint 100 éves múltra tekint vissza (1899).

Alapvetően új mechanizmussal ható effektív és potens fájdalomcsillapító molekula kifejlesztése azóta sem történt. Sem az opioid, sem a nem opioid fájdalomcsillapítók, ill. nem-szteroid gyulladásgátlók vegyületszoportokban az évtizedek során előállított újabb származékok nem hoztak áttörést sem a hatékonyságban, sem a mellékhatás spektrumában. Ez indokoja, hogy az egész világon intenzív kutatások folynak új típusú, biztonságos fájdalomcsillapítók kifejlesztésére.

Magyarországon nagy hagyományai vannak a fájdalom mechanizmusára irányuló kutatásának és ennek alapján új célponton, új hatásmódú molekulák kifejlesztésének. Jancsó Miklós a capsaicin deszenzitizáló hatásának felfedezésével, mely jelensége a kémiai ingerekre korlátozódik, de nem befolyásolja a mechanikus irritációt, a fájdalom mechanizmusára irányuló kutatásnak új fejezetét nyitotta meg. Szolcsányi János és munkatársai folyatták és jelentős új felfedezésekkel gazdagították a capsaicin és a szenzoros idegek farmakológiájával a vanilloid ill. TRPV1 receptorok-mediált folyamatokkal kapcsolatos ismereteket.

Ezen kissé hosszúra sikerült történeti visszatekintést Nagy István Doktori munkája ihlette. A disszertáció ui. imponáló alapossággal, körültekintően, eredeti gondolatmenettel kapcsolódik az előbb említett kutatási irányzathoz, annak új irányt adva elemzi a TRPV1 molekulák fájdalomban, gyulladásban játszott szerepét és kiterjeszti az endocannabinoid rendszerrel való kapcsolatára. A disszertációban bemutatott eredmények impresszionálók, jelentős újdonság értékkel bírnak és az endovanilloid és endocannabinoid rendszer kapcsolatának feltárása új szemléletet hozott a primer szenzoros idegsejtek aktiválódásának és szenzitivitásának megértésében, feltárásában és esetleges új fájdalomcsillapító molekula kifejlesztésében.

A disszertáció terjedelme 199 oldal, amit követ a 38 oldal irodalmi hivatkozás, melyből 4 oldal a saját közlemények jegyzéke.

A disszertáció tartalmazza:

- az *Értekezés alapját képező* eredmények, tudományos felismerések fejezetet 3 oldalon,
- az *Összefoglalást* másfél oldalon,
- a *Bevezetést, Hipotézist és Célkitűzéseket* 49 oldalon,
- az *Eredményeket* 98 oldalon,
- az *Eredmények és azok megbeszélését* 26 oldalon,
- az *Anyagok és Módszerek és Statisztikai elemzés* fejezetet 8 oldalon.

A disszertáció 90 ábrát tartalmaz, 9 a Bevezetéshez, 81 pedig az Eredmények fejezethez tartozik. Emellett az 5. és 6. fejezet egy-egy táblázatot is tartalmaz.

A bevezetés négy fő téma köré csoportosul, az 1. Endovanilloid rendszer (capsaicin receptor, és az általa mediált hatások), az 2. Endo-cannabinoid rendszer (receptorai, aktivátorai), 3. Az endovanilloid és enedocannabinoid rendszer közös aktivátorai 4. Az elsődleges érző idegsejtek.

Az **Eredmények** kilenc kérdéskör köré csoportosulnak: 1. A TRPV1 kifejeződése a hátsógyöki idegsejteken, 2. A TRPV1 közvetített hatás az elsődleges idegsejteken, 3. A cannabinoid CB1 receptor kifejeződése a hátsógyöki idegsejteken, 4. A cannabinoid CB1 receptor és TRPV1 molekula együttes kifejeződése a hátsógyöki idegsejteken. 5. Az anandamid metabolizáló és szintetizáló enzim rendszerének kifejeződése elsődleges idegsejteken, 6. Anandamid szintézise patkány tápfolyadékban növesztett elsődleges érző idegsejteken, 7. Anandamid hatása a patkány tápfolyadékban növesztette elsődleges érző idegsejteken, 8. A CB1 receptor TRPV1-t szintetizáló hatása tápfolyadékban növesztette elsődleges érző idegsejteken, 9. Az anandamid CB1 receptor és a TRPV1 közvetített hatások szerepe patkány húgyhólyag összehúzódásban.

A fenti fejezeteknek számos alpontja van, melyek logikailag egymásra épülnek. Többször előfordult, hogy a bíráló, az egyik alfejezetet olvasva felírta az ehhez kapcsolódó kérdését, amely azonban a következő alfejezetnek már a címében olvasható volt.

A disszertáció alapját a 43 vezető nemzetközi folyóiratban publikált közlemény adja. Ezek közül a jelölt 12 esetben első és 24 esetben utolsó szerző.

Elmondható, hogy a dolgozat egy kiemelkedően gazdag, logikailag szigorúan felépített, igen körültekintően szervezett kísérleti anyagra épült. Így számos megalapozott következtetés vonható le az eredményekből, melyeket a szerző 24 pontban foglalt össze. Ez is tükrözi a kísérletes munka gazdagságát és eredményességét.

Formai észrevételek:

- A disszertáció magyar nyelven készült, jól olvasható stílusban, betűhibák, elütések elvétele fordulnak elő (pl. 122. oldal ábraszöveg: prosztataglandin; ábra feletti sor: kapszaicinnel). Tagolása, jól követhető, a fejezetek, alfejezetek és azok további osztása decimális számozással került felosztásra, ami a nagyszámú kísérleti adatok leírásánál segíti az összefüggések követését.

- Szokatlan és dicsérendő, hogy az angol nyelvű szakkifejezéseket azok magyar nyelvű megfelelőjével, lefordításával igyekeznek a jelölt minél több alkalommal helyettesíteni. Jellemző az angol nyelvű terminológia igen elterjedt használatára, hogy időnként át kellett gondolni, hogy egy adott magyar kifejezés mely megszokott angol terminológiát jelent.

Az ábrák közül két esetben (5.11, 5.47) csak az ábraszöveg olvasható, de a hozzátartozó ábra hiányzik. Néhány ábránál az X tengelyen feltüntetett mérési paraméterek (pl. koncentrációk) igen nehezen olvashatóak.

- Igen hasznos lett volna egy rövidítés lista, ui. a dolgozatban nagy számban fordulnak elő rövidítések, és a kevésbé ismertek esetében ismételtten vissza kell keresni a rövidítés jelentésére.

- Az Anyagok és Módszerek fejezetben célszerű lett volna az alkalmazott vegyületek felsorolása, különösen azokat, melyek a endovanilloid ill. endocannabinoid rendszer funkcionális elemzésére irányultak.

Tartalmi értékelés, észrevételek

- A kutató munka nagyobbik része az endocannabinoid és endovanilloid rendszer kölcsönhatását vizsgálja. A tradicionális szemlélet szerint a két rendszer egymással ellentétes hatást fejt ki: az endocannabinoidok, elsősorban CB1 receptoron keresztül, a fájdalom csökkentésében, míg az endovanilloid rendszer a TRPV1 receptorok aktiválásán át a fájdalomérzet mediálásában játszik szerepet. A jelölt kutatómunkájának kiinduló pontja, hogy mindkét receptor megtalálható a primer szenzoros neuronokon, és az endogén cannabinoid, az anandamid a CB1 receptor mellett kötődik a TRPV1 receptorokhoz is, és azok aktiválása révén excitatórikus hatást fejt ki.

- A dolgozat másik része az endocannabinoid-endovanilloid rendszer húgyhólyag gyulladását kísérő fájdalomra és motoros hiperaktivitásra gyakorolt hatását elemzi.

A dolgozat számos eredményei közül az alábbiakat emelném ki:

1. Az endocannabinoid és endovanilloid rendszerhez tartozó molekulák kifejeződése az elsődleges intact, szenzoros neuronokon, és a tápfolyadékban bár számottevően nem különbözik egymástól, de nem azonos. A kobalt, kalcium áramlás és CGRP felszabadulás megbízhatóan jellemzi a capsaicinre adott választ.
2. Mind a TRPV1, mind a CB1 receptorok jellegzetes kifejeződést mutatnak az elsődleges idegrostokon a patkány húgyhólyagban, így az alkalmas a az endocannabinoid és endovanilloid rendszerek elsődleges idegsejteken kifejtett hatásának vizsgálatára.
3. Az anandamidnak mind a szintetizáló (kalcium függő, független), mind a bontó enzime kifejeződik az elsődleges érző neuronokon, és mindkét enzim jelentős együttes kifejeződést mutat a TRPV1-el. Következésképp az elsődleges érző neuronokon anandamid szintézis megfigyelhető.
4. Az exogén anandamidnak kettős hatása figyelhető meg, 1 μ M koncentrációban gátló (CB1-mediált), 1 μ m felett excitatórikus (TRPV1-mediált) hatású; a CB1-mediált (1 μ m) hatás gátolja a TRPV1-mediált excitatórikus hatást.

5. A gyulladáshoz vezető mediátorok növelik az anandamid TRPV1-mediált excitatorikus hatását, és csökkentik a CB1-mediált gátló hatást a TRPV1 excitatorikus hatástára.
6. Mind a FAAH gátlása, mind az anandamid szintézis prekuzorja az anandamid szint növelése révén fokozza a TRPV1 excitatorikus hatását elsődleges érző neuronokon.
7. Az anandamid CB1 receptor közvetítésével szintetizálja a TRPV1-t az anandamid és capsaicin érzékeny idegsejteken (ACR).
8. Igazolást nyert, hogy a CB1 receptor és TRPV1 molekula közt fehérje-fehérje kölcsönhatás áll fenn az elsődleges érző idegsejteken.
9. A húgyhólyag motoros aktivitását az anandamid TRPV1-mediált úton befolyásolja és megemeli a c-fos aktivitást a gerincvelőben.
10. Gyulladásban a húgyhólyag megnövekedett anandamid szintje, valamint az anandamid szintjének farmakológiai növelése (FAAH gátlással) fokozza a hólyag összehúzódásának gyakoriságát.
11. A fájdalmat okozó, magas hő hatásnak érzékelésében, legalább 2 molekula vesz részt a alacsony hőküszöbű TRPV1 és a magas hőküszöbű TRPV2.

Az fenti eredmények alapján számos új következtetés vonható le.

Ezek közül legfontosabb új megállapításoknak az alábbiakat tartom:

1. Az exogen anandamid a kultúrmédiumban koncentrációtól függően vagy CB1-mediált gátló (1 μ m) vagy TRPV1-közvetített (1 μ m felett) excitatorikus hatást fejt ki. Gyulladáshoz vezető mediátorok, valamint az endogén anandamid magasabb szintje, mely pl. gyulladáshoz vezet, fokozza az anandamid TRPV1 excitatorikus hatását, melyhez hozzájárul a CB1 receptor mediált gátló hatás csökkenése. Hozzájárul a hatáshoz továbbá, hogy az anandamid CB1 receptoron keresztül szintetizálja a TRPV1-t. Az endogén anandamid tehát az elsődleges érző idegsejteken csak TRPV1-mediált serkentő hatást indukál.
2. Igazolást nyert, hogy a CB1 receptor és TRPV1 molekula közt fehérje-fehérje kapcsolat áll fenn az elsődleges érző idegsejteken. Valószínűsíthető tehát, hogy az elsődleges idegsejteken egy autokrin endocannabinoid-endovanilloid rendszer alapvető szerepet játszik a gyulladás folyamán kialakuló fájdalomban.
3. A húgyhólyagban az anandamid, mely a gyulladás során képződik, TRPV1-mediált úton hozzájárul a hólyag motoros aktivitásához és a gyulladást kísérő fájdalom kialakulásához.

Tartalmi észrevételek, kérdések:

Előrebocsátanám, hogy az alábbi kérdések nem a dolgozat hiányosságaira vonatkoznak, hanem épp a dolgozatban bemutatott elegáns kísérlet-sorozatok, az új, eredeti megfigyelések, és az eredmények izgalmas volta indukálta a további felvetéseket, gondolatokat.

1. Az anandamid parciális agonista a CB1 receptoron. Van-e jelentősége az anandamid primer szenzoros idegeken kifejtett hatásában, hogy nem teljes (full)

agonista, hanem parciális? A TRPV1 receptoron parciális vagy teljes agonistaként viselkedik?

2. Az anandamid metabolizmusban a FAAH mellett, a COX2 enzim is részt vesz. Kifejeződik-e COX-2 az elsődleges érző neuronokban és a COX-2 által képződött metabolitok, a prostaglandin ethanolamidok játszanak-e szerepet az anandamid- okozta hatásban a primer szenzoros neuronokon? Továbbá kérdés, hogy a FAAH gátlás következtében megnőtt mennyiségű anandamidból a COX2-hatására feltehetőleg ugyancsak nagyobb mennyiségben képződő prostaglandin ethanolamidok hogyan befolyásolják a fájdalomérzést?

3. Másrészt a FAAH hatására az anandamidból arachidonsav képződik, mely szubsztrátja a COX-1-nek és COX-2-nek és a lipo-oxygenáz enzimnek is, melyek végtermékei gyulladáshoz vezető mediátorok. Játssza-e ez a mechanizmus szerepet az anandamid TRPV1 aktivációt befolyásoló hatásában?

4. A másik fontos endocannabinoid, a 2-arachidonoylglycerol (2-AG), a CB1 és CB2 receptorok teljes agonistája. Belőle a COX-2 hatására a prostaglandin glicerol észterek képződnek. Van-e szerepe a primer szenzoros neuronokban a fájdalomérzésben a 2AG-nek ill. metabolitjának ?

5. Opioid mu, delta receptorok szintén megtalálhatók a primer afferens neuronokon. Ismeretes-e kölcsönhatás az opioid, cannabinoid és TRPV1 receptorok között a primer szenzoros neuronokon?

6. Az eredmények alapján új terápiás célpontként vetődött fel, az anandamid szintézis csökkentése ill. a CB1 receptor TRPV1-re gyakorolt szintetizáló hatásának gátlása. Azonban az endocannabinoidok szintézisének csökkentése egyéb központi idegrendszeri régiókban számos mellékhatást indukálhat. Másrészt, hogyan valósítható meg a CB1 receptor TRPV1 szintézisét fokozó hatásának szelektív gátlása?

Összefoglalva, Nagy István doktori értekezésének témája a farmakológiai kutatás egyik igen fontos, de meg nem megoldott területét érint; új hatásmódú fájdalomcsillapító kifejlesztéséhez szükséges célpont, mechanizmus meghatározása. Ennek kapcsán vizsgálta primer szenzoros neuronokban az endocannabinoid és endovanilloid rendszer nociceptív mechanizmusban betöltött szerepét. Eredményeiből jelentős, új következtetések vonhatók le, melyek lehetőséget nyújtanak új gyógyszer-célpontok kifejlesztésére. A dolgozat alapját 43 nemzetközi folyóiratban publikált cikk képezi, melyek közül 36 esetben Nagy István az első vagy utolsó szerző. Ez egyértelműen jelzi a dolgozat eredményeinek megalapozottságát, nemzetközi megmérettetését és elfogadását.

Melegen támogatom a dolgozat nyilvános vitára bocsátását és (sikeres védelem esetén) az MTA Doktora cím elnyerését.

Budapest, 2020. március 10.

Dr. Gyires Klára egyetemi tanár
az MTA Doktora