

Válaszok Prof. Dr. Hársing László Gábor opponensi véleményére.

Először is köszönöm az opponensi munkát és a pozitív értékelést. Észrevételeire, kérdéseire a következő válaszokat adnám.

1. Megjegyzés:

Megadja továbbá az alkalmazott statisztikai módszereket. Itt jegyzem meg, hogy a statisztikai adatszolgáltatás esetenként hiányos: minden esetben, amikor átlag és szórás valamely formája kerül megadásra, a kísérleti esetszám (n) megadása nem nélkülözhető.

Opponens azon megjegyzésével, hogy az átlag és szórás megadásához szükséges az esetszám megadása, teljesen egyetértek. Dolgozatomban ezek az adatok valóban nem kerültek több esetben sem megadásra, melynek oka, hogy a konkrét mérések leírása a publikációkhoz képest rövidítve került bele a dolgozat metodikai eljárásokat taglaló részébe. Az egyes mérési módszereket lényegükben igyekeztem megragadni, a leírások nem tartalmazzák minden mérés pontos körülményeit, így jellemzően az elemszámokat sem. Valóban célszerű lett volna az ábrákhoz rendelve megadni az egyes elemszámokat is, de mivel a statisztikai analízisek is összefoglalva kerültek leírásra, és ott adtam meg az általánosan alkalmazott szignifikancia-szintet, amire az érvényes szignifikanciát meghatároztuk, így az elemszámok minden esetre történő megadásától is eltekintettem. Ezek az adatok viszont minden esetben megtalálhatók a forráspublikációkban, vagy a metodikai leírásoknál, vagy az ábraleírásokban.

2. Megjegyzés:

1. Az Értekezés viszonylag nagy számú rövidítést tartalmaz, amelyek listája az értekezés végére került. Ez azzal jár, hogy az olvasónak rendszeresen vissza kell lapoznia a listához a rövidítés megértéséért. Valamely rövidítés bevezetése előtt az első alkalommal történő alkalmazásnál a szövegben a rövidítés ismételt nem kerül kiírásra.

A rövidítésjegyzék elhelyezését nem gondoltam kritikus pontnak, habár meg tudom érteni opponens észrevételét. Az okozott kényelmetlenségéért elnézését kérem. A rövidítéseket igyekeztem minden esetben utánellenőrizni, hogy első alkalommal a feloldása is megtörténjen, elnézést, ha legjobb szándékom ellenére mégis sikerült elfelejtkezmem néhányról.

3. Megjegyzés:

2. Az Értekezés nem tartalmazza a saját közleményeket, az Irodalom jegyzékben vastag betűvel szedett közleményekről vélhető, hogy azok, amelyek az Értekezés alapját képezik. Az hivatkozások azonban csak az első szerző nevét jelölik, valamint az első oldal oldalszámát.

Valóban, ahogyan az irodalomjegyzék elején írtam, a vastagon szedett hivatkozások szolgálták az értekezés eredményeinek alapjául. A részletes lista megtalálható a tézisfüzet 8-9. oldalain.

4. Megjegyzés:

3. Tapasztalható bizonyos aránytalanságok: az Irodalmi előzmények, amely a Bevezetésnek felel meg, 27 oldal, míg az Összefoglalás-kitekintés 6 oldal terjedelmű.

Köszönöm az észrevételt, ez szándékos szerkesztés eredménye. Az összefoglalás-kitekintés részben nem gondoltam már minden korábbi eredmény diszkusszióját szerepeltetni, ezeket inkább az eredmények mellett gondoltam megadni, ezért lett annak a fejezetnek eredmények és értékelésük a címe. Az összefoglalást inkább konkluzívnak szántam, mintsem részletezőnek, emiatt a viszonylag rövidebb terjedelem. Az irodalmi áttekintés pedig szintén egy átcsoportosítás eredménye lett, mivel a kezdeti verziókban a konkrét eredményeket megalapozó speciális irodalmi előzményeket is az eredmények részben szerepeltettem. Végül az utolsó fázisban kerültek ezek át az irodalmi előzményekhez, melyet rövidítettem, de a munka témái diverzitása miatt egy bizonyos terjedelem alá már nem tudtam leszorítani az előzményeket. Valószínűleg, ha az első megoldást alkalmazom, a fejezetek terjedelme kiegyensúlyozottabb lehetett volna, ez viszont az irodalmi alapozás szétszabdolásával járt volna.

5. Kérdés:

1. A 4.8.pontban említi új statisztikai módszer kialakítását és alkalmazását a Morris Water Maze vizsgálatban. A módszert kiterjedten alkalmazzák konvencionális statisztikai rendszerek felhasználásával. Miért volt szükséges új eljárás kidolgozására, mennyiben elfogadott annak alkalmazása?

A Richard Morris által 1981-ben kifejlesztett Morris Water Maze (MWM) teszt egy széles körben használt magatartásvizsgálati módszer, amelyet rágcsálók, különösen egerek térbeli tanulásának és memóriájának értékelésére használunk. Az MWM-teszt eredményeinek kiértékelése során alkalmazott elsődleges statisztikai módszerek közé tartozik a varianciaanalízis (ANOVA) és az azt követő különféle *post hoc* tesztek a csoportok közötti szignifikáns különbségek meghatározására.

Az MWM módszer lényege viszont, hogy a mérési alanyok (egerek) minden méréskor ugyanazok, a platform megtalálási idejük pedig a tanulási periódus alatt folyamatosan csökken. Így az egyes napokon mérhető adatok nem függetlenek egymástól, ezért a legelterjedtebben használt egyutas ANOVA nem alkalmas a kiértékelésre. Ezért több tanulmányban ismétléses ANOVA-t is alkalmaztak már. Ez a megközelítés eredendően kontrollálja az egyéni különbségeket, csökkenti az alanyok közötti változékonysággal kapcsolatos hibavariánst. Az ismétlődő mérések kialakítása lehetővé teszi a kezelés hatásainak érzékenyebb kimutatását, mivel figyelembe veszi az ismétlődő megfigyelések közötti korrelációkat (Muhammad et al., 2013).

A kevert modelles ANOVA egyesíti az egyutas és az ismétléses ANOVA jellemzőit. Különösen hasznos, ha a kutatók olyan adatokat akarnak elemezni, amelyek mind fix hatásokat (pl. kezelési feltételek), mind véletlen hatásokat (pl. az alanyok közötti egyéni különbségek) tartalmaznak (West, 2009; Kain et al., 2015). Ez a modell lehetővé teszi

mind az alanyok közötti, mind az alanyokon belüli tényezők bevonását, így sokoldalúan alkalmazható komplex kísérleti tervekhez. A vegyes modellek hatékonyabban képesek kezelni a kiegyensúlyozatlan adatokat és a hiányzó értékeket, mint a hagyományos ANOVA-módszerek, ami jelentős előny longitudinális vizsgálatokban.

A fentiek alapján tehát az MWM vizsgálatok kiértékelésére kevert modelles ANOVA lehetne a legmegfelelőbb, viszont félrevezető eredményeket adhat, ha az adatok normál vagy közelítően normál eloszlásának kritériuma nem teljesül. A probléma viszont ott merül fel, hogy a publikált kísérleti leírások sosem fedik fel azokat a gyakorlatban alkalmazott metodikai finomításokat, melyek következtében az adatok Gauss-eloszlása nem teljesül. Ezekkel a finomításokkal a kísérletek valós időben elvégezhetőek lesznek (pl nem várunk hosszú ideig arra, hogy egy egér magától megtalálja a platformot, hanem adott idő után felhelyezzük), az adathalmaz eloszlását viszont torzítják. Így szükségesnek találtuk egy, a kísérlethez illesztett nemparaméteres eljárás kidolgozását, melyet az eredményeink mellett közöltünk. Mindazonáltal a nem parametrikus tesztek, bár kevésbé érzékenyek a feltételezések megsértésére, gyakran alacsonyabb statisztikai erejűek parametrikus társaikhoz képest. Ez azt jelenti, hogy előfordulhat, hogy nem észlelnek szignifikáns hatásokat, ha azok léteznek, különösen nagyobb mintákban (Nwobi & Akanno, 2021). Emiatt saját eljárásunkat teszteltük mind a fals pozitív, mind a fals negatív következtetések kiszűrésének hatékonyságára.

A megjelenés óta erre a publikációnkra 10 független idézés keletkezett, azonban ezeket áttekintve nyilvánvaló, hogy nem a statisztikai eljárást hivatkozzák a szerzők. Valószínűleg egy viselkedés-magatartásvizsgálatra jobban specializálódott folyóiratban nagyobb figyelmet kaphatott volna maga a kiértékelési metodika.

Hivatkozott irodalmak:

Kain, M., Bolker, B., & McCoy, M. (2015). A practical guide and power analysis for glms: detecting among treatment variation in random effects. *Peerj*, 3, e1226. <https://doi.org/10.7717/peerj.1226>

Muhammad LN. Guidelines for repeated measures statistical analysis approaches with basic science research considerations. *J Clin Invest*. 2023 Jun 1;133(11):e171058. doi: 10.1172/JCI171058

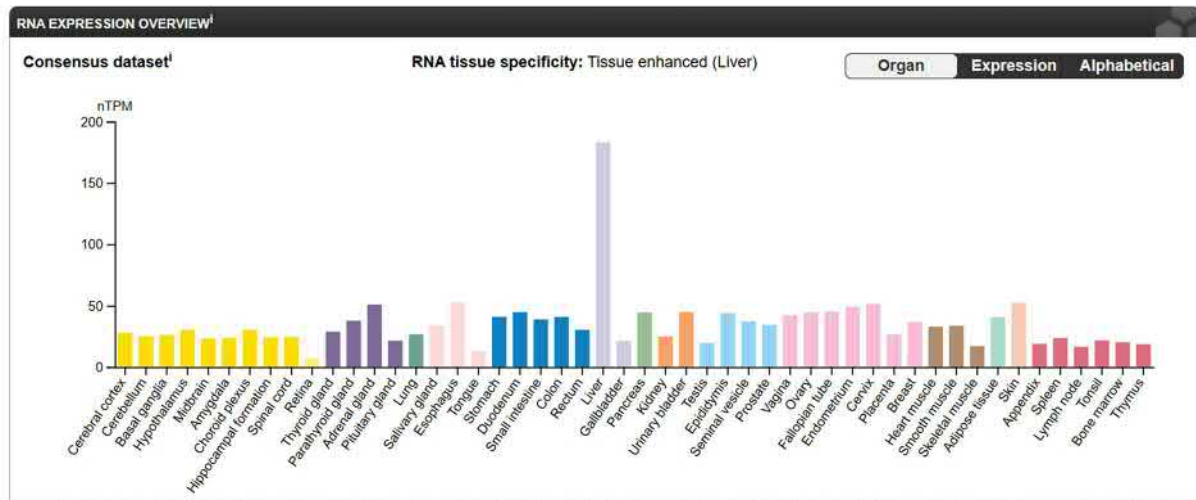
Nwobi, F. and Akanno, F. (2021). Power comparison of anova and kruskal–wallis tests when error assumptions are violated. *Advances in Methodology and Statistics*, 18(2). <https://doi.org/10.51936/ltgt2135>

West B. T. (2009). Analyzing longitudinal data with the linear mixed models procedure in SPSS. *Evaluation & the health professions*, 32(3), 207–228. <https://doi.org/10.1177/0163278709338554>

6.

2. A receptorkötési tesztben membrán preparálás két species (tengerimalac és patkány)-ból és májszövetből történt egy olyan vizsgálati körben, amely döntő mértéken a központi idegrendszert érinti. Mi volt a megfontolás, hogy membrán preparálás nem agyból (corex vagy hippocampus) történt?

A [proteinatlas.org](https://www.proteinatlas.org) oldalon elérhető ábrát szeretném válaszem illusztrálásaként bemutatni:



<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000147955-SIGMAR1/tissue>

Habár az irodalmi adatok szerint a szigma-1 receptor expressziója a megfelelő agyi területeken magas, az RNS-mennyiség összehasonlító analízise szerint a májszövetben várható a legnagyobb receptorsűrűség. A Cagnotto és csoportja által meghatározott érték patkány agyszövetben 280 fmol/mg protein volt [³H]-(+)-pentazocin alkalmazása mellett (Cagnotto et al., 1994). Saját méréseink szerint a tengerimalac máj-preparátumban 1072 fmol/mg protein volt a receptorsűrűség értéke. Ezen kívül metodikai szempontból könnyebben kivitelezhető volt a membránpreparátum nagy mennyiségben történő előállítása, amire azért volt szükség, mert a referencia vegyületek mellett az *in silico* szűrés eredményeként adódó, viszonylag nagy számú potenciális S1R modulátor kötődésvizsgálatát is el kellett végeznünk. Végeztünk receptorkötési kísérleteket egér agyszövetből előállított preparátumon is (Szabó et al., 2021), tapasztalataink szerint a [³H]-(+)-pentazocin kötődési állandója jó egyezést mutatott a kétféle preparátummal végzett kísérletben.

Hivatkozott irodalmak:

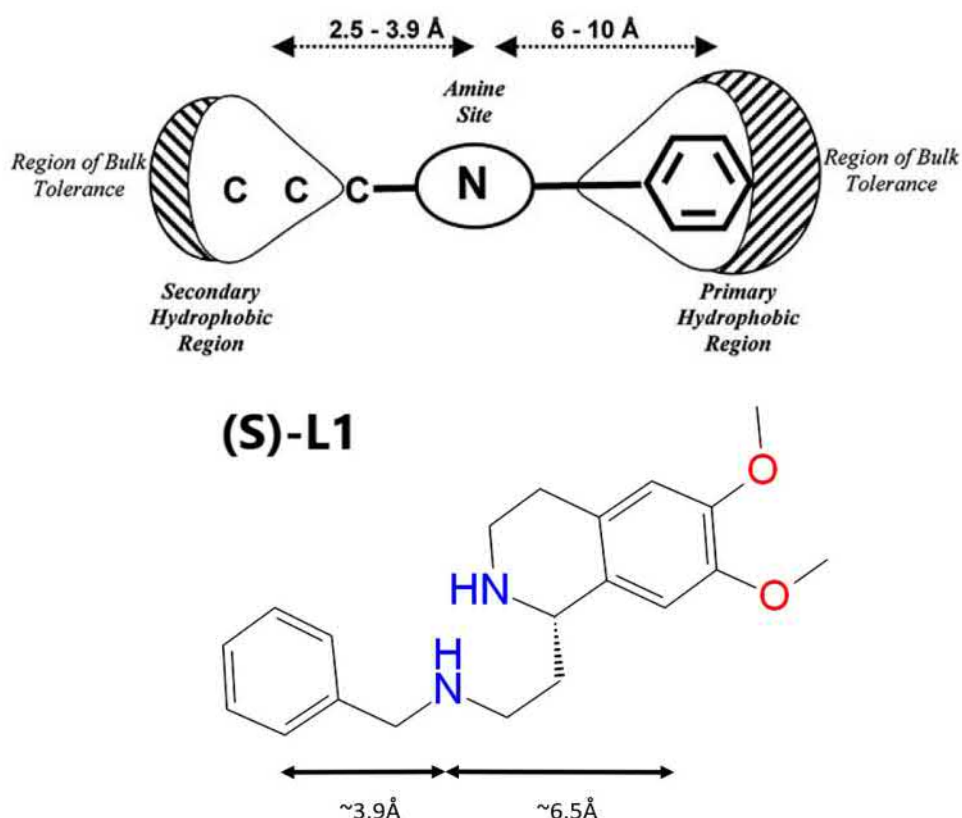
Cagnotto, A., Bastone, A., & Mennini, T. (1994). [³H](+)-pentazocine binding to rat brain sigma 1 receptors. *European journal of pharmacology*, 266(2), 131. [https://doi.org/10.1016/0922-4106\(94\)90102-3](https://doi.org/10.1016/0922-4106(94)90102-3)

Szabó, Í., Varga, V. É., Dvorácskó, S., Farkas, A. E., Körmöcz, T., Berkecz, R., et al. (2021). N,N-Dimethyltryptamine attenuates spreading depolarization and restrains neurodegeneration by sigma-1 receptor activation in the ischemic rat brain. *Neuropharmacology*, 192, 108612. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108612>

7.

3. 12 Molekula receptorkötési eredményét közli, ezek szerkezetileg különböző molekulák és a megadott inhibíciós konstans (K_i) értékek alapján többszörösen gyengébb hatásuk, mint a referens vegyületek. Referenst legkifejezettebben megközelítő az L1 vegyület S enantiomerje. Van-e itt szerkezeti hasonlóság a referens vegyületek és az L1 vegyület szerkezete között? A 11. táblázatban közölt K_i értékek S1R vagy S2R-re vonatkoznak-e?

Válaszomban először a referenciavegyületek szerkezetét szeretném összehasonlítani. A leggyakrabban alkalmazott S1R-modulátor referencia vegyület a (+)-pentazocin, mely egy benzomorfán-származék, benne egy fenilcsoport kapcsolódik egy morfinán-alapvázhoz. A piperidin-gyűrű tercier aminocsoportja a molekula farmakológiai hatásának kialakulásában fontos szerepet játszik. A cutamesine egy piperazin-származék, a gyűrű két nitrogénjén egy-egy fenalkil-csoport található. A feniletilcsoportokhoz metoxicsoporthoz kapcsolódnak az aromás gyűrű 3. és 4. pozíciójában, míg a fenilpropilcsoportokhoz nem kapcsolódnak további funkciós csoportok. A fluvoxamin, mely egy szelektív szerotonin-újrafelvételt gátló molekula, egy fenilpropilamin származék. A haloperidol központi eleme egy piperidingyűrű, mely 4-es pozícióban hidroxilcsoporttal és p-Cl—fenilcsoporttal szubsztituált, a nitrogén pedig szintén egy tercier amin, harmadik szubsztituense viszonylag nagyobb távolságban pedig szintén tartalmaz egy aromás csoportot.



Az (S)-L1 molekula szerkezetének összehasonlítása a Glennon-moddal.

2005-ös összefoglaló munkájában Glennon azonosította az S1R receptorhoz való kötődéshez szükséges szerkezeti elemeket, melyeket az addig felfedezett ligandumok összehasonlításával nyert (Glennon, 2005). Modellje szerint az S1R kötőzsebének

központjában egy aminkötőhely található, amit két hidrofób régió szegélyez. Az elsődleges hidrofób régió úgy helyezkedik el, hogy egy öt- vagy hattagú, esetleg aromás gyűrűvel kedvező kölcsönhatást tudjon kialakítani. A másodlagos hidrofób hely valószínűleg valamivel kisebb, mint az elsődleges hely, és optimálisan egy háromatomos láncot fogad be. Mindkét hidrofób helyhez kapcsolódik egy további régió, mely megengedi a hidrofób csoport méretének növelését, de ez általában nem növeli az affinitást. Az amin lehet szekunder vagy tercier, utóbbi esetben a viszonylag kis szubsztituensek az optimálisak. Az aminrész ciklikus szerkezetbe, például pirrolidin-, piperidin- vagy piperazingyűrűbe is beágyazható.

A Glennon által meghatározott szerkezeti követelmények az előbbieken felsorolt referenciavegyületekre jó közelítéssel érvényesek. Az általunk kiválasztott L1 molekula tetrahydroizokinolin-alapváz, ezzel biztosítva a bázikus szekunder amin funkciót, mely egy 6-tagú gyűrűben található. Az aromás gyűrű az elsődleges hidrofób kötőhely toleranciarégiójába illeszkedik, míg a nitrogén melletti szénhez kapcsolódó viszonylag flexibilis, aromás csoportot 4 atomcsoportnyi távolságra tartalmazó szubsztituens és a másodlagos hidrofób régió között szintén kialakulhat kedvező kölcsönhatás.

A 11-es táblázat a [^3H]-(+)-pentazocinnal szemben mért K_i értékeket tartalmazza, melyek a vegyületek S1-receptorhoz való affinitását jellemzik.

Hivatkozott irodalom:

Glennon R. A. (2005). Pharmacophore identification for sigma-1 (sigma1) receptor binding: application of the "deconstruction-reconstruction-elaboration" approach. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 5(10), 927–940. <https://doi.org/10.2174/138955705774329519>

Szeged, 2025. március 7.


Dr. Fülöp Livia