

VÁLASZOK PROF. DR. KAMONDI ANITA OPPONENSI VÉLEMÉNYÉRE

Köszönöm Kamondi Anita Professzornő véleményét, értékelését, bíráló megjegyzéseit.

Formai, stiláris jegyek

„A dolgozat formai, stiláris jegyei A 160 oldalas értekezés 105 oldalon ismerteti a jelölt kutatásának eredményeit, amit, a hagyományos dolgozati formától kissé eltérő módon követ a disszertációban bemutatott vizsgálatok módszertanainak részletes ismertetése. Az irodalomjegyzék 518 hivatkozott közleményt sorol fel. A rövidítések jegyzéke közel 130 rövidítést tartalmaz; a pontos lista nagyban segítette a szöveg olvasását, és megértését. A disszertációban 64 ábra és 17 táblázat kapott helyet, melyek bizonyítják a kutatómunka magas színvonalát, és biztosítják az eredmények jobb megértését, értékelését. Az immunhisztológiai ábrák számos esetben fekete-fehér képek, melyeken a pontos tájékozódás nem mindig könnyű. A 31. oldalon például kettős immunfluoreszcens reakció eredményét demonstrálja a szerző, de a fekete-fehér ábrán a kettős jelölés nehezen ítéltető meg. A rajzos ábrák (pl. 20., 48., 53.stb.) angol nyelvűek, ezek magyar változata jobban illett volna a magyar nyelvű dolgozatba. A diagramokat bemutató ábrák szintén angol nyelvűek (pl. 25., 28., 32. stb), ezek egy részének a minősége, feltehetőleg nyomdatechnikai okokból kissé gyengébb (pl. 54. ábra). A 2. ábra esetében kisebb tördelési pontatlanság adódott: az egy ábrához tartozó képek két oldalra kerültek. A 106. oldalon található táblázatban az átlagéletkor oszlopban a szórás értékek hiányoznak. A dolgozatban elütést, ortográfiai hibát nem találtam. Öröndetes módon, a szerző, ahol csak lehet, az idegennyelvű szakkifejezések magyar megfelelőit használja. Ezzel kapcsolatban egy kivételt említenék: a 17. oldalon olvasható, hogy a jelölt és munkatársai egy modellt kívántak létrehozni a migrén kronicizálódásának magyarázatára. Ehelyett talán az állandósulás kifejezést lehetne használni. A szöveg könnyen olvasható, nyelvezete szabatos, megfelel a tudományos szakirodalomban elvárt színvonalnak, ugyanakkor több helyen megakasztja az olvasást a szenvedő szerkezet használata (el lett hagyva, volt futtatva, lett képezve, stb.).”

A dolgozat formai és stiláris jegyeire vonatkozó bíráló megjegyzéseket egytől-egyig elfogadom. A fekete-fehér képek használatával kapcsolatban megjegyzem, hogy az eredeti közlemények születésekor még nem léteztek digitális fotókamerák és a kiadók fekete-fehér felvételeket kértek immunfluoreszcens metszetek esetében, továbbá az archiválást is fekete-fehér negatívok formájában végeztük. Ezért tudtam csak fekete-fehér képeket bemutatni egyes eredményeknél.

A rajzos ábráknál és a diagrammoknál a magyar feliratozás helyesebb lett volna. A 2. ábra esetén a tördelési pontatlanság miatt kerültek a képek két külön oldalra. A 106. oldalon található táblázatban az összesített átlagéletkor: $65,2 \pm 8,2$ év (átlag $\pm$ S.D.).

A 17. oldalon olvasható „kronicizálódás” szó helyett valóban az „állandósulás” sokkal szebb kifejezés.

Tartalmi megjegyzések

„A Bevezetésben a szerző a migrénes fejfájás rövid történeti áttekintését adja, bemutatja a betegség gyakoriságát, nemek közötti megoszlását és a klinikum alapvető jellegzetességeit. A Prodroma leírásnál (10 .o.) „neurogén” tüneteket említ, ezeket talán pontosabb lenne „neurológiai” tüneteknek nevezni.”

A prodroma leírásánál a „neurogén” jelző helyett a „neurológiai” kifejezés a helyes.

„A 13. oldalon olvasható, hogy a Na-pumpa károsodása következtében csökken a kálium ionok és a glutamát szinaptikus részből történő elmozdítása, ami kissé szokatlan megfogalmazás. Valójában itt a szinaptikus részből történő visszavétel (re-uptake) károsodik?”

A Familiáris Hemiplégiás Migrén 2-es típusában (FHM2) az 1q23 kromoszómán (az 1-es kromoszóma hosszú karjának 23-as locusán) az ATP1A2 gén károsodása következtében sérül a Na⁺, K⁺-ATPase alpha₂ alegység funkciója. Ezen alegység alapvető szerepet játszik a glutamáterg „tripartite” (3 szereplős) szinapszis működésében. Az Na⁺, K⁺-ATPase alpha₂ alegység az asztrocitákban expresszálódik és befolyásolja a glutamát felvételt (uptake) a szinaptikus részből a glutamát/aszpartát transzporter, valamint a glutamát transzporter útján. Az alpha₂ alegység károsodása esetén a glutamát nem jut be a szinaptikus részből az asztrocitába, tehát a felvétel (uptake) károsodik. További szerepe az ATP1A2 gén által kódolt Na⁺, K⁺-ATP-ase-nak, hogy fenntartsa a fiziológias grádienszt a Na⁺ és K⁺ ionok vonatkozásában, azáltal hogy a Na⁺-okat kipumpálja a sejtéből, míg a K⁺-okat a sejtbe juttatja. Az enzim működészavara esetén az extracelluláris K⁺ szint kórosan megnövekszik, mivel a pumpafunkció károsodik (Friedrich et al. 2016).

Irodalom

Friedrich T., Tavrız N.N., Junghans C. ATP1A2 Mutations in Migraine: Seeing through the Facets of an Ion Pump onto the Neurobiology of Disease. Front. Physiol. 7:239. doi: 10.3389/fphys.2016.00239, 2016.

„A Bevezetés fejezet utolsó része (16. o.) a migrén pathomechanizmusát tárgyalva mindössze két általános megállapítást tesz. Tekintettel arra, hogy a dolgozatban bemutatott vizsgálatok erre a problémára koncentrálnak, feltétlenül előnyös lett volna, ha ezt a kérdéskört részletesebben mutatja be a jelölt.”

Professzornő véleményét elfogadom.

„A **Célkitűzések** fejezetben (16-17. o.) a szerző 8 pontban, 1-1 mondatban foglalja össze, azokat a fő kérdéseket, melyek megválaszolására a disszertációban bemutatott vizsgálatokat elvégezték. Mivel a pathomechanizmus ismert elemeiről a bevezetésben nem esett szó, ez nehezítette annak a megítélését, hogy a célkitűzésekben megfogalmazottak miképpen illeszkednek a már rendelkezésre álló szakirodalmi ismeretekhez. Ezt a hiányosságot pótolta a **Célkitűzések irányába végzett munka** fejezetben az egyes vizsgálatok bemutatása előtt a háttér ismertetése.”

Professzornő véleményét elfogadom.

„ Az alábbiakban a különböző vizsgálatokkal kapcsolatban felmerült kérdéseimet, megjegyzéseimet foglalom össze.”

1. „A 3.1 alfejezetben az 1. táblázatban szerencsésebb lett volna, ha a humán ggl. trigeminaleban azonosított különböző immunreaktív neuronok százalékos gyakoriságának sorrendjében sorolja fel a szerző a különböző neuropeptideket. A bemutatott felsorolás a bíráló számára véletlenszerűnek tűnik, az előfordulási gyakorisági sorrend nehezen megállapítható.”

Elfogadva a bíráló megjegyzését, véleményét, a neuropeptidok és receptoraik százalékos megoszlásának sorrendbeli feltüntetésében nem a numerikus (százalékos) megjelenést vettem alapul, hanem a migrén trigemino-vascularis hipotézisében feltételezhetően elsődlegesen szerepet játszó neuropeptideket, így a CGRP-t és a PACAP-ot soroltam előre.

2. „Ugyanebben az alfejezetben a 6. ábra mutatja az 5HT1B és 1D sejtek méretének megoszlását. Funkcionálisan miben különbözik a kis, ill. a nagy átmérőjű sejt?”

A kis és a nagy átmérőjű trigeminális ganglion sejtek funkcionalitásában a következő különbségeket tehetjük. Cholera toxin B alegységével, wheat germ agglutinin-nel és *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B4-gyel végzett jelöléses vizsgálatok igazolták, hogy a kis sejtek nem-myelinizált axonokkal rendelkeznek, a caudalis trigeminális magcsoportban (TNC) a felszíni (I-II.) laminában végződnek és a nociceptív afferensekkel állnak kapcsolatban. A nagy sejtek myelinizált axonokkal rendelkeznek, a TNC mélyebb lamináiba (III-V.) vetülnek és az alacsony ingerküszöbű mechanoreceptorokkal állnak összefüggésben (Sugimoto et al. 1997; Liu et al. 2004).

A Familiáris Hemiplégiás Migrén 1-es (FHM1) típusában a 19p13 kromoszómán a P/Q-típusú feszültség-függő kalcium ioncsatorna α -1A elegységét kódoló génben (CACNA1A) jön létre mutáció. A leggyakoribb mutáció a T666M (Treanin-Metionin) a csatorna második domainjén (pore-forming P hairpin loop) történik. Trigeminalis ganglion sejtenyészeten végzett kísérletes genetikai és elektrofiziológiai vizsgálatok igazolták, hogy a T666M mutáció szelektíven csak a kis sejtekben (isolation B4 negatív) növelte meg az alacsony küszöbű T-típusú kalcium áramok aktivitását, és váltotta ki a kis méretű sejtek hyperexcitabilitását. Ezen megfigyelések a különböző nagyságú trigeminális sejtek eltérő pathogenetikai funkciójára utalnak (Tao et al. 2012).

Immunhisztokémiai vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a humán ganglion trigemináléban a CGRP elsősorban a kis méretű, míg a CGRP receptor komponensek (CLR és a RAMP1) immunreaktivitása a nagyobb méretű neuronokban volt megfigyelhető. A CLR és a RAMP1 ko-lokalizációt mutatott. Tehát ezen sejtek receptorként szerepelhetnek a CGRP vonatkozásában a ganglionon belüli jelzőrendszeri folyamatokban (Eftekhari et al. 2010).

A TRPV1 nem szelektív kation csatorna, melyet a capsaicin, valamint a hő és a savas vegyhatású közeg aktivál. Immunhisztokémiai vizsgálatok igazolták, hogy a trigeminális ganglionban a TRPV1 csatorna a kis méretű neuronokban fejeződik ki elsődlegesen és ezen sejtek részt vesznek a cerebrális dura beidegzésében. A TRPV1 agonisták CGRP és SP felszabadulást, így neurogén inflammációt váltanak ki. A sumatriptan, mely „gold standard”-ja a migrén rohamterápiájának, gátolja a TRPV1 közvetítette kis sejt aktivitást és így gátolja a neurogén inflammáció kialakulását. A sumatriptannak a TRPV1 csatornán való hatása ma még nem teljesen tisztázott. A hipotézis szerint a cAMP-dependens protein kináz (PKA) szabályozza a TRPV1 rendszer deszenzitizációját, direkt foszforiláción keresztül. Ezen eredmények alapján a kis sejtek funkcionálisan részt vesznek a neurogén inflammáció kialakításában (Evans et al. 2012; Bhave et al. 2002).

Irodalom

Sugimoto T., Fujiyoshi Y., He Y.F., Xiao C., Ichikawa H. Trigeminal primary projection to the rat brain stem sensory trigeminal nuclear complex and surrounding structures revealed by anterograde transport of cholera toxin B subunit-conjugated and Bandeiraea simplicifolia isolectin B4-conjugated horseradish peroxidase. Neurosci. Res. 28:361-71, 1997.

Liu Y., Broman J., Edvinsson L. Central projections of sensory innervation of the rat superior sagittal sinus. Neuroscience 129:431-437, 2004.

Tao J., Liu P., Xiao Z., Zhao H., Gerber B.R., Cao Y.Q. Effects of familial hemiplegic migraine type 1 mutation T666M on voltage-gated calcium channel activities in trigeminal ganglion neurons. J. Neurophysiol. 107:1666-1680, 2012.

Eftekhari S., Salvatore C.A., Calamari A., Kane S.A, Tajti J., Edvinsson L. Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human trigeminal ganglion. Neuroscience 169:683-696, 2010.

Evans M.S., Cheng X., Jeffry J.A., Disney K.E., Premkumar L.S. Sumatriptan inhibits TRPV1 channels in trigeminal neurons. Headache 52:773-784, 2012.

Bhave G., Zhu W., Wang H., Brasier D.J., Oxford G.S., Gereau R.W. 4th. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. Neuron 35:721-731, 2002.

3. „A szerző által közölt új adatok szerint a humán ggl. trigeminaleban a neuronok 20%-a PACAP immunreaktivitást mutatott, amelyből arra következtetnek, és ezt további vizsgálati eredményeik is megerősítették, hogy a PACAP alapvető jelentőségű a trigemino-vascularis rendszer aktiválásában. A kérdésem az, hogy vannak-e hasonló vizsgálatok a spinális szenzoros ganglionokra vonatkozóan?”

A gerincvelői hátsó gyöki ganglionok (DRG) és a PACAP vonatkozásában humánban meglepően kevés vizsgálat történt. Humán immunhisztokémiai vizsgálatok szerint 3 thoracalis DRG-ban összesen 220 PACAP immunpozitív neuront figyeltek meg. A sejtek 59%-a 30-50 µm átmérőjű, 21%-a 30 µm feletti, 20%-a 50 µm átmérő alatti volt (Dun et al. 1996).

A PACAP megjelenésére mind protein, mind mRNS szinten a kísérleti állatokban már több adat gyűlt össze. Patkányban immunhisztokémiai vizsgálatok alapján a lumbalis régióból származó (L₅) DRG-ban a sejtek 17.5%-a mutatott PACAP immunfestést, a sejtek elsősorban kis méretűek voltak (Zhang et al. 1995).

In situ hibridizációval PACAP mRNS jelenlétét igazolták patkány L₅-DRG-ban. A sejtek 26%-a adott közepes-erős szignált, mely elsősorban a kicsiny és a közepes méretű neuronokban volt megfigyelhető. Más vizsgálatok szerint a neuronok 24%-a mutatott jelölődést, melyek kis méretűek voltak (Zhang et al. 1996).

Sertésben a L₁-L₃ DRG-ban azon neuronokban, amelyek az emlőmirigyekhez adtak rostokat a sejtek 5.87±0.5%-a mutatott PACAP immunreaktivitást (Franke-Radowiecka 2011). Sertések húgyhólyagját ellátó idegsejtek közül a sacralis (S₃-S₄) DRG-ban a neuronok 31%-a, míg a lumbalis (L₃-L₆) DRG-ban a neuronok 23%-a mutatott PACAP immunreaktivitást (Bossowska et al. 2009).

A trigemino-vascularis rendszer aktivitásában a C₂-DRG-nak szerepük van. Ezért a jövőben érdemesnek mutatkozik a C₂-DRG-k neuronjainak PACAP eloszlását meghatározni.

Irodalom

Dun E.C., Huang R.L., Dun S.L., Dun N.J. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-immunoreactivity in human spinal cord and dorsal root ganglia. *Brain Res.* 721:233-237, 1996.

Zhang Q., Shi T.J., Ji R.R., Zhang Y.Z., Sundler F., Hannibal J., Fahrenkrug J., Hökfelt T. Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in dorsal root ganglia following axotomy: time course and coexistence. *Brain Res.* 705:149-158, 1995.

Zhang Y.Z., Hannibal J., Zhao Q., Moller K., Danielsen N., Fahrenkrug J., Sundler F. Neuroscience. Pituitary adenylate cyclase activating peptide expression in the rat dorsal root ganglia: up-regulation after peripheral nerve injury. *Neuroscience* 74:1099-1110, 1996.

Franke-Radowiecka A. Immunohistochemical characterisation of dorsal root ganglia neurons supplying the porcine mammary gland. *Histol. Histopathol.* 26:1509-1517, 2011.

Bossowska A., Crayton R., Radziszewski P., Kmiec Z., Majewski M. Distribution and neurochemical characterization of sensory dorsal root ganglia neurons supplying porcine urinary bladder. *J. Physiol. Pharmacol.* 4:77-81, 2009.

4. „A 3.2 alfejezet részletes módszertanát bemutató leírásban a 12. táblázat (107. o.) adatai alapján mind a kontroll csoport (31±9), mind az aurával járó migrénés betegek (34±14) átlagéletkora jelentősen különbözik az aura nélküli betegektől (40±13), a statisztikai szignifikanciára vonatkozóan azonban nincs adat.”

Valóban, a nyálmintákat szolgáltató betegcsoportok (aura nélküli és aurával járó migrénés), valamint a kontroll csoportok életkorát tekintve elmaradt a statisztikai

szignifikancia ismertetése. Student-féle 2 mintás T-próbát alkalmazva a kontroll vs. migrén aurával csoport életkori értékei között nem volt statisztikai szignifikancia ($p < 0.45$). A kontroll vs. migrén aura nélküli csoport életkori adatai között statisztikailag szignifikáns különbség mutatkozott ($p < 0.012$). A migrén aura nélkül vs. aurával csoportok között az életkort tekintve nem volt statisztikai szignifikancia ($p < 0.1945$).

Megjegyzendő, hogy vizsgálatok szerint a nyálmintában a glicin és a lizin koncentrációja az életkor előrehaladtával szignifikánsan növekszik, míg a histidin és a rendszerünkben kiemelkedő figyelmet jelentő glutaminsav koncentrációnak nincs életkortól függő változása (Tanaka et al. 2010).

Irodalom

Tanaka S., Machino M., Akita S., Yokote Y., Sakagami H. Changes in salivary amino acid composition during aging. In Vivo 24:853-856, 2010.

5. „A 40. oldalon olvasható, hogy szervtenyészetek esetén a szérumentes tápfolyadék nagyfokú stresszt jelent a sejteknek. Kérném a jelöltet, hogy ezt az állítását részletesebben fejtse ki.”

Az élő rendszerek számára a megfelelő környezet teszi lehetővé az optimális működést. A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) a szerin/treonin kináz csoportjába tartozó enzim, mely az evolúciót tekintve az eukaryotákban igen jól konzerválódott. A MAPK rendszernek kivételes szerepet tulajdonítanak a környezeti stimulusokra bekövetkező sejten belüli jelzőrendszeri válaszok kialakításában, melyek többek között a sejtek differenciálódását, proliferációját, cytoskeletális proteinek kialakítását, transzkripciós faktorok működését és a sejtek túlélését szabályozzák. A MAPK családnak négy jól elkülönített tagja van, az ERK1/2, a p38, a c-Jun N terminális kináz (JNK) és a BMK/ERK. Mind a négy rendszer foszforilációs kaszkádot követően válik aktívvá. Az iniciálási stimulus pedig lehet pl.: gyulladásos mediátorok, citokinek, növekedési faktorok és a stressz (Meier et al. 1996; Guan et al. 1994; Moriguchi et al. 1997; Kristiansen and Endvinsson 2010). Az 1990-es évek közepén került felismerésre (több Nature-ban megjelent közlemény), hogy a sejt kultúrában a sejtek számára a környezet változása stresszt jelent, pl.: ozmotikus sokk (0.5 M szorbitol) vagy ultraibolya besugárzás (60 J/m^2). Ezen stresszt okozó stimulusok hatására válaszként stressz-

aktiválta protein kinázok válnak aktívává, (pl.: p38, JNK) (Sánchez et al. 1994; Yan et al. 1994).

Kísérleteink során a sejt kultúrában a környezetváltozást, a stresszt a szérummentes tápoldat alkalmazása jelentette, mely vizsgálataink szerint aktiválta az ERK1/2 rendszert, következményes fokozott CGRP megjelenéssel a trigeminalis neuronokban és a satellita glia sejtekben.

Irodalom

Sánchez I., Hughes R.T., Mayer B.J., Yee K., Woodgett J.R., Avruch J., Kyriakis J.M., Zon L.I. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* 372(6508):794-798, 1994.

Yan M., Dai T., Deak J.C., Kyriakis J.M., Zon L.I., Woodgett J.R., Templeton D.J. Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature* 372(6508):798-800, 1994.

Meier R., Rouse J., Cuenda A., Nebreda A.R., Cohen P. Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated-protein kinase kinase homologues in PC12 and KB cells. *Eur. J. Biochem.* 236:796-805, 1996.

Guan K.L. The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway: from the cell surface to the nucleus. *Cell Signal* 6:581-589, 1994.

Moriguchi T., Toyoshima F., Masuyama N., Hanafusa H., Gotoh Y., Nishida E. A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNF α and cellular stresses. *EMBO. J.* 16:7045-7053, 1997.

Kristiansen K.A., Edvinsson L. Neurogenic inflammation: a study of rat trigeminal ganglion. *J. Headache Pain* 11:485-495, 2010.

6. „A 3.4 alfejezetben az olvasható, hogy a VIP koncentrációja mind a krónikus, mind az epizódikus migrénben szenvedő betegek fejfájásmentes időszakában jelentősen magasabb a kontroll személyekhez képest. Mi lehet a magyarázata ennek a jelenségnek?”

A trigemino-vascularis rendszer parasympathicus ágának aktivitása a nucleus salivatorius superiorból indul és a ganglion sphenopalatinumon át éri el a perifériás célszerveket, következményes parasympathicus izgalmi állapotot okozva (pl: miosis, ptosis, könnyezés, orrfolyás). Az epizódikus migrénben a betegek közel felében, míg a krónikus migrénben szenvedők 80%-ában a roham alatt cranialis autonóm parasympathicus tünetek (CAPS) alakulnak ki (Riesco et al. 2016/a). Epizódikus, de gyakori rohamfrekvenciával élő migrénesekben, akiknél a roham során CAPS is

jelentkezik, a nyálban emelkedett VIP koncentrációt találtak az intervallum időszakban (Bellamy et al. 2006). Krónikus migrénes betegek vérplazmájában az interictalis fázisban emelkedett VIP koncentrációt mértek, mely korrelált a CAPS jelenlétével (Riesco et al. 2016/b; Cernuda-Morollón et al. 2015). Magyarázatként Cernuda-Morollón és munkatársainak véleményéhez csatlakozom, feltételezhetően a trigemino-vascularis rendszer parasympathicus ágának csaknem „permanens” aktivációja okozza a periférián mért interictalis VIP koncentráció emelkedést (Cernuda-Morollón et al. 2014; Cernuda-Morollón et al. 2015; Riesco et al. 2016/b).

Irodalom

Cernuda-Morollón E., Martínez-Camblor P., Ramón C., Larrosa D., Serrano-Pertierra E., Pascual J. CGRP and VIP levels as predictors of efficacy of Onabotulinumtoxin type A in chronic migraine. Headache 54:987-995, 2014.

Riesco N., Pérez-Alvarez A.I., Verano L., García-Cabo C., Martínez-Ramos J., Sánchez-Lozano P., Cernuda-Morollón E., Pascual J. Prevalence of cranial autonomic parasympathetic symptoms in chronic migraine: Usefulness of a new scale. Cephalalgia 36:346-50, 2016/a.

Riesco N., Cernuda-Morollón E., Martínez-Camblor P., Pérez-Alvarez A.I., Verano L., García-Cabo C., Serrano-Pertierra E., Pascual J. Relationship between serum levels of VIP, but not of CGRP, and cranial autonomic parasympathetic symptoms: A study in chronic migraine patients. Cephalalgia 2016/b. Jun 1. pii: 0333102416653232.

Bellamy J.L., Cady R.K., Durham P.L. Salivary levels of CGRP and VIP in rhinosinusitis and migraine patients. Headache 46:24-33, 2006.

Cernuda-Morollón E., Martínez-Camblor P., Alvarez R., Larrosa D., Ramón C., Pascual J. Increased VIP levels in peripheral blood outside migraine attacks as a potential biomarker of cranial parasympathetic activation in chronic migraine. Cephalalgia 35:310-316, 2015.

7. „Ugyancsak ebben a fejezetben található az a megállapítás, hogy krónikus migrénben az onabotulinumtoxin-A-ra (OBOT-A) jól ill. kevésbé jól reagáló betegek esetében a VIP potenciális prediktor lehet, ugyanakkor nem derül ki egyértelműen, hogy milyen összefüggésről van itt szó.”

A krónikus migrén a népesség 2%-át érinti. A botulinumtoxin a krónikus migrén kezelésében ezidáig az egyetlen elfogadott és igazolt terápia (Aurora et al. 2011; Diener et al. 2014; Dodick et al. 2010; Szok et al. 2015). Az onabotulinumtoxin A-val (onabotA) kezelt (minden 12. hétben, legalább 2 ciklusban) krónikus migrénes betegek több, mint

66%-a jól reagált a kezelésre (a fejfájások számának csökkenése, valamint szubjektív kedvező állapot), 1/3-uk nonresponder volt. A vérplazmában a VIP koncentráció emelkedés szignifikánsan magasabb volt az onabotA kezelésre jól reagáló csoportban a nem jól reagáló csoporthoz képest. Ezek alapján a perifériás vérben meghatározott VIP koncentráció nagy segítséget jelenthet – megállapított küszöbérték mellett – az onabotA terápia hatékonyságának az előrejelzésében krónikus migrénes betegekben (Cernuda-Morollón et al. 2014).

Irodalom

Cernuda-Morollón E., Martínez-Camblor P., Ramón C., Larrosa D., Serrano-Pertierra E., Pascual J. CGRP and VIP levels as predictors of efficacy of Onabotulinumtoxin type A in chronic migraine. Headache 54:987-995, 2014.

Aurora S.K., Winner P., Freeman M.C, Spierings E.L., Heiring J.O., DeGryse R.E., VanDenburgh A.M., Nolan M.E., Turkel C.C. OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: pooled analyses of the 56-week PREEMPT clinical program. Headache 51:1358-1373, 2011.

Diener H.C., Dodick D.W., Turkel C.C., Demos G., Degryse R.E., Earl N.L., Brin M.F. Pooled analysis of the safety and tolerability of onabotulinumtoxinA in the treatment of chronic migraine. Eur. J. Neurol. 21:851-859, 2014.

Dodick D.W., Turkel C.C., DeGryse R.E., Aurora S.K., Silberstein S.D., Lipton R.B., Diener H.C., Brin M.F.; PREEMPT Chronic Migraine Study Group. OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: pooled results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phases of the PREEMPT clinical program. Headache 50:921-936, 2010.

Szok D., Csáti A., Vécsei L., Tajti J. Treatment of Chronic Migraine with OnabotulinumtoxinA: Mode of Action, Efficacy and Safety. Toxins (Basel) 7:2659-2673, 2015.

8. „A 3.7 alfejezetben a 8. táblázatban közölt adatok alapján a migrénes betegek nyálában mért aminosav koncentráció a kontroll csoporttól szignifikánsan eltér, ugyanakkor a p értéket a szerző nem adta meg. Az ebben a fejezetben leírt eredmények rendkívül fontosak, hiszen könnyen vizsgálható, a nyálból meghatározható biomarkerekről van szó, felmerül ugyanakkor hogy mennyire specifikus elváltozásról van szó. Ismert-e olyan kutatás, amelyben a szerző által mért aminosavakat vizsgálták nyálból más neurológiai vagy nem neurológiai betegségben.

A „p” érték feltüntetése sajnos lemaradt. Ezen adatokra vonatkozó számításaink alapján: $p < 0.05$. A „p” értéket az eredeti közleményben a 645. oldalon adtuk meg

(Rajda et al. 1999). Vizsgálataink alapján véleményünk szerint a migrénesekben a nyálban elsősorban a glutaminsav monitorizálását véljük elsődlegesnek. Phenylketonuriás gyermekeknél végeztek nyálból aminosav meghatározást, de a glutaminsavra nem terjedt ki ez a vizsgálat. A phenylketonuriában az egészségesekhez képest csökkent a nyálban egyes aminosavak (pl.: a taurin, a szerin, a glycin, az alanin, a citrulin) koncentrációja (Liappis et al. 1986). Más vizsgálatok alapján felnőttekben krónikus periodontitiszben a glycin, a prolin, a tyrozin és a delta-aminolevulinsav (DALA) koncentrációja emelkedett a nyálban (Syrjänen et al. 1987). Féloldali jóindulatú parotis tumor (pleiomorf adenoma) esetében a kétoldalról elkülönítve gyűjtött nyálban nem találtak eltérést a γ -amino-vajsav (GABA), a glutaminsav és az aszpartát esetében (Jezewska et al. 2011). Tenziós típusú fejfájásban szenvedő betegek nyálában a GABA esetében nem találtak különbséget az egészséges kontrollokhoz viszonyítva (Marukawa et al. 1996).

A fentiek alapján úgy vélem, hogy feltételezetten migrénben szenvedő betegek nyálából a glutaminsav meghatározás a diagnózist segítő specifikus marker lehet.

Irodalom

Rajda C., Tajti J., Komoróczy R., Seres E., Klivényi P., Vécsei L. Amino acids in the saliva of migraine patients. *Headache* 39:644-649, 1999.

Liappis N., Pohl B., Weber H.P., el-Karkani H. Free amino acids in the saliva of children with phenylketonuria. *Klin. Pediatr.* 198:25-28, 1986.

Syrjänen S., Piironen P., Markkanen H. Free amino-acid content of wax-stimulated human whole saliva as related to periodontal disease. *Arch. Oral. Biol.* 32:607-610, 1987.

Jezewska E., Scinska A., Kukwa W., Sobolewska A., Turzynska D., Samochowiec J., Bienkowski P. Gamma-aminobutyric acid concentrations in benign parotid tumours and unstimulated parotid saliva. *J. Laryngol. Otol.* 125:492-496, 2011.

Marukawa H., Shimomura T., Takahashi K. Salivary substance P, 5-hydroxytryptamine, and gamma-aminobutyric acid levels in migraine and tension-type headache. *Headache* 36:100-104, 1996.

9. „A 3.9 alfejezetben a vizuális rendszer vizsgálatához aura nélküli betegeket választottak. Van-e adat vizuális aurával járó migrénben a látórendszer érintettségére, ill. milyen módon egészítik ki a disszertációban bemutatott eredmények az aurás betegekből származó ismereteket elsősorban a közös vagy eltérő pathomechanizmus vonatkozásában?”

Történtek aurával járó migrénben szenvedő betegeknél kontraszt szenzitivitást meghatározó vizsgálatok. Kontrasztérzékenység az a minimális kontraszt, mely szükséges a stimulusok detektálásához és megkülönböztetéséhez. Egy tanulmányban megállapították, hogy a több, mint 30 éve fennálló aurával járó migrénesekben kontrasztérzékenységi deficit alakul ki. Ezt a jelenséget nem figyelték meg a 10 évnél rövidebb ideje meglévő aurás migrénesek vizsgálatakor (Yenice et al. 2007).

Más munkacsoport vizsgálata szerint a középperifériás látótér stimulusnál mind a magnocelluláris, mind a parvocelluláris vizuális pályarendszer funkciócsökkenését mutatták ki a kontrasztérzékenység feldolgozásában aurás és aura nélküli migrénes páciensekben (McKendrick et al. 2003).

További tanulmányok az eltérő stimulusok és kísérleti felállás okozta nehézségek mellett sem találtak különbséget a csökkent kontrasztszenzitivitás tekintetében az aurás vagy az aura nélküli migrénesek csoportjainak az összevetésekor (O'Hare et al. 2015; McKendrick et al. 2001; Tibber et al. 2006; Wagner et al. 2010; Webster et al. 2012). A fenti vizsgálati eredmények alapján a migrénesekben csökkent a kontrasztérzékenység, tehát a migrénesekben az alacsony szintű vizuális feldolgozás károsodott.

Megemlítendő továbbá, hogy steady-state vizuális kiváltott válasz (SSVEP) vizsgálatok mindkét migrénes csoportban (aurás és aura nélküli) az elsődleges látókéregben hyperexcitabilitást igazoltak (Sibata et al. 2008).

Irodalom

Yenice O., Onal S., Incili B., Temel A., Afşar N., Tanridağ T. Assessment of spatial-contrast function and short-wavelength sensitivity deficits in patients with migraine. *Eye* 21:218-223, 2007. Ref.: Khalil NM, Legg NJ. Pathophysiology of migraine: a study using VEP and contrast sensitivity. In: Clifford and Rose FC (eds). *New advances in headache research*. 3rd edn. London: Smith-Gordon, 1989, pp 57–61.

McKendrick A.M, Badcock D.R. Contrast-processing dysfunction in both magnocellular and parvocellular pathways in migraineurs with or without aura. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:442–448, 2003.

O'Hare L., Hibbard P.B. Visual processing in migraine. *Cephalalgia* 36:1057-1076, 2016.

McKendrick A.M., Vingrys A.J., Badcock D.R. Visual dysfunction between migraine events. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42:626–633, 2001.

Tibber M.S. and Shepherd A.J. Transient tritanopia in migraine: Evidence for a large-field abnormality in blueyellow opponent pathway. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47:5125–5131, 2006.

Wagner D., Manahilov V., Loffler G. Visual noise selectively degrades vision in migraine. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 51:2294–2299, 2010.

Webster K.E., Dickinson J.E., Battista J. Evidence for increased internal noise in migraineurs for contrast and shape processing. *Cephalalgia* 32: 125–139, 2012.

Shibata K., Yamane K., Otuka K., Iwata M. Abnormal visual processing in migraine with aura: a study of steady-state visual evoked potentials. *J. Neurol. Sci.* 271:119-26, 2008.

10. „A 3.11 alfejezetben a szerző megállapítja, hogy a PACAP fontos etiológiai tényező a migrénes fejfájás kialakulásában, és ez a felismerés új kezelési eljárások bevezetésének lehetőségét veti fel. Kérem, hogy bővebben mutassa be ezt a lehetőséget.”

A VIP és a PACAP-38 endogén ligandjai a VPAC_{1/2} és a PAC₁ receptoroknak. A VPAC_{1/2} receptorhoz a VIP és a PACAP-38 egyforma affinitással kötődik, míg a PACAP-38 a VIP-hez képest 1000x potensebb agonistája a PAC₁ receptornak. A VIP és a PACAP-38 a VPAC₂ receptor útján váltja ki a meningeális vazodilatációt. A PACAP-38 a trigemino-cervicalis complexben (TCC) a másodlagos átkapcsoló neuronok késleltetett aktivációját és szenzitizációját okozza. Elektrofiziológiai vizsgálatok igazolták, hogy csak a centrálisan (intracerebroventricularisan) beadott PAC₁ receptor antagonist (PACAP₆₋₃₈) képes gátolni a másodlagos szenzoros neuronok aktivitását a TCC-ben (Akerman and Goadsby 2015). A jelenleg rendelkezésre álló specifikus PAC₁ receptor agonista a maxadilan, mely egy szúnyogszerű élősködő (*Lutzomyia longipalpis*) nyálában fellelhető peptid. Ezen peptid gyűrű szerkezetében a 24 és a 42 pozícióban történő hasítással juthatunk az M65-nevű egységhez, mely PAC₁ receptor antagonist (Lerner et al. 2007). A rendelkezésre álló adatok szerint azonban a maxadilan nem befolyásolta a CGRP felszabadulást és az M65 pedig nem gátolta a PACAP-38 által indukált CGRP kibocsátást a trigemino-vascularis rendszerben (Jansen-Olesen et al. 2014).

Ezen adatok arra utalnak, hogy humán vonatkozásban a vér-agy gáton átjutó PAC₁ receptor antagonisták jelenthetik az új terápiás lehetőséget a migrén rohamterápiájában

(Tfelt-Hansen 2007), de csak akkor, ha tudott lesz a PACAP hatásának pontos helye a humán trigemino-vascularis rendszerben.

Irodalom

Akerman S., Goadsby P.J.. Neuronal PAC1 receptors mediate delayed activation and sensitization of trigeminocervical neurons: Relevance to migraine. Sci. Transl. Med. 2015 Oct 7;7(308):308ra157. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa7557.

Tfelt-Hansen P.C. PACP-induced migraine: a possible CNS effect? Brain 137:1-2, 2014.

Lerner E.A., Iuga A.O., Reddy V.B. Maxadilan, a PAC1 receptor agonist from sand flies. Peptides 28:1651-1654, 2007.

Jansen-Olesen I., Baun M., Amrutkar D.V., Ramachandran R., Christophersen D.V., Olesen J. PACAP-38 but not VIP induces release of CGRP from trigeminal nucleus caudalis via a receptor distinct from the PAC1 receptor. Neuropeptides 48:53-64, 2014.

„A dolgozat 4. fejezete az Összegzés, melyben a jelölt 1-1 mondatban tárgyalja a különböző vizsgálatokból származó új eredményeket. A bíráló számára ebből a fejezetből hiányzik a szintézist adó összefoglalás. A vizsgálatokat leíró alfejezeteket záró „Megfigyeléseink jelentősége” című paragrafus minden esetben röviden értékeli és kontextusba helyezi az adott vizsgálat legfontosabb következtetéseit, ugyanakkor ezek egymáshoz kapcsolódását nem tárgyalja részletesen, valamint kitekintést a további kutatási feladatokra, vagy az esetleges terápiás lehetőségekre csak néhány esetben ad.”

Professzornő véleményét elfogadom.

Szintézist adó összefoglalás:

Munkám során azon nemzetközi klinikai és kísérletes gondolkörhöz csatlakoztam, mely a trigemino-vascularis rendszer aktivitását, szenzitizációját, a neuropeptidek szerepét és az agyi hiperexcitabilitást a migrén pathomechanizmusában lehetséges tényezőkné tekintette. A trigemino-vascularis rendszer központi eleme a TRIG, melyben humán vizsgálataink alapján CGRP és hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) proteinek és receptoraik jelenlétét igazoltuk. A trigemino-vascularis rendszer – feltételezhetően a kúszó depolarizáció/depresszió (CSD) hatására keletkezett – aktivitása következtében a ganglion trigeminale pseudounipolaris neuronjainak perifériás ágán a durális vasculatúrába CGRP és PACAP kiáramlás következik be. A folyamat eredőjeként neurogén inflammáció (vasodilatatio, plasma protein extravasatio) és hízósejt degranuláció jön létre, melyek a trigeminális afferensek perifériás szenzitizációját váltják ki. Klinikailag ezt jelzi a fejfájás lüktető jellege,

valamint a fizikai aktivitásra erősödő fájdalom. Terápiás szempontból a közeljövőben már esély mutatkozik a ganglion trigeminalera ható, CGRP-, valamint CGRP-receptor ellenes ellenanyagok alkalmazására, mint a migrén profilaktikus kezelési módja. A trigeminális perifériás ágak és a trigemino-vascularis rendszer parasympathicus karja által ellátott nyálmirigyekből észlelésünk szerint a migrénesekben glutaminsavban gazdag nyál szabadul fel, mely hyperexcitábilis állapotot tükröz. Ez lehetőséget jelenthet a migrénes betegekben biomarker meghatározására, mely segítséget nyújthat a differenciál diagnosztikában, a terápiás válaszban és a prognosztikában. A migrénes páciensek jelentős részében a fejfájásroham során tapasztalt craniális autonóm jelek (pl.: könnyezés, orrfolyás) hátterében, vizsgálataink alapján a trigeminális rendszer által befolyásolt parasympathicus ganglion funkció áll. Erre utaltak a parasympathicus ganglion sphenopalatinumban általunk kimutatott szenzoros neuropeptidet (CGRP) tartalmazó idegrostok, és a satellita glia sejteken észlelt funkcionális CGRP receptor komponensek (CLR, RAMP1) jelenléte. Megfigyeléseink szerint a migrénes rosszullétek állandósulásának, a krónikus migrén kialakulásának a hátterében a ganglion trigeminale-ban zajló szignalizációs rendszer aktivitása feltételezhető. Ez felismerésünk szerint a MAPK rendszerben az ERK1/2 működésén át valósul meg, következményes fokozott CGRP megjelenéssel neuronális és gliális szinten egyaránt. A jövőbe tekintve, az innovatív gyógyszergyártásban az ERK1/2 gátlókat, mint migrén ellenes farmakonok kifejlesztését célozhatják meg. A trigemino-vascularis rendszer központi ágát a TRIG-ből a trigemino-cervicalis komplexbe (TCC) jutó rostok jelentik. A humán TCC-ben igen jelentős CGRP és PACAP immunreaktív idegrost arborizációt találtunk. Ez lehetőséget teremt, hogy az itt felszabaduló CGRP és PACAP aktiválja, szenzitizálja a TCC-ben a másodlagos átkapcsoló neuronokat, mely hátterét jelentheti a migrénes fejfájásroham során gyakran létrejövő cephalikus allodynia kialakulásának. Az agytörzsi „migrén-generátorok” értékelése során arra a következtetésre jutottunk, hogy a locus ceruleus (LC) a PACAP és a CGRP által befolyásolhatja a TCC-ben a nociceptív folyamatok transzmisszióját. A migrénes betegek komorbid tényezői között szerepel az ischaemiás stroke. A migrénes páciensek vérlemezke eikozanoid rendszerének elemzése nyomán úgy tartjuk, hogy a megnövekedett thrombocyta aggregabilitás az egyik lényeges eleme a migrén és az ischaemiás stroke közötti szoros kapcsolatnak. A migrénes betegek neurológiai vizsgálata során gyakori tünet a látórendszeri eltérés (pl.: homályoslátás, fotofóbia). Kérdésként merült fel a magnocellularis, illetve a parvocellularis vizuális pályarendszer funkciózavara. A vizuális rendszer

elektrofiziológiai vizsgálatával megállapítottuk, hogy az aura nélküli migrénes betegekben a magnocellularis pályarendszer zavara volt kimutatható. Az a klinikai megfigyelés, miszerint a migrénes páciensekben az intravénás infúzióban adott PACAP-38 késleltetett aura nélküli migrénes rohamot provokált, megerősítette a PACAP-38 szerepét a migrén kórfolyamatában. Ezért a trigemino-vascularis rendszerben a PACAP előfordulását feltárni igyekvő immunhisztokémiai vizsgálatainkat követően a migrénes betegekben spontán rohamban, valamint fájdalommentes időszakban meghatároztuk a PACAP-38 koncentrációját az antecubitalis vénás vérplazmában. Eredményként a roham alatt jelentősen megemelkedett PACAP-38 koncentrációt tapasztaltunk. A trigemino-vascularis rendszer perifériás és centrális területén immunhisztokémiai vizsgálatainkkal kimutatott PACAP jelenlét, a betegekben az iktális és interiktális PACAP-38 koncentrációváltozás, valamint azon elektrofiziológiai vizsgálatok eredményei, melyek felvetik a PAC1 receptor szerepét a TCC-ben a másodlagos átkapcsoló neuronok aktivitásában, együttesen célozzák a közeljövőben a PAC1 receptor antagonisták előállításának a fontosságát a migrénes páciensek akut terápiájában.

Áttekintve a migrén kórfolyamatának vizsgálatára irányuló törekvéseim eredményeit és az abból levonható következtetéseket, úgy vélem, hogy a migrén neurovascularis megbetegedés, melyben a trigemino-vascularis rendszer neuropeptidek által meghatározott működésének elsődleges szerepe van.

További terveim között szerepel a kémiai és elektromos úton aktivált trigemino-vascularis rendszerben a PACAP és a kynureninek, mint a glutamáterg rendszeren keresztül ható komponensek együttes vizsgálata. Az ezzel kapcsolatos előkísérletek már megtörténtek, a továbbiakban ezt folytatjuk munkacsoportunkkal.

Rövidítések jegyzéke:

cAMP: ciklikus adenosin monophosphat

BMK: nagy mitogén-aktivált protein kináz

CAPS: craniális autonóm parasympathicus tünet

CGRP: calcitonin génnel-rokon peptid

CLR: calcitonin receptor-szerű receptor

CSD: corticalisan tovaterjedő kérgi gátlás

DALA: delta-aminolevulinsav

DRG: hátsó gyöki ganglion
ERK1/2: extracellularis szignál-szabályzott kináz 1 és 2
FHM: familiáris hemiplégiás migrén
GABA: γ -amino-vaajsav
JNK: c-Jun N-terminális kináz
LC: locus ceruleus
MAPK: mitogén-aktivált protein kináz
OnabotA: onabotulinumtoxin A
PAC1: PACAP1 receptor
PACAP: hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid
PKA: protein kináz
RAMP1: receptor aktivitást befolyásoló protein1
S.D.: standard deviáció
SP: P-anyag
SSVEP: steady-state vizuális kiváltott válasz
TCC: trigemino-cervicalis komplex
TRPV1: Transient Receptor Potential Vanniloid1
VIP: vasoactiv intestinalis polipeptid
VPAC1: VIP1 vagy PACAP2 receptor
VPAC2: VIP2 vagy PACAP3 receptor

Végezetül ismételten köszönöm Kamondi Anita Professzornő munkáját, kérdéseit és a bennük foglalt, a további munkámra vonatkozó javaslatait.

Szeged, 2016. november 28.

Dr. Tajti János