

Opponensi vélemény

Az MTA Doktori Tanácsa DT.58.072/17/05 számú felkérésére az alábbiakban fejtem ki opponensi véleményemet **Dr. Pethő Gábor: „A termonocicepció vizsgálata hagyományos *in vitro* és új, a nociceptív hőküszöb mérésén alapuló *in vivo* módszerekkel** című doktori értekezéséről.

A fájdalom mindannyiunk által megélt, erősen szubjektív, gyakran gazdag emocionális elemekkel bíró, kellemetlen érzéskvalitás, melyet potenciálisan (vagy ténylegesen) szövetkárosító ingerek, un. noxák váltanak ki. Ezek az ingerek a fájdalomérző receptorokat az un. nociceptorokat aktiválják. A fájdalom kutatása, a szövetkárosító ingerek által kiváltott membránszintű folyamatok mechanizmusának megismerése nemcsak elméleti szempontból fontos, de a gyakorlati orvoslás szempontjából is kiemelkedő jelentőségű. Emberen történő kísérletes vizsgálata etikai okokból, természetesen erősen korlátozott.

Miután a fájdalom definíciója szerint erősen szubjektív, jelentős emocionális komponensekkel bíró érzéskvalitás, állatkísérletes körülmények között nem is fájdalomról beszélünk, hanem ***nocicepcióról***, vagyis a szövetkárosító ingerek által kiváltott elhárító un. ***nocifenzív magatartási reakcióról***.

Az értekezés a Jelölt közel két évtizedes kutatómunkáját foglalja össze, melyet a fenti témában végzett. Munkája a nociceptorok, elsősorban a termonociceptorok vizsgálatára irányult, s így témaválasztása korszerű, a farmakológia, az idegtudományok, ill. ezek határterületének homlokterében áll.

Dr. Pethő Gábor első megközelítésben talán hagyományosnak mondható értekezést írt, amennyiben a 205 oldalas mű nagy fejezetei (Bevezetés, Előzmények, Kísérletes munka részletes leírása, Fontosabb eredmények és felismerések összefoglalása, Rövidítések jegyzéke, Saját közlemények listája, Irodalomjegyzék, Köszönetnyilvánítás) megfelelnek a hagyományos formának. A kísérletes munka részletes leírása során azonban, minden kísérlet típus önálló egységet képezve, Előzmények és célkitűzések, Módszerek, Eredmények és megbeszélések, sőt, több esetben Fontosabb következtetések c. alfejezetekre oszlik. Úgy vélem, a Jelölt az értekezésnek ebben a formájában megtalálta a lehető leglogikusabb, legáttekinthetőbb ismertetését szerteágazó munkájának.

Az értekezés 16 db. saját közleményen alapul, melyből 13-ban a Jelölt első vagy utolsó szerző. A felsorolt cikkek túlnyomó többsége magas impact faktorú nemzetközi folyóiratban jelent meg (*European Journal of Neuroscience, British Journal of Pharmacology, Pain* stb.).

Az értekezés szerkezete világos. A módszereket és eredményeket ismertető fejezetekben mindenütt utal a megfelelő, nemzetközi lapokban megjelent cikkekre, s így az opponensnek módja van a részlet-adatok és metodikai kérdések részletes tanulmányozására. Az eredményeket logikus láncba fűzi, s az egyes alfejezetek végén egy rövid diszkussziót követően indokolja a következő kísérlet elvégzésének szükségességét, a „Fontosabb következtetések”-ben pedig mindig utal az eredmények elméleti és azok esetleges gyakorlati jelentőségére.

Az értekezés átolvasásakor az opponens számára a munka több olyan pozitív értéke válik nyilvánvalóvá, amit sajnos újabban egyre ritkábban látunk szűkebb szakterületünkön is. Kiemelendőnek tartom az eredmények mértéktartó kezelését és a kontroll vizsgálatok sokrétűségét. Eredményeit kellően támasztja alá irodalmi adatokkal, s ahol szükségesnek látszik, ütközteti is azokat, majd szintézisben igyekszik feloldani az ellentmondásokat. Az értekezés kiemelkedően értékes része a módszertani fejlesztés, ami mind műszerfejlesztésben, mind pedig a termális allodynia-modellek kifejlesztésében és validálásában megnyilvánult.

Az értekezésről alkotott átfogó véleményem után a továbbiakban a munka részleteivel foglalkozom.

Formai, észrevételek:

Az értekezés formai szempontból tetszetős, igényesen megírt munka. Persze, félreütésektől, „nyomdai” hibáktól, néha fogalmazásbeli problémáktól ez sem mentes. Ez lehet egyszerű *vesszőhiba* (19. old., 4. sor), *hiányzó szóköz* (68. old. utolsó sor), *hiányzó betű* (100. old. 17. sor „iperalgéria”), *felesleges betű* (149. old. 11. sor), *betűtévesztés* (148. old. alulról a 4. sor), *szóismétlés* (73., 156., 159. old.), esetlegesen *egy hiányzó szó* (78. old. 1. sorból a „sem” szó) zavarja a könnyű megértést. Azonban, ezekről komolyabb nehézséget okozott a 104. oldalon a 4.9. alcím megértése. Véleményem szerint, az abban a formában, ahogy az értekezésben áll, nem érthető. A „*továbbfejlesztése*” helyett esetleg a „*továbbfejlesztett*” szót kellene használni, vagy más módon át kellene fogalmazni.

Formai észrevételek közé sorolom azt a nem túl szerencsés kettősséget, mely végig megvan az értekezésben. Nevezetesen, a magyar nyelvű értekezés ábrái angol nyelvűek. Természetesen tudom, hogy az értekezésben részletezett eredmények angol nyelvű folyóiratokban lettek közölve, és nagy (talán értelmetlen) munka lett volna új, magyar nyelvű ábrákat készíteni, de ettől még ez a kettősség megvan. Hasonlóképpen végigvonul az értekezésen, hogy a latin nyelvű kifejezések (pl. *in vivo*, *in vitro*) hol dőlt betűvel írtak, hol nem.

Tartalmi vonatkozású megjegyzések, kérdések

A kísérletes munka részletes ismertetése a **3. fejezet**ben kezdődik, melyben *in vitro* vizsgálatokban a nociceptorok forró ingerekre adott válaszait tanulmányozták. A preparátum hátsó végtagi lábhati bőrből és a kapcsolódó n. saphenusból állt. A kísérletekben egyrost-elvezetést (single-unit recording) végeztek C polimodális nociceptorokról.

Megjegyzés: elektrofiziológusként szívesen láttam volna az értekezésben egy-két originális regisztrátumot.

Kérdések: Miután receptív területeket vizsgáltak, adódik a kérdés; **1)** történtek-e tényleges receptív mező meghatározások? Technikailag egyáltalán mennyire lehetséges ezek pontos területi meghatározása pl. mechanikai ingerléssel (Frey-szálak)? **2)** Ha igen, akkor mekkora egy ilyen C polimodális nociceptor receptive field-je?

A receptív terület mechanikai ingerlése előtt fémhengert helyeztek a receptív területre, (amely kiemelkedett a szuperfundáló folyadékból), és amiből ezután kiszívták a folyadékot. **3)** Hogyan csinálták, hogy a fémhenger meg is akadályozza a folyadék visszaszívárgását, ugyanakkor az alatta lévő bőrre (idegre) gyakorolt kompresszió ne okozza az ingerületvezetés blokkolását?

- 1) Kritikai észrevétel: Véleményem szerint maga a 10. ábra (44. old.) és az ábraszöveg nincs összhangban: az ábraszöveg R(+)-flurbiprofen-ről szól, míg az ábrán (és az értekezés szövegében is) R(-)-flurbiprofenről van szó.

Kísérleteik eredménye azt mutatta, hogy a bradikinin hőszensibilizáló hatása COX-függő folyamat, amit az is jelez, hogy a hatást a nem-szelektív COX-gátló flurbiprofen aktív enantiomere megszüntette. A folyamat molekuláris mechanizmusát illetően feltételezik, hogy a folyamat hátterében a polimodális nociceptorok membránjában expresszáldó hőérzékeny ioncsatornák (pl. TRPV1) facilitációja állna.

A fejezet tartalmaz egy valóban tetszetős hipotézist, mely magyarázatot ad arra is, hogy belső szerveinket miért olyan nociceptorok innerválják, melyek hőküszöbe 43 °C, ami az élettel összeegyeztethetetlen. Ezen nociceptoroknak, ezek szerint, az lenne a funkciója, hogy a gyulladásos mediátorok hatására szensibilizálódva, aktivációs küszöbüket a maghőmérséklet (37 °C) alá csökkentik, így a belső maghőmérséklet folyamatos hőingerként hatva, tartós nociceptor kisülést tartson fenn.

- 2) Kritikai észrevétel: a 13. ábra "B" paneljében az abszcissza beosztása nincs feltüntetve. Logikus, hogy ez egy időtengely, aminek a beosztása a fölötté lévő "A" panelben lévőével azonos, de ezt vagy jelölni kellett volna vagy az ábraszövegben említeni.

Érdekes megfigyelésük, hogy a prosztaglandinok hőszensibilizációt okoznak az egyrost-elvezetési kísérletekben, de nem az iCGRP-felszabadulás esetében. Magyarázatul feltételezik, hogy a kétféle választ közvetítő idegvégződés-populáció nem azonos.

Kérdés: 4) erre vonatkozóan, ismert-e olyan irodalmi adat (hisztológiai, immunhisztokémiai), ami ezt a feltételezést alátámasztaná?

Eredményeik egyértelműen arra utalnak, hogy a forró ingerek transzdukciójának farmakológiája a TRPV1-antagonisták tekintetében különbözik a perifériás idegvégzódésekben és a tenyésztett DRG neuronok sejttestén. Szerepük a sejttesten kizárólagosnak tűnik, az idegvégzőkben viszont csekély. Feltételezik, hogy a perifériás nociceptorokban a TRPV1-en kívül más hőérzékeny ioncsatorna/csatornák is expresszáldnak.

Kérdések: 5) Hisztológiai, immunhisztokémiai vagy a farmakológiai vizsgálatokon kívül bármilyen más bizonyítéka van-e ennek a megállapításnak? 6) Normál, fiziológiás körülmények között vannak-e a DRG-ben lévő neuronok sejttestén TRPV1-receptorok? Ha igen, milyen szerepük lehet?

A 3. fejezet legfontosabb új eredményeinek a következőket ismerem el:

- **Kimutatta, hogy a tartós bradikininexpozíció szensibilizáló hatása COX-függő folyamat, amiben a PGE₂/PGI₂ fontos szerepet játszik.**
- **Bemutatta, hogy a peptiderg polimodális nociceptorok két funkciójának (afferens: akciós potenciált generáló és efferens: neuropeptid felszabadító) szensibilizálhatósága eltérő, aminek hátterében eltérő ionális mechanizmusok lehetnek.**

A **4. fejezet** egy része magatartási nociceptív hőküszöb mérésére alkalmas műszerek és modellek kifejlesztéséről és validálásáról szól. Ez a rész az értekezés egyik izgalmas és különösen érdekes fejezete. Nem csak azért, mert körültekintő, jól átgondolt kísérletekkel, szisztematikus munkával, nagyon érzékeny, ugyanakkor jól reprodukálható eredményt adó allodynia-modelleket fejlesztettek ki, hanem azért is, mert a fejezet jelentős új tudományos eredményeket tartalmaz. Példaként említeném, hogy akut hatást vizsgálva, elsőként mutatták ki a TRPV1-agonista resiniferatoxin (RTX) nociceptív hőküszöböt csökkentő hatását éber állaton. Ugyanakkor, az RTX hosszú távú hatását vizsgálva, azt találták, hogy először 1 órával a beadást követően, majd 5 napon át tapasztalható volt egy reverzibilis hőküszöb-emelkedés.

Kérdés: 7) Az RTX-nek ezen (1 órától 5 napig terjedő) deszenzibilizáló hatása mögé milyen molekuláris mechanizmust kell elképzelnünk?

A Jelölt részletesen taglalja az enyhe traumával kiváltott hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodynia-moddal validálásával kapcsolatos munkákat. A hőküszöb mérésére az Experimetria Kft.-vel közösen kifejlesztett készülék és a módszer is egyszerű, mégis, megbízhatónak bizonyult. A műszert és magát az eljárást a 33. ábra szemlélteti. A kísérlet során két kézzel megfogják az éber patkányt, melynek hátsó lábát belemerítik egy emelkedő hőmérsékletű vízfürdőbe (33. ábra B). Hő-küszöbként azt a hőmérsékletet tekintik, amikor az állat kihúzza a lábát a folyadékból.

Kérdés: 8) Nem fordulhatott elő, hogy az állat egyszerűen menekülni igyekezett a kísérletező kezéből, azért húzta ki a lábát?

Ahogy korábban is említettem, számomra sok érdekes, értékes eredményt és megállapítást tartalmaz ez a fejezet. Többek között, az első dokumentált kísérletet, amelyik a hőtrauma fél órán belül bekövetkező hőküszöb-csökkentő hatását (7 – 8 °C –ról van szó!) bemutatta. Mindezt termális allodynia-ként tekintik.

Kérdés: 9) Mi lehet az oka annak, hogy Melzak-ék kísérleteiben a hiperalgéria mindkét végtagon kialakult, míg a Jelölt kísérleteiben csak a hőtraumának kitett lábon volt hőküszöb-csökkenés?

A kérdést annál is indokoltabbnak érzem, mert egy későbbi fejezetben kerül részletes ismertetésre a decentralizált nociceptorok kémiai izgatásával kiváltott *távoli termális antiallodynia* jelensége. (Igaz, ott kémiai ingerlés történik, itt pedig hőtrauma, ott antiallodyniás hatást találtak, itt inkább az ellenkezőjét), Mégis, a nociceptorok ingerlésével (akár kémiai, akár hő) fellépő „szenzokrin” jelenség után azt várnám, hogy mindkét végtagon érzékelhető lesz valamilyen hatás (hőküszöb csökkenés vagy növekedés). Első megközelítésben Melzak-ék eredményei talán nagyobb összhangban vannak a *távoli termális antiallodynia* esetén leírtakkal, mint az itteni saját eredmények, hogy tudniillik csak a hőtraumának kitett lábon volt hőküszöb-változás (jelen esetben csökkenés) megállapítható.

A **4. fejezet** legfontosabb *új eredményeinek* a következőket ismerem el:

- ***Két műszer kifejlesztése és három allodynia-modell kidolgozása és validálása, melyek hőküszöbváltozások mérésén alapulva, rendkívül kis változások jól reprodukálható detektálását teszik lehetővé.***

- **Modelljeik segítségével, elsőként végezték el különböző gyógyszergyárak által kifejlesztett TRPV1-receptor-antagonisták szisztematikus összehasonlító vizsgálatát.**
- **Kimutatták, hogy az enyhe hőtrauma akut (kb. 60 perc), míg a talp bemetszése legalább 1 hétig tartó krónikus hőküszöbcsökkenést okoz.**

Az **5. fejezet** azokat a kísérleteket tartalmazza, melyben nociceptív hőküszöb mérésével a TRPV1-receptor funkcióját és a termonocicepció mechanizmusát vizsgálták. Fontos megfigyelés volt pl. az, amit az enyhe hőtraumával és plantáris bemetszéssel kiváltott termális allodynia mechanizmusainak összehasonlító vizsgálatai során tettek. Ennek egyik lényeges megállapítása, hogy az antagonistákkal ill. enzimgátlókkal nyert gátlási százalékok összege több, mint száz, ami arra mutat, hogy a mediátorok között interakció van, hatásuk közös célstruktúrára irányul, és egy ilyen célpont maga a TRPV1-receptor.

Szép kísérletsorozat volt a TRPV1-csatornán ható zsírsavamidok *in vitro* és *in vivo* vizsgálata. A komplex megközelítés, sokoldalú elemzés világosan megfogalmazott eredményeket hozott, melyek közül én a legfontosabbnak az alábbiakat tartom:

- 1) az OLDA (N-oleoildopamin) és a 3-MOLDA (metil-N-oleoildopamin) TRPV1-receptor agonista (bár kevésbé potens, mint a kapszaicin vagy RTX)
- 2) a 4-MOLDA és az OEA (N-oleoiletanolamid) TRPV1-antagonista, (bár az antagonizmus pontos típusa nem volt megállapítható)
- 3) bár a kísérletekben az anandamide kizárólag CB₁-receptor-agonistaként viselkedett, de képes volt aktiválni a TRPV1-receptort is, de magasabb koncentrációnál, mint ami a CB₁-receptor stimulációhoz kell.

Értekes részét képezi az értekezésnek az az alfejezet, mely a protein-kináz A és a protein-kináz C szerepét vizsgálja a TRPV1-receptor érzékenységeinek meghatározásában. Ezekből a vizsgálatokból az derült ki, hogy a TRPV1-receptor agonisták iránti érzékenységeinek beállításában a PKA-nak fontos szerepe van, míg a PKC nincs.

Az értekezés kísérletes részét bemutató utolsó alfejezetek egyike a decentralizált nociceptorok kémiai ingerlésével kiváltott távoli antiallodyniás hatás vizsgálatával foglalkozik.

- 1) Bizonyították, hogy a perifériás nociceptorok izgatása távoli antiallodyniás hatást vált ki, ami a CNS-től független.
- 2) Ebben a hatásban igazolták a szomatosztatin és az endogén opioidok szerepét.
- 3) Mindezt "szenzokrin" hatásnak nevezték, amit a peptiderg nociceptorok harmadik funkciójaként írtak le.

Kérdések: 10) Mennyi ideig és mennyire tekinthető „működőképesnek” az idegátmetésztől disztálisan lévő axon-csonk, rajta a receptorokkal? Működőképesség alatt értem az antiallodyniás hatást kiváltó szomatosztatin felszabadulást. **11)** Maga az idegátmetzés nem okozza-e az ilyen antiallodyniás hatású anyagok felszabadulását?

Egy kísérletsorozatban egészen a TRPV1- és a TRPA1-ioncsatornák szerepét vizsgálták a nociceptív hőküszöb meghatározásában és a nociceptív reakciókban. Ezen kísérletek során tett megfigyelések egy élettanászból olyan kérdéseket vetnek fel, hogy pl.

Kérdések: 11) Vajon mi a jelentősége, egyáltalán, van-e jelentősége annak a –számomra meglepő- észleletnek, hogy a TRPV1 szerepét illetően markáns különbség van a farok és a talp között? Ehhez kapcsolódóan, a TRPA1 hidegnocicepcióban betöltött szerepét is

vizsgálták, és érdekes módon, ez is csak farkon volt kimutatható, de a talp bőrén nem. Funkcionális szempontból várható lenne, hogy a talp bőre legalább olyan jelentőséggel bír a hővel kapcsolatos nocicepcióban, mint a farok. **12)** Adható-e erre valamilyen magyarázat?

Megjegyzés: A TRPV1-receptor-agonistákkal kiváltott deszenzibilizáció vizsgálata során, a 80. ábrán a kapszaicin és a RTX különböző dózisainak hosszú távú hatását vizsgálták. Talán érdemes lett volna a szolvans hatását/hatástalanságát is feltüntetni az ábrán.

A 5. fejezet legfontosabb új eredményeinek a következőket ismerem el:

- ***Kimutatta, hogy az OLDA és a 3-MOLDA TRPV1-receptor agonista, a 4-MOLDA és az OEA TRPV1-antagonista***
- ***Bizonyította, hogy a perifériás nociceptorok izgatása távoli antiallodynias hatást vált ki, ami hatás a CNS-től független.***
- ***A távoli antiallodynias hatásban igazolták a szomatosztatin és az endogén opioidok szerepét.***

A fentiek alapján egyértelműen kitűnik, hogy Pethő doktor nemzetközi szinten végzi tudományos munkáját, melyet publikációs tevékenysége is igazol. Értekezésében több eredeti megállapítást tett, és eredményeit rendszerbe foglalta. Véleményem szerint dr. Pethő Gábor értekezése messzemenően teljesítette a doktori fokozat megszerzésével támasztott követelményeket, alkalmas a nyilvános vitára. Tisztelettel javaslom a Bíráló Bizottságnak az értekezés elfogadását és dr. Pethő Gábor részére az MTA doktora cím odaítélését.

Szeged, 2018. június 28.

Toldi József
egyetemi tanár
az MTA doktora