

Válasz Prof. Dr. Oláh László opponensi véleményére

Hálásan köszönöm Dr. Oláh László Professzor Úrnak, hogy alaposan áttanulmányozta az értekezésemet és ez alapján elkészítette részletes bírálatát.

Általános megjegyzések:

Őszintén örülök, hogy a dolgozat stílusa elnyerte a tetszését. A rövidítésekre vonatkozó építő jellegű kiegészítését köszönettel veszem. Természetesen az összes kísérlet az etikai bizottság engedélyével történt, melyek az eredeti közleményekben részletesen fel vannak tüntetve. A további kérdéseket, megjegyzéseket és válaszokat sorszámozom a könnyebb követhetőség végett.

Kérdések és megjegyzések:

1. *A 3.1.1., 3.1.2., 3.1.3., 3.1.4., 3.1.5. alfejezetekben az „Anyag és módszer” rész a következőképp kezdődik: „Felnőtt hím Wistar patkányok egyszeri s.c. NTG injekciót kaptak 10 mg/kg dózisban. Négy órával az injekciók adása után az állatokat perfundáltuk...” Az „Anyag és módszer” további részében sem derül ki, hogy az állatok egy része placebo kapott, az majd csak az „Eredmények” részben, az ábra értelmezésekor lesz világos. Így az állatok számának csoportonkénti megadása a módszerek részben nehezen volt értelmezhető. A 3.1.6. alfejezettől már változik a leírás: „Felnőtt hím Wistar patkányok (n=5 csoportonként) egyszeri s.c. NTG injekciót kaptak 10 mg/kg dózisban, az állatok másik fele placebo kezelésben részesült.”*

Egyetértek a bírálóval, az elemszám mellett valóban oda kívánczok, hogy az állatok másik fele vehikulumot kapott a kísérlet során. A részletes metodikai részben (6. fejezet) viszont egyértelműen le van írva a kontroll csoport kezelése is.

2. *Miért 4 órával a NTG adás után vizsgálták az állatokat? Ekkor volt a legerősebb a fájdalom? Történt előtte olyan vizsgálatsorozat, melyben mérték az optimális vizsgálati időpontot? NTG adás után lehetett mérni valamilyen módon a fájdalom intenzitását?*

A kísérlet időzítésével kapcsolatosan, nagyon fontos momentumra kérdezett rá a bíráló, melynek alapját egy korábbi vizsgálat adta. Cristina Tassorelli olasz munkacsoportja szintén a NTG modell vizsgálatával foglalkozik. Egy korábbi dolgozatukban részletesen felmérték különböző agyi és agytörzsi magvak aktiválódási mintázatát és időbeli alakulását patkányban szisztémás NTG adása után (Tassorelli és mtsai., 1995). Ebben úgy találták, hogy a fájdalomérzésben releváns kaudális trigeminális mag másodlagos érző neuronjai, az NTG adása után 4 órával mutatják a legkifejezettebb c-fos expressziót. Az állatok viselkedését elemző kísérletek eredményei is erre utalnak 4 óra elteltével (Demartini és mtsai., 2022) valamint párhuzam vonható azokkal a vizsgálatokkal, melyekben NTG adása után 3 órával is kifejezett kraniális allodyniára utaló tüzelési mintázatot detektáltak a TNC elektrofiziológiai vizsgálata során patkányban (Akerman és mtsai., 2018).

3. 22. oldalon A „Megfigyeléseink jelentősége” részben írja: „Kísérleteink megmutatták, hogy a szisztémásan adott NTG több órás latenciával megemeli a TNC nNOS expresszióját.” Mivel csak egy időpontot vizsgáltak, nehéz megmondani, hogy mikortól emeli meg a NTG a nNOS szintet. Amit állítani lehet, hogy 4 óra elteltével még/már emelkedett a nNOS reaktív sejtek száma, de arra nem lehet következtetni, hogy milyen latenciával nő a nNOS expresszió.

Köszönöm Professzor Úr pontosítását és egyetérték velem, az említett szakaszban azt akartam kihangsúlyozni, hogy a hatás esetünkben 4 óra elteltével fennáll, mely időtartam összemérhető, a NTG okozta roham megjelenésével migrénesekben.

4. 27. oldalon a 11. ábra grafikonján nincs feltüntetve, hogy az y tengely mit demonstrál, s a mértékegység sem szerepel az y tengelyen. Mindez az ábraalírásból sem derül ki.

Igen, itt is relatív optikai denzitásról van szó, mint többi Western blotot bemutató ábrán.

5. 29. oldal, 13. ábrán a relatív optikai denzitás szerepel. Mitől relatív? Mi tekinthető 100%-nak, ill. 1.0-nek? Sem itt, sem később nem derült ki a bíráló számára.

Az elfogadott gyakorlat az, hogy az optikai denzitásokat valamilyen viszonyítási alaphoz adjuk meg, ez az 1 (vagy 100 attól függően, hogy milyen váltószámot használunk). A kísérleteinkben legtöbbször egy belső kontroll fehérjéhez (ún. housekeeping protein, melynek megjelenése kizárólag a minta mennyiségétől függ) hasonlítjuk a vizsgált fehérje optikai denzitását, így még pontosabb a mérés, mivel a pipettázáskor esetlegesen kialakuló kismértékű mennyiségi különbségek is korrigálódnak. Az is elfogadott, hogy egy kontroll minta vagy a kontroll csoportok átlaga adja a viszonyítási alapot. Mivel az évek során sokfajta megközelítést alkalmaztunk, jogos a bíráló észrevétele, hogy ezt pontosítani kellett volna az egyes kísérleteknél.

6. 30. oldal: A c-fos, nNOS expressziót, a CGRP tartalmú rostokat, a szerotonint és a CamKII expressziót a TNC-ben és a Th1 gerincvelői szegmentumban is vizsgálták, viszont a NTG NFkB, COX-2, TRPV-1-re gyakorolt hatását csak a TNC-ben nézték, a Th1 gerincvelői szegmentumban nem. Mi az oka, hogy itt nem vizsgálta azt, hogy a NTG direkt hatásáról van-e szó?

A bíráló részéről jogos az észrevétel, de a korábbi kísérletsorozatban sosem tapasztaltunk változást a Th1 gerincvelői szinten, emiatt az említett, későbbi kísérletben ezt már nem vizsgáltuk, feltételezve, hogy a hatás hasonló mintázatban jelentkezik.

7. 38-39. oldal: *A bajuszpárnába fecskendezett formalin beadása után 4 órával a jelölt leírása szerint „a CGRP pozitív rostok által lefedett terület a TNC-ben nem változott meg szignifikánsan a formalinkezelés hatására egyik magasságban sem”. Csak találgatni lehet, feltehetően a placebo kezeléshez képest nem volt szignifikáns a változás. A „Megfigyelések jelentősége” részben azt a feltételezést fogalmazta meg, hogy a CGRP esetleges változásai hamarabb lezajlottak. Az adatok erre semmilyen formában nem utaltak, tehát ez marad egy feltételezés.*

Egyetértek a bírálóval, hogy az orofaciális modellben a CGRP-vel kapcsolatos negatív eredményekből csak feltételezni tudjuk, hogy az esetleges változások korábban lezajlottak-e. Ezt a hipotézist némileg erősíti az a megfigyelés, hogy az intraplantáris formalin a megfelelő gerincvelői szegmentumban megemeli a CGRP expressziót az első két órában, és ez a hatás eltűnik 4 óra látenciával (Greco és mtsai., 2008).

8. 40-41. oldal: *A c-fos és nNOS immunreaktív sejtek számát az orofaciális formalin adás oldalán az ellenoldali immunreaktív sejtek számával hasonlították össze (nem a placebo kapott állatok adataival). A c-fos és nNOS pozitív sejtek számának a formalin adás oldalán mért magasabb számát úgy értelmezték, hogy „az orofaciális formalin is képes a trigeminális rendszer aktivációs és szenzitizációs markereit megemelni”. Ez bizonyára így van, de a kísérleti elrendezésből ezt a következtetést nem lehet levonni, hisz az injekció okozta fájdalom formalin nélkül is előidézhetette volna ezt a változást. Mivel placebo kontrollos kísérletet végeztek, meg kellett volna említeni, hogy a kontrollként szolgáló, placebo kapó állatoknál ilyen eltérés nem volt.*

Az értekezésben az orofaciális formalin teszt kapcsán bemutatott c-fos és nNOS expressziós adatok a legelső kísérletekből származtak, és valóban az ellenoldalhoz hasonlítottunk, mert hasonló megközelítésre már volt példa a szakirodalomban (Lam és mtsai., 1995). Azonban egy későbbi cikkünkben (melynek ezen adatait didaktikai szempontokat figyelembe véve nem tüntettem fel az értekezésemben) már a bíráló által is felvetett kontroll vizsgálat is elkészült, mely megnyugtatóan igazolta a fenti állítást (Fejes-Szabó és mtsai., 2015).

9. 42. oldal: *A trigeminális ganglion elektromos ingerlése kapcsán írja „A többi agytörzsi páros magnál az oldalak közötti különbséget páros t-próbával vizsgáltuk. Mivel oldalkülönbséget nem találtunk, az adatokat összevontuk...” Két kérdés merül fel. Páros t-tesztet általában akkor alkalmazunk, ha ugyanazt a mintát vizsgáljuk valamilyen hatás előtt és után. Jelen esetben nem ez történt, hanem egy jobb oldali trigeminális ganglion elektromos ingerlés után két különböző mintát (jobb és bal oldal) vizsgáltak, még ha azok ugyanazokból az állatokból származtak is. Helyesnek tartja ezt a statisztikai módszert? A másik kérdés, hogy mi lehet az oka annak, hogy egyoldali ingerlés nem okozott oldalbeli különbséget a nucleus raphe magnus aktivitásában? A pályák keresztezett és nem keresztezett volta?*

A páros t-próbákat összetartozó minták elemzésére használják. Az összetartozó minták leggyakrabban valóban előtte/utána mérések, de alkalmazhatók ugyanazon minta jobb és bal oldalának összehasonlítására is. A nucleus raphe magnus (NRM) esetében nem találtunk oldalkülönbséget az aktivációs mintázatban egyoldali Gasser-dúc ingerlés után. Mivel a TNC és a NRM közötti direkt összeköttetés gyenge (Hermann és mtsai., 1997), ezt indirekt hatásnak

gondoljuk felsőbb központi idegrendszeri régiók révén (cortex, periaqueductalis szürkeállomány). Retrográd jelölési módszerekkel viszont az NRM bemenete ezen területekről bilaterális reprezentációt mutat, azaz feltételezhető, hogy így kétoldali szupranukleáris bemenetet kap, és ez magyarázhatja az egységes aktivációt (Hermann és mtsai., 1997).

10. A 47. oldalon szerepel „...a műtét alatt alkalmazott lokális lidokain viszont mindegyik csoportban csökkenti a c-fos aktivitást az V/1-es területen (31. ábra)”. A 48. oldalon a 31. ábrán írja, hogy „A lidokain kezelés csökkenti a műtét kapcsán kialakuló c-fos aktivitást a durális kezelést nem kapott, műtött állatokban...” Számomra nem meggyőző, hogy az V/1. szomatotópiás területben lidokain mellett alacsonyabb lenne a műtét hatására megjelenő c-fos immunreaktív sejtek száma a 31. ábrán. Sőt, a lidokaint kapókban (A), legalábbis az ábra szerint, magasabb volt a c-fos immunreaktív sejtek száma, mint a lidokaint nem kapókban (B). Nem lehet, hogy az A és B ábrarész felcserélődött?

Köszönöm szépen az észrevételt, sajnos az ábraalírásban csere történt.

11. 57. oldal: „Korábbi kísérletek igazolták, hogy a NTG szisztémás adása késleltetett módon aktiválni képes az aktivációs és szenzitizációs markereknek tartott molekulákat a TNC területén, mely folyamatban feltehetőleg a proszttaglandinok játszanak szerepet.” Feltehetően azt akarta írni a szerző, hogy a proszttaglandinok is szerepet játszanak. Egy meglehetősen bonyolult folyamatról van szó, tehát biztosan nemcsak a proszttaglandinoknak van szerepe a TNC területi aktivációban.

Köszönöm szépen a pontosítást, egyetértek vele.

12. 60. oldal, 42. ábra d és f ábrarész felcserélődött, vagy az ábraalírás hibás. Az ábra, ellentétben a szöveggel, pont azt mutatja, hogy a COX-1 gátló, nem pedig a COX-2 gátló védi ki a nitroglicerinnel való adás okozta CamKII aktivációt.

Igen, az ábrák logikája alapján az ábraalírás cserélődött fel.

13. 61. oldal, 43. ábrán hiányzik az ábráról annak jelölése, hogy mely ábrarész jelöli a COX-1, vagy COX-2 gátlóval történt előkezelést.

Igen ez ott kimaradt, de szerencsére az ábra logikája ugyanaz, így talán nem rontja lényegesen az érthetőséget.

14. 61. oldal: Mi az oka a szerző szerint, hogy bár a migrén kialakulásában a COX-2 izoenzimnek tulajdonítanak szerepet, s ezt a szerző eredményei is alátámasztják, mégis a nem szelektív COX gátlók terjedtek el a migrén kezelésében (naproxen, diclofenac, ASA, ibuprofen)?

Teljesen ésszerű volt a gyógyszerfejlesztők részéről, hogy a mellékhatásprofil javítása céljából a gyulladási és a fájdalom kialakulásában elsődlegesen szerepet játszó COX-2 izoforma gátlására törekedjenek. Sajnos nem sokkal a bevezetésük után kiderült, hogy lényegesen emelik a

kardiovaszkuláris megbetegedések kockázatát (Kearney és mtsai., 2006). A képet árnyalja, hogy a nem szelektív COX gátlók nagyobb dózisban adva is rendelkeznek ilyen hatással a naproxen kivételével (Bhala és mtsai., 2013). A migrén rohamterápiájában a COX-2 inhibitorok hatékonyak bizonyultak (Krymchantowski és Bigal 2005, Ailani és mtsai., 2023), de elterjedésüket feltehetőleg a fenti körülmény gátolta.

15. 66. oldal 48. ábra és 68. oldal 50. ábra ábraalírása szerint „Az IS hatására szignifikánsan emelkedik a TRPV1 és nNOS a kontrollhoz (SIF) viszonyítva, míg a szumatriptán előkezelést kapott állatokban nincs különbség az aktív kezelt csoport (SUMAIS) és a kontroll (SUMASIF) között”. A nNOS IR sejtek számát mutató ábrarészen az aktív kezelt csoport SUMAIS értékek magasabbak voltak a kontroll SUMASIF adatokhoz képest, s az aktív kezelt csoport SUMAIS jelek fölött szignifikancia jelzések láthatók. Ez nem azt jelenti, hogy különbség volt az aktív kezelt csoport (SUMAIS) és a kontroll (SUMASIF) között?

A durális IS kezelés szignifikánsan megemelte a TRPV1 és nNOS expressziót a kaudális trigeminális mag területén a kontrollhoz képest (IS vs. SIF). A szumatriptán előkezelés modulálta ezt a hatást, azaz a TRPV1 és nNOS expresszió szignifikánsan kisebb, mint az aktív előkezelést nem kapott állatokban (SUMAIS vs. IS). Ezt hivatott jelezni a lenti szignifikancia jelzés. A SUMAIS és SUMASIF csoport között nem volt szignifikáns különbség. Az ábraalírás kiegészítése és nagyobb nagyítás alkalmazása pontosabbá tehetné volna ezt.

16. A 82. oldalon szereplő kijelentést, miszerint „az NMDA receptorok kiemelt szerepet játszanak a NO szintézisében (Entrena és mtsai., 2005)” legyen kedves magyarázni!

A neuronális NOS fontos regulátora a kalmodulinhoz kötődő intracelluláris Ca^{2+} , mely az enzimhez kapcsolódva képes azt indukálni (Su és mtsai., 1995). Ezen Ca^{2+} egyik forrása az NMDA receptorok fokozott aktivitásából eredő beáramlás (Bredt és Snyder 1994), melyet az NMDA blokkoló kinurénsav származékokkal gátolni lehet, és ezáltal a nNOS aktivitás is csökken (Entrena és mtsai. 2005).

17. A 87. oldalon, a 68. ábrán más rövidítések szerepelnek, mint az ábramagyarázatban (KYNAIS — KYNIS, KYNASIF — KYNSIF). Az IS vonal fölötti szignifikancia-jelölések kivételével nem egyértelmű, hogy a szignifikancia jelzések mire vonatkoznak. Bár a jelölt azt írja, hogy „a KYNA előkezelést kapott állatokban nincs különbség az aktív kezelt csoport (KYNAIS) és a kontroll (KYNASIF) között”, a nNOS változást feltüntető ábrarészen látszik egy határozott különbség a fenti két csoport görbéje között, s feltehetően a szignifikancia jelzések arra utalnak, hogy ez a különbség szignifikáns!

Igen, sajnálatosan a rövidítések egy betűben különböznek az ábrán és a feliraton. A helyzet hasonló, mint a 15. kérdésnél. Egyrészt jelöltük, hogy az IS kezelés szignifikánsan megemelte a TRPV1 és a nNOS expresszióját a kaudális trigeminális magban. Másrészt a KYNA kezelés modulálta ezt, azaz az IS és a KYNAIS között szignifikáns különbség mutatkozik. Ezt jelöli a másik szignifikancia jelzés. Bár az ábrát áttekintve joggal merül fel, hogy a kontroll (KYNASIF) és aktív kezelt csoport (KYNAIS) között esetlegesen különbség van, de ez a nyers adatokat ismételtén átnézve sem igazolódott szignifikáns mértékűnek.

18. A 94. oldalon az Immunhisztokémia fejezetben az állatoknak adott SZR81 kezelés dózisének mmol/kg, a Western blot fejezetben mg/kg dózisban adta meg. Feltehetően az egyik helytelen.

A számos kísérlet során többféle mértékegységgel adtuk meg a kezelések dózisének, emiatt történhetett az elírás. A helyes ebben az esetben az 1 mmol/kg.

Szeretném még egyszer megköszönni Dr. Oláh László Professzor Úrnak javító szándékú értékes észrevételeit és kérdéseit, valamint azt, hogy dolgozatomat pozitívan értékelte és nyilvános vitára bocsátását támogatta. Tisztelettel kérem a bírálói kérdésekre adott válaszaim elfogadását.

Szeged, 2024. november 12.



Dr. Párdutz Árpád

Felhasznált irodalom:

Ailani J, Nahas SJ, Friedman DI, Kunkel T. The Safety of Celecoxib as an Acute Treatment for Migraine: A Narrative Review. *Pain Ther.* 2023 Jun;12(3):655-669. doi: 10.1007/s40122-023-00501-5. Epub 2023 Apr 24. PMID: 37093356; PMCID: PMC10199993.

Akerman S, Karsan N, Bose P, Hoffmann JR, Holland PR, Romero-Reyes M, Goadsby PJ. Nitroglycerine triggers triptan-responsive cranial allodynia and trigeminal neuronal hypersensitivity. *Brain.* 2019 Jan 1;142(1):103-119. doi: 10.1093/brain/awy313. PMID: 30596910; PMCID: PMC6308314.

Bhala N, Emberson J, Merhi A, Abramson S, Arber N, Baron JA, Bombardier C, Cannon C, Farkouh ME, FitzGerald GA, Goss P, Halls H, Hawk E, Hawkey C, Hennekens C, Hochberg M, Holland LE, Kearney PM, Laine L, Lanus A, Lance P, Laupacis A, Oates J, Patrono C, Schnitzer TJ, Solomon S, Tugwell P, Wilson K, Wittes J, Baigent C. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet.* 2013 Aug 31;382(9894):769-79. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60900-9. Epub 2013 May 30. PMID: 23726390; PMCID: PMC3778977.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:175-95. doi: 10.1146/annurev.bi.63.070194.001135. PMID: 7526779.

Demartini C, Greco R, Francavilla M, Zanaboni AM, Tassorelli C. Modelling migraine-related features in the nitroglycerin animal model: Trigeminal hyperalgesia is associated with affective status and motor behavior. *Physiol Behav.* 2022 Nov 1;256:113956. doi: 10.1016/j.physbeh.2022.113956. Epub 2022 Aug 31. PMID: 36055415.

Entrena A, Camacho ME, Carrión MD, López-Cara LC, Velasco G, León J, Escames G, Acuña-Castroviejo D, Tapias V, Gallo MA, Vivó A, Espinosa A. Kynurenamines as neural nitric oxide synthase inhibitors. *J Med Chem.* 2005 Dec 29;48(26):8174-81. doi: 10.1021/jm050740o. PMID: 16366599.

Fejes-Szabó A, Bohár Z, Nagy-Grócz G, Vámos E, Tar L, Pődör B, Tajti J, Toldi J, Vécsei L, Párdutz Á. Effect of probenecid on the pain-related behaviour and morphological markers in orofacial formalin test of the rat. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2015;14(3):350-9. doi: 10.2174/1871527314666150225141229. PMID: 25106627.

Greco R, Tassorelli C, Sandrini G, Di Bella P, Buscone S, Nappi G. Role of calcitonin gene-related peptide and substance P in different models of pain. *Cephalalgia.* 2008 Feb;28(2):114-26. doi: 10.1111/j.1468-2982.2007.01468.x. PMID: 18197882.

Hermann DM, Luppi PH, Peyron C, Hinckel P, Jouvet M. Afferent projections to the rat nuclei raphe magnus, raphe pallidus and reticularis gigantocellularis pars alpha demonstrated by iontophoretic application of cholera toxin (subunit b). *J Chem Neuroanat.* 1997 Jun;13(1):1-21. doi: 10.1016/s0891-0618(97)00019-7. PMID: 9271192.

Kearney PM, Baigent C, Godwin J, Halls H, Emberson JR, Patrono C. Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ.* 2006 Jun 3;332(7553):1302-8. doi: 10.1136/bmj.332.7553.1302. PMID: 16740558; PMCID: PMC1473048.

Krymchantowski AV, Bigal ME. Rofecoxib in migraine. *Expert Rev Neurother.* 2005 Jan;5(1):55-61. doi: 10.1586/14737175.5.1.55. PMID: 15853474.

Lam HH, Hanley DF, Trapp BD, Saito S, Raja S, Dawson TM, Yamaguchi H. Induction of spinal cord neuronal nitric oxide synthase (NOS) after formalin injection in the rat hind paw. *Neurosci Lett*. 1996 Jun 7;210(3):201-4. doi: 10.1016/0304-3940(96)12702-6. PMID: 8805130.

Tassorelli C, Joseph SA. Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Res*. 1995 Jun 5;682(1-2):167-81. doi: 10.1016/0006-8993(95)00348-t. PMID: 7552308.

Su Z, Blazing MA, Fan D, George SE. The calmodulin-nitric oxide synthase interaction. Critical role of the calmodulin latch domain in enzyme activation. *J Biol Chem*. 1995 Dec 8;270(49):29117-22. doi: 10.1074/jbc.270.49.29117. PMID: 7493936.