

## Válasz Prof. Dr. Póka Róbert egyetemi tanár MTA Doktori Értekezésemre adott opponensi véleményére

Szeretném hálás köszönetemet kifejezni Póka Róbert professzor úrnak, hogy értekezésemet alaposan áttanulmányozta és részletesen elbírálta. Hálásan köszönöm valamennyi, lényegre törő, helyenként a hiányosságokra is rámutató észrevételét és kérdését, melyekre az alábbiakban szeretnék reagálni, illetve válaszolni.

### Kritikai kiegészítő megjegyzések

A Célkitűzések, valamint az Eredmények közötti tagolásban némi eltérés valóban fellelhető, és elismerem, hogy a Célkitűzésekben jó lett volna további szempontokat megadnom annak ellenére, hogy a peptid természetű anyagok vizsgálati célkitűzése lényegében lefedi a nociceptin, nocistatin és az adipokinek vizsgálatát, amelyben az obezitásos vizsgálatok is szerepeltek. Ugyanakkor ez a Célkitűzések elolvasásakor nem látszik egyértelműen, ezért elnézést kérek.

Az  $\alpha_1$ -altípus szelektív adrenerg receptor antagonisták vizsgálata esetén az egyik legfontosabb kérdés az volt, hogy a női nemi hormonok hogyan változtatják meg expressziójukat és funkciójukat az uterusban a patkány vemhessége során, hiszen korábban erre nem álltak rendelkezésre kísérletes adatok. A  $\beta_2$ -adrenerg receptorok kapcsán ilyen összefüggések korábban már ismeretek voltak [1], illetve a PhD disszertációmban már igazoltuk a progeszteron szerepét [2], ami értelemszerűen nem képezhette az akadémiai doktori értekezés érdemi anyagát. Az értekezésbe nem került bele, de megvizsgáltuk a progeszteron és a nifedipin kombinációjának hatásosságát is, de azt találtuk, hogy a progeszteron előkezelés rontja a nifedipin uterus relaxáló hatását, ami feltehetően kalcium csatornák kevésbé aktív izoformájának expressziójával magyarázható [3]. Jogos felvetés, hogy más farmakonok esetében miért nem vizsgáltuk a női nemi hormonok hatását. Ennek egyik oka az, hogy a legtöbb vizsgált célpont esetén a vemhesség előrehaladtával történő fiziológias receptor változásokat vizsgáltuk, és számos esetben nem jutott idő a nemi hormon hatások tisztázására. Ugyanakkor egyetértek azzal, hogy ezeket is szükséges megvizsgálni, amit a jövőbeni kísérleteink tárgyává tudunk tenni.

Az  $\alpha_{1B}$ -adrenerg receptor antagonisták vizsgálata azért maradt ki, mert saját méréseinkben igazoltuk, hogy a patkány vemhes uterusban az  $\alpha_{1B}$ -adrenerg receptorok nem mutathatók ki [4], így további vizsgálatoknak nem láttuk értelmét.

Egyetértek azzal, hogy a kutatási eredmények rövid ismételése az adott alfejezetekben hasznos lett volna, de mivel szerettem volna elkerülni a redundanciát, ezért nem tettem meg. Ugyanakkor belátom, hogy az ismételésekkel lényegesen könnyebbé tehettem volna a megértést, ezért ennek elmaradásáért elnézést kérek.

A Bevezetésben említett antibiotikumok és probiotikumok kapcsán valóban nem történtek vizsgálatok, ezen a területen nem végeztünk még méréseket. Azzal a szándékkal foglaltam bele a Bevezetésbe ezt részt, hogy minél teljesebb képet vázolhassak a tokolitikus terápia jelenlegi

helyzetéről és perspektíváiról. Elnézést kérek, ha ez félrevezető várakozásokat ébresztett az olvasás során.

Az 5.4.4. alfejezetet ért kritikai megjegyzésre a következő választ tudom adni: A 98. oldal egy bevezetés az obezitásos vizsgálatokhoz, melynek utolsó bekezdése egy rövid összefoglalása az elvégzett kísérletekről. A 99. oldalon az 5.4.4.1 alfejezetben további részletek vannak megemlítve kezdésként a vizsgálatról, illetve zárójelben ott szerepel, hogy a 4.13.4.1. alfejezetben elolvasható a részletes kísérleti protokoll, ami sajnos téves, mert a 4.15.4.1. fejezet tartalmazza a leírást. A hibát valószínűleg az okozta, hogy az értekezés készítése közben még bővült a Módszerek rész, de itt az Eredményeknél nem javítottam a megváltozott számozást. A kísérleteket szemléltető grafikus ábrák a 72-80. ábrák a 99-107. oldalak között, melyek közül a 80. ábra C része tartalmazza a kísérleti állatok plazmájában mért gyulladásos és gyulladáscsökkentő citokinek plazmaszintjét, így megítélésem szerint a hiányolt részek az értekezés részét képezik. Ugyanakkor szeretnék elnézést kérni, hogy egy félrevezető alfejezet hivatkozással zavart okoztam a megértésben.

### **Tartalmi kérdések a doktori művel kapcsolatban**

- 1. A jelöl saját vizsgálatait vagy irodalmi ismeretei alapján alkalmasnak tartja-e a TNF $\alpha$  ligand vagy receptor ellenes biológiai terápiát a gyulladásos eredetű korai méhizom-aktivitás kezelésére?*

Mivel klinikai bizonyíték áll rendelkezésre, hogy terhességben a gyulladásos folyamatok miatt megemelkedett TNF $\alpha$  plazmaszint jelentősen emeli a koraszülés kockázatát [5], valamint sikeres tokolízis esetén a szintje csökken [6], így a TNF $\alpha$  gátlás racionális terápia célnak tűnik. Saját kísérleteinkben a TNF $\alpha$  gátlás önálló következményeit nem vizsgáltuk, azt viszont igazoltuk, hogy a TNF $\alpha$  gátlása a terbutalin hatékonyságát egyértelműen csökkenti az LPS indukálta gyulladásos állapotban, így zavarhatja a  $\beta_2$ -adrenerg agonista tokolitikus hatását [7]. Autoimmun kórképekben a TNF $\alpha$  gátló monoklonális antitest infliximab terhesség alatti alkalmazása lehetségesnek tűnik, az első trimeszterben nem jut át a placentán, később is csak alacsony kockázatot jelent, ami elsősorban születés után az újszülött fokozott infekcióveszélyét jelenti [8]. Hasonló kockázatot észleltek psoriasisban szenvedő várandósok TNF $\alpha$  gátló kezelése során [9]. Ugyanakkor egy észak-európai vizsgálat alapján elősorban a biológiai TNF $\alpha$  gátló kezelés, azaz az antitest terápia, terhesség alatt fokozhatja koraszülést, a császármetszés és kisebb születési súly kockázatát [10]. Ezek az adatok természetesen nem tokolitikus terápia révén születtek, hanem a terhesség alatt fellépő autoimmun betegségek kezelése során, de egyértelműen óvatosságra intenek a TNF $\alpha$  gátló kezelés kapcsán. Érdekes problémát vet fel az immun hátterű gyulladásos betegségek és a koraszülés kapcsolata. Megfigyelték, hogy colitis ulcerosa-ban és Crohn-betegségben szenvedő várandósok esetén gyakori a koraszülés, ami feltételezhetően összefügg az abdominális gyulladásos folyamatokkal. A rendelkezésre álló adatok alapján a gyulladásos bélbetegségek TNF $\alpha$  gátló terápiaja terhesség alatt fokozza a koraszülés valószínűségét [11], ami azt sugallja, hogy ezek a szerek nem alkalmasak tokolízisre. Feltehetően a TNF $\alpha$  szint emelkedés csak egy komponens a koraszüléshez vezető komplex folyamatban és szelektív gátlása -eddig fel nem tárt okok miatt- inkább ront a fenyegető koraszülésen, mintsem segít.

2. *A jelölt szerint mi lehet a magyarázata annak, hogy a drotaverin -placebo kontrollós humán vizsgálatokkal bizonyítottan – terminusban rövidíti a szülés tágulási szakát, s ezáltal gyorsítja a szülést? Mi lehet az in vitro uterusrelaxáló hatás és az in vivo szülésgyorsító hatás közötti ellentmondás magyarázata?*

A drotaverin simaizom relaxáló hatásában elsősorban a foszfodiészteráz gátlás játsza a főszerepet, a később feltárt  $Ca^{2+}$ -csatorna gátló hatás önmagában nem rendkívüli, hiszen az ópiumban megtalálható papaverin, mely a félszintetikus drotaverin természetes alapvegyülete, mindkét mechanizmussal képes gátolni a simaizom kontrakciókat [12]. A drotaverin említett placebo kontrollós vizsgálata során azt is leírták, hogy a szülést gyorsító hatásában szerepet játszik a cervix dilatáló effektusa, valamint nem volt hatása az uterusz kontrakciókra [13]. A drotaverin  $Ca^{2+}$ -csatorna gátló hatását feltáró közleményben tengerimalac bronchus preparátumon a vegyület igen mérsékelt relaxáló hatást mutatott (30-40%) meglehetősen magas koncentrációban [14]. Ezek az adatok is azt sugallják, hogy a drotaverin simaizomgörcsoldó hatása, legalábbis a vizcerális szervekben nem túl erős. Ezt egyébként alátámasztja a klinikai tapasztalat is, mely szerint a drotaverin erős, pl. vesekő okozta vagy epeúti görcsök esetén csakis kombinációban tud kifejteni terápiásan megfelelő hatást. Mindehhez hozzájárul, hogy a légúti simaizomzat és a terhes méhizomzat farmakológiai befolyásolhatóságában és jelátviteli útjaiban lehetnek eltérések, ahogyan azt saját kutatásunkban is igazoltuk [15]. A szülést gyorsító hatása valószínűleg azzal magyarázható, hogy amikor a cervix érési folyamata előrehaladott, a cervix kollagéntartalma jelentős csökken a mátrix metalloproteinázok aktivitás fokozódása révén [16]. A drotaverin foszfodiészteráz gátló hatása kapcsán relaxálja a cervix simaizomzatát a szöveti cAMP és cGMP szint növelésével és ezzel meggyorsítja a szülést [17]. Ez olyannyira jól működik, hogy egy 2023-ban megjelent klinikai tanulmány kifejezetten ajánlja a drotaverint a szülés meggyorsítására, mivel fokozza a cervix tágulását és nem befolyásolja a miometriális kontrakciókat [18].

3. *A  $\beta_2$ -AR agonisták és a  $Ca^{++}$ -csatorna blokkolókat egyidejűleg alkalmazva a  $\beta_2$ -AR agonisták toxicitása fokozódik. A két támadáspont együttes alkalmazásának az értekezésben bizonyított szinergikus hatása a  $\beta_2$ -AR agonista terbutalin kontrakciógátló hatásának maximumát növelte és  $EC_{50}$  értékét is csökkentette. Jelentheti-e ez az eredmény azt, hogy a két különböző másodlagos jelátviteli útvonal már az útvonalak végállomását jelentő miozin könnyűlánc foszforiláció előtt kapcsolatot tart fenn egymással?*

Ismert, hogy a  $\beta_2$ -adrenerg receptor stimulációja aktiválja a  $G_s$ -fehérjéket, ami növeli az intracelluláris cAMP-szintet. A cAMP viszont foszforilálja az izomtónus szabályozásában részt vevő fehérjéket, gátolja a  $Ca^{2+}$  felszabadulását az intracelluláris raktárakból és csökkenti a  $Ca^{2+}$  bejutását a sejtekbe [19]. Ezt a hatást erősíti a  $Ca^{2+}$ -csatorna gátlása, amely elsősorban a sejtmembránban inaktiválja a csatornákat és megakadályozza az extracelluláris  $Ca^{2+}$  belépését, ezzel potenciózva a  $\beta_2$ -adrenerg receptor agonisták relaxáló hatását. Az intracellulárisan megnövekedett cAMP aktiválja a protein kináz A-t, amelyről feltételezik, hogy gátolja a  $Ca^{2+}$  csatornákon keresztüli szignáltranszdukciót [20], és ez alapján elképzelhető, hogy a miozin könnyűlánc foszforiláció előtt is van már kooperáció a két mechanizmus között.

Még egyszer tisztelettel és hálásan köszönöm Póka Róbert professzor úrnak az értekezésem bírálatát, támogató javaslatát és elgondolkodtató, fontos részletekre rámutató kérdéseit.

Tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Szeged, 2025. február 14.



Dr. Gáspár Róbert PhD

egyetemi tanár

## Irodalomjegyzék

- [1] J.M. Roberts, P.A. Insel, R.D. Goldfien, A. Goldfien, Identification of Beta-Adrenergic Binding Sites in Rabbit Myometrium, *Endocr* 101 (1977). <https://doi.org/10.1210/endo-101-6-1839>.
- [2] R. Gáspár, E. Ducza, A. Mihályi, Á. Márki, Z. Kolarovszki-Sipiczki, E. Páldy, S. Benyhe, A. Borsodi, I. Földesi, G. Falkay, Pregnancy-induced decrease in the relaxant effect of terbutaline in the late-pregnant rat myometrium: Role of G-protein activation and progesterone, *Reprod* 130 (2005). <https://doi.org/10.1530/rep.1.00490>.
- [3] J. Hajagos-Tóth, G. Falkay, R. Gáspár, Modification of the effect of nifedipine in the pregnant rat myometrium: The influence of progesterone and terbutaline, *Life Sci* 85 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.08.008>.
- [4] E. Ducza, R. Gáspár, G. Falkay, Altered levels of mRNA expression and pharmacological reactivity of  $\alpha$ 1-adrenergic receptor subtypes in the late-pregnant rat myometrium, *Mol Reprod Dev* 62 (2002). <https://doi.org/10.1002/mrd.10148>.
- [5] K. Romanowska-Próchnicka, A. Felis-Giemza, M. Olesińska, P. Wojdasiewicz, A. Paradowska-Gorycka, D. Szukiewicz. The role of TNF- $\alpha$  and anti-TNF- $\alpha$  agents during preconception, pregnancy, and breastfeeding, *Int J Mol Sci* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22062922>.
- [6] F. Song, M. Yang, J. Chen, Z. Zhao, S. He, L. Wang, Correlation of TLR4/MyD88 signaling with early miscarriage, *Int J Clin Exp Pathol* 10, 3601-3608 (2017).
- [7] A. Klukovits, A. Márki, E. Páldy, S. Benyhe, M. Gálik, G. Falkay, R. Gáspár, Inflammatory processes enhance cAMP-mediated uterus relaxation in the pregnant rat: The role of TNF- $\alpha$ , *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00210-008-0381-9>.
- [8] N. Djokanovic, C. Klieger-Grossmann, A. Pupco, G. Koren, Safety of infliximab use during pregnancy, *Reproductive Toxicology* 32 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.05.009>.
- [9] C.B. Johansen, E. Jimenez-Solem, A. Haerskjold, F.L. Sand, S.F. Thomsen, The use and safety of TNF inhibitors during pregnancy in women with psoriasis: A review, *Int J Mol Sci* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19051349>.
- [10] G. Bröms, H. Kieler, A. Ekblom, M. Gissler, K. Hellgren, A.M. Lahesmaa-Korpinen, L. Pedersen, M. Schmitt-Egenolf, H.T. Sørensen, F. Granath, Anti-TNF treatment during pregnancy and birth outcomes: A population-based study from Denmark, Finland, and Sweden, *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 29 (2020). <https://doi.org/10.1002/pds.4930>.
- [11] G. Bröms, F. Granath, O. Stephansson, H. Kieler, Preterm birth in women with inflammatory bowel disease – the association with disease activity and drug treatment, *Scand J Gastroenterol* 51 (2016). doi: <https://doi.org/10.1080/00365521.2016.1208269>.
- [12] U. Arshad, S. Bashir, N. Ur-Rehman, T. Yaqub, A.H. Gilani, Dual Inhibition of Ca<sup>2+</sup> Influx and Phosphodiesterase Enzyme Provides Scientific Base for the Medicinal Use of *Chrozophora prostrata* Dalz. in Respiratory Disorders, *Phytother Res* 30 (2016). <https://doi.org/10.1002/ptr.5610>.
- [13] A. Roy, K.K. Patra, S. Mukhopadhyay, S. Guha, Study of drotaverine on first stage of labour and pregnancy outcome, *J Indian Med Assoc* 105 (2007). PMID: 18236908
- [14] Z. Patai, A. Guttman, E.G. Mikus, Potential L-type voltage-operated calcium channel blocking effect of drotaverine on functional models, *J Pharm Exp Ther* 359 (2016). <https://doi.org/10.1124/jpet.116.237271>.
- [15] Á. Hódi, I. Földesi, E. Ducza, J. Hajagos-Tóth, A.B. Seres, A. Klukovits, R. Gáspár, Tocopherol inhibits the relaxing effect of terbutaline in the respiratory and reproductive tracts of the rat: The role of the oxidative stress index, *Life Sci* 105 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.04.023>.

- [16] D. Stygar, H. Wang, Y.S. Vladic, G. Ekman, H. Eriksson, L. Sahlin, Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix, *Biol Reprod* 67 (2002). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.005116>.
- [17] P.R. Dhungana, R. Adhikari, P.R. Pageni, A. Koirala, A. Nepal, A prospective study on effectiveness of drotaverine in acceleration of labor, *Med J Pokh Acad Health Sci* 2 (2019). <https://doi.org/10.3126/mjpahs.v2i3.26108>.
- [18] S. K. V., S. Hebbar, D. Pandey, R. Upadhyaya, V. Lobo, Drotaverine to improve progression of labour among parturient women- a case control study, *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol* 12 (2023). <https://doi.org/10.18203/2320-1770.ijrcog20232737>.
- [19] M. Johnson, Beta2 -adrenoceptors: Mechanisms of action of beta2-agonists, *Paediatr Respir Rev* 2 (2001). <https://doi.org/10.1053/prrv.2000.0102>.
- [20] W. Yuan, A. López Bernal, Cyclic AMP signalling pathways in the regulation of uterine relaxation, *BMC Preg Child*, 7 Suppl (2007). <https://doi.org/10.1186/1471-2393-7-S1-S10>.