Válaszok Dr.Tajti János címzetes egyetemi docens MTA doktora opponens kérdéseire, melyeket a CHARACTERIZATION OF NEW ANTINOCICEPTIVE LIGANDS IN A RAT MODEL: PRECLINICAL STUDIES című Ph.D. dolgozattal kapcsolatban megfogalmazott.

Tisztelt Tanár Úr !

Először is szeretném megköszönni, hogy elvállalta Ph.D munkám opponensi felkérését.
Köszönöm munkám részletes, mélyreható elemzését és számomra kedvező bírálatát. A formai hiányosságokat érintő észrevételeit köszönöm, későbbi munkám során ezekre nagyobb gondot fogok fordítani.

A Tanár úr által feltett kérdéskre a következő válaszokat adom:

1. Mi lehet az oka, hogy egyes állatok „nem válaszoltak" az intratekális ketéterezésre?

Az intratekális kanül technikáját kis állatok kísérletes vizsgálatába Yaksh és Rudy vezette be (Yaksh és Rudy 1976). A kanül végének helymeghatározásában úttörő munkát végzett az Élettan Intézet Magatartásfarmakológiai Laboratóriuma (Dobos és mtsai, 2003), ennek a munkának a figyelembevételével végeztük kísérleteinket. A beavatkozást követően azokat az állatokat, amelyekben neurológiai deficit jelentkezett és/vagy 100 µg lidokain beadása nem okozott bénulást, kizártuk a további vizsgálatból. Ennek okát a továbbiakban nem vizsgáltuk, de a fent említett közlemény nyomán ismert, hogy a bevezetett kanül kerülhet az epidurális vagy a subdurális térbe, illetve a gerincvelőbe, melyek bármelyike okozhatta a lidokain hatástalanságát.

2. Véleménye szerint az EMD3, EMD4, milyen humán betegségekben kaphatna terápiás szerepet?

Az ópioid peptidek kutatásának fő célkitűzése, hogy olyan új készítményeket fejlesszenek ki, melyek képesek hatásában kiváltani vagy felülmúlni a morfint annak ismert mellékhatásaitól mentesen. Tóth Géza professzor úr munkacsoportja különböző pozíciókban módosított EM-2 származékokat hoztak létre azáltal, hogy az egyes aminosavakat módosították 2',6'-dimetil-tirozinra (Dmt^1)-re, 2-aminociklohezán-karboxilsavra [cis-(1S,2R)$Achc^2$/cis-(1R,2S)$Achc^2$], β-metilfenilalaninra [(2R,3R)β$MePhe^4$/(2S,3S)β$MePhe^4$] és para-fluorfenilalaninra ($pFPhe^4$), mely proteolítikusan stabil vegyületet eredményezett (Mallareddy és mtsai, 2011). Az in vitro vizsgálati eredmények azt igazolták, hogy a Dmt^1 és $Achc^2$-t tartalmazó analógok fokozott MOR kötődési aktivitással rendelkeznek, függően a beépült $Achc^2$ konfigurációjától. A származékok kombinálása $pFPhe^4$-val vagy β$MePhe^4$-val még fokozta kötődési potenciált, míg a hatásosságuk nem különbözött az eredeti ligandtól. Vizsgálatunk során ezen módosított EM-2 származékokat vizsgáltuk, és kimutattuk, hogy a legkomplexebben módosított derivátumok az EMD3: Dmt-(1S,2R)Achc-Phe-pFPhe-NH2 és EMD4: Dmt-(1S,2R)Achc-

Phe-(2S,3S)bMePhe-NH2) alkalmazása mellett kaptuk a legjobb eredményeket. Az EMD3 az utolsó időintervallumban (75-120 min), míg az EMD4 a teljes vizsgálati periódusban hatásosabb volt az EM-2-nél. A derivátumok mellékhatás profiljának meghatározása egy másik kísérletsorozat feladata, de amennyiben ezen derivátumok ebben a tekintetben is eredményesek, a klinikai felhasználásuk sem kizárt.

A klinikumban a morfin kiváltható lenne a műtét utáni fájdalomcsillapításban, és egyes krónikus fájdalom szindrómákban (daganatos fájdalomcsillapítás), elsősorban a spinalis térbe adva. További vizsgálatot kíván annak kiderítése, hogy lokális alkalmazásuk ezen ligandoknak hogyan befolyásolja a fájdalomküszöböt.

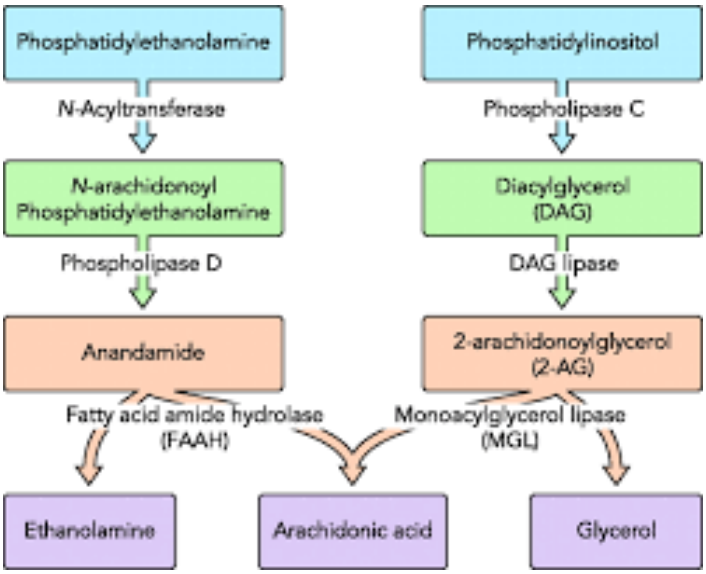
3. Ismert a kannabinoidok és az arachidonsav rendszer kapcsolata. A nem szteroid gyulladásgátló készítmények miként befolyásolhatják a kannabinoidok hatását krónikus fájdalom syndromában?

Mind az endokannabinoidok és a prosztaglandinok is a telítetlen zsírsav, az arachidonsav (AA), származékai, és mind a szintézisükben és metabolizmusukban sok átfedés van.
Az AA-ból a cikloxigenáz enzimek (COC-1, COX-2) révén prosztaglandinok, prosztaciklinek és thromboxán képződik, míg lipoxigenáz enzimek (LOX) leukotriéneket szintetizálnak.
A nem szteroid gyulladáscsökkentő készítmények (NSAID) hatásukat a prosztaglandin szintézis gátlása révén fejtik ki (ciklooxigenáz, COX). Ennek két izoformája COX-1 és COX-2 ismert. A COX-1 a normal sejtek alkotóeleme, míg a COX-2 izoforma elsősorban a gyulladásos sejtekben található.

A 2-arachidonoil glycerol (2-AG) szintézise a menbránalkotó foszfolipid, a foszfatidilinositol-4,5 biszfoszfátból indul ki (PIP2), mely a foszfolipáz Cβ (PLCβ) hatására inositol trifoszfátra (IP3) és diacil-glicerinre bomlik (DAG). A 2-AG (1. ábra) a DAG-ból keletkezik egy zsírsav lehasításával a dialcil-glicerin lipáz (DGL) enzim közreműködésével (Bisogno és mtsai, 1997). Ezen ismert fő útvonal mellett alternatív úton is keletkezhet 2-AG, úgymint a foszfatidil-inozitolból a foszfolipáz A1 hatására lizo-foszfatidil-inozitol keletkezik, amelyet PLC bont 2-AG-ra (Ueda és mtsai, 1993), illetve foszfatidsav hidrolizise során is képződhet 2-AG (Bisogno és mtsai, 1999).
A 2-AG lebontása során (1. ábra) hidrolízis eredményeként glicerin és AA keletkezik monoacil-glicerin lipáz (MGL) közreműködésével (Karlsson és mtasai, 1997; Dinh és mtsai, 2002, 2004). A kutatások ezen fő lebontási útvonal mellett alternatív útvonalakat is feltártak, így α/β hidroláznak is szerepe lehet a lebontásban (Blankman és mtsai, 2007), ugyanakkor a COX-2 oxidálhatja a 2-AG-t (Kozak 2000).

Az anandamid szintézise (1. ábra) alapvetően két ezimatikus lépésben történik. A folyamat első lépéseként egy N-acil-transzferáz enzim a membrán foszfatidil-kolinjának arachidonil csoportját áthelyezi a foszfatidil-etanolaminra, így létrejön az N-acil-foszfatidil-etanolamin, mely egy további lépésben N-acil-foszfatidil-etanolamin-hidrolizáló foszfolipáz D (NAPE-PLD) segítségével foszfatidsavra és anandamidra hasad (Okamoto és mtsai, 2004). Az anandamide a makrofágokban

tirozin foszfatáz éa az N-acil-etanolamin-hidrolizáló foszfolipáz C közreműködésével jön létre (Liu és mtsai, 2006). Az anandamid lebontásában elsősorban a zsirsavamid-hidroláz (FAAH) (Cravatt és mtsai, 1996) vesz részt, melynek során AA és etanolamin keletkezik, de felmerült egyéb enzimek szerepe is a folyamatokban, beleértve a COX-2-t (Woodward és mtsai, 2008, Ueda és mtsai,2001).



1. ábra

Tehát mindkét endogen ligand lebontása során keletkezik AA, mely tovább alakulva COX által létrehozhatja a prosztaglandinokat, továbbá a COX-2 mind az AA és a 2-AG lebontásában szerepel Ugyanakkor kevés, és ellentmondásos adat áll rendelkezésre a kannabinoidok és a COX gátlók interakciója tekintetében, mely arra utal, hogy további vizsgálatok szükségesek a két rendszer interakciójának a vizsgálatára (Paunescu és mtsai, 2011).

4. Mi lehet a magyarázata, hogy a hemopresszin önmagában nem csillapította a fájdalmat modelljükben?

Néhány tanulmány a hemopresszin (HP) fájdalomcsillapító hatását tapasztalta mechanikai allodíniában (lábnyomási teszttel) intraplantáris, orális, intraperitineális és intratekális alkalmazás mellett karragén talpba adása után (Dale és mtsai 2005, Heimann és mtsai, 2007), mely eredmények ellentmondanak az általunk tapasztaltaknak. Ennek oka az lehet, hogy mi az ízületbe adtuk a karragént, mely nagyobb mértékű fájdalmat válthatott ki, illetve mi nem lábnyomási tesztet, hanem von Frey tesztet alkalmaztunk.

5. Ismertesse az allodynia és a szenzitizáció folyamata közötti kapcsolatot.

Szenzitizáció során a neuronok egy nem változó ingerre fokozott afferens választ adnak. Két fő formáját különböztethetjük meg perifériás és centrális formát. Elsőként Perl hivta fel a figyelmet perifériás nociceptorok sérülést követő érzékenységére (Perl 1976). A perifériás szenzitizáció során egy magas ingerküszöbű nociceptor kémiai stimulus hatására alacsony ingerküszöbűvé válik. A kémiai stimulust a sérült szövetei reakció során felszabadult citokinek (interleukin-1, -6,-α, -β, tumor necrosis faktor-α),

gyulladásos mediátorok (bradikinin, hisztamin, szerotonin, prosztaglandin E2) jelentik, illetve idegnövekedési faktorok hatására a feszültségfüggő Na^+ csatornák száma (és ezzel az ingerlékenység) megnő.

A másodlagos neuronok szenzitizációját centrális szenzitizációnak nevezzük (Woolf 1983). Kialakulásában szerepet játszik a glutamát receptorok (NMDA és AMPA), a nitrogén monoxid szintáz és számos foszforilációs enzim aktivitásának fokozódása (Párdutz és mtsai, 2000, Salter 2012).

A szenzitizáció megjelenését tekintve két formáját különböztethetjük meg: az allodíniát és a hiperalgéziáziát. Allodínia során az egyed a korábbi nem fájdalmas ingerre fájdalom válasszal reagál, míg hiperalgézia során a fájdalmas ingerre fokozott fájdalom választ ad. LaMotte kísérlete igazolta, hogy míg a kapszaicin illetve hő által kiváltott fájdalmat C típusú rostok közvetítik, addig mechanikai allodínia során az alacsony ingerküszöbű myelinizált rostok aktívak (LaMotta és mtsai, 1992).

A klinikai megjelenési formák közül a centralis szenzitizáció felmerült és igazolódott, reumatoid artritisz, oszteoartritisz, temporomandibuláris betegség, fibromialgia, fejfájás (tenziós típusú), neuropátiás fájdalom, komplex regionális fájdalom szindróma, sebészi beavatkozás utáni fájdalom, viscerális fájdalom, érzékenyégi szindrómák (irritábilis bél szindróma, nem szíveredetű mellkasi fájdalom, endometriózis, krónikus hasnyálmirigy-, húgyhólyag- és prosztata gyulladássok) esetében.

Ismereteink bővülése lehetővé teszi a fenti kórképek hatásosabb kezelést, melynek alapját ma elsősorban antikonvulzivumok, antidepresszánsok, triciklikus antidepresszánsok jelentik.

Válaszomban idézett közlemények jegyzéke:

Bisogno T, Sepe N, Melck D, Maurelli S, De Petrocellis L, Di Marzo V. Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. Biochem J. 1997;322:671–77.

Blankman JL, Simon GM, Cravat BF. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. Chem Biol. 2007;14:1347-56.

Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acidamides. Nature 1996;384:83-87

Dale CS, Pagano RdL, Rioli V, Hyslop S, Giorgi R, Ferro ES. Antinociceptive action of hemopressin in experimental hyperalgesia. Peptides 2005;26:431-6.

Dihn TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:10819–24.

Dinh TP, Kathuria S, Piomelli D. RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. Mol Pharmacol. 2004 ;66:1260-4.

Dobos I, Toth K, Kekesi G, Joo G, Csullog E, Klimscha W,Benedek Gy, Horvath Gy. The significance of intrathecal catheter location in rats. Anesth Analg. 2003;96:487-92.

Heimann AS, Gomes L, Dale CS, Pagano RL, Gupta A, de Souza LL, et al. Hemopressin is an inverse agonist of CB1 cannabinoid receptors. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104: 20588-93.

LaMotte RH, Lundberg LE, Torebjörk HE. Pain, hyperalgesia and activity in nociceptive C units in humans after intradermal injection of capsaicin. J Physiol. 1992;448:749-64.

Mallareddy JR, Borics A, Keresztes A, Kover KE, Tourwe D, Toth G: Design, synthesis, pharmacological evaluation, and structure-activity study of novel endomorphin analogues with multiple structural modifications. J Med Chem. 2011;54:1462-72.

Karlsson M, Contreras JM, Hellman U, Tornquist H, Holm C. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalythic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases and haloperoxidases, J Biol Chem. 1997;272: 27218-23.

Kozak KR, Rowlinson SW, Marnett LJ. Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. J Biol Chem. 2000;275:33744-9.

Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, et al. A biosynthetic pathway for anandamide. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:13345-50.

Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. J Biol Chem. 2004;279:5298-305.

Pardutz A, Krizbai I, Multon S, Vecsei L, Schoenen J. Systemic nitroglycerin increases nNOS levels in rat trigeminal nucleus caudalis. Neuroreport. 2011;11:3071-3075.

Păunescu H, Coman OA, Coman L, Ghiţă I, Georgescu SR, Drăghia F, Fulga I. Cannabinoid system and cyclooxygenases inhibitors. J Med Life. 2011;4:11-20.

Perl ER, Kumazawa T, Lynn B, Kenins P. Sensitization of high threshold receptors with unmyelinated (C) afferent fibers. Prog Brain Res. 1976;43:263-77.

Salter MW. Dorsal horn plasticity and neuron-microglia interactions.In: Pain 2012, Refresher Courses. 14th World Congresson Pain. Ed.: Tracey I, IASP Press, Seattle, USA 2012.

Ueda N, Yamanaka K, Yamamoto S. Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance. J Biol Chem. 2001;27:35552-7.

Yaks TL, Rudy TA Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. Science 1976;192:1357-58.

Woodward DF, Carling RW, Cornell CL, Fliri HG, Martos JL, Pettit SN, et al. The pharmacology and therapeutic relevance of endocannabinoid derived cyclo-oxygenase (COX)-2 products. Pharmacol Ther. 2008;120:71-80.

Woolf CJ. Molecular signals responsible for the reorganization of the synaptic circuitry of the dorsal horn after peripheral nerve injury: The mechanisms of tactile allodynia. In: Molecular Neurobiology of Pain, Progress in Pain Research and Management.Ed.: Borsook D, IASP Press, Seattle, USA, 1997.

Tisztelt Tanár Úr !

Bízom abban, hogy a felvetett kérdéseire adott válaszaim elfogadja, ezáltal is támogatva dolgozatomat.

Kecskemét, 2017. június 2.

Tisztelettel:

Dr. Kovács Gyula