

Válasz

dr. Komoly Sámuel , az MTA doktora opponensi véleményére

Tisztelt Professor Úr!

Nagyon köszönöm hozzáértő, szakszerű és egyben alapos munkáját dolgozatom bírálása során.

Elismerő szavait a nociceptin-nocistatin rendszerrel kapcsolatos szakirodalmi tájékozottságomra, az eredmények világos megfogalmazottságára, ezek jó dokumentáltságára, a disszertációban közölt eredmények közölségére, a tudományos felismeréseink hitelességére vonatkozóan nagyon szépen köszönöm.

Kérdéseire az alábbiakban szeretnék válaszolni:

1.) „A bevezető irodalmi áttekintésben 29 oldalon az irodalomjegyzékben felsorolt 197 vonatkozó közlemény alapján részletesen taglalja a szerző a nociceptin-nocistatin rendszerrel kapcsolatos szakirodalmi adatokat, ami alapos tájékozottságra utal. Sajnálatosan az áttekintés pontatlanságokat is tartalmaz. Néhányat kiemelve: 16. oldalon azt írja hogy „klinikai vizsgálatban” az antagonistá JTC-801 fájdalom csillapítóként, az antagonistá SB-612111 anti-parkinson szerként-, a parciális agonista ZP-120 akut szívelégtelenségben diuretikumként, az antagonistá TRK-820 viszketés csillapítóként került kipróbálásra. Az említett kijelentéseket a Medline adatbázisában ellenőrizve kiderült, hogy egyedül a TRK-820 antagonistával történtek klinikai vizsgálatok (sőt ezt a szer törzskönyvezésre is került viszketés kezelésére – ezt viszont a szerző nem említi). A többi, szerző által említett agonistát ill. antagonistát mint „ígéretes terápiás lehetőséget”, említik összefoglaló, áttekintő közlemények, ezekkel kapcsolatos klinikai vizsgálatokról beszámoló közleményeket nem találtam.”

Valóban, egyetemi kutatóhelyről ingyenesen elérni klinikai vizsgálatok eredményeit nem könnyű feladat. A disszertációban említett klinikai vizsgálatokba vont NOP receptor ligandokról egyrészt az FDA <http://clinicaltrials.gov> honlapról másrészt összefoglaló publikációkból szereztem az adatokat. A JTC-801 2003-ban kezdődött klinikai vizsgálatáról Zaveri [Zaveri N Peptide and nonpeptide ligands for the nociceptin/orphanin FQ receptor ORL1: research tools and potential therapeutic agents. Life Sci. 2003,73:663-678] cikkében lehetett először olvasni, de ahogy azt Largent-Milnes és Vanderah összefoglalója is megállapítja [Largent-Milnes TM, Vanderah TW Recently patented and promising ORL-1 ligands: where have we been and where are we going? Expert Opin Ther Pat. 2010,20:291-305] a vizsgálat eredményéről és jelenlegi állapotáról további információt nem közöltek . Az SB-612111 NOP receptor antagonistá klinikai I. fázis-vizsgálatáról Parkinson-betegek esetében Lambert összefoglalójából lehetett értesülni [Lambert DG. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. Nat Rev Drug Discov. 2008 Aug;7(8):694-710]. A NOP receptor antagonistá és KOP

receptor agonista hatású TRK-820 (nalfurafine, melyet a Toray fejlesztett, de jelenleg az Acologix gyárt) mint viszketés-ellenes vegyület klinikai vizsgálatáról Mustazza és Bastanzio [Mustazza C, Bastanzio G. Development of nociceptin receptor (NOP) agonists and antagonists. Med Res Rev. 2011 Jul;31(4):605-48.] összefoglalójában találni adatokat. A ZP-120 parciális NOP receptor agonista II. fázisú klinikai vizsgálatáról diuretikumként akut szívelégtelenségben Bignan és mtsai összefoglalójából [Bignan GC, Conolly PJ, Middleton SA, Recent advances towards the discovery of ORL-1 receptor agonists and antagonists Expert Opin. Ther. Pat. 2005,15:357-388] értesültem. Időközben további klinikai vizsgálatokat is végeztek, ill. szerveznek, pl. Woodcock és mtsai a NOP1 agonista SCH486757 köhögéscsillapító hatását vizsgálták placebo kontrollos és codein-hez hasonlított kettős, párhuzamos-csoportos multicentrikus vizsgálatban [Woodcock A, McLeod RL, Sadeh J, Smith JA. The efficacy of a NOP1 agonist (SCH486757) in subacute cough. Lung. 2010 Jan;188 Suppl 1:S47-52.] valamint a Serodus ASA cég izolált szisztolés hypertóniában multicentrikus IIa fázis vizsgálatot indított 2013-ban a ZP-120-szal, melynek generikus neve SER100 (http://www.serodus.com/product_pipeline).

Magát a nociceptint is klinikailag hatékonynak találták neurogén húgyhólyag okozta inkontinenciában [Lazzeri M, Calò G, Spinelli M, Malaguti S, Guerrini R, Salvadori S, Beneforti P, Regoli D, Turini D Daily intravesical instillation of 1 mg nociceptin/orphanin FQ for the control of neurogenic detrusor overactivity: a multicenter, placebo controlled, randomized exploratory study. J Urol. 2006,176:2098-102.] felvetve nem-peptid NOP receptor agonisták alkalmazását ebben a kórképben.

2.) „Az irodalmi áttekintés néhány – a forrás megjelölésével más közleményekből átvett - ábrája szintén kívánni valót hagy maga után. Például az 1. ábrán még a feliratokat sem fordította le magyarra (ez a többi ábrán többnyire megtörtént). Az 1. ábra eredeti angol feliratai ráadásul nagyon kisméretűek, színük alig emelkedik ki a háttérből, hogy alig olvashatók. Az 5. ábra, ami a nociceptin receptor agonisták és antagonisták potenciális terápiás felhasználását foglalja össze, nehezen értelmezhető. Nem derül ki, hogy a felsorolt lehetőségek közül melyik vonatkozik az agonistákra ill. antagonistákra, az sem derül ki hogy mit jelent az ábra szövegének színekódja, azaz mit jelentenek a feketével illetve pirossal nyomott szövegrészek.”

Az 1. ábra feliratait valóban nem fordítottam magyarra, viszont az ábraszövegben megadtam a rövidítések jelentését. Az 5. ábrán Lambert összefoglaló közleménye alapján [Lambert DG. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. Nat Rev Drug Discov. 2008 Aug;7(8):694-710] fekete betűkkel a humán szöveteken, ill. szerveken igazolt nociceptin-hatásokat tüntettem fel és piros betűkkel a potenciális gyógyszer-fejlesztési lehetőségeket. Ennek megfelelően pl. a nociceptinnek a légúti símaizom-összehúzódást gátló hatása a NOP receptor agonisták köhögéscsillapító gyógyszerként történő fejlesztéséhez szolgáltat alapot, vagy pl. a nociceptin vas deferens-összehúzódást gátló és vizelési reflex-gátló hatása a NOP receptor agonistáknak a neurogén húgyhólyag szindrómában történő felhasználását vetíti előre. A NOP receptor antagonisták pl. a Parkinson-kórban válhatnak új terápiás célpontokká a gyógyszer-fejlesztés számára [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], vagy a nociceptinnek mind az artériákon mind a vénákon megvalósuló (általános) vazodilatátor és mikrocirkulációt javító hatása a hipertónia terápiájában kínál új terápiás célpontot.

3.) *„Tekintettel a nociceptin rendkívül széles skálájú involváltságára a legkülönbözőbb élettani folyamatokban, hasznos lett volna az irodalmi áttekintést egy összefoglaló táblázattal zárni.”*

Elfogadom opponensem kritikáját, valóban segítette volna a nociceptin komplex hatásainak jobb áttekinthetőségét egy összefoglaló táblázat.

4.) *„Az utolsóként felsorolt kísérletekben azt vizsgálta, „hogyan kapcsolódnak a nociceptin – nocistatin rendszerhez a disszertáció többszöri áttanulmányozása során sem találtam. Kérdéseim ezzel kapcsolatban: Kaphatnék erre magyarázatot? Vagy valahol a disszertációban megvan az acetilcholinesteráz reaktivátor K27 és K203-al kapcsolatos vizsgálatok indoklása a nociceptin-nocistatin rendszerrel kapcsolatosan csak elkerülte a figyelmemet?”*

„A bioanalitikai módszerek leírása részletes, meggyőzőnek látszik, de azok validitásáról - ezen a területen nem jártas klinikusként - nem tudom magam kompetensnek véleményét alkotni.”

Elfogadva Komoly professzor úr kritikáját, a K-vegyületekkel történt vizsgálataim valóban nem igazán kapcsolódnak szervesen a nociceptin-nocistatin-rendszer jellemzésére irányuló kísérletekbe. Szerepeltetésükkel azt kívántam bemutatni, hogy olyan hidrofíli molekulák, mint a K27 és K203, melyek vér-agy gáton történő átjutása a fiziko-kémiai paramétereik alapján nem várható, mégis terápiás adagban be képesek jutni a központi idegrendszerbe intramuszkuláris adagolás után, valamint azt, hogy a HPLC-vel végzett biogénamin-méréseink optimalizált módszerrel történtek.

5.) *„Kissé zavaró, hogy a célkitűzéseket követető „ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK” fejezetben általánosságok mellett két állatkísérletes modell ismertetése szerepel, majd a human betegségek felsorolása ismertetése következik, utána újra az állatkísérletes vizsgálatokról van szó. Kérdésem: mi indokolja ezt a logikailag zavaró, nehezen követhető felépítést?”*

Azért választottam ezt a felépítést az „Anyagok és Módszerek” fejezetnek, mert el szerettem volna kerülni az egyes módszerek leírásánál az ismétléseket, így a 4.1 fejezetben adtam meg, hogy a patkánykísérletek mindegyikében Wistar patkányokat alkalmaztunk, itt szerepeltettem az állatok tartási körülményeit, az etikai engedély számát és a vér-, liquor és szövetminták izolálásának körülményeit. a 4.1.1 fejezetben a krónikus diabetesz-modell létrehozásának módját, a 4.1.2 fejezetben az

exogén nociceptin hisztamin és szerotonin anyagcserére gyakorolt hatásának vizsgálatára vonatkozó kísérleti elrendezést. A 4.2 fejezetben a vizsgált betegcsoportokat és a betegek demográfiai adatait, klinikai jellemzőit foglaltam össze. A 4.3 fejezetben az alkalmazott bioanalitikai módszereket, így a nociceptin és a nocistatin RIA-módszerrel történő meghatározását, a hisztamin-N-metiltranszferáz preparálását, a hisztamin radiometriás meghatározását, a biogén aminok és metabolitjaik RP-HPLC módszerrel történő mérését, a K-vegyületek RP-HPLC módszerrel történő meghatározását, ill. a RIA és a HPLC módszerek validálását írtam le. Úgy érzem, hogy ez a felosztás jobban áttekinthetővé teszi az alkalmazott módszereket, de opponensem szerint mégsem ez volt a legjobb csoportosítás. Véleményét elfogadom.

6.) „*A streptozotocin modellel kapcsolatban kritikai megjegyzésem: idézem a szerzőt - „A streptozotocinnal kiváltott krónikus diabetes-t a neuropathiás fájdalom metabolikus modelljeként alkalmaztuk (Courteix et al. 1993)” – ugyan akkor nem találtam egyetlen utalást sem arra, hogy meggyőződtek volna arról, hogy valóban kialakult az általuk streptozotocinnal kezelt állatokban neuropathia, illetve a fájdalomfeldolgozás zavara. Ennek igazolására számos módszer ismert, pl. Hargreaves K et al 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain 32:77–88, vagy hivatloznék a pécsi Szolcsányi-munkacsoport által kidolgozott módszerekre.*”

Természetesen jól ismerem és igen nagyra becsülöm Szolcsányi professzor úr és munkacsoportjának sokoldalú tevékenységét a gyulladós és nem-gyulladós fájdalom mérésének módszereire vonatkozóan, de sajnos az intézetünkben nem áll rendelkezésre nocicepció mérésére alkalmas műszer.

Elfogadom opponensem kritikai megjegyzését arra vonatkozólag, hogy saját kísérleteinkben nem mértük a streptozotocinnal kiváltott krónikus diabetes-modellben az állatok neuropathiás fájdalmát. Az idézett Hargreaves és mtsai közlemény [Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain. 1988,32:77-88.] valójában csak a thermális és a mechanikus ingerekre kialakuló hatásokat vizsgálja, míg az általunk elfogadott 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] közleményben négy különböző fájdalom-ingerre („tail immersion test”, „thermal stimulus”, mechanical stimulus”, formalin- test”) adott válaszok részletes analízise szerepel. Courteix és mtsai az alkalmazott fájdalom-ingertől függően a patkányok 80-90%-ában szignifikánsan különböző fájdalom-tűrést tapasztaltak 4 héttel a diabetes 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 összefoglalóban is szerepelnek.

7.) „A Wilson-kóros betegek klinikai ismertetőjéből hiányzik, hogy valamennyien genetikailag igazoltan Wilson kórosak voltak-e? Amennyiben nem, megtörtént-e a 24 órán keresztül gyűjtött vizeletből a réz meghatározás? Ez a kérdés azért is indokolt, mert a vizsgált 21 beteg közül csak 12 esetben említi Kayser-Fleischer gyűrű jelenlétét, ami a (24 órás rézürítés mellett) másik legérzékenyebb, közel specifikus jele neurológiai tünetekkel járó a Wilson-kórnak.”

A Wilson-kóros betegek diagnózisa és terápiája a Semmelweis Egyetem I.sz Belgyógyászati Klinikáján, a Szalay Ferenc professzor úr vezette Hepatológiai Munkacsoportban történt, aki szoros együttműködésben dolgozik Ferenci Péterrel, a bécsi IV.sz Belgyógyászati Klinika Gasztroenterológiai és Hepatológiai Osztályának vezetőjével [Folhoffer A, Ferenci P, Csak T, Horvath A, Hegedus D, Firneisz G, Osztoivits J, Kosa JP, Willheim-Polli C, Szonyi L, Abonyi M, Lakatos PL, Szalay F. Novel mutations of the ATP7B gene among 109 Hungarian patients with Wilson's disease. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2007,19:105-111; Firneisz G, Szonyi L, Ferenci P, Willheim C, Horvath A, Folhoffer A, Tulassay Z, Szalay F. The other mutation is found: follow-up of an exceptional family with Wilson disease. Am J Gastroenterol. 2004,99:2504-2505; Firneisz G, Lakatos PL, Szalay F, Polli C, Glant TT, Ferenci P. Common mutations of ATP7B in Wilson disease patients from Hungary. Am J Med Genet. 2002,108:23-28. ; Firneisz G, Szönyi L, Ferenci P, Görög D, Nemes B, Szalay F. Wilson disease in two consecutive generations: an exceptional family. Am J Gastroenterol. 2001,96:2269-2271.] valamint követve az EASL (European Association for the Study of the Liver) gyakorlati útmutatóját [EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. J Hepatol. 2012,56:671-685].

A Kayser- Fleischer gyűrű , bár jellegzetes a Wilson-kóros betegekre, csak 30-40%-ukban jelentkezik, a neurológiai tüneteket mutatók között azonban nagyobb előfordulást mutat. A d-penicillamin beadását követő 24 órás réz-ürítés mértéke akkor tekinthető diagnosztikai értékűnek, ha az eredeti érték a tízszeresére nő, ill. eléri az 1500-1600 mg/nap értéket. Saját vizsgálati csoportunkban nem követéses vizsgálatot végeztünk, hanem keresztmetszeti képet adtunk a Wilson-kóros betegek csoportjáról, így a d-penicillamin-kezelés hatására javuló klinikai/laboratóriumi értékek megfigyelésére nem volt módunk.

8.) „Az ischaemiás stroke betegek ismertetésével kapcsolatban: a 3. táblázatban helyesen „lacunaris stroke” szerepel, míg az eredményeket ismertető 7. táblázatban helytelenül „lacunaris területi keringészavart” említ – ez ugyan nem zavarja az eredmények értelmezését, de mindekképpen pontatlan megjelölés. A többi betegcsoport leírása, jellemzése korrekt.”

Köszönöm szépen opponensem megjegyzését, valóban mindvégig a „lacunaris stroke” kifejezést kellett volna használnom.

9.) „Mivel magyarázza, hogy az Önök mérései szerint a plazma nociceptin-szint nem mutatott korrelációt sem a májfunkciós értékekkel, sem a szérum réz-szintekkel, sem a neurológiai tünetek súlyosságával, sem a klinikai tünetek megjelenése óta eltelt idővel sem a Dpenicillamin- kezelés időtartamával?”

Nem könnyű egyértelmű és mérési eredményeken alapuló választ adni ezekre a kérdésekre különösen annak vetületében, hogy nem mértük a nociceptin inaktivációjában legfontosabb szerepű enzimek, így az aminoszteroid N és a nociceptinre specifikus endopeptidáz 24.15 aktivitását. Ismerve, hogy a Wilson-kór egy olyan genetikai meghatározottságú betegség, mely autoszomális, recesszív öröklődésű, a 13q14.1 helyen lokalizált, a rezept-transzportáló p-típusú ATP-áz kódoló gén mutációjából adódik, csak feltételezni tudjuk, hogy már a diagnózis idejére oly mértékben cserélődött ezekben a Zn-metalloproteáz enzimekben a Zn központi atom rézre, ami a nociceptin inaktivációját klinikailag szignifikáns mértékben gátolta. Figyelembe véve, hogy követéses vizsgálatot nem végeztünk és a betegek d-penicillamin kezelése folyamatos volt a vizsgált betegcsoportban, a klinikai tünetek/laboratóriumi értékek változását és a nociceptin-szintek időbeli alakulását nem volt módunk követni.

10.) „Migrénben a plazma nociceptin szint szignifikáns csökkenését találták. Az adatok önmagukban meggyőzőek, közlésre is kerültek. Fenntartásaim mindössze annyiban vannak, hogy a migrén gyakoriságához viszonyítva (élettartam prevalenciáját 10%-ra teszik) igen kis-számú beteget vizsgáltak: 4 aurával komplikált migrénes és 14 az aura nélküli migrénes beteg vett részt a vizsgálatban. Végeztek-e nagyobb betegszám bevonásával nociceptin szint méréseket és azok hasonló eredményt adtak-e? Összehasonlítottak-e olyan betegeket akik roham-, illetve intervallum terápiát kaptak? Más (független) munkacsoport megerősítette-e eredményeiket?”

Valóban, a migrén gyakoriságához viszonyítva a 14+4 fős vizsgált beteglétszám nem nagy, de a mérési eredmények egyértelmű interpretálhatósága érdekében és a szűkös anyagi források miatt olyan betegeket vontunk be a vizsgálatba, akik intervallum-terápiában nem részesültek és a roham-terápiára alkalmazott gyógyszereik felezési idejét is figyelembe véve hosszú ideje (72,15± 42,4 óra) nem rohamoztak. A PubMed adatbázisban nem találtam további, klinikai beteganyagot végzett vizsgálatról cikket, de a <http://www.sbir.gov> honlapon az olvasható, hogy a Department of Health and Human Services 217.525 USD összegű pályázati összeget ítélte oda a TRIGEMINA INC. Nancy Federspiel benyújtotta „Intranasal nociceptin for the treatment of migraine and head pain” című pályázatára 2009-ben valamint a www.clinicaltrials.gov adatbázis szerint a National Taiwan University Hospital NCT00155129 számú „The Role of CGRP and Nociceptin in Migraine” vizsgálatába résztvevőket toboroz.

11.) „Kardio-vaszkuláris kórképekben szenvedő betegek vizsgálata során ischaemiás stroke-ban a plazma nociceptin szint emelkedését, míg krónikus stabil angina pectoris és perifériás artéria-betegség esetében a plazma nociceptin szint csökkenését észlelték. Mi lehet annak a magyarázata, hogy hasonló etiológiájú (nagyon leegyszerűsítve érthetően alapuló) betegségekben a nociceptin szint ellentétes elmozdulását észlelték. Nem magyarázhatja-e ezt a relatíve kis betegszám? Megerősítették-e esetlegesen későbbi saját vizsgálataikban ezt a

megfigyelést, illetve közöltek-e mások a nociceptin szintek hasonló változásaira vonatkozóan megfigyeléseket ezekben a vascularis betegségekben?”

Az ischémiás stroke-betegekből a kórházba érkezésük utáni 6 órán belül kaptuk a vérmintát, így utalva Perera és mtsai összefoglaló közleményére [Perera NM, Ma HK, Arakawa S, Howells DW, Markus R, Rowe CC, Donnan GA. Inflammation following stroke. J Clin Neurosci. 2006,13:1-8.] úgy gondoljuk, hogy az akut stroke kiváltotta gyulladáshoz kapcsolódó reakcióban felszabaduló nociceptint mértük. [Buzas B, Rosenberger J, Kim KW, Cox BM Inflammatory mediators increase the expression of nociceptin/orphanin FQ in rat astrocytes in culture. Glia. 2002,39:237-246]

Arra vonatkozó kérdésére, hogy a krónikusan fennálló ischémiás állapotokban miért alacsony a plazma nociceptin-szint, sajnos egyértelmű választ adni nem tudok, erre vonatkozóan sem állatkísérletes sem klinikai beteganyagban végzett vizsgálatokat nem találni. Fontana és mtsai [Fontana F, Pizzi C, Bernardi P, Pich EM, Bedini A, Spampinato S Plasma nociceptin/orphanin FQ levels in response to the hyperventilation test in healthy subjects. Peptides. 2010,31:720-722] egészséges személyekben vizsgálták a hiperventillációs teszttel létrehozott hypocapniás alkalózis hatását megállapítva, hogy azoknál, akiknél vérnyomás-csökkenés jött létre a plazma nociceptin-szint szignifikáns csökkenése volt tapasztalható. Saját vizsgálatunkban a viszonylag kis beteglétszám (n = 34) miatt is a mérési eredményeket igen sokoldalú statisztikai elemzésnek vetettük alá, azaz Brown-Forsythe ANOVA tesztet és Games-Howell post-hoc tesztet alkalmaztunk, faktor-analízist használtunk a betegek változó paraméterei és a plazma nociceptin-szint közötti, esetleg nem látszó összefüggések feltárására, a betegek folyamatos jellemzői és a plazma nociceptin-szint közötti összefüggések vizsgálatára lineáris és nem-lineáris regressziós módszert alkalmaztunk, így minimalizáltuk a viszonylag kis beteglétszám miatt esetleg rejtve maradó hibákat. Jelenleg újabb betegcsoport(ok) vizsgálatáról még csak terveket készítünk Sótonyi Péter docens úrral.

Hálásan köszönöm opponensem hozzáértő és részletes bírálatát, tisztelettel kérve válaszaim elfogadását.

Budapest, 2014. május 6.

dr. Tekes Kornélia

(dr. Tekes Kornélia)