

Vélemény Pethő Gábor MTA doktori értekezés téziseiről

Az értekezés a termonocicepció, azaz a forró ingerekkel kiváltott fájdalom vizsgálatával kapcsolatos állatkísérletes eredményeket bemutató 205 oldal terjedelmű írásmű, amely a szerző 16 közleményének anyagán alapul. A 30 oldalas bevezetést egy rövid, általános célkitűzés követi, majd a szerző ismerteti az értekezés további részének logikai struktúráját. Eszerint három fejezetbe sorolva mutatja be eredményeit: (i) a nociceptorok forró ingerre adott válaszána vizsgálatát in vitro elektrofiziológiai és neurokémiai módszerekkel alaphelyzetben és szenzibilizált állapotban (4 közlemény anyaga); (ii) a nociceptív hőküszöb mérésére alkalmas műszerek és a hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodynia-modellek kifejlesztése és validálása (5 közlemény anyaga); (iii) a nociceptív hőküszöb mérésének alkalmazása a TRPV1-receptor funkciójának és a termonocicepció mechanizmusainak vizsgálatában (7 közlemény anyaga). Ezen fejezeteken belül előzmények, célkitűzések és módszerek bemutatását követően kerülnek ismertetésre az eredmények és megbeszélésük. Dicséretes módon a szerző minden kísérletsorozat bemutatásának a végén pontokba szedve összefoglalja a fontosabb következtetéseket. Helyenként közleményenkénti bontásban ismerteti az egyes témaköröket, máshol – ahol a kísérletek logikája erre lehetőséget ad – több közlemény anyagát egybegyűrva történik a bemutatás. Mindezeket követően 4 oldalon összefoglalja a legfontosabb eredményeket és felismeréseket. Ezt követi a rövidítések jegyzéke, az értekezés alapját képező saját közlemények listája, a 478 tételből álló irodalomjegyzék és a köszönetnyilvánítás. Az értekezésben 83 ábra és 10 táblázat található. A fentiekben vázolt struktúra ugyan eltér a hagyományos Bevezetés-Célkitűzések-Módszerek-Eredmények-Megbeszélés szerkezettől, de egyrészt a kísérletek heterogenitása, illetve az eredmények jelentős részét képező metodikai fejlesztés indokoltá teszi, másrészt nem okoz nehézséget a szöveg követésében. Az ábrák jó minőségűek, és az ábramagyarázatok is minden szükséges információt – beleértve az alkalmazott statisztikai próbát is – tartalmaznak. Kritikaként említhető, hogy az eredeti közleményekből származó ábrák angol nyelvűek; elegánsabb lett volna azok magyarosítása. Mindent egybevetve az értekezés az akadémiai doktori disszertációknál elvárt/megszokott formai követelményeknek megfelel.

Az értekezés témaválasztása korszerű. A szerző a termonocicepció perifériás mechanizmusainak vizsgálatával foglalkozott abból a célból, hogy új típusú, a perifériás nociceptorokon ható analgetikumok kifejlesztését alapozza meg potenciális támadáspontok

azonosításával. Az effajta analgetikumokra nagy az igény a klinikum részéről, mivel a jelenleg használt fájdalomcsillapítók közül az opioidok számos központi idegrendszeri mellékhatással bírnak, és a prosztaglandin-szintézis gátlásával ható NSAID-ok hosszú távú alkalmazása is problematikus a különféle szervek prosztaglandin-depléciója révén fellépő mellékhatások végett. A szerző többféle módszert alkalmazott: az in vitro elektrofiziológiai (egyrostos-elvezetés) és neurokémiai módszereket (neuropeptid-felszabadulás mérésére, Ca imaging) jól kiegészítették az in vivo végzett magatartási, nociceptív tesztek. Az értekezés eredménye, hogy a tárgyalt eredmények koherensek, az összes tárgyalt kísérletsorozat felfűzhető egyetlen logikai vezérfonalra, a nociceptorok forró ingerekkel kiváltott válaszreakcióinak vizsgálatára.

Az elektrofiziológiai kísérletekben igazolást nyert az a tény, hogy az izolált patkánybőr C polimodális nociceptoraiban a bradikinin termális nociceptor-szenzibilizáló hatásában COX-termékek, köztük a PGE2/PGI2 igen fontos szerepet játszanak. Érdekes eredménynek tartom azt, hogy a kívülről bevitt PGE2/PGI2 fokozta a forró ingerrel kiváltott akciós potenciálok számát, de – nem várt módon – nem változtatta meg a rostok hőküszöbét, jelezve mindazt, hogy az aktivációs hőküszöb és a küszöbfeletti hőingerre adott válasz nagyságának szenzibilizálhatósága eltérő. Szintén nem várt eredmény, hogy a kívülről adott PGE2/PGI2 nem befolyásolta a hővel kiváltott CGRP felszabadulást jelezve azt a tényt, hogy a peptiderg polimodális nociceptorok afferens és efferens funkciójának szenzibilizálhatósága eltérő.

Az értekezésben bemutatott munka specifikuma, hogy jelentős része metodikai fejlesztés: a nociceptív hőküszöb mérésére alkalmas két készülék, az emelkedő hőmérsékletű forró lap, illetve vízfürdő ipari partnerrel történő kooperáció keretében történő konstrukcióját és validálását foglalta magába. Túlmenően ezekre a műszerekre adaptált, hőküszöbcsökkenéssel járó termális allodyniamodellek (talpba injektált RTX, enyhe hőtrauma, sebészi bemetszés) kifejlesztése és validálása is megtörtént. Bár a nociceptív hőküszöb állatkísérletes mérésének első, a szakirodalomban történő dokumentálása nem a szerző nevéhez köthető (ezt ő maga említi az értekezés 14. oldalán), az értekezésben bemutatott fejlesztés tekinthető az egyetlen komplex, integratív hőküszöbmérési megközelítésnek. A különféle hőküszöbmérési paradigmákban tesztelt referencia-analgetikumok (morfin, diclofenac, paracetamol, ibuprofen) ugyanolyan vagy több esetben jóval alacsonyabb dózisban voltak hatékonyak, mint az irodalmi adatok alapján a latenciamérési tesztekben. Kiemelkedő fontosságú eredménynek tartom azt, hogy potenciális analgetikumnak számító, perifériás támadáspontú TRPV1-antagonisták hatását a hőküszöbmérési paradigmákkal nagyságrenddel kisebb dózisban lehetett detektálni, mint a latenciamérés (Hargreaves teszt) esetében. Kritikai

megjegyzésem, hogy több összehasonlítás a latenciamérésen alapuló hagyományos termonociceptív modellekkel, illetve a mechanonociceptív küszöbvel további adatokat szolgáltatott volna a hőküszöbmérés előnyeiről és hátrányairól egyaránt. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő adaptálása egér farkán történő küszöbmérésre speciális állatbefogó hengerek alkalmazásával megnövelte a módszer verzatilitását, másrészt kiküszöböli az állat megfogásából eredő stressz torzító hatását. Génhiányos egerek vizsgálata kimutatta, hogy az egér farkán – ellentétben a talppal – a TRPV1 szerepet játszik a bazális nociceptív hőküszöb beállításában, illetve mindkét esetben a talpon a mustárolajjal kiváltott termális allodyniában.

A munka további pozitívuma, hogy a szerző az újonnan kifejlesztett hőküszöbmérési paradigmákat sokrétűen alkalmazta. Összehasonlította az enyhe hőtraumával kiváltott akut és a sebészi bemetszéssel keltett szubakut/krónikus hőallodynia mediátor-háttérét. A potenciális TRPV1-ligandum zsírsavamidok vizsgálata során a hőküszöbmérés mellett az intracelluláris Ca-szint in vitro mérése is történt TRPV1-gyel transzfektált sejtekben vagy trigeminális neuronok sejttestén. A szerző kimutatta, hogy az OLDA és a 3-MOLDA TRPV1-receptor-agonista hatásúak, míg a 4-MOLDA és az OEA antagonistaként viselkedett. A fent említett két módszer párhuzamos alkalmazásával az is kiderült, hogy alaphelyzetben a PKA állítja be a TRPV1-receptor agonisták iránti érzékenységet, a PKC nem, de stimulált formában mindkét enzim képes fokozni a TRPV1-receptor aktiválhatóságát.

Az értekezés legizgalmasabb kísérlet sorozatában az a hipotézis került tesztelésre, hogy a peptiderg nociceptorok izgatásával kiváltott, Pintér és Szolcsányi által 1998-ban leírt távoli, „szenzokrinnek” nevezett hatásnak a gyulladásgátló komponens mellett van-e fájdalomcsillapító összetevője. Elegáns kísérletes elrendezésben megállapították, hogy éber patkányban az akutan denervált jobb hátsó láb kémiai izgatása kapszaicinnel vagy mustárolajjal a bal hátsó lábon előzetes bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenést gátolta. Ennek kapcsán a plazma szomatosztatinszintje megnőtt. Farmakológiai tesztanyagok segítségével igazolást nyert az, hogy ennek a távoli termális antiallodyniás hatásnak a közvetítésében a szomatosztatinon kívül endogén opioidok is szerepet játszanak.

A nociceptív hőküszöb hosszú távú mérésével a szerzőnek sikerült kimutatni, hogy a patkány talpába adott kapszaicin és RTX, de nem az OLDA, tartós, több napig tartó hőküszöbemelkedést idéz elő, amely a TRPV1-agonisták idegvégződés-szintű deszenzibilizációjának a következménye. Arra is bizonyítékot szolgáltatott, hogy az RTX és OLDA alacsonyabb dózisban adva csak a TRPV1-receptort deszenzibilizálja anélkül, hogy tartós hőküszöbemelkedést, azaz végződésszintű deszenzibilizációt okozna.

Összességében elmondható, hogy az eredmények leírása precíz, jól követhető; az ábrákra való hivatkozás konzekvens. Az eredményekből levont következtetések megalapozottak, kellő mélységűek, nem túlzóak. A tárgyalásmód szabatos, a fogalmazás igényes. A szerző számos alkalommal él az értekezésen belüli kereszthivatkozás eszközével; ezekre vonatkozóan nem találtam említésre méltó kritikát. Megítélésem szerint az értekezés hiteles adatokat tartalmaz. Mindent egybevetve a doktori művet nyilvános vitára alkalmasnak találom.

Az értekezés tézisei közül az alábbiakat fogadom el fontosabb új eredményként

1./ Izolált patkánybőr C polimodális nociceptoraiban a bradikinin termális nociceptor-szenzibilizáló hatásában COX-termékek, köztük a PGE2/PGI2 jelentős szerepet játszanak. A kívülről bevitt PGE2/PGI2 növelte a forró ingerrel kiváltott tüskesisülések számát, de nem változtatta meg a rostok hőküszöbét, jelezve azt, hogy az aktivációs hőküszöb és a küszöbfeletti hőingerre adott válasz nagyságának szenzibilizálhatósága eltérő. A kívülről bevitt PGE2/PGI2 nem befolyásolta a hővel kiváltott CGRP felszabadulást, mutatva, hogy a peptiderg polimodális nociceptorok afferens és efferens funkciójának szenzibilizálhatósága szintén eltérő. A hőingerekkel kiváltott CGRP-felszabadulást nem gátolta a TRPV1-antagonista ruténiumvörös ill. capsazepin, jelezve, hogy a forró ingerek transzdukciójában a peptiderg primer szenzoros neuronok perifériás végződésében a TRPV1 szerepe elhanyagolható.

2./ Az újonnan kifejlesztett és validált két hőküszöbmérő készülék (emelkedő hőmérsékletű forró lap, illetve vízfürdő), illetve három hőküszöbcsökkenéssel járó paradigma (intraplantáris RTX-injekció, enyhe hőtrauma, sebészi bemetszés) segítségével patkányban nagy érzékenységgel detektálható mind a hagyományos (morfin, diclofenac, paracetamol), mind új hatásmódú analgetikumok (TRPV1-antagonisták) termális antinociceptív hatása.

3./ Az enyhe hőtraumával kiváltott akut és a sebészi bemetszéssel keltett szubakut/krónikus hőküszöbcsökkenés mediátor-háttere nagy mértékben hasonló: a B2 bradikininreceptor, a P2X purinoceptorok, a TRPV1-receptor, a prosztaglandinok és az NO mindkét modellben szerepet játszik, míg a hőtrauma esetében a lipoxigenáz-termékek, az incíziónál a B1 bradikininreceptor járulékos szerepe igazolódott.

4./ A potenciális TRPV1-ligandum zsírsavamidok közül az OLDA és a 3-MOLDA agonista hatásúak, míg a 4-MOLDA és az OEA antagonisták. Alaphelyzetben a PKA állítja be a TRPV1-receptor agonisták iránti érzékenységet, de stimulált formában mind a PKA, mind a PKC képes fokozni a receptor aktiválhatóságát.

5./ A decentralizált perifériás nociceptorok kémiai izgatása távoli termális antiallodyniás hatást vált ki, amelynek indukciója központi idegrendszeri ellenregulációs folyamatoktól független. E hatás közvetítésében szerepet játszik a szomatosztatin és endogén opioidok. Mindezek alapján a peptiderg nociceptorok izgatásával kiváltott távoli hatásnak nemcsak gyulladásgátló, hanem antinociceptív összetevője is van.

6./ A hőküszöbmérési paradigma adaptálása egér farokra speciális állatbefogó henger alkalmazásával kimutatta, hogy az egér farkán – ellentétben a talppal – a TRPV1 szerepet játszik a bazális nociceptív hőküszöb beállításában és a mustárolajjal kiváltott termális allodyniában mind a farkon, mind a talpon.

7./ A patkány talpába adott kapszaicin és RTX, de nem az OLDA, tartós hőküszöbemelkedést okoz, amely a TRPV1-agonisták idegvégződés-szintű deszenzibilizációjának a következménye. RTX és OLDA alacsonyabb dózisainak TRPV1-re korlátozódó deszenzibilizáló hatását is sikerült kimutatni.

A vélemény-nyilvánítóban felmerült kérdések az alábbiak:

1./ A szerző emelkedő hőmérsékletű forró lap, illetve vízfürdő segítségével mérte a hőküszöböt. Figyelembe véve a bevezetés 1.3.4. pontjában említett, az emberi bőrben mért termális fájdalomküszöböt befolyásoló tényezőket (melegítési ütem, szövetek termális tehetetlensége), mennyire tekinthető valósnak az állatokban mért nociceptív hőküszöb?

2./ Az előző kérdéshez kapcsolódik egy teoretikus felvetés. A szerző véleménye szerint ha pl. 45,5°C küszöböt mérünk az emelkedő hőmérsékletű forró lappal, illetve vízfürdővel a „ramp” típusú melegítés után, vajon ugyanerre a hőmérsékletre reagáltak volna az állatok, ha egyből ezt alkalmaztuk volna állandó hőmérsékletű stimulusként?

3./ A diclofenac-kal és a paracetamollal kapcsolatos eredmények alapján kimondható-e az, hogy a hőküszöbmérés alkalmas általában a nemszteroid gyulladásgátlók analgetikus hatásának vizsgálatára?

4./ A szerző nem közölt eredményként mutatja be, hogy a carrageninnel kiváltott szubakut gyulladással modellben jelentős latenciarövidülés volt mérhető az állandó hőmérsékletű forró lapon, de nem volt szignifikáns hőküszöbcsökkenés az emelkedő hőmérsékletű forró lapon.

Van-e a szerzőnek tapasztalata más kísérletes paradigmákkal kapcsolatban, amelyekben van latenciarövidülés, de nincs hőküszöbcsökkenés?

5./ A szerző meggyőzően érvel a nociceptív hőküszöb mérése mellett – a latenciaidő mérésének alternatívájaként –, felsorolva a hőküszöbmérés előnyeit. Vannak-e a hőküszöbmérési paradigmának hátrányai?

6./ Mekkora esélyt lát arra vonatkozóan a jelölt, hogy a nociceptív hőküszöböt mérő paradigmák bekerüljenek az analgetikumok gyógyszergyári tesztelésének rutin módszerei közé?

7./ Mely eredményeket tartja legjelentősebbnek transzlációs szempontból?

Összefoglalva megállapítom, hogy Pethő Gábor MTA doktori értekezésének tézisei megfelelnek az MTA doktori fokozat előírási követelményeinek, s a nyilvános vita kitűzését javaslom és támogatom.

2018. június. 22.

Tósaki Árpád
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszerhatástani tanszék
Debreceni Egyetem