

Válasz

dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora opponensi véleményére

Tisztelt Professzorasszony!

Mindenek előtt szeretném megköszönni hozzáértő, szakszerű és egyben alapos munkáját dolgozatom bírálása során.

A feltett kérdésekre az alábbiakban szeretnék válaszolni:

1.) A NOP receptor és a nociceptin központi idegrendszeri lokalizációja a bevezetésben részletes bemutatásra kerül. Ezzel szemben a perifériás expressziót, eloszlást és funkciókat nem, illetve a NOP receptorra vonatkozóan mindössze néhány mondatban, meglehetősen szűkszavúan említi a szerző a 14. oldal alján és a 15. oldalon levő ábrán. A májbetegekben, tumoros és ischémiás klinikai állapotokban való vizsgálatok indoklásához és értelmezéséhez a perifériás szövetekben való előfordulás részletes bemutatása fontos. Milyen szerv-, szövet-, és sejtszintű adatok állnak rendelkezésre erre vonatkozóan?

Valóban a NOP receptor és a nociceptin központi idegrendszeri lokalizációja és funkciói tekintetében összehasonlíthatatlanul több információ áll rendelkezésre, mint a NOP receptor perifériás expressziójára és a nociceptin perifériás szerepére vonatkozóan. A NOP receptor mRNA jelenlétének RT-PCR módszerrel történő igazolása májszövetben valamint vas deferens-ben, vékonybélben és a lépben Wang és mtsai nevéhez fűződik [Wang JB, Johnson PS, Imai Y, Persico AM, Ozenberger BA, Eppler CM, Uhl GR: cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. FEBS Lett 1994, 348:75–79]. Daganatos betegek teljes vér mintáiban RT-PCR módszerrel mérve mind a NOP receptor mind a ppN/OFQ mRNS expresszióját $p < 0,001$ szignifikanciával magasabbnak találták Stamer és mtsai [Stamer UM, Book M, Comos C, Zhang L, Nauck F, Stüber F.: Expression of the nociceptin precursor and nociceptin receptor is modulated in cancer and septic patients. Br J Anaesth. 2011, 106:566-72.]. Humán aorta endothélium sejteken immunhisztokémiai módszerrel igazolták a NOP receptor jelenlétét és patkány endothélsejt szövetkultúráján, hogy a NOP receptort a nociceptin aktiválja a MAP-kináz kaskádon keresztül [Granata F, Potenza RL, Fiori A, Strom R, Caronti B, Molinari P, Donsante S, Citro G, Iacovelli L, De Blasi A, Ngomba RT, Palladini G, Passarelli F. Expression of OP4 (ORL1, NOP1) receptors in vascular endothelium. Eur J Pharmacol. 2003, 482:17-23]. A mikrovaszkuláris endothéliumban a qPCR módszer nem elég érzékeny a NOP receptor-fehérje kimutatására, de fluorescein-isothiocyanát-jelzett nociceptint alkalmazva igazolható volt a NOP receptor aktiváció szerepe a mikrocirkuláció szabályozásában [Brookes ZL, Stedman EN, Brown

NJ, Hebbes CP, Guerrini R, Calo G, Reilly CS, Lambert DG: The nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist UFP-101 reduces microvascular inflammation to lipopolysaccharide in vivo. PLoS One. 2013,8:e74943].

2.) Az agonisták és antagonisták potenciális terápiás felhasználását bemutató 5. ábra meglehetősen nehezen értelmezhető és -amennyiben a címe megfelelő- összemosódik rajta a receptor aktiváció- illetve blokkolás hatásainak jellemzése. Mely indikációk esetében jelentenek az agonisták és mely esetekben az antagonisták gyógyszerfejlesztési perspektivákat? Milyen lehetséges mellékhatásokkal kell számolni? Hogy értékeli a klinikai farmakológiai vizsgálatok eddigi eredményeit? Lát-e valamely esetben a közeljövőben törzskönyvezhető gyógyszerre reális esélyt?

Az 5. ábrán pirossal jelöltem a NOP receptoron ható potenciális gyógyszer-fejlesztési lehetőségeket és fekete betűkkel azokat a humán szöveteken, ill. szerveken igazolt hatásokat, melyek ezeket a fejlesztési irányokat megalapozzák. A gyógyszer-fejlesztést azonban mind az agonisták mind az antagonisták esetében erősen befolyásolja, hogy a NOP receptor és endogén agonistája a nociceptin számos élettani folyamat szabályozásában játszik szerepet és a potenciális gyógyszer farmakokinetikai/ metabolikus sajátosságai is jelentősen befolyásolják a terápiás alkalmazhatóságot. A teljesség igénye nélkül szeretném említeni, hogy pl. az SCH 486757 NOP receptor agonista a szubakut köhögés csillapítójaként [Woodcock A, McLeod RL, Sadeh J, Smith JA: The efficacy of a NOP1 agonist (SCH 486757) in subacute cough. Lung 2010; 188(suppl 1):S47–S52.] I/II klinikai fázis-vizsgálatban valamint egy másik, kettősvak, keresztezett, párhuzamos-csoportos klinikai vizsgálatban a vírus-fertőzés utáni perzisztáló köhögés esetén a codeinnel azonos hatást mutatott. [McLeod RL, Tulshian DB, Sadeh J. Where are the new cough treatments: a debriefing of recent clinical proof-of-concept trials with the NOP agonist. Pharmacology 2011,88:50-4]. Említhetem a Parkinson-kór potenciális gyógyszereiként tekintett nem-peptid szerkezetű NOP receptor antagonistákat is [Tekes K, Tariq S, Adeghate E, Laufer R, Hashemi F, Siddiq A, Kalasz H.: Nociceptinergic system as potential target in Parkinson's disease. Mini Rev Med Chem. 2013,10:1389-97], bár randomizált klinikai vizsgálatokat erre vonatkozóan még nem publikáltak. A ClinicalTrials.gov honlapon található NCT00155129 számmal jelölt „The Role of CGRP and Nociceptin in Migraine” című vizsgálat eredménye még nem ismert hasonlóan az NCT00173225 számú „Sputum and Plasma Levels of Nociceptin and Substance P in Patients With Asthma, COPD and Chronic Cough” vizsgálat is folyamatban van.

3.) Milyen mechanizmusokat és hatásokat ért pontosan az alatt a megállapítás alatt, hogy, „Wilson kóros betegekben a nociceptinerg jelátvitel tartós fokozódásával kell számolni”? Ismer-e erre vonatkozóan funkcionális adatokat? Van-e ennek klinikai jelentősége?

„A nociceptinerg jelátvitel tartós fokozódása” megfogalmazással arra kívántam utalni, hogy a Wilson-kóros betegekben méréseink szerint a nociceptin perifériás szintje élethosszig tartóan szignifikánsan magasabb, mint az egészségesekben. Ebben az autoszomális, recesszív öröklődésű, a 13q14.1 helyen lokalizált, a rezet-transzportáló p-típusú ATP-ázt kódoló gén mutációjából adódó betegségben a nociceptin inaktivációja tartósan gátolt (a nociceptint specifikusan inaktíváló citoplazmás elhelyezkedésű endopeptidáz 24.15 enzim Zn központi atomjának Cu-re történő részleges cserölődése miatt) és feltételezve, hogy a NOP-receptoron nem történik down-reguláció a tartósan magas nociceptin-szint hatására, az következhet, hogy a NOP receptor aktiváció közvetítette hatások a Wilson-kóros betegeknél fokozottan jelentkeznek. A nociceptin, mint heptadekapeptid molekula fiziko-kémiai tulajdonságai alapján (lipofilitás, molekula-tömeg, TPSA-érték) a nem-károsodott vér-agy gáton nem tud a perifériáról a központi idegrendszerbe bejutni, így a perifériás NOP receptor aktivációs hatásaival lehet reálisan számolni, azaz pl.az urogenitális rendszerre kifejtett vizeleési reflex-gátló, a gyomor-bélrendszeren kialakuló motilitás-csökkentő vagy pl. az érrendszeren tapasztalható általános (artériákon és vénákon egyaránt mérhető) vazodilatációs hatással, esetleg a vérnyomás-csökkentő hatással. Az említett perifériás nociceptin-hatások többszörösen igazoltak, de Wilson-kóros betegekben ezek szisztematikus vizsgálata még nem ismert.

4.) *A különféle, rendkívül heterogén daganatos betegek (csoportonként 1-2 tüdő, hasnyálmirigy, epeúti, vese, mellékvese, prosztata, lymphoid leukemia, stb.) eredményei egyben kerültek értékelésre. Ezek makroszkópos és mikroszkópos patológiai viselkedésükben, mikrokozonyezetükben, invazivitásukban, metasztázisképzésben, immunológiai viselkedésükben stb. nagyon eltérő tumor-típusok, véleményem szerint nem szerencsés együtt értékelni őket. Milyen primer tumorban szenvedtek a metasztázis csoportban levő betegek, milyen klinikai stádiumban voltak, mekkora és hány áttét volt? Kaptak-e ezek a betegek bármilyen gyógyszeres kezelést? A 82. oldalon szerepel, hogy „a daganattípustól és metasztázistól függetlenül a nociceptin-szint kiugróan magas”, azonban ezt 1-4 elemszámú klinikai csoportból nehéz megállapítani. A tumoros betegekben mért jelentősen emelkedett nociceptin plazma-koncentrációt az immunfolyamatokban való részvétellel magyarázza. Elképzelhető-e, hogy a tumor környezetében levő szövet-széteses és/vagy magának a tumornak a szétesése eredményezi a nociceptin-szint emelkedését? Mit jelent pontosan az a megállapítás, hogy „Adataink klinikai vizsgálatokban az immunszupresszív folyamatok és a nociceptinerg rendszer összefüggéseit igazolják.”? Ismer-e irodalmi adatokat a NOP receptor expressziójára és funkcionális jelentőségére vonatkozóan tumoros állapotokban?*

A daganatos betegek klinikai jellemzőinek részletes elemzésére (TNM-besorolásuk, kórtörténetük, metasztázisaik mérete, gyógyszeres kezelésük részletei, a primer

tumorerok hisztológiai jellemzői stb.) sajnos a klinikus partnerünk, Magyar Pál professzor úr halála miatt nem került sor és azóta sem találtunk együttműködő onkológus partnert. A nociceptinnek a humán immunfolyamatok szabályozásában betöltött szerepét elsőként Peluso és mtsai [Peluso J, Gavériaux-Ruff C, Matthes HW, Filliol D, Kieffer BL.: Orphanin FQ/nociceptin binds to functionally coupled ORL1 mind az IL-1receptors on human immune cell lines and alters peripheral blood mononuclear cell proliferation. Brain Res Bull. 2001,54:655-660] elemezték U937 monocita-sejtvonalon, CEM és MOLT-4 T-limfoma sejtvonalakon, EBV-transzformált B limfocitákon és SH-SY5Y neuroblastoma sejteken. Megállapították, hogy a monocitákon és a T-limfocitákon a NOP receptor jelentős számban van jelen és G-fehérje-kapcsoltan funkcionális, míg az EBV-transzformált B limfocitákon nem tapasztalták funkcionális NOP receptor jelenlétét ellentétben Hom és mtsai-val [Hom J. S., Goldberg I. Mathis J. Pan, Y. X., Brooks A. I., Ryan-Moro J., Scheinberg D. A., Pasternak G.W.: [(125)I]orphanin FQ /nociceptin binding in Raji cells. Synapse 1999,34:187–191], akik a B-limfoma Raji sejtvonalon viszont igazolták a NOP receptor kifejeződését. Ezen túlmenően a nociceptint 10^{-12} – 10^{-11} M-os koncentrációban alkalmazva néhány egyénben a fitohemaglutinin (PHA)-stimulált humán perifériás mononukleáris sejtek (PBMC) proliferációja volt tapasztalható, feltételezhetően a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) útvonalon keresztül, ahogy az a stabilan transzfektált CHO sejteken igazolást nyert [Fukuda K., Shoda T., Morikawa H., Kato S., Mori K.: Activation of mitogen-activated protein kinase by the nociceptin receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. FEBS Lett. 1997,412:290–294]. Az endogén opioidok és az akut valamint a krónikus morfin-adagolás immunmoduláns szerepét számos munkacsoport igazolta [Finley M.J., Happel C.M., Kaminsky D.E., Rogers T.J.: Opioid and nociceptin receptors regulate cytokine and cytokine receptor expression. Cell. Immunol. 2008,252:146-154]. A nociceptinnek az immun-válaszokban betöltött szerepét is egyre több munkacsoport vizsgálja. Az i.c.v. adott nociceptin erőteljesen gátolta peritoneális makrofágokban a posztoperatív stressz-kiváltotta TNF_{α} és $IL-1\beta$ transzkriptek mennyiségének emelkedését [Zhao H., Wu G.C., Cao X.D.: Immunomodulatory activity of orphanin FQ/nociceptin on traumatic rats. Acta Pharmacol. Sin. 2002,23:343-348]. A streptococcus enterotoxin A (SEA)-indukálta proinflammatorikus citokin-tesztben a nociceptin szignifikánsan emelte a TNF_{α} és INF_{γ} mRNA mennyiséget a lépben valamint a plazma TNF_{α} szintet [Godfarb Y., Reinscheid R.K., Kusnecov A.W.: Orphanin FQ/nociceptin interactions with the immune system in vivo: gene expression changes in lymphoid organs and regulation of the cytokine response to staphylococcal enterotoxin A. J. Neuroimmunol. 2006,176:76-85]. Érdekes módon humán monocitákon a nociceptin gátolta a CCL2 és CCL5 kemokin fehérjék mennyiségét, de nem volt hatással ezek receptorainak expressziójára [Finley M.J., Happel C.M., Kaminsky D.E., Rogers T.J.: Opioid and nociceptin receptors regulate cytokine and cytokine receptor expression. Cell. Immunol. 2008,252:146-154].

5.) *Mi lehet az oka, mechanizmusa és funkcionális jelentősége a migrénesekben a roham- mentes periódusban mért alacsonyabb nociceptin plazma -koncentrációnak, valamint további csökkenésének a roham alatt? A trigemino-vaszkuláris rendszer aktivációja során a peptid koncentrációjának emelkedését várnánk (mint pl. a CGRP esetében). Ok vagy okozat lehet inkább migrénesekben az alacsony nociceptin-szint? Vannak-e állatkísérletes adatok a nociceptin-koncentrációk változására a trigeminovaszkuláris aktiváció modelljeiben?*

Nem könnyű egyértelmű választ találni arra, hogy a migrén-betegek plazma nociceptin-szintje miért alacsonyabb az egészséges személyekénél, hiszen a nociceptin felszabadulásának mechanizmusa(i) máig nem ismert(ek). Az igazolást nyert, hogy a humán trigeminális ganglionban a neuronok 70%-a mutat nociceptin-immunopozitivitást és ko-lokalizációt mutat CGRP-vel, SP-vel, NOS-sal és PACAP-pal valamint a craniális erek nem tartalmaznak NOP receptort kódoló mRNS-t és a nociceptin nincs hatással a craniális erek kontrakciójára, ill. dilatációjára [Hou M, Uddman R, Tajti J, Edvinsson L. Nociceptin immunoreactivity and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *Brain Res.* 2003,964:179-186.] Viszont kontrol patkányok trigeminális ganglionjának primér szövettenyészetén a tiszta nociceptin-agonista (1-13)NH₂-NC dózis-függően gátolta mind a nem-specifikus (veratridinnel kiváltott, ill.K-stimulált) mind a specifikus (kapszaicinnel indukált) depolarizációval kiváltott CGRP-felszabadulást [Capuano A, Currò D, Dello Russo C, Tringali G, Pozzoli G, Di Trapani G, Navarra P. Nociceptin (1-13)NH₂ inhibits stimulated calcitonin-gene-related-peptide release from primary cultures of rat trigeminal ganglia neurones. *Cephalalgia.* 2007,27:868-876]. Sajnos azon saját kísérleteinkben, melyekben patkányon létrehozott Moskowitz-migrén modellen is megerősítettük a Gasser-dúc elektromos ingerlésének (1,2mA, 1Hz, 5 min) hatására létrejövő plazma nociceptin-szint csökkenést, CGRP-választ nem mértünk [Ertsey C., Bizderi B., Hantos M, Gyenge M., Tekes K. Plasma nociceptin levels decrease after trigeminal stimulation *Cephalalgia* 2007,27:1183-1184.]. A kérdéskör komplexitásához tartozik az is, hogy a gerincvelő trigeminális nociceptív neuronjainak NMDA-val kiváltott nociceptív válaszát a nociceptin a neuronok 50%-ában facilitálta, 31%-ában gátolta és 19%-ában bifázisos hatást eredményezett, mely hatás csak a proestrus-fázisban lévő nőstény patkányokon volt tapasztalható, a hímeken a nociceptin gátló hatást mutatott, ami a nociceptin hatásának ösztrogén-moduláltságát mutatja. [Flores CA, Wang XM, Zhang KM, Mokha SS. Orphanin FQ produces gender-specific modulation of trigeminal nociception: behavioral and electrophysiological observations. *Neuroscience.* 2001,105:489-498., ill. Flores CA, Shughrue P, Petersen SL, Mokha SS. Sex-related differences in the distribution of opioid receptor-like 1 receptor mRNA and colocalization with estrogen receptor mRNA in neurons of the spinal trigeminal nucleus caudalis in the rat. *Neuroscience.* 2003,118:769-778.]

6.) *Mi lehet a magyarázata annak, hogy akut stroke-ban emelkedik, krónikus ischémias állapotban csökken a nociceptin plazma -koncentráció? Milyen választ adna az értekezésben is feltett, de nyitva hagyott kérdésre, hogy "az alacsony nociceptin-szint a krónikus ischémias állapot következményeként jön-e létre vagy oka a kardiovaszkuláris betegségeknek"?*

Sajnos a krónikus ischémias állapotban talált alacsony plazma nociceptin-szint okát a legújabb irodalmi adatok tükrében sem tudjuk egyértelműen megmondani alapvetően a nociceptin felszabadulását szabályozó mechanizmusok ismeretének hiányában. Az akut ischémias stroke-betegek esetében mért emelkedett plazma nociceptin-szint a stroke-betegekben is igazolt celluláris és molekuláris gyulladósos reakciókkal magyarázható [Perera NM, Ma HK, Arakawa S, Howells DW, Markus R, Rowe CC, Donnan GA. Inflammation following stroke. J Clin Neurosci. 2006,13:1-8.].

7.) *Mi a magyarázata annak, hogy az 15. és 18. ábrákon oszlop diagramokon, a 16. és 19. ábrákon viszont „box plot” formában ábrázolja az eredményeket?*

Az eltérő ábrázolási móddal arra kívántam utalni, hogy a 15. és 18. ábrákon alkalmazott statisztikai értékelés az egyedi értékek átlagát és az SD értéket mutatja, míg a 16. és 19. ábrákon a statisztikai értékelés Brown-Forsythe ANOVA és Games-Howell „post hoc” teszt alkalmazásával történt. Ezekben az értékelésekben faktor analízist alkalmaztunk a vizsgált személyek jellemzőinek változásaira a plazma nociceptin-szinttel való összevetésben, hogy az esetleges rejtett faktorokat is felderíthessük. A vizsgált személyek jellemzőinek változását és a plazma nociceptin-szintet lineáris és nem-lineáris regressziós módszerrel is számoltuk, a „box plot” ábrázolásban a medián és az „interquartile range” is feltüntetésre került.

8.) *A streptozotocinnal kiváltott I. típusu diabetesz-modellt valóban gyakran használják metabolikus polyneuropatia (és egyéb diabetesz-komplikációk, pl. retinopatia, nefropatia) modelljeként. Nem lehet azonban egyértelműen neuropatia modellnek tartani anélkül, hogy a nociceptív küszöbököt meghatároznánk és a hiperalgéziát, idegkárosodást igazolnánk. Általában nem minden állatban és nem azonos idő után alakul ki neuropatia még hasonló mértékben emelkedett vércukorszintek esetén sem. Történtek-e nociceptió-mérések a vizsgálatok során?*

Bár a 21. és 22. ábrákon hiányos a statisztikai analízis eredményének jelölése, úgy tűnik, hogy a nocistatin-koncentráció a 4. héttől már a plazmában is jelentős emelkedést mutat, a CSF-ben pedig a 8. héttől. Biztos abban, hogy a neuropatia eredményezi a nocistatin-koncentrációk emelkedését (elsősorban a plazmában),

és nem a komplex metabolikus zavar vagy egyéb szervkárosodás (pl. a vesekárosodás és uremia) közvetlen következménye?

Sajnos Intézetünkben nem áll rendelkezésre nocicepció-mérésre alkalmas műszer, így a streptozotocinnal kiváltott krónikus diabetesz-modellt Courteix és mtsai [Courteix C, Eschalier A, Lavarenne J. Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain*, 1993,53:81-88] részletes analízise alapján tekintettük a diabeteszes neuropátia modelljének. Saját vizsgálatainkban valóban nem ismételtük meg az általuk alkalmazott négy különböző fájdalom-ingerre („tail immersion test”, „thermal stimulus”, „mechanical stimulus”, formalin- test”) adott válaszok mérését, elfogadtuk azon eredményeiket miszerint az alkalmazott fájdalom-ingertől függően a patkányok 80-90%-a szignifikánsan különböző fájdalom-tűrést mutatott 4 héttel a diabetesz indukciója után. Saját vizsgálatainkban 16 héten át mértük a diabeteszes állatok nociceptin és nocistatin-szintjeit a plazmában és a CSF-ben, mértük a vércukor-értékeket valamint testtömegüket és bár nem kvantifikáltuk, de tapasztaltuk mindazon jellemzőket is (motoros aktivitás csökkenés, a külső testfelület hőmérsékletének csökkenése) melyek az idézett Courteix és mtsai összefoglalóban is szerepelnek.

A 21. ábrán szereplő nociceptin adatok statisztikai analízise nem mutatott szignifikáns ($p < 0,05$) változást a diabetesz 16 hetes fennállásának vizsgált időszakában és a 22. ábrán szereplő nocistatin értékek mind a plazmában mind a CSF-ben csak a 8. héttől váltak szignifikánsan ($p < 0,05$) emelkedetté.

A komplex metabolikus zavar és egyéb szervkárosodás (pl. vesekárosodás, urémia), mint lehetséges oka a nocistatin-szint emelkedésnek nem zárható ki, de vizsgálataink ennek elemzésére nem terjedtek ki.

9.) Milyen mechanizmussal szabadítja fel az i.c.v. adott nociceptin a hisztamint és csökkenti le a szerotonin szintet a liquorban? Mi lehet ennek a következménye? Vannak erre vonatkozóan funkcionális adatok? Miért a kontroll értékek %-ában ábrázolja az adatokat a 23. és 24. ábrán, valamint a 10. táblázatban? A 10. táblázatban a plazma nociceptin-szint ng/ml, a korábbi ábrákon pg/ml nagyságrendű. Elírás ez az utóbbi? Saját előzetes kísérletek vagy irodalmi adatok alapján választották az állatonként adott 5.5 nmol nociceptin dózist?

A nociceptin hisztamin-felszabadító hatásának vizsgálatával arra kerestünk választ, hogy az i.c.v. adott nociceptin miként befolyásolja a hisztaminerg neuronokból vagy a centrális hízósejtekből a hisztamin-felszabadulást. Ismert volt, hogy az i.c.v. adott μ -receptor agonisták fokozzák a hisztamin felszabadulást [Barke KE, Hough LB. Characterization of basal and morphine-induced histamine release in the rat periaqueductal gray. *J Neurochem*. 1994,63:238-244.] egyes adatok szerint neuronálisan [Chikai T, Oishi R, Saeki K. Increase in the extracellular histamine concentration in the rat striatum by μ -opioid receptor activation. *J Neurochem*. 1994,62:724-729.]. Eriksson és mtsai hypothalamus szeleteken végzett mérései

alapján a nucleus tuberomamillarisban a nociceptin és a morfin ellentétesen hat a hisztamin-kiáramlásra [Eriksson KS, Stevens DR, Haas HL Opposite modulation of histaminergic neurons by nociceptin and morphine Neuropharmacology 2000,39:2492-2498]. Kísérleteink kezdetén ismertek voltak azon in vitro kísérletek eredményei, melyekben a nociceptint a központi idegrendszeri szerotonin-felszabadulás egyik leghatékonyabb gátlójának találták [pl. Siniscalchi A, Rodi D, Beani L, Bianchi C. Inhibitory effect of nociceptin on [3H]-5-HT release from rat cerebral cortex slices. Br J Pharmacol. 1999,128:119-123.; Sbrenna S, Marti M, Morari M, Calo' G, Guerrini R, Beani L, Bianchi C. Modulation of 5-hydroxytryptamine efflux from rat cortical synaptosomes by opioids and nociceptin. Br J Pharmacol. 2000,130:425-33.], így eredményeink csak az in vitro adatok in vivo vizsgálatokban történt megerősítését jelentik. A központi idegrendszeri szerotonerg és hisztaminerg neurotranszmisszió kapcsolatának vizsgálatára vonatkozó szakirodalom meglehetősen szegényes [Joško J, Drab J, Jochem J, Nowak P, Szkilnik R, Korossy-Mruk E, Boroń D, Kostrzewa RM, Brus H, Brus R Ontogenetic serotonergic lesion ing alters histaminergic activity in rats in adulthood. Neurotox Res. 2011, 20: 103-108; Jochem J, Rybczyk R, Irman-Florjanc T, Zwirska-Korczala K, Niwecka A Central serotonin-induced pressor effect in rats is mediated in part via the histaminergic system. Inflamm Res. 2008,57 Suppl 1:S35-6.] amiben bizonyára az is szerepet játszik, hogy a neuronális és a hízósejtes hisztamin-kiáramlás elkülönítése technikai nehézségekkel tarkított.

A 23. és 24. ábrán, valamint a 10. táblázatban a kontroll értékek számszerű megadása mellett azért ábrázoltam a változásokat %-osan, mert úgy éreztem, hogy így könnyebben áttekinthetők a nociceptin-kiváltotta hatások. A 10. táblázat ng/ml értéke a pg/ml helyett valóban elírás, amiért elnézést kérek.

Az i.c.v. adott 5,5 nmol dózissal az irodalmi adatokhoz könnyen viszonyítható, ún. közepes dózist kívántunk alkalmazni [pl. Lutfy K, Do T, Maidment NT. Orphanin FQ/nociceptin attenuates motor stimulation and changes in nucleus accumbens extracellular dopamine induced by cocaine in rats. Psychopharmacology (Berl). 2001, 154:1-7.; Di Giannuario A, Pieretti S Nociceptin differentially affects morphine-induced dopamine release from the nucleus accumbens and nucleus caudate in rats. Peptides. 2000,21:1125-1130].

10.) Arra a következtetésre jutottak, hogy a rendkívül hidrofil K27 és K203 vegyületek jó agyi penetrációját valószínűleg karrier-mediált transzport teszi lehetővé. Melyik hordozófehérje végezheti ezt a transzportot? Milyen irodalmi, illetve saját kísérleti adatok alapján választották a vegyületek alkalmazására az 50µmol dózist? Milyen mechanizmussal csökkentik régió-szelektíven az agyi szerotonin-koncentrációt ezek az acetilkolin-eszteráz-reaktátorok? Milyen előnyei vannak ezeknek a K vegyületeknek a jelenlegi klinikai gyakorlatban használt obidoximmal és pralidoximmal összehasonlítva?

A K-vegyületek agyi penetrációját bizonyító vizsgálatainkat Karasova és mtsai is megerősítették [Karasova JZ, Zemek F, Musilek K, Kuca K. Time-dependent changes of oxime K027 concentrations in different parts of rat central nervous system. Neurotox Res. 2013,23:63-68.], de a feltételezett transzporter jelenleg nem

ismert. Miután mindkét K- vegyület alkothat olyan intermolekuláris komplexet, mely a parciális töltéssel rendelkező N-atomokat „elfedi” jelentősen megnövelve az így létrejött komplex lipofilitását, nem okvetlenül szükséges aktív transzportot feltételezni a vegyületek vér-agy gáton történő átjutása mögött [Karasova J Z., Pohanka M, Musilek K, Zemek F, Kuca K.: Passive diffusion of acetylcholinesterase oxime reactivators through the blood-brain barrier: influence of molecular structure. Toxicol In Vitro. 2010,24:1838-1844.]. Az intermolekuláris komplex kialakulásának feltételeit, fiziológiás körülmények közti stabilitását, membrán-permeabilitását jelenleg vizsgáljuk.

A K-vegyületek dózisának megválasztásakor a K. Kuca vezette kutatócsoport eredményeire épülően az előzetes toxikológiai vizsgálatokban nyert LD₁₀ értékekhez igazodtunk és az adagolás módjával (intramuszkuláris) a potenciális terápiás alkalmazást modelleztük.

A K-203 15 percnél mért átmeneti agyi szerotonin-turnover csökkentő hatásának régió-szelektivitása adódhat a vegyületek szöveti kötődésének különbségéből [Karasova JZ, Zemek F, Musilek K, Kuca K. Time-dependent changes of oxime K027 concentrations in different parts of rat central nervous system. Neurotox Res. 2013,23:63-68.], de a 60 perces értékek már nem különböznek a kontroll állatokétól, így terápiás szempontból biztonságos és hatékony vegyületnek minősíthető.

A K-vegyületek fejlesztésének indoka a jelenleg klinikai használatban lévő pralidoxim és obidoxim csekély terápiás értéke.

Megköszönve opponensem hozzáértő, alapos és részletes bírálatát, tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Budapest, 2014. április 26.



(dr. Tekes Kornélia)