

Válasz Dr. Jancsó Gábor egyetemi tanár „A nociceptin-nocisztatin rendszer szabályzó szerepe és szabályozottsága: kapcsolat a biogénamin rendszerrel, című akadémiai doktori értékezéssel kapcsolatos opponensi véleményére

Köszönöm Jancsó professzor úr alapos, és minden részletre kiterjedő véleményét.

Igen tisztelt opponensem azt írja:

1.) „Nem tartom valószínűnek például, hogy a „foramen occipitale magnum-on át vettük a liquor” megfelelően írja le az alkalmazott kísérleti módszert.”

Ez a liquor-vételi eljárás, a ciszterna punkció, a kísérletes farmakológiában valóban ritkán alkalmazott, a humán gyógyászatban a neurológia és bizonyos esetekben a sürgősségi orvoslás gyakorlatának módszere. [www.youtube.com/watch?v=MRSW09NLFH4, ill. Roberts J.R. & Hedges J.R.: Clinical Procedures in Emergency Medicine, 2009 Elsevier, Saunders, 5th ed., ISBN: 978-1-4160-3623-4]. Talán ezért is történt, hogy az egyik korai állatkísérletes munkánkról beszámoló kéziratunkban, melyben a „cisternal puncture” kifejezést használtuk, az egyik reviewer a pontos anatómiai hely megjelölését kérte, így került megadásra a „foramen occipitale magnum”, mely kifejezést a továbbiakban egyetlen reviewer sem kifogásolta.

2.) „Az „agyrészleteket jéghideg alumínium lapon preparáltuk” írja a Jelölt, de nem részletezi, hogy ezen „agyrészletek” melyek voltak, és azokat milyen anatómiai kritériumok alapján preparálták illetve definiálták.”

A patkányagyból a 11.-14. és a 17. táblázatokban szereplő agyrészletek (frontális cortex, striatum, hippocampus, hypothalamus, nyúltvelő, kisagy, gerincvelő) izolálását végeztük, melyek preparálásának módját számos korábbi, társszerzőimmel közös közleményünkben is megadtuk, és a laboratóriumi munkánk során általánosan alkalmazott módszer, a Paxinos és Watson patkány-agy atlaszban foglaltak valamint Palkovits Miklós professzor úr módszertani útmutatója szerint történt. [Paxinos G. and Watson C.: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6th ed. Academic Press, 1998., ill. Palkovits M. Útmutató és atlasz patkányagy sejtcsoportjainak izolált kivételére. Akadémiai Kiadó, 2001]

3.) „A kísérletes diabetes, helyesebben diabetes mellitus „indukálásának” leírása pontatlan, emellett a kontroll csoportnak nem fiziológiás sóoldatot, hanem a streptozotocin oldásához alkalmazott speciális pufferoldatot kellett volna kapniuk.”

Elfogadva opponensem megjegyzését, valóban helyesebb lett volna a “diabetes mellitus” kifejezés használata és az általánosan alkalmazott “streptozotocin-induced diabetes” helyett is találhattam volna megfelelőbb magyar kifejezést.

A streptozotocin stabilitásának biztosítására alkalmaztuk a pH 4,5-re beállított 0,1 mol/l nátriumcitrát/citromsav puffer oldatot oldószerként, mely oldatból 200 µl térfogatban injektáltunk az intraperitoneálisan 0,2 ml térfogatban adott 50 mg/ttskg dózisú pentobarbital-nátrium oldattal altatott patkányok v. femoralis-ába. Mint ahogy az az eredeti közleményünkben [Tekes K., Hantos M., Gyenge M., Bizderi B., Kecskeméti V.: Diabetes and endogenous orphaninFQ/nociceptin levels in rat CSF and plasma. *Int. J. Diabetes & Metabolism* 2005, 13:147-153] is szerepel, a kontroll állatok az oldószert kapták, így az elírásért elnézést kérek.

4.) *Jellemzően, az állatkísérletekben dózis-hatás vizsgálatok nem történtek, általában egy dózist alkalmaztak pl. a nociceptin vagy a béta-endorfin hormonális imprintingre irányuló vizsgálatokban, de egyéb vizsgálataikban is. Éppen a hormonális imprinting esetében talán érdekesek lettek volna a dózis-hatás vizsgálatok.*

A hormonális imprinting vizsgálatokban jellemzően egyetlen jól megválasztott dózist alkalmazva arra kell figyelemmel lenni, hogy az újszülött patkányok receptorai a felnőttétől eltérő K_D és B_{max} értékekkel rendelkeznek. A β -endorfin-nal történt hormonális imprinting esetében irodalmi adatok [pl. Angelogianni P., Li H.L., Gianoulakis C. Ontogenesis of proopiomelanocortin and its processing to beta-endorphin by the fetal and neonatal rat brain. *Neuroendocrinology*. 2000, 72:231-241, ill. Rossier J., Vargo T. M., Minick S., Ling N., Bloom, F.E., Guillemin R. Regional dissociation of f₁-endorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 74: 5162-5165, ill. Bayon A., Shoemaker W.J., Bloom F.E., Mauss A., Guillemin R.: Perinatal development of the endorphin- and enkephalin-containing systems in the rat brain *Brain Research*, 1979, 179: 93–101] valamint Csaba György professzor úr korábbi vizsgálataiban [Csaba G, Kovács P, Pállinger E. Effect of a single neonatal endorphin treatment on the hormone content of adult rat white blood cells and mast cells. *Cell Biol Int*. 2003, 27:423-427] hatásosnak talált 3µg/újszülött állat dózist alkalmaztunk.

Az újszülött patkányokon nociceptin-nel, ill. nocistatinnal végzett hormonális imprinting vizsgálatainkban irodalmi előzmények adataira nem támaszkodhattunk, a publikációk [pl. Sun R.Q., Wang Y., Zhao C.S., Chang J.K., Han J.S. Changes in brain content of nociceptin/orphanin FQ and endomorphin 2 in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 2001, 311:13-16; Lutfy K, Lam H, Narayanan S.

Alterations in the level of OFQ/N-IR in rat brain regions by cocaine. Neuropharmacology 2008,55:198-203;] 200-300-g-os patkányokon nyert adatokat tartalmaznak, így az általunk választott 10µg/újszülött patkány dózis megválasztásánál a felnőtt patkányok esetében i.c.v. alkalmazott dózisokhoz [pl. Chen X, Geller EB, Adler MW. Nociceptin/orphanin FQ blocks the antinociception induced by mu, kappa and delta opioid agonists on the cold water tail-flick test. Eur J Pharmacol. 2007,557:32-36., ill. Nakagawa T., Kaneko M., Inamura S., Satoh M. Intracerebroventricular administration of nocistatin reduces inflammatory hyperalgesia in rats Neurosci. Lett. 1999,265:64–66.] igyekeztünk alkalmazkodni.

5.) *„A humán vizsgálatok eredményeinek ismertetése lényegében kimerül a vizsgált betegségekben – Wilson-kór, primer biliáris cirrhosis, hepatocelluláris carcinoma, migrén, cluster-fejfájás, akut ischemias stroke, krónikus stabil angina pectoris és perifériás érbetegségek – mért nociceptin szintek ismertetésében.”*

Vizsgálataim előtt ismeretlen volt a plazma nociceptin szint alakulása a vizsgált kórképekben. A ténymegállapítást jelentő új eredmények esetében opponensem a mechanizmus(ok) ismertetését kéri, mely az irodalmi adatok tükrében Wilson-kór esetében a nociceptin inaktivációs útjának gátoltságára utal (80. oldal), primer biliáris cirrhosis esetén az antimitokondriális antigén kötődés és a citotoxikus reakció okozta progresszív máj-parenchima sejt károsodásból adódhat (81. oldal), migrén és cluster-fejfájás esetén a n. trigeminus területén kialakuló neurogén gyulladásnak (83. és 84. oldal) tudható be. A májcirrhosis és hepatocelluláris carcinoma vonatkozásában Fisher 344 patkányokon létrehozott állatkísérletes modellen is megerősítettük a klinikai anyagon igazolt eredményeinket, mely vizsgálatok Hantos Mónika PhD disszertációjának részét képezi [Hantos M. PhD disszertáció, Semmelweis Egyetem, 2003]. A migrénes betegek esetében, akiknél a fejfájás-mentes periódusban tapasztalt alacsony nociceptin-szint a fejfájás-roham idején további drámai csökkenést mutatott, a neurogén gyulladással való kapcsolatot látszik igazolni. Elgondolásunk helyességét támasztják alá a patkányon létrehozott Moskowitz-migrén modellen nyert adataink is. [Ertsey C., Bizderi B., Hantos M, Gyenge M., Tekes K. Plasma nociceptin levels decrease after trigeminal stimulation Cephalalgia 2007,27:1183-1184.]

6.) *„Az eredmények megbeszélése” fejezetben a Jelölt kiemeli, hogy a streptozotocin diabetes a neuropathiás fájdalom modellje, és ebben a kontextusban diszkutálja az eredményeket. A vizsgálatok valójában nem alkalmasak arra, hogy eldöntsék, hogy a nocistatin-szint változások a diabeteses anyagcsere zavarral vagy a neuropathia kialakulásával függenek-e össze. Érdemes lett volna ezért egyéb diabeteses állatmodellekben illetve más neuropathiás állatmodellekben is megvizsgálni a nociceptin/nocistatin szintek változásait.”*

A streptozotocinnal kiváltott krónikus diabetesz-modellt Courteix és mtsai (Pain, 1993,53:81-88) részletes analízise alapján tekintetűk a diabeteszes neuropátia metabolikus modelljének. A tartósan (vizsgálatainkban 16 héten át) fennálló diabetes mellitus-ra jellemző komplex metabolikus zavar, mint lehetséges oka a nocistatin-szint emelkedésnek nem zárható ki, de vizsgálataink ennek elemzésére nem terjedtek ki. Nagyon köszönöm opponensem azon felvetését, hogy egyéb diabetes-modellben, ill. neuropathiás modellben is érdemes lett volna megvizsgálni a nociceptin/nocistatin szintek változását. Az időközben történt, jelenleg közlés alatt lévő vizsgálataink azt mutatják, hogy a streptozotocinnal kiváltott kísérletes diabetesben szignifikánsan csökken a pancreas Langerhans sejtjeinek nociceptin-pozitív immunfluoreszcenciája, ami az irodalmi adatok tükrében a nociceptinnek a diabetesben betöltött szerepére utalhat. [Adeghate E, Ponery AS. The role of leucine-enkephalin on insulin and glucagon secretion from pancreatic tissue fragments of normal and diabetic rats. Arch Physiol Biochem. 2001,109:223-229].

7.) „5.6. fejezetben a Jelölt megállapítja, hogy a „nociceptin kutatás kezdeti időszakától ismert volt, hogy az exogén nociceptin jelentős hatással van a biogénaminok (szerotonin, dopamin, noradrenalin) anyagcseréjére (Werthwein et al. 1999, Siniscalchi et al. 1999, Schlicker and Morari 2000). Eltekintve a bibliográfiai adatok idézésének formai hibáitól, a probléma az, hogy a hivatkozott cikkek nem a biogén aminok anyagcseréjének változásait taglalják nociceptin kezelés után, hanem azt bizonyítják, hogy a nociceptin (preszinaptikusan) gátolja a noradrenalin- és szerotonin felszabadulást, elsősorban in vitro kísérletekben. Ezek a hivatkozások félrevezetőek, és irrelevánsak a Jelölt által nociceptin imprintingként említett jelenség vonatkozásában. Az is nehezen érthető, hogy a 12-13. táblázatokban a Jelölt a változások irányát nyilakkal jelzi, ahelyett, hogy a mérési adatokat és azok statisztikai elemzését tüntetné fel.”

Valóban Werthwein és mtsai (1999) és Siniscalchi és mtsai (1999) idézett publikációi in vitro kísérletekben elemezték a nociceptin noradrenalin- és szerotonin-felszabadulásra gyakorolt gátló hatását. Schlicker és Morari (2000) összefoglaló közleménye azonban részletesen tárgyalja a különféle in vitro és az in vivo módszerekkel nyert adatokat nemcsak a nociceptinnek a noradrenalin-, dopamin- és a szerotonin-felszabadulásra hanem az acetilkolin, a glutamát és a GABA-neurotranszmisszióra kifejtett hatása vonatkozásában is. Ez utóbbi közlemény tárgyalja Di Giannuario és mtsai [Di Giannuario A., Pieretti S., Catalani A., Loizzo A. Orphanin FQ reduces morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens: a microdialysis study in rats. Neurosci Lett, 1999,272:183–186] azon kísérleteit is, melyben a nociceptin gátló hatását elemezték a morfin-kiváltotta dopamin, DOPAC és HVA felszabadulásra, ezért alkalmaztam a „biogén aminok anyagcseréje” kifejezést. Opponensem szerint ez a megfogalmazás pontatlan volt, amit elfogadok. A bibliográfiai adatok idézésének formai hibáira való utalást sajnos nem tudom értelmezni.

A hormonális imprinting vizsgálatainkban a liquor és agyterületek szöveti noradrenalin, dopamin és szerotonin, ill. ezen biogén aminok fő metabolitjainak (HVA, ill. 5HIAA) szöveti koncentrációját is mértük ami mind a nociceptin mind a nocistatin esetében új

adatnak minősül. Az újszülött patkányoknál β -endorfinnal végzett imprinting vizsgálatainkban négy agyterület (hypothalamus, hippocampus, frontális kéreg és agytörzs) esetén a szerotonin turnover fokozódását állapítottuk meg, mely a csökkent szerotonin-szintek és emelkedett 5HIAA szintek tükrében a szerotonin anyagcsere változására utal.

A kritizált 12. és 13. táblázatban a noradrenalin, a dopamin, a HVA, a szerotonin és az 5HIAA koncentrációk változását a liquor, a hypothalamus, az agytörzs, a hippocampus, a striatum és a frontális kortex szöveti szintjére mind hím mind nőtény állatokban tüntettem fel a 11. táblázatban megadott kontroll értékekhez viszonyított statisztikai elemzés alapján. A változások és ezek irányának jobb áttekinthetősége érdekében választottam a nyilakkal történő ábrázolást a $p < 0,05$ szinten szignifikáns változások esetén, míg a $p < 0,05$ szintű eltérést nem mutató adatok esetén az „ns” jelölést alkalmaztam.

8.) „A 6.2. fejezetben Jelölt az újszülöttkori béta-endorfin imprinting hatását is tárgyalja a nocistatin szintre. A diszkusszióban Jelölt szerint eredményeik a dopamin ill. szerotonin szintek csökkenésére vonatkozóan összhangban vannak azon irodalmi adatokkal, amelyek a nociceptin ezen biogén aminok felszabadulására kifejtett hatását mutatták ki. Talán nem szükséges részletezni, hogy a nociceptin biogén aminok anyagcseréjére és felszabadulására kifejtett hatásai nem feltétlenül állnak egymással ok okozati összefüggésben.”

Egyetértek opponensem azon megállapításával miszerint a nociceptinnek a biogén aminok anyagcseréjére kifejtett hatása nem magyarázható a β -endorfinnal végzett újszülöttkori hormonális imprintingnek a nocistatin plazma és liquor-szintjét emelő hatásával. A kritizált 6.2 fejezetben (93. oldal) a következő áll „A β -endorfinnal végzett imprinting kiváltotta szerotonin-szint csökkenés és 5HIAA szint emelkedés (5HT turnover fokozódás) vizsgálataink alapján nem eldönthetően vagy a megemelkedett nocistatin-szintnek vagy a nocistatin hatásához hozzáadódóan a β -endorfin közvetlen hatásának is betudható.”

9.) „Az értekezés erősen szerteágazó tematikájából is feltűnően „kilóg” a biszpiridinum aldoximoknak a központi idegrendszer biogén amin koncentrációjára kifejtett hatásainak ismertetése. Ezeknek a vizsgálatoknak nehéz meghatározni az értekezés egyébként is rendkívül szerteágazó tematikájához való logikai kapcsolódását.”

Elfogadom opponensem kritikai megjegyzését hozzátéve, hogy ezek az adatok is új eredmények és azt mutatják, hogy a HPLC-vel végzett biogénamin-méréseink optimalizált módszerrel történtek.

10.)” Meggyőződésem szerint egy akadémiai doktori, de lényegében minden tudományos igényű traktátus sine qua non-ja, hogy jól körvonalazott feltételezésekből

induljon ki, amelyek a rendelkezésre álló ismeretanyagon és előzetes kísérleti eredményeken alapulnak.,,

Egyetértek opponensem véleményével, miszerint minden új kísérletes munkát a rendelkezésre álló ismeretanyagon és előzetes kísérleti eredményeken kiindulva kell végezni. Mint ahogy a „Célkitűzések”-ben szerepel munkánk kezdetén nem álltak rendelkezésre irodalmi adatok a nociceptin klinikai jelentőségére vonatkozóan. A publikációk kísérleti állatokban a nociceptin és a NOP receptor szöveti kifejeződésére, ill. az exogén nociceptin-kiváltotta hatásoknak, döntően in vitro rendszerekben történő vizsgálatára korlátozódtak annak lényegi ismerete nélkül, hogy a nociceptin endogén szintje milyen kórfolyamatokban, humán betegségekben bírhat jelentőséggel. Úgy gondoljuk, hogy az endogén nociceptin-szint változások, a nociceptin és nocistatin szabályozó szerepének megismerése egyrészt új gyógyszer-célpontok meghatározását segítheti elő, másrészt a jelenleg több mint 600 szabadalmaztatott szintetikus NOP receptor ligand közül kifejlesztésre kerülő potenciális gyógyszerek várható mellékhatásainak feltérképezhetőségéhez járulhat hozzá.

11.) *„Tekintettel arra, hogy társzerzői nyilatkozatokat nem találtam a hozzám eljuttatott anyagban, nehéz állást foglalni a tekintetben, hogy az értekezésben ismertetett eredmények mennyiben tekinthetők a Jelölt saját szellemi teljesítményének.”*

A társszerzői nyilatkozatok hiánya arra vezethető vissza, hogy azok jelenleg nem szerepelnek az akadémiai doktori értekezéshez csatolandók listáján. Eleget téve opponensem kívánságának, ezeket a nyilatkozatokat beszereztem, és mellékelem.

Opponensem arra vonatkozó kérdésére, hogy az értekezésben szereplő eredmények mennyiben tekinthetők saját szellemi teljesítményemnek szeretném megemlíteni, hogy a nociceptinerg rendszer szerepének vizsgálata során a klinikus partnereket és egyetemi kutatóhelyen dolgozó kollégákat én vontam be a témába, a vezetésemmel működő nociceptin-munkacsoport kutatási eredményeiből eddig három PhD disszertánsom védte meg értekezését, további megvédett 4 PhD disszertáció és egy MTA doktori disszertáció részét képezték a laboratóriumunkban született eredmények, 26 eredeti közlemény jelent meg, ezek összesített impakt-faktora közel 50 és a független idézések száma az értekezés benyújtásakor is meghaladta a 130-at.

12.) Opponensemnek a 21. és 22. ábra túlságosan kicsiny betűméretére, a 23. ábra minőségére, a 26.- 32. ábrák angol feliratozására - vonatkozó észrevételét elfogadom.

Szeretném megjegyezni, hogy disszertációm megfelelő részei valóban korlátozódnak a „Célkitűzések”-ben megfogalmazott betegcsoportokon és állatkísérletekben mért eredményeim ismertetésére és igyekeztem a belőlük levonható következtetések mértéktartó diszkussziójára. Nem értek egyet opponensem „motto”-jával, miszerint „egy rossz elmélet jobb, mint semmi”, hiszen vizsgálatainkban olyan új összefüggéseket tártunk fel, melyek a nociceptin-rendszer szerepének további megértése és a NOP

receptor mint terápiás célpont tekintetében nem hagyhatók figyelmen kívül. Se a kutató munkám során se egyetemi oktatóként se a magánéletben nem szándékoztam soha senkit félrevezetni egy rossz/valótlan megállapítással vagy elmélettel.

Végezetül megköszönve opponensem alapos és részletes bírálatát, tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Budapest, 2014. április 16.



(dr. Tekes Kornélia)