

Válasz Dr Klebovich Imre egyetemi tanár bírálatára

Válaszomban a bírálatból idézett szöveget dőlt betűvel jelöltem. A dolgozatomból idézett szöveget idézőjelek közé tettem.

Köszönöm, Klebovich professzornak hogy értekezésemet átnézte, és az értekezés erőnyeit és hibáit részletesen elemezte.

Válaszaimat feltüntettem a bírálatban megjelölt hibát / feltett kérdést.

Válaszok a hibákkal kapcsolatos megjegyzésekre:

Sajnálatos, hogy nincs megadva az internetes hivatkozások évszáma és id_adatai a disszertáció 141. oldalán és a tézisek 26. oldalán.

Ez valóban fontos észrevétel, pontatlanul idéztünk.

Az értekezés igen demonstratív része, hogy számos rövidítést mutat be. Sajnálatos, hogy a Rövidítés jegyzékből kimaradt több fontos fogalom, amely rontja a nyomon követhetőséget (123., 124. oldal).

Valóban, legalább két rövidítés kimaradt a Rövidítés Jegyzékből. A nagy áteresztőképességnek megfelelő high throughput rövidítése a „HT”. Szintén nem található a Rövidítés Jegyzékben a humán agyi endotélből készített sejt vonal, a „hCMEC/D3” teljes neve. A sejt vonalat leíró közleményben (Weksler és mtsai 2005 FASEB J 19:1872) sem szerepel a teljes név, csak annyi, hogy így nevezték el az immortalizált sejt vonalat.

A 132. oldalon a 6. pontnak nincs előzménye.

Ez egy szerkesztési hiányosság. Az eredeti terv szerint önálló, a 8. fejezet szándékozott lenni.

Talált betűhibák: 6., 49., 63., 78. oldal, 10. táblázat.

Elismerem, és csak remélni merem, hogy nem volt köztük értelemzavaró.

A 2.6.1.1. bekezdésben a membrán vezikula alapú vizsgálatokban, csak az kerül leírásra, hogy az emlős sejtek sokszor nem rendelkeznek elegendően magas expresszióval, de nincs leírva, hogy akkor mi használható.

Ez a megjegyzés az ATPáz esszében használt membránokra vonatkozik. Az ATPáz esszéhez elsősorban bakulovírus-sal fertőzött rovarsejt membránok alkalmazhatók. Csak kivételesen vannak olyan szelektált sejt vonalak is, amik ATPáz esszéhez elegendően magas expresszióval rendelkeznek.

A 29. ábra aláírásából hiányzik a calcein tesztre való utalás.

Valóban, míg a 29A és 29B ábrák ATPáz eredmények, addig a 29C és 29D ábrák calcein esszéből származó adatok.

A glikokenodeoxikolát (GCDC) intrinszik klírensz (77. oldal, 11. táblázat) egyik transzporter esetében sem változott koleszterinnel való töltés hatására. Ezért nem lehet kijelenteni, hogy a vizsgált szubsztrátokra az intrinszik klírensz emelkedett a koleszterin töltés hatására.

Az intrinszik klírensz a $V_{\max}/K_m$ hányados, fontos ADME/farmakokinetika paraméter, a katalitikus hatékonyság jellemzésére is használják. A glikokenodeoxikolát (GCDC) szubsztrát esetében –szemben a többi vizsgált szubsztráttal– a K_m értékek koleszterin feltöltés hatására történő, a $V_{\max}$ -al párhuzamos emelkedését és ennek következtében az intrinszik klírensz változatlanóságát a dolgozat alapjául szolgáló közlemény (Kis és mtsai 2009 Drug Metab Disp 37:1878) 1884. oldalán megemlítettük mint kivételt. Felületesség illetve az a tény, hogy ABCG2-re is a K_m érték változatlanósága mellett a $V_{\max}$ értékek, következésképp az intrinszik klírensz membrán koleszterin tartalom növelés hatására történő emelkedését állapítottuk meg (Pál és mtsai 2007 JPET 321:1085) hozzájárulhatott ahhoz, hogy a disszertációból ez kimaradt. Mindenesetre, ABCB11 mediált taurokolát (TC) transzportra a következtetést (változatlan K_m és emelkedett $V_{\max}$) Guyot és mtsai (2014 Mol Pharmacol 85:909) egy egészen a közelmúltban közölt cikkükben megerősítették. A GCDC-re megfigyelt adat ugyanakkor helytálló, hiszen mindhárom fajból származó transzporter esetében megfigyeltük.

Válasz a kérdésekre:

A ciklosporin A (CS) IC_{50} értékében mért gátlás különbség az ABCB11/CTRL esetén $2 \mu M$ és az ABCB11-HAM membrán esetében $18,9 \mu M$, amely közel tízszeres értéket mutat (12. táblázat, 78. oldal). Mivel magyarázható ez a kiugró érték?

Az ABCB11-re röviden leírt homológia modell és a gátlószerek fizikokémiai paramétereit domináló lipofilicitás alapján feltételezik, hogy az ABCB1-hez hasonlóan az ABCB11 esetében is a transzporter kötőhelyhez való kötődést megelőzi a membránba történő inzerció / átoldódás / megoszlás (Warner és mtsai 2012 Drug Metab Dispos 40:2332). Az analógia megnöveli a lényegesen többet vizsgált ABCB1-re érvényes adatok relevanciáját. Az ABCB1 esetében a koleszterin részben csökkenti a legtöbb vizsgált vegyület membránba történő inzercióját (Eckford és mtsai 2008 Biochemistry 47:13686), részben a transzporter modulátor helyéhez kötődve –molekulasúlytól függő módon– növeli a transzporter affinitását a gyógyszerhez ami csökkenő K_m értékben nyilvánult meg az adott vizsgálatban (Kimura és mtsai 2007 Biochem J 401:597). Utóbbi hatás az ABCB1 esetében <500-as móltömegű anyagok esetében figyelhető meg. A feltételezés az, hogy nagyobb móltömegű anyagok esetében a sztérikus gátlás akadályozza a szimultán kötődést (Kimura és mtsai 2007 Cancer Sci 98:1303

A CsA-ról leírták, hogy a membrán koleszterin jelentős mértékben csökkenti a membrán asszociált CsA mennyiségét (Quayang és mtsai 1995 Transplantation 60:999; Söderlund és mtsai 1999 Mol Pharmacol 55:32). Molekulatömege 1202, tehát valószínűleg nem érvényesül a koleszterin potencírozó hatása az affinitásra, így az eredő hatás egy megnövekedett IC_{50} .

A kérdést továbbgondolva felvetődik, hogy miért nem látunk ilyen szintű IC_{50} növekedést a kísérletsorozatban szereplő további nagy molekulatömegű anyagok, mint a vinblastin, rifampicin és elsősorban a valinomycin esetében. A listából két anyag, a vinblastin és a valinomycin szerepel egy a korábbi Kimura és mtsai által jegyzett tanulmányban (2007 Biochem J 401:597), és ott sem láttak koleszterinfüggő csökkenést az ABCB1 ATPáz K_m értékében. Sőt, a valinomycin K_m -re a legmagasabb koleszterin tartalomnál egy 40%-os K_m növekedést találtak, ami megfelel az általunk mért IC_{50} növekedésnek. Abban a tanulmányban ugyan ATPáz aktiválást és nem gátlást vizsgáltak, azonban saját nem közölt eredményeinkből tudjuk, hogy ABCB1 ATPáz aktivátorok esetében elfogadható korreláció van az EC_{50} és az VT IC_{50} értékek között. Abban a tanulmányban nem szerepelt a CsA, és egy másik, bár B családbeli transzporterről volt szó, így az analógia nem teljes.

Van-e in vivo igazolása annak, hogy a seliciclib agyi expozícióját az ABCB1 fehérje limitálja?

Kezdeti eredményeink vannak. Agyi mikrodialízis módszert alkalmazva a szabad agyi és szabad plazma szint aránya a specifikus inhibitor a PSC833 alkalmazásának hatására 2-3-szorosára emelkedik.

Ismét megköszönöm Klebovich professzornak az alapos munkát és a méltató szavakat valamint az ajánlást, amivel pályázatomat támogatta.

Budaörs, 2014. augusztus 8.

Tisztelettel,

Krajcsi Péter