

## **Bírálat Dr. Párdutz Árpád „A SZENZITIZÁCIÓ MIGRÉNBEN ÉS ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLEIBEN” című MTA doktori értekezéséről.**

Dr. Párdutz Árpád munkájában a trigeminális rendszer állatkísérletes aktivációját és szenzitizációját vizsgálta és a kapott eredményeket állította párhuzamba a migrén patomechanizmusára jellemző folyamatokkal. A jelölt több migraine modellt is vizsgált, melyekben a trigeminális rendszer aktivációját és a szenzitizációs folyamatokra jellemző molekuláris markereket vizsgálta kísérletes körülmények között, majd azt tanulmányozta, hogy milyen tényezők befolyásolják ezeket a folyamatokat.

Az értekezés a 664 irodalmi hivatkozást is beleszámítva 159 oldalt tartalmaz, az érdemi rész 124 oldal, a megértést 88 ábra és 2 táblázat segíti. A dolgozat alapjául a témához szorosan kapcsolódó 17 közlemény szolgál, melyek közül 4-ben első, 7-ben utolsó szerzőként szerepel a jelölt.

Az értekezésben a szerző a perifériás és centrális szenzitizáció ismertetése után a migraine jellegzetességeiről szól, majd bemutatja a fejfájásokban megjelenő szenzitizációs folyamatokat, tüneteket. A célkitűzések ismertetését követően a migraine állatkísérletes modelljeit írja le. Ezt követően került sor az egyes munkák bemutatására, melynek során az egyes munkák háttérét és célját, majd röviden a módszereket és eredményeket ismertette, melyet tömör diszkusszió követett. Az egyes munkák ismertetése után 16 pontban összefoglalta az új eredményeket és röviden magyarázta azokat. Az értekezés végén részletesen írt a felhasznált módszerekről, ezt követte az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke, a köszönetnyilvánítás, majd az irodalomjegyzék. Bár szokatlan a módszerek utoljára történő részletes ismertetése, néhány tudományos folyóirat is ezt a gyakorlatot követi, ez a jelen esetben sem volt zavaró.

### **Általános megjegyzések**

A dolgozat szépen megírt, stílusa olvasmányos, jól követhető. Nyelvtani hiba elvéve található, egyedül a rövidítések előtti névelő használata volt helyenként zavaró. A rövidítések előtti névelővel kapcsolatban az a szabály, hogy az a rövidítés kiejtett alakjához igazodik, míg a szerző a nem rövidített alakhoz igazította a névelőt.

Hiányoltam, hogy sehol sem említette az állatkísérletes munkákat engedélyező etikai bizottsági állásfoglalásokat.

### **Kérdések, megjegyzések:**

#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.”

# 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?

# 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 az nNOS szintet. Amit állítani lehet, hogy 4 óra elteltével még/már emelkedett az nNOS reaktív sejtek száma, de arra nem lehet következtetni, hogy milyen latenciával nő az nNOS expresszió.

# 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.

# 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.

# 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 NTC-ban nézték, a Th1 gerincvelői szegmentumban nem. Mi az oka, hogy itt nem vizsgálta azt, hogy a NTG direkt hatásáról van-e szó?

# 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 egy marad egy feltételezés.

# 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 előidézhette volna ezt a változást. Mivel placebo kontrollos kísérletet végeztek, meg kellett volna említeni, hogy a kontrollként szolgáló, placebo kapó állatoknál ilyen eltérés nem volt.

# 42. oldal A trigeminalis 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 trigeminalis ganglion elektromos ingerlés után két különböző mintát (jobb és bal oldal) vizsgáltak, mégha 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 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. szomatotopiás területben lidocain mellett alacsonyabb lenne a műtét hatására megjelenő c-fos immunreaktív sejtek száma a 31. ábrán. Sőt, a lidocaint kapókban (A), legalábbis az ábra szerint, magasabb volt a c-fos immunreaktív sejtek száma, mint a lidocaint nem kapókban (B). Nem lehet, hogy az A és B ábrarész felcserélődött?

# 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 prosztaglandinok játszanak szerepet.” Feltehetően azt akarta írni a szerző, hogy a prosztaglandinok is szerepet játszanak. Egy meglehetősen bonyolult folyamatról van szó, tehát biztosan nemcsak a posztaglandinoknak van szerepe a TNC területi aktivációban.

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

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

# 61. oldal Mi az oka a szerző szerint, hogy bár a migraine 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)?

# 66. oldal 48. ábra és 68. oldal 50. ábra ábraaláírása 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”. Az 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 82. oldalon szereplő kijelentést, miszerint „az NMDA receptorok kiemelt szerepet játszanak a NO szintézisében (Entrena és mtsai., 2005)” legyen kedves magyarázni!

# 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”, az 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!

# 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.

**Új eredményeknek az alábbi, vastagon szedett állításokat javaslom elfogadni:**

Az NO donor **NTG szisztémás adása patkányokban szelektíven fokozta a TNC (kaudális trigeminális mag) területén található másodlagos trigeminális neuronok nNOS expresszióját, valamint a gyulladásos és nociceptív folyamatokban szerepet játszó molekulák (TRPV1, COX2, NFkB) expresszióját, jelezve a trigeminális aktivációt és a szenzitizációs folyamatok aktiválódását.** Rámutatott, hogy a NTG, azáltal, hogy **növelte a CamKII és csökkentette a kinurenin útvonal enzimjeinek expresszióját, hozzájárulhatott a glutamaterg neurotranszmisszió fokozódásához és az antiglutamaterg hatás csökkenéséhez, fenntartva és erősítve a szenzitizációs folyamatokat.** Igazolta, hogy a NTG adás a TNC területén **csökkentette a CGRP expressziót mutató rostok által fedett területet, de növelte a szerotonin pozitív rostok számát, mely változásokból és a szinaptikus boutonok méretcsökkenéséből fokozott CGRP felszabadulásra, a trigeminális rendszer aktivációjára és a szerotoninergerg pályák fejfájásban betöltött szerepére következtetett.** A **COX2 inhibitor a NTG okozta nNOS és CamKII változásokat kivédte a TNC területén, rámutatva, hogy a COX2 izoenzim szerepet játszik a trigeminális aktivációban és a szenzitizációs folyamatok kialakulásában.**

Az **orofacialisan adott formalin, a trigeminalis ganglion elektromos stimulációja és a durális kémiai ingerlés c-fos emelkedést eredményezett a TNC területén mely trigeminális aktivációt jelzett.** Az orofacialisan adott formalin az **nNOS expressziót is fokozta a TNC területén.**

Az **inflammatory soup-pal végzett durális ingerlés a NTG-hez hasonlóan megemelte a gyulladásos és nociceptív folyamatokban szerepet játszó molekulák (nNOS, TRPV1, COX2,**

**NFKB) expresszióját a kaudális trigeminális mag területén, jelezve a trigeminális aktivációt és a szenzitizációs folyamatok aktiválódását.**

**A krónikus ösztadiol kezelés, a kinurénsav vagy kinurénsav anológok, illetve a cannabinoid receptor agonista anandamid alkalmazása kivédte a NTG adás okozta hatásokat a TNC területén, vagyis antinociceptív hatással bírnak a NTG modellben. A fentiekén túl a kinurénsav a corticalis spreading depression kialakulását mérsékelte, feltehetően antiglutamaterg hatás révén.**

**Mind a kinurénsav, mind a sumatriptan kivédte az inflammatory soup kezelés okozta aktivációs és szenzitizációs markerek expressziójának növekedését, míg a NTG modellben a sumatriptan hatástalannak bizonyult.**

Összegezve, a jelölt számos migraine állatkísérletes modellben igazolta a trigeminális aktivációt, a NTG modellben kimutatta a másodlagos trigeminális neuronok nNOS, valamint a gyulladáshoz és nociceptív folyamatokban szerepet játszó molekulák expressziójának fokozódását. Rámutatott a CGRP expressziót mutató rostokban történt változásokra, valamint a glutamát rendszert is befolyásoló CamKII és kinurenin útvonal enzimek expressziójának a változására a kaudális trigeminális mag területén. Igazolta, hogy az inflammatory soup okozta durális ingerlés is megemelte a gyulladáshoz és nociceptív folyamatokban szerepet játszó molekulák expresszióját a kaudális trigeminális magban. Leírta a kinurénsav, a CB receptor anandamid, és a krónikus ösztadiol kezelés aktivációs és szenzitizációs markerek expressziójára, valamint a kinurénsav corticalis spreading depression kialakulására gyakorolt hatását.

## **Vélemény**

A szerző kísérletes eredményeken alapuló, számos migraine modellt felhasználó munkája jelentősen hozzájárult a migraine trigeminális aktivációs modelljének megismeréséhez, a trigeminális aktiváció során kialakuló molekuláris változások leírásához és azoknak a migraine pathomechanismusában betöltött lehetséges szerepének a megismeréséhez. A munka jelentőségét fokozza, hogy számos terápiás készítmény hatását is vizsgálta a trigeminális aktivációra és a szenzitizációs folyamatokra. Ezek között nemcsak a mindennapi klinikai gyakorlatban alkalmazott szerek, mint a COX gátlók, vagy sumatriptan szerepeltek, de új, még kísérleti fázisban, vagy az előtt álló szerek is, mint a kinurénsav anológok, illetve a cannabinoid rendszeren ható anandamid. A fentiekén túl tanulmányozta és leírta a női nemi hormonok komplex szerepét a trigeminális aktivációra és a szenzitizációs folyamatokra.

A fentiek alapján elmondható, hogy a jelölt MTA doktori értekezése értékes, előremutató eredményekkel gazdagította a migraine kísérletes vizsgálatával kapcsolatos tudományos irodalmat. Az értekezést több ok miatt is élvezettel olvastam: a szerző a migraine állatmodellek széles tárházát vonultatta fel, számos metodikát használt, az eredmények gyakorlati jelentőséggel bírnak, s több potenciális gyógyszer hatását is leírta.

Az értekezésből kiderül, hogy a kutatás a szerző önálló munkája, a disszertáció hiteles adatokat tartalmaz. Az értekezésben bemutatott kísérletes eredmények, valamint a citációs értékek az MTA doktora cím feltételeként szabott kritériumoknak messzemenőig megfelelnek. A feltett kérdések, kritikák a doktori disszertáció értékét nem csökkentik, a doktori művet nyilvános vitára alkalmasnak tartom, s az MTA doktori cím odaítélését támogatom.

Tisztelettel:



Dr. Oláh László  
egyetemi tanár

Debrecen, 2024. 08. 26.