

Válasz dr. Tótsaki Árpád egyetemi tanár opponensi bírálatára

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Professzor Úr alapos bírálatát, beleértve a dicsérő szavakat és a kritikai megjegyzéseket egyaránt. Az ábrák „magyarításának” elmaradásáért elnézést kérek.

A kérdésekre adott válaszaim 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?

1./ Amint azt az értekezés 1.3.4. pontjában említettem, fokozatosan emelkedő intenzitású, „ramp” típusú hőingerlés során a bőrhőmérséklet közel lineárisan növekszik. A melegítési sebesség növelésének három jellegzetes következménye lehet.

(i) Gyorsabb ütemű hőstimuláció esetében elméletileg a termális fájdalomküszöb alacsonyabb lesz, mert ilyenkor a termonocceptorok tüzelési frekvenciája magasabb (Yarnitsky és Ochoa 1990; Yarnitsky *et al.*, 1992; Tillman *et al.*, 1995a), emiatt a fájdalomérzet kiváltásához szükséges küszöbfrekvenciát hamarabb elérjük. Ezt az összefüggést kimutató kísérletekben a melegítési sebesség 0,5, 1,2 és 2 °C/s volt, ami 30, 72 és 120 °C/percnek felel meg.

(ii) A melegítési ütem növekedése esetén nagyobb lesz a hőküszöbmérésnek az az artefaktja, amelyik a reakcióidőből származik (Yarnitsky és Ochoa, 1990). Ez az idő amiatt kép fel, hogy a valódi fájdalomküszöb elérésekor még nem ad a reakciót a vizsgálati alany (ember vagy állat), hiszen a perifériás nociceptorokban kiváltott impulzusoknak be kell jutniuk az agyba, és centrális feldolgozásuk után ki kell váltaniuk a megfelelő magatartási reakciót. Mire mindez lezajlik, a bőrhőmérséklet – a melegítési ütemmel arányosan – már „túlfut”, azaz az igazi fájdalomküszöbnél magasabb lesz. Ezekben a kísérletekben is a melegítési sebesség 0,5, 1,2 és 2 °C/s volt, ami 30, 72 és 120 °C/percnek felel meg.

(iii) A szövetek termális tehetetlenséggel rendelkeznek, ami azt jelenti, hogy a bőr rétegei közötti hőmérséklet-kiegyenlítődés időben elhúzódik, a mélyebb rétegek (ahol a nociceptorok találhatóak) hőmérséklete „késik” a felszínéhez viszonyítva. Emiatt gyorsabb melegítési ütem esetén a bőrfelszínen mérve az egyes C polimodális nociceptorok aktivációs küszöbe magasabb, mint lassabb melegítéskor (Tillman *et al.*, 1995a; 1995b). Ezekben a kísérletekben a melegítési sebesség 0,1, 0,8 és 5,8 °C/s volt, ami 6, 48 és 348 °C/percnek felel meg.

A fentiekben vázolt alapelveket feltáró, emberen és majmokon végzett vizsgálatok során alkalmazott melegítési ütemek sokkal magasabbak voltak, mint a saját, hőküszöbmérésre kifejlesztett paradigmáink során beállított értékek (6–24 °C/perc). Ebből

kifolyólag valószínűsíthető, hogy mind a magas fűtési rátából eredő, a termális fájdalomküszöböt csökkentő, mind a reakcióidőből és a szöveti termális inerciából eredő küszöbnövelő torzító hatások csak minimálisan jutottak érvényre kísérleteinkben.

2./ A második kérdésre válaszolva azon a véleményen vagyok, hogy valószínűleg hasonló hőküszöböt kaptunk volna akkor, ha az előzőleg emelkedő-hőmérsékletű forró lappal vagy vízfürdővel meghatározott küszöbhőmérsékletre, illetve a körüli értékekre beállított állandó hőmérsékletű forró lapot vagy vízfürdőt használtunk volna. Ezt arra alapozom, hogy az általunk alkalmazott kiindulási hőmérséklet (30 °C), fűtési sebességek (6, illetve 24 °C/perc) és 45 °C körüli hőküszöb mellett az emelkedő hőmérsékletű forró lapnál maximum 2,5 perc, a vízfürdőnél pedig legfeljebb 40 másodpercnyi idő telt el a nocifenzív reakció bekövetkeztéig. Valószínűtlennek tartom, hogy ezen rövid idő alatt a küszöbalatti termális stimuláció érdemben módosította volna a nociceptív hőküszöböt, különösen a vízfürdőnél érvényes alig több mint fél percnyi idő túl rövidnek tűnik ilyen változás kialakulásához.

Összefoglalóan elmondható, hogy a kísérleteinkben alkalmazott melegítési ütemek kellőképp gyorsak ahhoz, hogy – a felfűtési periódus alatt – nagy valószínűséggel ne befolyásolják lényegesen a valódi nociceptív hőküszöböt, de messze nem elég gyorsak ahhoz, hogy a reakcióidőből vagy a bőr termális inerciájából származó számottevő artefaktot produkáljanak.

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

3./ A kérdést ketté kell választani egyrészt a kiindulási (alap) nociceptív küszöb mérésére, másfelől a valamilyen noxiával (RTX, hőtrauma, sebészi bemetszés) kiváltott hőküszöbcsökkenés detektálására. Az emelkedő hőmérsékletű forró lapon a diclofenac és a paracetamol hőküszöbemelő hatását sikerült kimutatni. Tekintettel arra, hogy a paracetamol nem tekinthető nem-szteroid gyulladásgátló (NSAID) szernek, önmagában a nem-szelektív COX-gátló diclofenac mint NSAID szer hőküszöbemelő hatékonysága – a 10–60 mg/kg-os dózistartományban – alapján nem következtethetünk arra, hogy a küszöbemelkedés ténylegesen a COX-gátlás következménye. Ezt több tényező is alátámasztja.

(i) Más, ismert COX-gátló szereket nem vizsgáltunk az emelkedő hőmérsékletű forró lapon.

(ii) A diclofenacról kimutatták, hogy a COX-gátláson kívül más hatásokkal is bír, amelyek hozzájárulhatnak a hőküszöbemelő/fájdalomcsillapító hatásához: pl. képes aktiválni az NO–cGMP–K⁺-csatorna tengelyt (Tonussi és Ferreira, 1994; Ortiz *et al.*, 2003) és – más NSAID-okhoz hasonlóan – befolyásolni többféle ioncsatornát (pl. feszültségfüggő Na⁺- és Ca²⁺-csatornák, különféle K⁺-csatornák, ASIC; TRPA1; Gwanyanya *et al.*, 2012).

(iii) A forró ingerrel kiváltott, nagyon hamar bekövetkező akut nocifenzív reakcióról nehéz elképzelni, hogy mechanizmusa relatíve időigényes prosztaglandin-szintézist foglalna magába. Az utóbbi feltételezéssel összecseng az az általánosan elfogadott nézet, hogy az állandó hőmérsékletű forró lap nem alkalmas az NSAID-ok antinociceptív hatásának a kimutatására (Le Bars *et al.*, 2001).

Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mért nociceptív hőküszöböt a diclofenac kevésbé emelte meg, mint a forró lappal mértet, és a másik tesztelt NSAID, az ibuprofen gyakorlatilag hatástalannak bizonyult (nem közölt adatok). Összességében elmondható, hogy a bazális nociceptív küszöb mérése nem alkalmas az NSAID-ok COX-gátláson alapuló termális antinociceptív hatásának a kimutatására.

Más a helyzet a különféle módon (RTX-injekció, hőtrauma, sebészi bemetszés) kiváltott hőküszöbcsökkenés (hőallodynia) esetében. Az értekezés 101. oldalán található táblázat tanúsága szerint a diclofenac mindhárom paradigma esetén gátolta a hőküszöbcsökkenést rendre 1, 0,3 és 1 mg/kg-os minimális hatékony dózisokban. Ezek a dózisok 10–33-szor alacsonyabbak, mint az emelkedő hőmérsékletű forró lapon a kiindulási hőküszöböt megemelő legkisebb adag (10 mg/kg). Ez valószínűtlenné teszi, hogy a szer alaphatásától (a COX-gátlástól) független mechanizmus lenne felelős az antiallodyniás hatásért, mivel a fentiekben említett egyéb hatásokat az NSAID-ok csak jóval magasabb koncentrációkban fejtik ki, mint amelyek a COX-enzimek gátlásához szükségesek (Gwanyanya *et al.*, 2012). Ráadásul az enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenést a szintén nem-szelektív COX-gátló ibuprofen is potens módon gátolta 10 mg/kg-os minimális hatékony dózissal. Mindezen adatok alapján valószínűsíthető, hogy az általunk kifejlesztett három paradigmában a hőküszöbcsökkenés gátlása döntően a diclofenac és az ibuprofen COX-gátló hatásának tudható be. Tehát ezen hőallodynia-modellek alkalmasnak tűnnek az NSAID-ok termális antinociceptív hatásának vizsgálatára. Természetesen ennek bizonyossággal történő kimondásához további NSAID-ok tesztelése szükséges.

4./ A szerző nem közölt eredményként mutatja be, hogy a carrageninnel kiváltott szubakut gyulladásos 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?

4./ Az egyik legmeglepőbb eredményünk volt, hogy azokban a carrageninnel kezelt patkányokban, amelyek jelentős latenciarövidülést produkáltak az állandó hőmérsékletű forró lapon, nem tudtunk hőküszöbcsökkenést mérni a emelkedő hőmérsékletű forró lappal. Hasonló eredményre jutottunk egy másik gyulladásmodellben, a komplett Freund-adjuvánssal kiváltott arthritis esetében, továbbá két neuropátia-modellben: a n. ischiadicus részleges lekötésével (Seltzer-modell), illetve az L5-ös spinális ideg lekötésével (Chung-modell) keltett termális hiperalgéria kapcsán. Hozzá kell tenni, hogy ez utóbbi modellekben inkább csak tájékozódó kísérleteket végeztünk (részben az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel), de azok eredménye egyértelműen a hőküszöbcsökkenés hiányára utalt.

5./ A hőküszöbmérési paradigma egyetlen hátrányát abban látom, hogy számos olyan modellben, amelyben termális hiperalgéria mutatható ki a latenciamérési módszerekkel, nem jön létre hőküszöbcsökkenés, azaz hőallodynia. Mindezen eredményeink azt is mutatják, hogy a termális szenzibilizáció két paramétere, az aktivációs küszöb és a küszöbfeletti hőingerre

adott válasz latenciaideje nem feltétlenül kapcsolatos, ami eltérő patofiziológiai szabályozásukra utal: a küszöböt a hővel aktiválható ioncsatornák determinálják, míg a hőválasz nagyságát (ami a latenciaidőben kódolódik) a feszültségfüggő Na^+ -csatornák aktivitása.

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

6./ A hőküszöbmérési paradigma gyakorlati hasznosíthatóságát két dologban látom. Egyfelől a három, különböző kinetikájú hőküszöbcsökkenésen alapuló allodyniamodelünk (RTX-injekció, hőtrauma, incízió) alkalmasnak bizonyult mind a hagyományos (morfin, diclofenac, ibuprofen, paracetamol) mind új típusú, perifériás támadáspontú analgetikumok (TRPV1-antagonisták) hatásának érzékeny detektálására. Ez utóbbiakkal szemben a hőküszöbmérési paradigma nagyságrenddel nagyobb érzékenységet mutatott, mint a latenciamérésen alapuló. Bár a TRPV1-antagonisták klinikai fejlesztése két irányból is gellert kapott (hipertémia, forrázásos sérülések fokozott kockázata), nincs kétség a felől, hogy ezek a szerek a perifériás nociceptív idegvégződésen fejtik ki antiallodyniás hatásukat. Ennek alapján valószínűsíthető, hogy a hőküszöbmérési paradigmáink más hatásmódú, de szintén a perifériás nociceptorokon ható potenciális analgetikumok preklinikai vizsgálatára is alkalmasak lesznek, akár gyógyszergyári körülmények között is. A talpba adott opioid és nem-opioid analgetikumokkal kiváltott lokális antiallodyniás hatások is alátámasztják azt a reményt, hogy módszereink perifériás támadáspontú analgetikumok vizsgálatára alkalmasak lehetnek.

Az állatkísérletes módszerek gyógyszergyári tesztelésben való alkalmazhatóságát jelentős mértékben elősegíti, ha azok standardizálhatók, illetve – legalább részben – automatizálhatók. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő egérbefogó hengerekkel való kiegészítése kiküszöböli az állat kézbentartásából fakadó stresszt, illetve a kézbentartás erősségének variabilitásából származó hibát. El tudom képzelni, hogy ez utóbbi módszer esetében a végpont (a farok kirántása a vízből) regisztrálása is automatizálható lesz pl. optikai úton. Természetesen tisztában vagyok azzal, hogy egy új módszer gyógyszergyári rutinba való bevezetéséhez többnyire jelentős barrier leküzdése szükséges, hiszen a gyárak preferálják a szakirodalomban széles körűen elfogadott, „gold” standardnak tekintett módszerek alkalmazását. Tehát a kérdésre konkrétan válaszolva elképzelhetőnek tartom a hőküszöbmérési paradigma alkalmazását a gyógyszergyári preklinikai tesztelés fázisában, de ennek megvalósulásához további meggyőző alapkutatási eredmények szükségesek.

7./ Mely eredményeket tartja legjelentősebbnek transzlációs szempontból?

7./ Transzlációs szempontból feltétlenül relevánsnak tartom azt az eredményünket, miszerint a perifériás nociceptorok izgatásával kiváltott – és szomatosztatin, illetve endogén opioidok által közvetített – távoli, „szenzokrinnek” nevezett hatás a korábban feltárt gyulladásgátló hatás mellett antiallodyniás komponenssel is bír. Ez a perifériás antinociceptív mechanizmus újfajta magyarázatul szolgálhat több jelenség, mint pl. a humán klinikai gyakorlatból jól ismert ellenirritációval kiváltott analgészia, illetve az akupunktúra jótékony hatásaira. Intézetünkől származó idevágó adat, hogy krónikus deréktáji fájdalomban szenvedő

betegekben kapszaicinderivátumot tartalmazó krémmel történő naponkénti kezelés analgetikus hatást eredményezett, és az első kezelés után 3-szorosára nőtt a plazma szomatosztatinszerű immunreaktivitása (Horváth *et al.*, 2014).

Szintén humán relevanciával bírónak tartom azt az eredményünket, miszerint az egér farkán – a talppal ellentétben – a TRPV1 szerepet játszik a kiindulási, alap nociceptív hőküszöb beállításában. Ennek indoklását azzal kell kezdenem – amit az értekezés 1.4.1.3. pontjában részletesen kifejtettem –, hogy az állatkísérletes adatok alapján nagyon ígéretesnek tűnt a TRPV1-antagonistáknak mint új típusú, perifériás támadáspontú analgetikumoknak a fejlesztése. Egérben és patkányban a TRPV1-antagonisták – a TRPV1-génhiányos egerekhez hasonlóan – a vizsgálatok túlnyomó többségében nem gátolták az alaphelyzeti, alacsony termális ingerintenzitásoknál vizsgált termonocicepciót sem a farkon, sem a talpon, azt sugallva, hogy a TRPV1 nem vesz részt a bőr nociceptív hőküszöbének beállításában. Ez utóbbit a patkány és egér talpára vonatkozóan saját hőküszöbmérési kísérleteinkben is megerősítettük. Mindezek alapján teljesen váratlan volt, hogy a TRPV1-antagonisták a fejlesztés klinikai fázisában emberben megnövelték a termális fájdalomküszöböt, forrázásos sérüléseket okozva. A fentiek alapján elmondható, hogy az egérfarok bőre az egyetlen ismert állati szövet, amely a TRPV1 hőküszöbben betöltött szerepét illetően utánozza az emberi bőr termonociceptorainak a viselkedését. Figyelembe véve, hogy a TRPV1-antagonisták fejlesztése még nem teljesen leállított projekt, az egérfarok mint modell jelentős lehet transzlációs szempontból.

Az enyhe hőtraumával, illetve plantáris bemetszéssel kiváltott hőallodynia mediátoraival kapcsolatos eredményeink szintén bírhatnak humán relevanciával, hiszen ezeknek a modelleknek közvetlen klinikai korrelátumuk van az égési sérülés, illetve a sebészi incízió formájában (ellentétben pl. a carrageninnel vagy formalinnal kiváltott pronociceptív hatásokkal).

Hivatkozott irodalom

- Gwanyanya A, Macianskiene R, Mubagwa K. Insights into the effects of diclofenac and other non-steroidal anti-inflammatory agents on ion channels. *J Pharm Pharmacol* 64:1359-1375, 2012.
- Horváth K, Boros M, Bagoly T, Sándor V, Kilár F, Kemény A, Helyes Z, Szolcsányi J, Pintér E. Analgesic topical capsaicinoid therapy increases somatostatin-like immunoreactivity in the human plasma. *Neuropeptides* 48:371-378, 2014.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53:597-652, 2001.
- Ortiz MI, Granados-Soto V, Castañeda-Hernández G. The NO-cGMP-K⁺ channel pathway participates in the antinociceptive effect of diclofenac, but not of indomethacin. *Pharmacol Biochem Behav* 76:187-195, 2003.
- Tillman DB, Treede RD, Meyer RA, Campbell JN. Response of C fibre nociceptors in the anaesthetized monkey to heat stimuli: correlation with pain threshold in humans. *J Physiol* 485:767-774, 1995a.
- Tillman DB, Treede RD, Meyer RA, Campbell JN. Response of C fibre nociceptors in the anaesthetized monkey to heat stimuli: estimates of receptor depth and threshold. *J Physiol* 485:753-765, 1995b.
- Tonussi CR, Ferreira SH. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol* 251:173-179, 1994.
- Yarnitsky D, Ochoa JL. Studies of heat pain sensation in man: perception thresholds, rate of stimulus rise and reaction time. *Pain* 40:85-91, 1990.
- Yarnitsky D, Simone DA, Dotson RM, Cline MA, Ochoa JL. Single C nociceptor responses and psychophysical parameters of evoked pain: effect of rate of rise of heat stimuli in humans. *J Physiol* 450:581-592, 1992.

Dr. Pethő Gábor akadémiai doktori értekezésének bírálatára adott válasz

Ismételten köszönöm Professzor Úrnak a kérdéseket, és kérem azokra adott válaszaim elfogadását.

Pécs, 2018. augusztus 10.

Dr. Pethő Gábor
egyetemi tanár