

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar
SZTE TTIK Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék
és
SZTE ÁOK Neurológiai Klinika

XXXII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia

Kinurénsav analóg moduláló hatásának vizsgálata
orofaciális formalin tesztben

BÜKI ALEXANDRA
Biológia M.Sc. II. évfolyam

Témavezetők

Dr. Párdutz Árpád

egyetemi docens
SZTE ÁOK Neurológiai Klinika
és

Fejes-Szabó Annamária

tudományos segédmunkatárs
SZTE ÁOK Neurológiai Klinika

Belső konzulens

Dr. Farkas Tamás

egyetemi docens
SZTE TTIK Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

2014

Összefoglaló

A trigeminális rendszer és annak aktiválódása kiemelkedő szerepet játszik a fejfájások patomechanizmusában, melynek során alapvető a glutamát és az $\alpha 7$ -nikotinos acetilkolin ($\alpha 7$ -nACh) receptorok jelentősége.

A trigeminális szomatikus nocicepció vizsgálatára ez egyik legalkalmasabb állatkísérletes modell az orofaciális formalin teszt, melyben a bajuszpárnába fecskendezett szubkután formalin lokális gyulladást indukál, és az elsődleges és másodlagos trigeminális neuronok aktiválódásához valamint, centrális szenzitizáció kialakulásához vezet. A formalin hatására a patkányokban kétfázisú nociceptív viselkedés figyelhető meg, amely az injektált bajuszpárna dörzsölésében vagy kaparásában nyilvánul meg, és lehetővé teszi a fájdalom mértékének viselkedés alapú felmérését.

Vizsgálatainkban a triptofán anyagsere során, endogén módon keletkező ionotróp glutamát és $\alpha 7$ -nACh receptor antagonistá kinurénsav (KYNA) egyik származékát, az új oldallánc szubsztituált SZR81-t alkalmaztuk, mely a KYNA-hoz hasonló receptoriális hatást fejthet ki.

Kísérletünk célja az volt, hogy megvizsgáljuk az SZR81 esetleges moduláló hatását az orofaciális formalin tesztben kialakuló nociceptív magatartásra és a kaudális trigeminális magban (TNC) megfigyelhető neuronális aktivációra. A kísérlet során hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk, amelyek előkezelésként Placebo (fiziológiás sóoldat) vagy SZR81 (1 mmol/ testsúly kg, 1ml foszfát pufferben feloldva, pH: 7,4) intraperitonális injekciót kaptak. Egy órával az előkezelés után az állatok jobb oldali bajuszpárnájába szubkután 50 μ l fiziológiás sóoldatot vagy 1,5%-os formalin oldatot injektáltunk. A jobb oldali bajuszpárnára irányuló ipszilaterális elülső vagy hátsó manccsal történő dörzsölési vagy kaparási aktivitással eltöltött időt a formalin injekció beadását követően 45 percen keresztül monitoroztuk. Négy órával a szubkután injekció után az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk és eltávolítottuk a nyúltvelő azon szakaszát, amely tartalmazza a TNC-t. Ezen szakaszból készült metszeteken immunhisztokémiai módszerrel *c-Fos* festést végeztünk, hogy felmérjük a másodlagos trigeminális neuronok aktivitását.

Eredményeink alapján az SZR81 előkezelés szignifikánsan csökkentette az állatok a nociceptív viselkedéssel töltött idejét a második fázisban és ezzel összhangban csökkent a TNC-ben található *c-Fos* immunreaktív sejtek száma is.

A viselkedésvizsgálatok alapján tehát az SZR81 antinociceptív hatásának bizonyult az orofaciális formalin tesztben, továbbá csökkentette a gyulladás által kiváltott neuronális aktivációt a TNC-ben. A jelenség alapja feltehetőleg a centrális és perifériás glutamát valamint $\alpha 7$ -nACh receptorokon kialakuló antagonistá hatás, melyet az SZR81 direkt módon, vagy KYNA-vá visszaalakulva indirekten hoz létre. Ezek alapján a KYNA származékok az eddigiektől eltérő támadáspontú vegyületekként a későbbiekben szóba jöhetnek a fejfájások kezelésében.

Tartalomjegyzék

Összefoglaló	2
Ábrajegyzék	4
Rövidítések.....	5
Irodalmi áttekintés.....	6
Fájdalom és anatómiája	6
Fejfájások.....	7
Trigeminális rendszer és szerepe.....	11
Orofaciális formalin teszt	13
Kinureninek	15
Célkitűzés	18
Anyagok és módszerek.....	19
SZR81	19
A kísérlet menete	20
Magatartás teszt	20
C-Fos immunhisztokémia.....	21
Sejtszámolás	21
Statisztikai elemzés.....	22
Eredmények.....	23
Magatartás teszt eredményei	23
Immunhisztokémiai eredmények.....	25
Megbeszélés	29

Ábrajegyzék

1. ábra Trigeminalis rendszer	12
2. ábra Trigemino-facialis reflex vázlata.....	13
3. ábra Kinurénsav szerkezete	15
4. ábra Kinureninek hatásai a migrén és a fájdalom patomechanizmusában szerepet játszó idegrendszeri struktúrákra	16
5. ábra SZR81 szerkezete	19
6. ábra Az arcdörzsöléssel töltött átlagos idő (másodperc) blokkonkénti bontásban a négy alcsoportban (átlag±S.E.M.).....	24
7. ábra Az arcdörzsöléssel töltött átlagos idő (másodperc) fázisonkénti bontásban a négy alcsoportban (átlag±S.E.M.).....	25
8. ábra A TNC kezdetétől számított -1,5 mm-es magasságban készült reprezentatív nyúltvelői transzverzális metszet a Placebo-Form alcsoportból <i>c-Fos</i> immunhisztokémiai festést követően	26
9. ábra <i>c-Fos</i> immunreaktív sejtek átlagos száma a rostromaudális tengely mentén a Placeo-Form és az SZR81-Form alcsoportok ipszi- és kontralaterális TNC-éinek felszíni rétegeiben (átlag±S.E.M.)	27
10. ábra Ipsilaterális és kontralaterális TNC-t ábrázoló reprezentatív transzverzális metszetek <i>c-Fos</i> immunhisztokémiai festést követően a Placebo-Form és az SZR81-Form alcsoportokból	28

Rövidítések

α 7-nACh: alfa7-nikotinos acetilkolin

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propion sav

CSD: tovaterjedő kérgi gátlás

GPR35: G-protein kapcsolt receptor 35

KYNA: kinurénsav

L-KYN: L-kinurenin

NMDA: N-metil-D-aszpartát

PBS: foszfát puffer

PBST: 1%-os Triton X-100-at tartalmazó PBS

TNC: kaudális trigeminális mag

Irodalmi áttekintés

Fájdalom és anatómiája

A fájdalom egy igen összetett jelenség, amely a Nemzetközi Fájdalom Társaság (International Association for the Study of Pain) megfogalmazása szerint egy kellemetlen szenzoros, emocionális tapasztalás, amelyet valós vagy lehetséges szövetkárosodás kísér. Észlelése létfontosságú, mivel felhívja a figyelmet a veszélyforrásokra, valamint a belső vagy külső elváltozásokra, betegségekre. A fájdalom különféle védekező mechanizmusok egész sorozatát indítja be, amik a vegetatív- és motoros reflexválaszok kiváltásán túl különféle viselkedési és emocionális változásokkal is járhatnak.

A fájdalomnak előfordul olyan formája is, aminek védő szerepe nincsen, csak „értelmetlen” szenvedést okoz és tartós fennállása nagymértékben rontja az életminőséget. Ide tartozik az idegi, más néven a neuropáthiás fájdalom, amely során elsősorban perifériás idegsérülésre keletkező nem múló nociceptív ingerek funkcionális változásokat okozhatnak a fájdalom feldolgozásban és az érzékelésben. A neuropáthiás fájdalomra jellemző a folyamatosan fennálló égő, hasogató, nyilalló, sajgó jelleg, aminek erőssége az enyhétől a „keresztre-feszítő”-ig terjedhet, emellett felléphet allodynia, hiperalgécia és *hyperpathia*. A neuropáthiás fájdalom magyarázata lehet a nociceptorok hiperszenzibilitása, a C-rostok, érző neuronok spontán aktivitása, nátrium csatornák expressziója, a gerincvelőben történő fokozott prosztaglandin E₂, P-anyag, glutamát felszabadulás, és az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorok tartós aktivitása. Ezt követően a központi pályák ingerelhetősége is megnövekszik, viszont a leszálló fájdalomcsillapító pályáknak csökken a modulációs hatása (*Schwartzman R. J. és mtsai. 2001*).

A fájdalom felosztása többféle módon történhet: az időbeli fennállása szerint a fájdalom lehet akut vagy krónikus; eredete szerint lehet exteroceptív vagy interoceptív, mely utóbbi esetében elkülöníthetjük a szomatikus és viszcerális eredetű fájdalmat.

A fájdalom percepciója a nocicepció útján történik, amire speciális fájdalomérző receptorok és pályák alakultak ki. A fájdalmas stimulust detektáló receptorok, a nociceptorok az elsődleges érző neuronok perifériás nyúlványának módosult idegvégződése. Ezen pszeudounipoláris neuronok sejtteste a hátsó gyöki ganglionban helyezkedik el és centrális nyúlványai a központi idegrendszer területére szállítják a nociceptív információkat.

A perifériás nociceptív axonoknak két típusát különböztetjük meg: a gyengén mielinizált A δ -rostokat és a nem mielinizált C-rostokat. Az A δ gyorsabb ingerületvezetéssel (5-20m/s) rendelkezik és főleg a veszélyesen intenzív mechanikai ingereket, illetve az erős mechanikai

és hőingereket együttesen szállítja. Ezzel szemben a polimodális C-rostok jóval lassabb ingerületvezetéssel (2m/s) viszik az információt a hő, kémiai és mechanikai ingerekről. E kétféle axontípusnak köszönhetően a fájdalom érzetének két fázisát tudjuk megkülönböztetni; amit kettős-fájdalomnak nevezünk (Allan I. és mtsai. 2009). Kísérletesen bizonyították az A δ -rostok és C-rostok szelektív blokkolásával, hogy az első, éles fájdalomért az A δ rostok, míg a második elnyújtott, diffúz fájdalomért a C-rostok felelnek. A kétféle axon a pseudounipoláris elsődleges neuronok centrális nyúlványaként a gerincvelő hátsó szarvába a hátsó gyökéren keresztül lép be, ahol az A δ rostok főleg az 1. és 5., míg a C-rostok az 1. és 2. Rexed-féle laminába érkezik, ahol közvetlenül projekciós neuronokra vagy interneuronokra kapcsolódnak át (Allan I. és mtsai. 2009).

A fájdalomérzetnek két komponensét különíthetjük el, melyek részben eltérő pályákon és agyterületeken kerülnek feldolgozásra. Ez a két komponens a szenzoros-diszkriminatív komponens, amely a sérülés helyét, minőségét és intenzitását adja és az affektív, motivációs komponens, amely a fájdalommal járó kellemetlen érzésekért illetve a *fight-or-flight* vészreakciók kiváltásért is felelős (Palkovits M. 2000). A diszkriminatív komponens a Lissauer-kötegen keresztül szállítódik, egy-két szegmentet halad felfele mielőtt a szürkeállományt elérné. Ezután kollaterálisokat ad az 1-5. Rexed-féle lamina másodlagos neuronjaira, melyeknek axonjai átkereszteződnek, és az *anterolateralis* pályán jutnak fel a magasabb központok felé. Az *anterolateralis* vagy más néven *spinothalamicus* pálya a talamusz ventrális postero- laterális relémagvain kapcsolódik át és érkezik a másodlagos szomatoszenzoros kéregbe. A másik, a motivációs-affektív komponens eleinte együtt halad az *anterolateralis* pályával, majd *spinoreticulothalamicus* pályaként a középvonali talamikus magvakon kapcsolódik át. A szomatoszenzoros kérget viszont nem éri el, hanem a limbikus rendszerbe érkezik, ami a fájdalomra adott viselkedés kialakulásában játszik fontos szerepet. Ezen kívül agytörzsi és középagyi szinten számos projekciót ad többek között a *spinomesencephalicus* pályán át a *periaqueductalis* szürkeállományba, amely a fájdalomcsillapításban játszik szerepet, vagy például a *spinoreticularis* pályán át a *formatio reticularis*-ba, amely a noradrenerg rendszer aktiválásában vesz részt (Palkovits M. 2000).

Fejfájások

A népesség körében az egyik leggyakoribb panasz a fejfájás, hiszen csaknem minden tizedik beteg fejfájással keresi fel háziorvosát, amely jelentkezhet önálló betegséggént, de számos betegség kísérő tüneteként is kialakulhat. Ezek alapján a Nemzetközi Fejfájás

Társaság legutóbb 2013-ban tette közzé a fejfájások aktuális csoportosítását (*Headache Classification Committee, 2013*), melyek alapján elkülöníthetjük az elsődleges (önálló) formákat és a másodlagos (tüneti) formákat. Az elsődleges (önálló) formákat a fejfájás és az azt kísérő tünetek jellemezik, háttérükben nem mutatható ki szervi elváltozás, míg a másodlagos fejfájások háttérében gyakran jól meghatározható szervi vagy metabolikus ok áll.

Az elsődleges fejfájások legfontosabb három fő típusa a migrén, a cluster típusú fejfájás és a tenziós típusú fejfájás.

A migrént úgy írhatjuk le, mint egy idiopátiás visszatérő fejfájást, amely 4-72 óráig tartó rohamokban jelentkezik, a fájdalom típusosan féloldali lokalizáltságú, lüktető jellegű, általában közepes vagy súlyos erősségű. A fejfájást a fizikai aktivitás fokozza, a roham alatt gyakran lép fel hányinger, *photo-* és *phonophobia*. A Nemzetközi Fejfájás Társaság migrénkritériumai alapján elkülöníthető a két főbb migrén típus: az aura nélküli migrén és az aurával járó migrén.

A migrént kialakító pontos patomechanizmus mai napig sem ismert, viszont az biztos, hogy a trigeminális rendszer aktiválódása, a perifériális- és a centrális szenzitizáció kiemelkedő szerepet játszik a rohamok létrehozásában.

Egyes elméletek szerint a kortex megváltozott ingerlékenysége miatt, az aurajelenségekért felelős tovaterjedő kérgi gátlás alakul ki, más néven *cortical spreading depression* (CSD) (*Lauritzen M. 1994*). A CSD során a látókéregből egy excitatorikus hullám indul ki és halad végig a kortexen, majd az ezt követő depolarizáció hatására ideiglenesen felborulhat az extracelluláris ionhomeosztázis, extracelluláris acidózis, a K^+ , Na^+ és Cl^- ionok mennyiségi átrendeződése és az energiaháztartás zavara következhet be (*Read S.J. és mtsai. 1999*). A CSD hatására megváltozik az agyi vérellátás és aktiválódnak a másodlagos trigeminális nociceptorok (*Moskowitz M. 2008*). A CSD során a kortexben a *dura mater* ereiben dilatációt kiváltó aminosavak és nitrogén monoxid is felszabadulhat, ami steril gyulladásához vezethet (*Olesen J. és mtsai. 2000*).

Más elméletek szerint a trigeminális rendszer aktiválásában, a migrénes roham kialakulásában, a kísérő tünetek megjelenésében (*photo-*és *phonophobia*, hányinger, *paraesthesia*) és az esetlegesen előforduló oldalváltásában jelentős szerepe van bizonyos agytörzsi magcsoportoknak, az úgynevezett „migrén generátorok” -nak: *nucleus raphe dorsalis*, *nucleus raphe magnus*, *locus coeruleus* és a *periaqueductalis* szürkeállomány (*Dodick D.W. és mtsai. 2000*).

A migrénes roham alatt létrejövő perifériás szenzitizáció során a *dura mater*-ben kialakuló steril gyulladás és annak következtében felszabaduló gyulladásos mediátorok (hisztamin,

szerotonin, prosztaglandin E2, bradykinin, tumor nekrosis faktor α) aktiválják az itt lévő nociceptorokat, és szenzitizálják a trigeminális ganglionban található elsődleges neuronokat (Strassmann A.M. és mtsai. 1996). Ezen neuronok hiperszenzitívvé válnak az egyébként nem fájdalmas koponya ürön belüli artériák pulzációjának nyomásváltozására is, ami a fejfájás lüktető jellegében nyilvánulhat meg (Burstein R. és Jakubowsky M. 2002).

A perifériális szenzitizáció alatt hiperreaktív állapotba kerülő elsődleges trigeminális neuronok a trigemino-cervikális komplexben található másodlagos neuronokat folyamatosan ingerlik, amelyeknél ezáltal hiperexcitabilitás lép fel. Ezt a folyamatot nevezzük centrális szenzitizációnak. Hátterében az NMDA receptorok nagyobb glutamát érzékenysége, és a nitrogén monoxid által stimulált nitrogén monoxid szintáz fokozott aktivitása állhat (Goadsby P.J. 2005). A hiperérzékenyvé vált másodlagos neuronokra jellemző a kiszélesedett receptív mező, a megemelkedett spontán- és kiváltott tüzelési frekvencia. Emellett az olyan stimulusok is ingerületet válthatnak ki, amelyek korábban nem. A centrális szenzitizáció klinikailag allodynia formájában nyilvánulhat meg, amely során a nem fájdalmas inger is fájdalmasnak érződik (Goadsby P.J. 2005, Burstein R. és mtsai. 2000).

A migrénes rohamhoz kapcsolódóan megjelenő aura jelek a kortexhez vagy az agytörzshöz köthető neurológiai tünetek, amelyek vizuális, szenzoros, ill. motoros eltérésekben, beszédzavarban, avagy ezek kombinációjában jelentkezhetnek. Ezek a jelek általában 5-20 perc alatt kifejlődnek és körülbelül 60 percig tartanak, melyeket azonnal vagy egy órán belül követ a fejfájás (Jensen K. és mtsai. 1986).

A cluster típusú fejfájás, amelyet az egyik legkínzóbb fejfájástípusnak tartanak, szintén az elsődleges fejfájások közé tartozik. A súlyos, típusosan féloldalt orbitálisan, szupraorbitálisan és/vagy temporálisan jelentkező fájdalom legtöbbször meglepetésszerűen lép fel. A fejfájás 5-10 perc alatt elérheti a maximális intenzitását, majd viszonylag gyorsan el is múlik, a frekvenciáját tekintve viszont akár naponta 1-8-szor is jelentkezhet. Jóllehet, a fájdalom egy epizódon és rohamperióduson belül szigorúan féloldali megjelenésű, azonban nagyon ritkán a betegek 5%-nál mégis megváltoztathatja oldaliségét. (Headache Classification Subcommittee, 2003.) A rohamok megjelenése gyakran mutat szezonálisitást. Azt az időszakot, amelyben a fájdalomrohamok jelentkeznek cluster periódusnak vagy epizódnak hívjuk, míg a fájdalommentes időszakot remisszióknak, ami minimum egy hónapig tartó rohammentességet jelent (Russel D. és Storstein L. 1983). Amikor a cluster és a remissziós időszakok váltakoznak és a remisszió időszaka hosszabb 14 napnál, akkor epizodikus cluster fejfájásról beszélhetünk. Viszont ha a rohamok egy évnél hosszabb ideig tartanak, és a remisszió időszaka nem haladja meg a 14 napot, akkor krónikus cluster fejfájás áll fenn.

A roham kísérő tünetei lehetnek a *conjunctiva* vérbőség, könnyezés, orrdugulás és orrfolyás, arc-, és homlokizzadás, *ptosis*, miózis, szemhéj ödéma. Ezeken kívül felléphet még változó szívfrekvencia, és emelkedett vérnyomás (*Lance J.W. és Goadsby P. 1998*). A cluster fejfájás pontos patomechanizmusa még nem ismert. A roham kialakulásának perifériás vagy centrális eredete sem egyértelmű. A klinikai tünetek arra utalnak, hogy a trigeminovaszculáris rendszer aktiválódása mellett vegetatív szabályozási zavar is kialakul a fej szimpatikus és paraszimpatikus beidegzésében. A trigeminális és vegetatív idegrendszer együttes diszfunkciója közötti kapcsolatot, a hipotalamusz egyes magcsoportjainak kóros aktiválódása teremtheti meg (cluster generátorok), mely magyarázatot adhat a tünetek jellegzetes időbeli megjelenésére is (*Leone M. és Bussone G. 2009*).

A harmadik elsődleges fejfájás típus a tenziós, ami az egyik leggyakrabban előforduló fejfájás típus. Mivel ez a betegség nagyfokú heterogenitással jelentkezik, korábban nem is álltak rendelkezésre pontosított diagnosztikai kritériumok, emiatt nehéz megállapítani a gyakoriságát. Egyes adatok kb. 30%-os előfordulást állapítanak meg (*Lance J.W. és mtsai. 1965*), míg más tanulmányok külön vizsgálták az epizódikus és a krónikus forma prevalenciáját. Egyéves periódusban az epizódikus tenziós fejfájás előfordulását 38,3%-osnak találták, míg a krónikus tenziós fejfájás prevalenciája 2,2%-os volt. Az epizódikus forma gyakorisága mindkét nemben az iskolázottsági szinttel egyenes arányban nőtt, míg a krónikus formánál ennek ellenkezőjét állapították meg, azaz fordított arányban nőtt a tanultsági szinttel (*Schwartz B.S. és mtsai. 1998*). Maga a tenziós fejfájás egyenletesen fennálló, enyhe vagy közepes erősségű kétoldali, feszítő-nyomó (nem pulzáló), abroncsszerű fájdalom, melyet fizikai aktivitás nem fokoz. Hossza általában 30 perctől akár 7 napig is tarthat. Kísérő tünetek ritkán, de előfordulhatnak, úgymint fény- és hangkerülés, ritkábban étvágytalanság, míg a hányinger nem jellemző (*Silberstein S.D. és mtsai. 1998*). A fájdalmat kiváltó tényezők közé sorolható a pszichés stressz, kimerültség, fáradtság, szorongás, frusztráció (*Mongini F. és mtsai. 2006*). Ellentétben a migrénes és clusteres fejfájással gyakran nem az intenzitása, hanem az időtartama jelent gondot. Viszont a tenziós fejfájásra is jellemző a periódikus visszatérés, aminek időtartama és gyakorisága diagnosztikai szempontból jelentős.

A tenziós típusú fejfájásokon belül elkülöníthetjük a krónikus és az epizódikus tenziós típusú fejfájást. Az előbbi diagnosztikai kritériumai, hogy a fejfájás havonta több mint 15 napon keresztül, és legalább 6 hónapig áll fenn, és kísérő tünetek csak a betegek kis hányadánál lépnek fel. Az epizódikus formánál kevesebb, mint 15 a havi fejfájós nap (*Kropp P. és mtsai. 2010*).

A tenziós típusú fejfájás pontos mechanizmusa a mai napig nem teljesen tisztázott, de feltehetően a *myofascialis* nociceptorok hiperszenzitizációja válthatja ki a kaudális

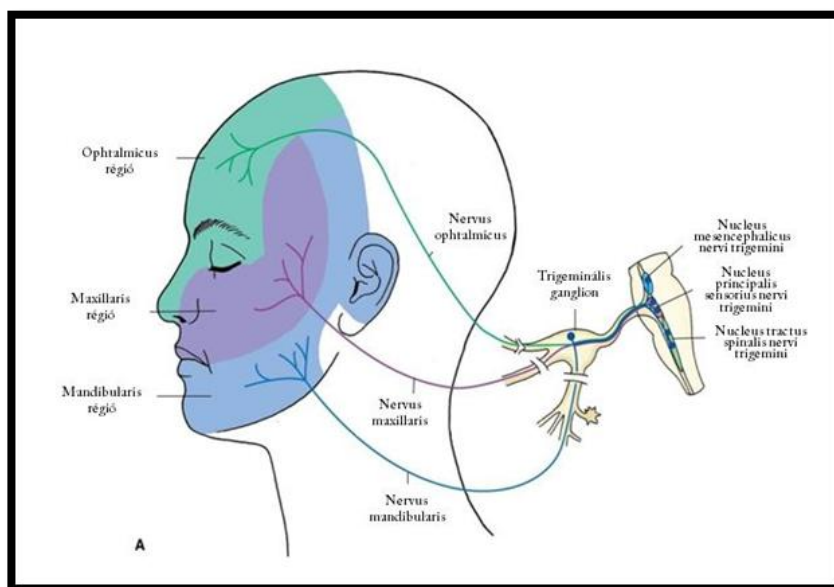
trigeminális mag (*nucleus tractus spinalis nervi trigemini*, TNC) aktiválódását és így a trigeminális rendszer szenzitizációját (Lance J. W. és Goadsby P. 1998).

Trigeminális rendszer és szerepe

Kutatások szerint a trigeminális rendszer aktivitása kulcsszerepet játszik az elsődleges fejfájások és a fej területére lokalizálódó fájdalom betegségek kialakulásában (May A. és Goadsby P.J. 1999).

Az V. agyideg, a *nervus trigeminus*, másnéven a háromosztatú ideg egy kevert ideg, amely érzőrostokkal innerválja az arc területét és mozgatórostokkal látja el a rágóizmokat. A háromosztatú nevet onnan kapta, hogy három nagyobb ágra oszlik: a *nervus ophthalmicusra* (V1), amely a homlok, szem környékét és *intracranialis* fájdalomérzékeny képleteket (vérér, *dura mater*) idegez be; a *nervus maxillarisra* (V2), mely a járomcsonti bőrt, felső ajkat, felső fogakat látja el érzőrostokkal; és a *nervus mandibularisra* (V3), amely tartalmaz érző és mozgató rostokat, melyekkel az alsó állkapocs rágóizmait és az alsó fogakat idegzi be (1.ábra).

Ezen perifériás rostok pseudounipoláris sejtestjei az érződúcban, a trigeminális ganglionban, más néven a Gasser-dúcban és a *nucleus mesencephalicus nervi trigemini*-ben találhatóak. A *nervus trigeminus* másodlagos érzősejtjei pedig a *nucleus principalis sensorius nervi trigemini* és *nucleus tractus spinalis nervi trigemini* (TNC) területén találhatók (1.ábra). A szomatoszenzoros magok mellett egy szomatomotoros magja is van: a *nucleus motorius nervi trigemini*. A trigeminális ganglionból kiinduló protopathiás centrális ágak az agytörzsbe szállnak le, szinaptizálnak a *nucleus tractus spinalis nervi trigemini*-ben található neuronokkal és funkcionális kapcsolatot alakítanak ki a cervikális gerincvelői 1-2-es szegmentumok hátsószarvi részében elhelyezkedő sejtekkel is (Yokota T. és mtsai. 1988). A TNC-ből a talamuszon át a kortex felé tartó impulzusokat a *nucleus raphe*, a *locus ceruleus* és a *periaqueductalis* szürkeállomány modulálják a leszálló pályáikkal (Szentágothai J. és Réthelyi M. 1994).



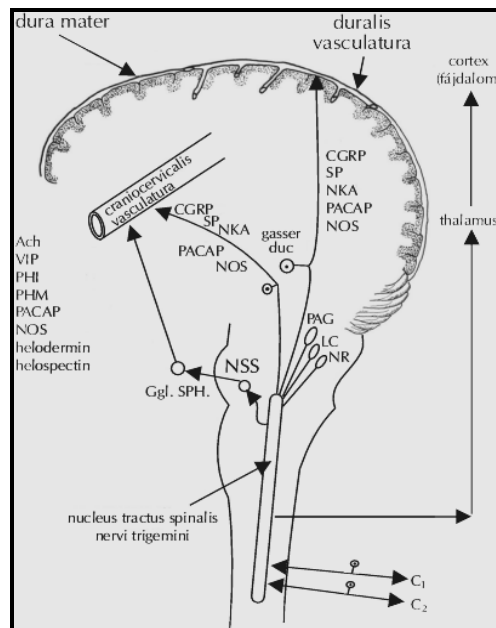
1. ábra Trigeminális rendszer

(<http://www.studyblue.com/notes/note/n/anatomy-final-2/deck/4701491>(Szerkesztve))

A glutamát az idegrendszer serkentő neurotranszmittere és fontos szerepe van a fájdalom patomechanizmusában és a fájdalomérzés kialakításában (Vikelis M. és Mitsikostas D.D. 2007). Az NMDA receptorok posztszinaptikusan találhatóak meg a másodlagos neuronokon (Tallaksen-Greene S.J. és mtsai. 1992), és közrejátszanak a fájdalmas stimulust követő trigeminális aktivációban. A trigeminális aktivációhoz vezető stimulus aktiválja az elsődleges trigeminális neuronokat, ami a glutamát szint megemelkedését okozza a TNC területén (Oshinsky M.L. és Luo J. 2006), ahol a felszabadult glutamát részben az NMDA receptorokon keresztül aktiválja a másodlagos neuronokat (Burstein R. és mtsai. 1998). Az NMDA receptorokon kívül más glutamát receptorok is megtalálhatóak a TNC-ben, úgymint az α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-izoxazol-propion sav (AMPA), és a kainát receptorok és ezen glutamát receptorok aktivitása szintén szerepet játszik a fájdalom érzés folyamatában (Tallaksen-Greene S.J. és mtsai 1992). Az elsődleges neuronokon preszinaptikusan elhelyezkedő alfa7-nikotinos acetilkolin ($\alpha 7$ -NACh) receptorok a nociceptív információk transzmisszióját befolyásolják az által, hogy szabályozzák a glutamát felszabadulást (McGehee D.S. és mtsai. 1995, Gray R. és mtsai. 1996).

Az elsődleges fejfájások patomechanizmusában nagy szerepet tulajdonítanak a trigeminofaciális reflexnek (2. ábra). A reflexet migrénnél egy vazokonstriktív inger vagy a „tovaterjedő kérgi gátlás”, míg a tenziós fejfájásnál pszichikai tényezők pl. szorongás, stressz, fáradtság, vagy külső tényezők, mint pl. időjárás, hideg, meleg, illetve a *myofascialis* nociceptorok hyperszenzitizációja válthatja ki, amelyek ingerületbe hozzák a Gasser-dúc perifériás ágát, és aktiválhatják a pseudounipoláris sejttesteket. Ezek a neuronok a centrális

nyúlványon keresztül váltják ki a TNC sejtjeinek aktivitását, melyek a *nucleus tractus salivatorius superioron* keresztül a *ganglion sphenopalatinum* neuronjait hozzák ingerületbe. Ennek következményeképpen acetilkolin, vazóaktív intesztinális peptid, hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid, nitrogén monoxid és egyéb vazodilatatív neuropeptidek kerülnek a paraszimpatikus rostokon keresztül a *cranio-cervicalis vasculaturába*. Emellett a Gasser-dúc pszeudounipoláris sejtjein keresztül a perifériás rostokból felszabadulva nitrogén monoxid és vazóaktív neuropeptidek, azaz calcitonin gén-relációs peptid és P-anyag kerül az erekbe (Edvinsson L. és mtsai. 1999)(2. ábra).



2. ábra Trigemino-facialis reflex vázlata

(<http://www.anesthesia2000.comCentralOpioidsopioidiv2.htm>)

Ach: acetilkolin, VIP: vazóaktív intesztinális peptid, PHI: peptid hisztidin izoleucin, PHM: peptid hisztidin metionin, PACAP: adenilát-cikláz aktiváló peptid, NOS: nitrogén szintáz, CGRP: calcitonin gén relációs peptid, SP: P-anyag, NKA: neurokinin A, NSS: *nucleus salivatorius superior*, ggl. SPH.: *ganglion sphenopalatinum*, NR: *raphe* magcsoport, PAG: *periaqueductalis* szürkeállomány, LC: *locus coeruleus*

Orofaciális formalin teszt

Az elsődleges fejfájások kialakulásában a trigeminális rendszer aktiválódása nagy szerepet játszik, ezért a fejfájások állatmodelljei általában a trigeminális rendszer kémiai és elektromos stimulációval történő aktiválásán alapulnak, amellyel az elsődleges fejfájásokkal sok párhuzamot mutató állapot hozható létre.

A szomatikus fájdalom vizsgálatára az egyik legalkalmasabb állatkísérletes modell a formalin teszt, sokkal inkább, mint a rövid ideig tartó, káros inger közbeni határérték- és latenciaidő méréseken alapuló „hot-plate” vagy „tail-flick” tesztek (Le Bars D. és mtsai. 2001). Ezt a modellt Dubuisson és Dennis dolgozta ki patkányokra, de a formalin hatását önmagukon is kipróbálták. Leírásuk szerint kezdetben „intenzív, éles, szűrő és égető” fájdalmat éreztek, amit 4-5 perc után egy „állandó, lüktető” fájdalom váltott fel, ami 30-60 perc után elmúlt (Dubuisson D. & Dennis S.G. 1977).

A formalin tesztnél a beadott formalin valódi szövethárosodáshoz vezet, mivel az élő szövetben a formaldehid keresztkötéseket hoz létre az ott lévő fehérjékkel, ezzel gyulladásos folyamatokat indítva el. Nem csak viselkedésben, hanem elektrofiziológiai válaszokban is detektálható változást okoz a beadás után pár perctől egészen több mint egy óráig. A formalinra adott magatartás válaszok tipikus lefolyása bifázikus: egy korai, rövid-fázis után egy hosszabb, tónikus fázis lép fel. A stimulusra adott válaszok amplitúdója és a szövethárosodás mértéke a formalin koncentrációjával arányosan nő egy bizonyos koncentrációig, ami felett egy kisebb plató fázist követően csökkenni kezd. A beadott kémiai stimulus először közvetlenül aktiválja az A δ és a C rostokat, majd ezeken keresztül a trigeminális és a spinális másodlagos nociceptív neuronokat, így váltva ki az első szakaszhoz köthető fájdalomérzetet, míg a második szakasz kialakulásáért az érintett szövetben kialakuló gyulladás, valamint a másodlagos neuronok szintjén zajló folyamatok okolhatóak (Porro C.A. és mtsai.1993).

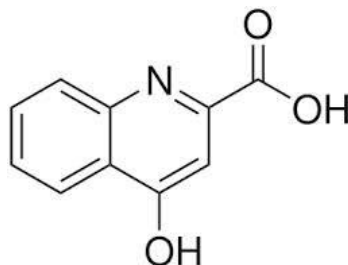
Az orofaciális formalin tesztél az állatok a bajuszpárnába kapnak szubkután 0,2-10%-os formalin injekciót. A mérhető nociceptív viselkedési válasz az arcdörzsöléssel töltött idő növekedése az alapszintű mosakodási időhöz képest. A kiváltott arcdörzsölés szintén bifázikus lefolyást mutat. A bajuszpárnába kerülő formalinnal kiváltható a trigeminális aktiváció és az orofaciális tónikus nocicepció (Raboisson P. és mtsai. 2004).

Az orofaciális formalin modell egy általánosan használt és megbízható módszer a trigeminális fájdalom kísérletes körülmények közötti előidézésére és vizsgálatára. Emellett a formalin teszt érzékeny olyan opioid és nem-opioid analgetikumokra is, mint például a morfin, a paracetamol vagy az acetil-szalicilsav (Clavelou P. és Pajot J. 1989). Ezen anyagok hatása a magatartási válaszok változásában kimutatható, képesek csökkenteni az adott testrészdörzsölés frekvenciáját és többek között a trigeminális rendszerben formalin hatására megjelenő c-Fos immunreaktív sejtek számát is (Rosland J. H. és mtsai. 1990).

Kinureninek

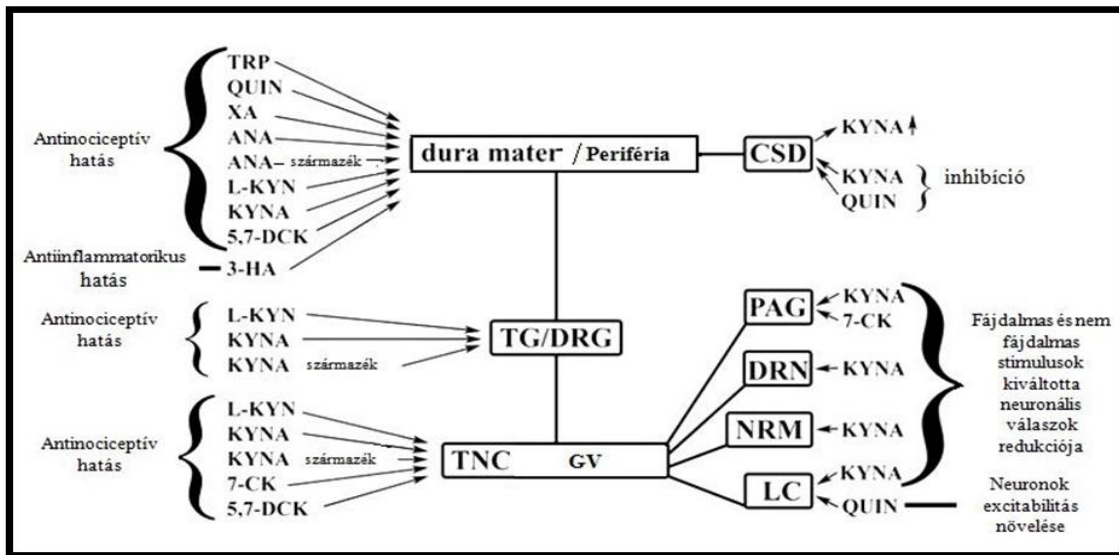
Az endogén triptofán 95%-ának metabolizmusáért felelős az úgynevezett kinurenin útvonal, amelynek elsődleges feladata az, hogy biztosítsa a nikotinamid-adenin-dinukleotid és a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát képződését fiziológias körülmények között (*Beadle G.W. és mtsai. 1947*). A kinurenin útvonal során keletkező vegyületeket összefoglaló néven kinurenineknek nevezzük, amelyek között több, neuroaktív tulajdonságokkal rendelkező anyag is van, mint például az antranil sav, 3-hidroxi-antranilsav, kvinolinsav, 3-hidroxi-kinurenin és kinurénsav (KYNA) (*Lapin I.P. 1978*)

A kinureninek közül kiemelendő jelentőséggel bír a KYNA (3. ábra), amely a kinurenin útvonal egyik oldalágának végterméke. Bizonyítottan neuroprotektív és antikonvulzív tulajdonságokkal rendelkezik (*Pellicciari R. és mtsai. 1994*), fontos szerepet játszik számos neurológiai betegség patomechanizmusában (*Vécsei L. és mtsai. 2013*), továbbá irodalmi adatok alapján hatással van a nocicepcióra és a trigeminális aktivációra is (*Mécs L. és mtsai. 2009, Nasstrom J. és mtsai. 1992, Párdutz A. és mtsai. 2012*)(4. ábra).



3. ábra Kinurénsav szerkezete

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/k3375?lang=hu®ion=HU>)



4. ábra Kinureninek hatásai a migrén és a fájdalom patomechanizmusában szerepet játszó idegrendszeri struktúrákra

(Fejes A. és mtsai. 2011)(Szerkesztett)

3-HA: 3-hidroxi-antranilsav, 5,7-DCK: 5,7-diklorokinurénsav, 7-CK: 7-klorokinurénsav, ANA: antranil sav, CSD: tovaterjedő kérgi gátlás, DRG: hátsó gyöki ganglion, DRN: *nucleus raphe dorsalis* KYNA: kinurénsav, L-KYN: L-kinurenin. NRM: *nucleus raphe magnus*, QUIN: kvinolinsav, TG: trigeminális ganglion, TNC: kaudális trigeminális mag, TRP: triptofán, XA: xanturénsav; ↑: növekvő koncentráció,

A KYNA az idegrendszer működésében és neurológiai betegségek patomechanizmusában betöltött meghatározó szerepének háttérében az áll, hogy több olyan receptor működését képes befolyásolni, amelyek ezekben a folyamatokban alapvető fontosságúak.

A KYNA egy ismert endogén ionotróp glutamát receptor antagonistája. Alacsony $\mu\text{mol-os}$ koncentrációban képes gátolni az NMDA receptort a glicin kötő helyéhez kapcsolódva (Kessler M. és mtsai. 1989), míg magasabb koncentrációban az AMPA és a kainát receptorok antagonistája (Prescott C. és mtsai. 2006).

Ezen kívül a KYNA az $\alpha 7\text{-nACh}$ receptorokon egy nem-kompetitív gátlást is kialakíthat, mellyel a glutamát felszabadulást képes modulálni. A kolinerg rendszerbe tartozó $\alpha 7\text{-nACh}$ receptor egy ionotróp receptor és hozzájárul a fájdalom kialakulásához, mivel aktivációja elősegíti a glutamát felszabadulást így ezen receptorok funkciójának és expressziójának szabályozásával befolyásolhatóvá válhat a neuronális plaszticitás és excitabilitás (Hilmas C. és mtsai. 2001).

A KYNA képes hatni a G-protein kapcsolt receptorok családjába tartozó G-protein kapcsolt receptor 35-n (GPR35) (Wang J. és mtsai. 2006), ami jelen van olyan fájdalomérzésben fontos szerepet játszó területeken, mint a hátsó gyöki ganglion és a gerincvelő (Ohshiro H. és mtsai. 2008). A hátsó gyöki ganglionban expresszálandó GPR35 receptorok részt vesznek a nociceptív szignalizációban, a KYNA-ra adott válaszuk során

gátolják a sejtben az adenilát-cikláz működését, ami a ciklikus adenosin monofoszfát szint csökkenését okozza anti-nociceptív hatást kifejtve (Wang J. és mtsai. 2006). Továbbá a humán perifériás vér mononukleáris sejtjeiben jelen lévő GPR35 receptor a KYNA beadását követően redukálta a gyulladáskeltő tumor nekrozis faktor α szekréciót, így csökkentve a gyulladásos folyamatok kialakulását (Wang J. és mtsai. 2006).

A KYNA alkalmazása több neurológiai betegségben is terápiás lehetőségként jöhetne szóba, azonban ennek határt szab az, hogy a vér-agy gáton csak korlátozottan képes átjutni, ezért kísérletes körülmények között hatékonyabbnak bizonyult előanyagának, az L-kinureninnek (L-KYN) vagy különböző oldallánc szubsztituált származékainak használata. Az L-KYN a vér-agy gáton könnyen bejut, majd az asztrocitákban transzaminálódik KYNA-vá a kinurenin-aminotranszferáz által. Kísérletes adatok támasztják alá, hogy az L-KYN-nel történő perifériás kezelés dóziszfüggően megnöveli a KYNA szintjét az agyban (Vámos E. és mtsai. 2009), ugyanakkor egy kainát-indukált modellben csak kismértékű hatékonyságot tapasztaltak (Vécsei és mtsai. 1990), melynek feltehetően az lehetett az oka, hogy az L-KYN bejutva nem csak KYNA-vá konvertálódik, hanem 3-hidroxikinureninné és kvinolinsavvá, amik viszont excitotoxicitást és neuronális károsodást képesek okozni az idegrendszerben (Kiss C. és Vécsei L. 2009). Emiatt vált fontossá olyan KYNA analógok szintetizálása, amelyek hatásmechanizmusban nem térnek el az alap vegyülettől, de esetlegesen hatékonyabban képesek bejutni a központi idegrendszerbe (Banik N. és mtsai. 2009).

Célkitűzés

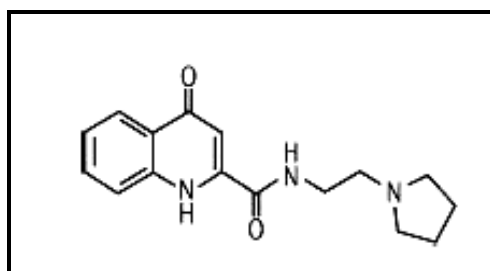
Kísérletünkben arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon egy újonnan szintetizált KYNA származék (SZR81) képes-e modulálni az orofaciális formalin teszt során kialakuló nociceptív viselkedési választ és a trigeminális aktivációt patkányokban.

Anyagok és módszerek

A kísérleti eljárások megfeleltek az Európai Közösség Tanácsának (86/609/ECC) és a Nemzetközi Fájdalomkutatói Egyesület ajánlásának. A kísérleteket engedélyezte a Csongrád Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága (I-74-12/2012), és a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (XI./352/2012). A kísérlet során 40 darab 200-250 g közötti tömegű hím Sprague-Dawley patkányt használtunk fel, amelyeket standard laboratóriumi körülmények között tartottunk elegendő étellel és ivóvízzel ellátva, 12 óra sötét és 12 óra világos ciklusokat biztosítva számukra. Minden állatot csak egyszer használtunk fel a kísérletek során.

SZR81

Az új KYNA amidot (Patent szám: #P0900281/PCT/HU2010/00050), N-(2-N-pirrolidiniletíl)-4-oxo-1H-quinolin-2-carboxamid hidrokloridot (SZR81) (5. ábra), a Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Karának Gyógyszerkémiai Intézetében szintetizálták, amelynek során a KYNA-t reagáltatták 2-pirrolidinoetilamin-nal létrehozva egy, a pirrol gyűrűben terciális nitrogént tartalmazó oldalláncot, ami a következő szerkezeti tulajdonságokkal bíró vegyületet eredményezett: (i) vízdékonyságot segítő oldallánc, (ii) egy beékel, új kationos központ és (iii) a vér-agy gáton való átjutást megkönnyítő oldallánc jelenléte (Fülöp F. és mtsai. 2012).



5. ábra SZR81 szerkezete
(Fejes-Szabó A. és mtsai. 2014)

A kísérlet menete

A patkányokat két csoportra osztottuk (n= 20 csoportonként). A Placebo csoportba kerülő állatok intraperitoneális fiziológiás sóoldatot, míg az SZR81 csoport állatai intraperitonális SZR81 (1mmol/ testsúly kg, 1 ml foszfát pufferben (PBS) feloldva, pH 7,4) előkezelést kaptak. Egy órával az előkezeléseket követően mindkét csoportban az állatok fele (n=10) a jobb oldali bajuszpárnájába szubkután 50 µl 1,5% - os fiziológiás sóoldatban feloldott formalin injekciót (Placebo-Form, SZR81-Form), míg az állatok másik fele fiziológiás sóoldatot kapott (Placebo-Fiz, SZR81-Fiz).

Magatartás teszt

A magatartás teszt a világos fázisban zajlott (reggel 8 és délután 2 óra között) egy csendes szobában. A magatartás vizsgálathoz használt teszt doboz egy 30 x 30 x 30 cm-es üveg terrárium volt tükörborítással. A bajuszpárnára irányuló dörzsölési aktivitás elemzéséhez az egyes patkányok viselkedését 1m-rel a terrárium fölött elhelyezett videó kamerával rögzítettük (Logitech HD Webcam C615). A teszt dobozban egyenként 10 perc habituációs időt töltöttek az állatok, majd kiemeltük őket, és formalin vagy fiziológiás sóoldat injekciót kaptak szubkután a jobb oldali bajuszpárnájukba, ezután rögtön visszahelyeztük őket a dobozba további 45 percre. A megfigyelési idő alatt az állatok nem kaptak sem enni, sem inni. Minden patkány után a dobozt kitakarítottuk és fertőtlenítettük.

A rögzített 45 perces videót 15 darab 3 perces blokkra vágtuk egy videó szerkesztő program segítségével (Microsoft, Movie Maker). A 3 perces blokkokban a beinjektált bajuszpárnára irányuló ipszilaterális elülső vagy hátsó manccsal történő dörzsöléssel vagy vakarással eltöltött időt mértük másodpercekben, ami az adott blokk nociceptív értékét adta meg. Korábbi tanulmányokhoz hasonlóan a Placebo-Fiz csoport állatainál mért alapvető mosakodási aktivitást vettük kontrollnak (*Claveluo P. és mtsai. 1995*).

C-Fos immunhisztokémia

Négy órával a formalin illetve a fiziológiás sóoldat beadása után, a patkányokat mély klorál-hidrát altatásban (0,4 g/ testsúly kg, Sigma-Aldrich) transzkardiálisan perfundáltuk 100 ml PBS-sel, majd fixáltuk 500 ml 4%-os PBS-ben oldott paraformaldehiddel (Merck). Az obextől számítva +1 és -5 mm közötti, a TNC-t is tartalmazó medulláris szegmentet eltávolítottuk és egy éjszakán át szintén 4%-os paraformaldehidben posztfixáltuk őket, amit krioprotekció követett (2 óra 10%-os szacharóz oldatban, majd süllyedésig 20%-os szacharóz oldatban, majd egy éjszaka 30%-os szacharóz oldatban). A metszetkészítés előtt minden medulláris szegmentum bal, ventrális (kontralaterális) oldalát egy kis bevágással jelöltük, hogy a sejtszámolás során egyértelműen meghatározható legyen az ipszilaterális és a kontralaterális oldal. A TNC kezdetétől rostromaudális irányban 30µm-es transzverzális metszeteket készítettünk *cryostat* segítségével. A metszeteket sorban 10 darab hideg PBS-t tartalmazó tégelybe gyűjtöttünk. A tégelyekben található szabadon úszó metszetek a rostromaudális tengely mentén egymástól 0,3 mm távolságra helyezkedtek el (15 darab egy tégelyben). A metszeteket PBS-ben mostuk, majd 0,3%-os H₂O₂-t (Scharlau Chemie) tartalmazó PBS-sel kezeltük 30 percig az endogén peroxidáz aktivitás blokkolása érdekében. Ezután a 1%-os Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben (PBST, VWR International) mostuk a metszeteket, majd egy éjszakán át inkubáltuk őket szobahőmérsékleten 1:2000 nyúlban termeltetett anti-patkány *c-Fos* poliklonális antitestet tartalmazó PBST-ben. Az immunhisztokémiai reakciót Vectastain Elite avidin-biotin kit (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories,) használatával vizualizáltuk, azaz a metszeteket 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kecskében termeltetett anti-nyúl biotinilált másodlagos antitestet tartalmazó PBST-ben, majd újabb 2 órán keresztül szobahőmérsékleten avidint és biotinilált torma peroxidázt tartalmazó PBST-ben inkubáltuk. A színreakciót nikkel-ammónium-szulfát (Scharlau Chemie) tartalmú 3', 3'-diaminobenzidinnel (Sigma-Aldrich) hoztuk létre. A festődés specifitását a primer antitest elhagyásával ellenőriztük. Végül a metszeteket tárgylemezre vittük, szárítottuk, és lefedtük.

Sejtszámolás

A Paxinos és Watson féle patkány agy atlasz alapján (Paxinos G. és Watson C. 2013) a számolás megkezdése előtt minden metszet helyzetét meghatároztuk a rostromaudális tengely mentén, továbbá minden metszeten meghatároztuk a TNC elhelyezkedését. Az immunreaktív

sejteket Nikon Optiphot-2 fénymikroszkóp 10-szeres nagyítású objektíve alatt számoltuk minden állatban, minden tizedik transzverzális metszeten, az ipszi- és a kontralaterális TNC-kben egyaránt. A számolás során csak azokat a *c-Fos* sejteket vettük figyelembe, amelyek egyértelmű specifikus magi festődést mutattak. A reprezentatív képeket Zeiss AxioImager M2 mikroszkópra (Carl Zeiss MicroImaging) szerelt AxioCam MRc kamerával (Carl Zeiss MicroImaging) készítettük.

Statisztikai elemzés

A magatartás vizsgálatnál elsőként mindegyik három perces periódusban (15 blokk) összevetettük egymással az alcsoportokban (Placebo-Fiz, Placebo-Form, SZR81-Fiz, SZR81-Form) mért átlagos arcdörzsölési aktivitást ismételt méréses varianciaanalízist (ANOVA) használva, amelyet a páronkénti összehasonlítások elkészítése miatt Sidak *Post Hoc* teszttel egészítettünk ki.

A két fázis elkülönítése az ismételt méréses ANOVA során a Placebo-Fiz és a Placebo-Form alcsoportok között kapott szignifikáns eltéréseken alapult. Így tehát az első fázis a szubkután injekciót követő első 3 perc, míg a második fázis a 12. perctől a 42. percig tart. Mindezek alapján az arcdörzsöléssel eltöltött idő az első fázisban megegyezik az első blokkban mért eredménnyel, míg a második fázis esetében az 5-től a 14-es blokkokban kapott eredményeket összegeztük. A statisztikai elemzést a két fázisban külön-külön, egyszempontos ANOVA-t használva végeztük. A páronkénti összehasonlításokhoz Tamhane *Post Hoc* tesztet használtuk.

Az immunhisztokémiai eredmények statisztikai elemzésénél ismételt méréses ANOVA-t használtunk, amelynek során a rosztrokaudális tengely mentén minden magasságban (15) összehasonlítottuk az immunreaktív sejtek átlagos számát az összes alcsoport (Placebo-Fiz, Placebo-Form, SZR81-Fiz, SZR81-Form) ipszi- és kontralaterális TNC-jét külön kezelve. A páronkénti összehasonlításokhoz Sidak *Post Hoc* tesztet használtuk. Mivel nem kaptunk szignifikáns különbséget sem úgy, ha összehasonlítottuk egymással a szubkután fiziológiás sóoldatot kapott alcsoportok (Placebo-Fiz, SZR81-Fiz) ipszi- és kontralaterális TNC-éit, sem úgy, hogy ezeket összevetettük a szubkután formalin injekciót kapott állatok (Placebo-Form, SZR81-Form) kontralaterális TNC-éivel, így a továbbiakban a szubkután formalint kapott állatok (Placebo-Form, SZR81-Form) kontralaterális TNC-éből származó eredményeket használtuk kontrollként.

Eredmények

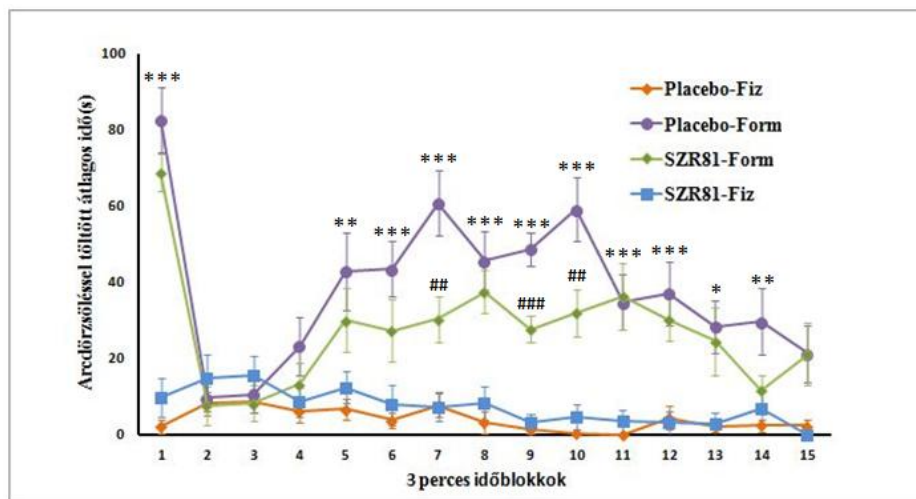
Magatartás teszt eredményei

Kísérleteinkben a Placebo csoportban a szubkután formalin hatására (Placebo-Form alcsoport) kialakult nociceptív viselkedési mintázat összhangban van korábbi, mások által már publikált eredményekkel (*Clavelou P. és mtsai. 1989, Clavelou P. és mtsai. 1995, Raboisson P. és Dallel R. 2004*). Az általunk végzett kísérletben is megfigyelhető volt, hogy a formalin injekció beadását követően az állatok azonnal elrántották a fejüket. A teszt dobozba visszatérve őket néhány másodperc elteltével intenzíven és folyamatosan dörzsölni kezdték a beinjektált bajuszpárnájukat, amely általában 3-4 percig tartott. Ez a periódus az első fázis. Ezt követően hozzávetőlegesen 9-10 perc erejéig a patkányok felfüggesztették a dörzsölési aktivitásukat, ami az ez idő alatti relatív fájdalommentességet jelzi. Ez az inaktív periódus választja el egymástól az első és a második fázist. A formalin beadását követő tizenkettedik perc környékén az állatok újból dörzsölni kezdték a kezelt területet, amely már kevésbé volt intenzív és körülbelül 20-22 percen keresztül kisebb-nagyobb megszakításokkal folyamatosan fennállt. Ez utóbbi szakasz a második fázis.

Az SZR81 előkezelésben részesült állatoknál a formalin injekció hatására (SZR81-Form alcsoport) szintén kialakult a típusos nociceptív viselkedési mintázat, azaz a kétfázisú arcdörzsölési magatartás, viszont ez kevésbé volt kifejezett a második fázisban a Placebo csoport formalinnal kezelt állataival (Placebo-Form alcsoport) összehasonlítva.

A két csoport szubkután fiziológiás sóoldattal oltott patkányainak (Placebo-Fiz, SZR81-Fiz) viselkedésében egyáltalán nem volt fellelhető a típusos kétfázisú magatartási válasz. Ezenél az állatoknál csupán csak a random módon jelentkező alapvető mosakodási aktivitás volt megfigyelhető.

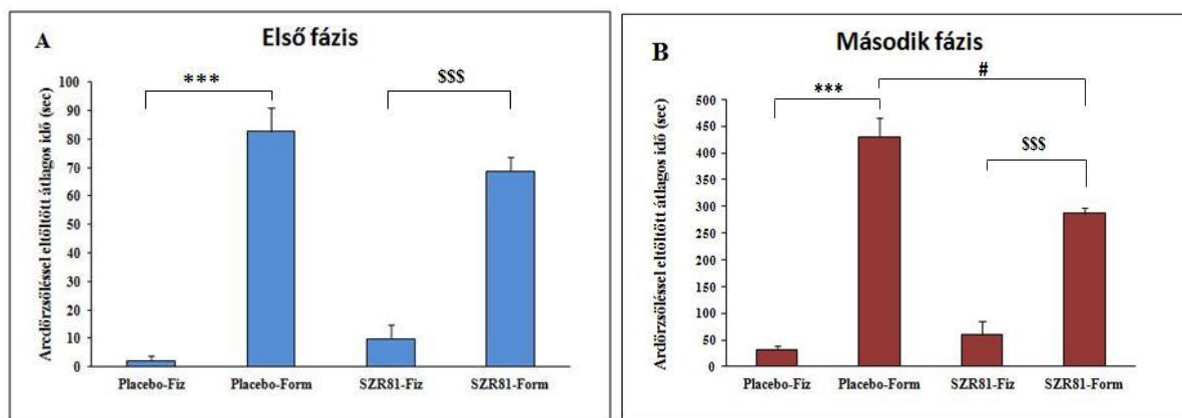
A statisztikai elemzés eredményeképpen elmondható, hogy a 3 perces blokkokat összehasonlítva a Placebo-Form alcsoport állatai szignifikánsan több időt töltöttek a kezelt terület dörzsölésével az 1. és az 5-14 blokkokban a Placebo-Fiz alcsoportéhoz viszonyítva (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; 6. ábra). Tehát a magatartás teszt során a beadott formalin hatására szignifikánsan megemelkedett az arcdörzsöléssel eltöltött idő az első és a második fázisban is (*** $p < 0,001$; 7. ábra).



6. ábra Az arcdörzsöléssel töltött átlagos idő (másodperc) blokkonkénti bontásban a négy alcsoportban (átlag±S.E.M.)

A Placebo-Form alcsoportban (lila görbe) a görbe alakja alapján is egyértelműen elkülöníthető egymástól az első és a második fázis, amely az SZR81-Form alcsoportban (zöld görbe) is megfigyelhető, bár itt már kevésbé kifejezett. A Placebo csoportban a dörzsölési aktivitás számos blokkban (1. és 5-14.) szignifikánsan megemelkedett a formalin injekció hatására (lila görbe) a fiziológiás sóoldattal kezelt állatokhoz képest (narancssárga görbe) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Ugyanakkor az SZR81 előkezelés (zöld görbe) képes volt szignifikánsan csökkenteni a formalin hatását a 7., 9. és 10. blokkokban a Placebo-Form alcsoportéhoz (lila görbe) képest (## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$). A Placebo-Fiz (narancssárga görbe) és SZR81-Fiz (kék görbe) alcsoportok között egyik blokkban sem, valamint az alcsoportokon belül a blokkok között sem volt szignifikáns különbség.

A további összehasonlítások egyértelműen kimutatták, hogy az SZR81 előkezelés a 7. és 9-10-es blokkokban és ezzel összhangban a fázisonkénti elemzésnél a második fázisban is képes volt szignifikánsan redukálni az arcdörzsöléssel eltöltött időt a Placebo-Form alcsoportéhoz képest (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; 6-7. ábra).



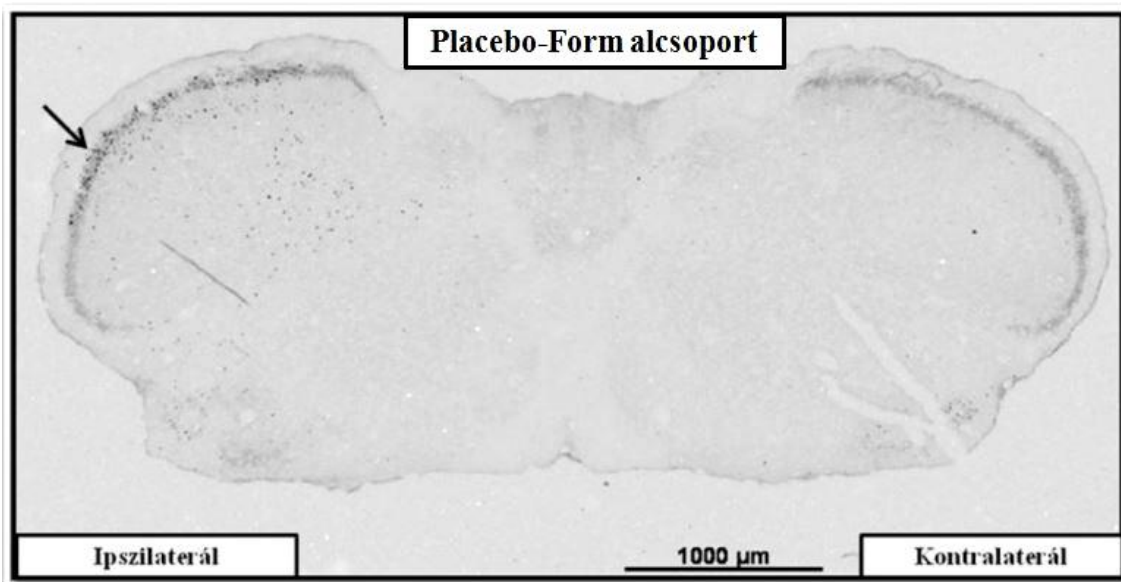
7. ábra Az arcdörzsöléssel töltött átlagos idő (másodperc) fázisonkénti bontásban a négy alcsoportban (átlag±S.E.M.)

A Placebo csoportban a szubkután formalin injekció (Placebo-Form) szignifikánsan megnövelte az arcdörzsöléssel töltött időt a szubkután fiziológiás sóoldattal oltott állatokhoz képest (Placebo-Fiz) az első és a második fázisban is (** $p < 0,001$). Mind az első, mind a második fázisban az SZR81-el előkezelt csoportban is megfigyelhető volt a szignifikáns emelkedés a szubkután fiziológiás sóoldattal (SZR81-Fiz) és formalinnal (SZR81-Form) kezelt állatok között (\$\$\$ $p < 0,001$). Ugyanakkor az SZR81 előkezelés képes volt szignifikánsan csökkenteni a formalin hatását a második fázisban (# $p < 0,05$). A szubkután fiziológiás sóoldattal kezelt alcsoportok (Placebo-Fiz és SZR81-Fiz) között nem volt szignifikáns különbség.

Immunhisztokémiai eredmények

A nyúltvelői transzverzális metszeteken a *c-Fos* immunreaktivitás egyértelmű nukleáris lokalizációt mutat az idegsejtekben.

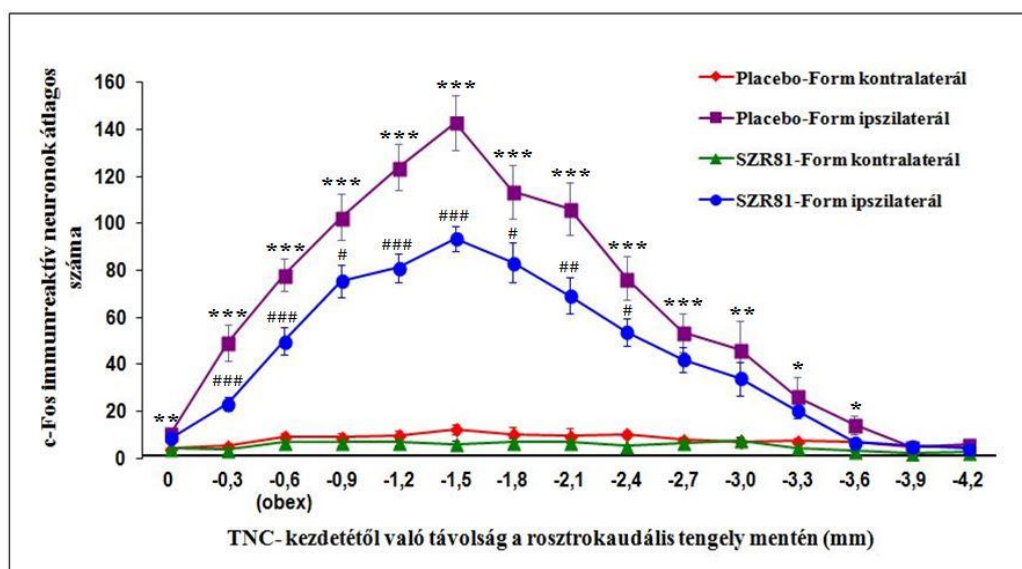
A Placebo-Form alcsoportban az egyoldali szubkután formalin injekcióval megegyező oldalon elhelyezkedő (ipszilaterális) TNC-ben sokkal több *c-Fos* immunreaktivitást mutató neuron látható, mint a kontralaterális TNC-ben (8. ábra). Ez az emelkedés változó mértékű a rostromaudális tengely mentén a szomatotópiás elrendeződés következtében. Így tehát az egyes magasságokban a formalin-kezelt oldalon eltérő számú *c-Fos* festődést mutató neuron található, amely a TNC kezdetétől számított -1,5 mm-nél a legkifejezettebb. Ez az emelkedés a TNC kezdetétől a -3,6 mm-es magasságig terjedő szakaszon szignifikáns különbséget mutat a kontralaterális TNC-hez képest (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; 9. ábra). A kontralaterális TNC-ben nem figyelhető meg változás a *c-Fos* immunreaktív neuronok számában a rostromaudális tengely mentén.



8. ábra A TNC kezdetétől számított -1,5 mm-es magasságban készült reprezentatív nyúltvelői transzverzális metszet a Placebo-Form alcsoportból *c-Fos* immunhisztokémiai festést követően

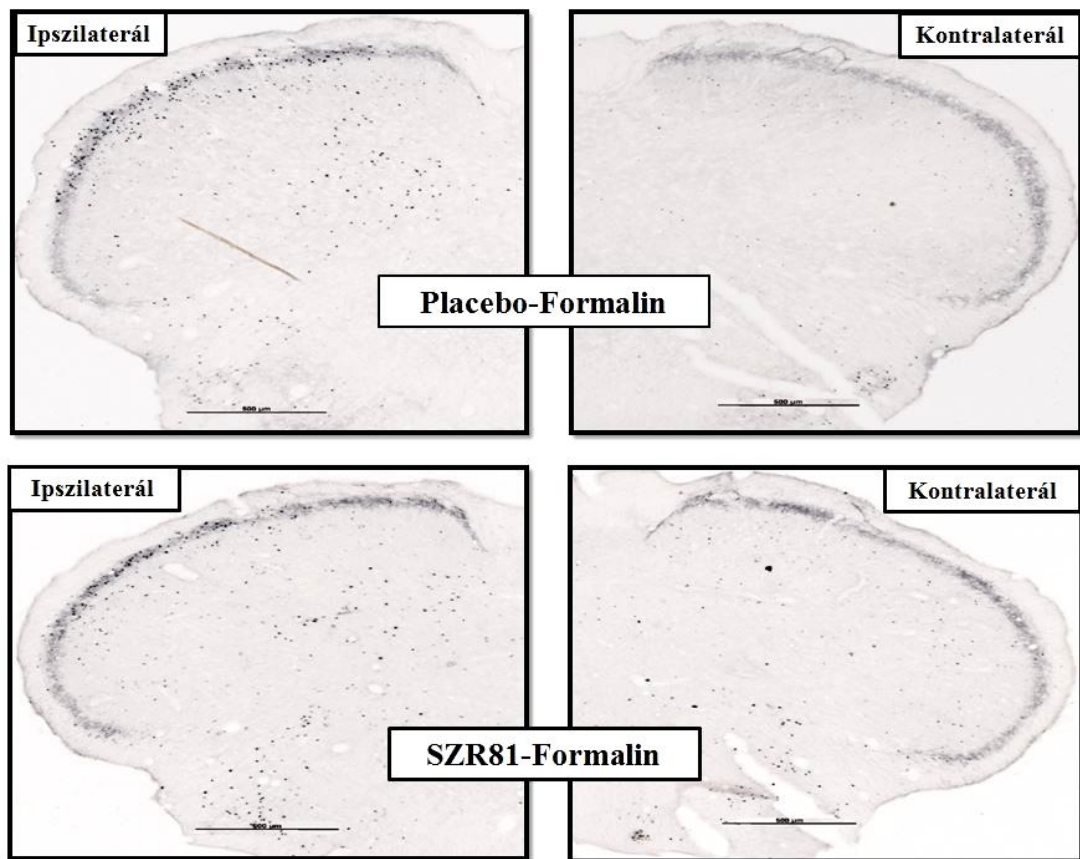
Sűrű nukleáris *c-Fos* festődés látható a formalin kezeléssel megegyező (ipsilaterális) oldali TNC felszíni rétegeiben (fekete nyíl). Ezzel szemben a kontralaterális TNC-ben csak néhány immunreaktív sejtmag látható.

Az SZR81 előkezelésben részesült SZR81-Form alcsoportban továbbra is megfigyelhető a formalin hatására bekövetkező szomatotópiás *c-Fos* sejtszám emelkedés az ipsilaterális TNC-ben a kontralaterális TNC-hez viszonyítva. Ugyanakkor a Placebo-Form és az SZR81-Form alcsoport ipsilaterális TNC-jéből származó eredményeket összevetve megállapítható, hogy az SZR81 előkezelés képes volt szignifikánsan csökkenteni a formalin *c-Fos* sejtszámra gyakorolt hatását a TNC kezdetétől számított -0,3 és -2,4 mm közötti szakaszon ($\#p<0,05$; $\#\#p<0,01$; $\#\#\#p<0,001$; 9-10. ábra). Ebben az alcsoportban sem volt megfigyelhető változás a kontralaterális TNC-ben a *c-Fos* immunreaktív neuronok számában a rostromaudális tengely mentén, továbbá nem volt különbség a két alcsoport kontralaterális TNC-éi között sem.



9. ábra *c-Fos* immunreaktív sejtek átlagos száma a rostromkaudális tengely mentén a Placeo-Form és az SZR81-Form alcsoportok ipszi- és kontralaterális TNC-éinek felszíni rétegeiben (átlag±S.E.M.)

A Placebo-Form alcsoportban a bajuszpárnába szubkután adott unilaterális formalin injekció szignifikánsan megemeli a *c-Fos* immunreaktív sejtek számát a rostromkaudális tengely mentén a TNC kezdetétől a -3,6 mm-es magasságig terjedő szakaszon az ipsilateralis TNC-ben (lila görbe) a kontralaterális TNC-hez képest (piros görbe) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Ez az emelkedés a rostromkaudális tengely mentén változó mértékű a szomatotópiának köszönhetően. Továbbá az SZR81 előkezelés szignifikánsan képes volt csökkenteni a formalin-indukálta *c-Fos* sejtszám emelkedést az SZR81-Form alcsoport ipsilateralis TNC-jében (kék görbe) a Placebo-Form alcsoport ipsilateralis TNC-jéhez viszonyítva (lila görbe) a TNC kezdetétől számított -0,3 és -2,4 mm közötti szakaszon (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$). Sem a két alcsoport kontralaterális TNC-je között, sem pedig ezekben a TNC-kben a rostromkaudális tengely mentén nem volt eltérés az immunreaktív sejtszámokban.



10. ábra Ipszilaterális és kontralaterális TNC-t ábrázoló reprezentatív transzverzális metszetek *c-Fos* immunhisztokémiai festést követően a Placebo-Form és az SZR81-Form alcsoportokból

A jobb oldali bajuszpárnába fecskendezett formalin ipszilaterálisan megemeli a *c-Fos* fehérjét expresszáló neuronok számát a kontralaterális oldalhoz képest mind a két alcsoportban. Ez az emelkedés viszont a Placebo-Form alcsoportban sokkal kifejezettebb, mint az SZR81-Form alcsoportban. Összehasonlítva a két alcsoport kontralaterális oldalát, nincs különbség a *c-Fos* immunreaktív sejtek számában.

Megbeszélés

A fejfájásbetegségek hátterében zajló patofiziológiai folyamatok megismerése kiemelt fontosságú, mivel ezek a betegségek jelentős gazdasági is szociális terhet rónak a társadalomra és a hatékony kezelés sem mindig megoldott (*Andlin-Sobocki P. és mtsai. 2005, D'Andrea G. és mtsai. 2012*)

Kísérleteinkben az elsődleges fejfájások patomechanizmusában alapvető szerepet játszó trigeminális aktiváció egyik állatkísérletes modelljét, az orofaciális formalin tesztet használtuk egy újonnan szintetizált kinurénsav származék, az SZR81 moduláló hatásának vizsgálatára.

Eredményeink azt mutatják, hogy az SZR81 előkezelés anti-nociceptív hatású, hiszen szignifikánsan csökkentette a bajuszpárnába adott szubkután formalin injekció okozta nociceptív választ, azaz az arcdörzsölési aktivitást a második fázisban. Az orofaciális formalin tesztben kialakuló típusos arcdörzsölési aktivitás bifázikus lefolyásának első fázisa feltehetően a primer nociceptorok közvetlen ingerlésének köszönhető, míg a második fázis hátterében a perifériás szövetben kialakuló gyulladásos reakció illetve a trigeminális és gerincvelői másodlagos neuronok szenzitizálódása állhat. A formalin a beadást követően erőteljes aktivációt fejt ki a perifériás nociceptorokra, a fájdalomérző A δ - és C- rostokra, majd az elsődleges és a másodlagos trigeminális neuronokra. Mindez a perinazális területre irányuló intenzív dörzsölést vált ki patkányoknál (*Tjølsen A. és mtsai. 1992*), ami körülbelül 3-4 percig tart, és az első fázisnak felel meg. Ezután a szövetbe került formalin elkezd kölcsönhatásba lépni a fehérjékkel, károsítja őket, és helyi gyulladást vált ki. A felszabadult gyulladásos mediátorok által a formalin indirekt módon aktiválja az A δ és C-rostokat, ezáltal az elsődleges és másodlagos trigeminális neuronokat is, amelyeknek az ingerküszöbe erősen lecsökken és hiperreaktívává válnak (*Rosland J. H. és mtsai 1990*). A körülbelül 30-40 percig elhúzódó, kevésbé intenzív dörzsölési aktivitásban megnyilvánuló második fázis kifejlődésében a fájdalomérzetben és a fájdalomra adott válaszreakcióban közreműködő másodlagos neuronok szenzitizálódásának is szerepe lehet (*Raboisson P. és mtsai. 1995*). Mivel az SZR81 előkezelés a magatartás vizsgálatokban kapott eredményeink alapján szignifikánsan csökkentette a második fázis során az arcdörzsöléssel eltöltött időt, arra következtethetünk, hogy az SZR81 anti-nociceptív hatása a trigeminális neuronok aktivációjának és szenzitizálódásának modulálása révén nyilvánult meg, ezáltal csökkentve a fájdalom indukálta válaszreakciót.

Az SZR81 trigeminális aktivációra gyakorolt moduláló hatása nem csak a magatartás vizsgálat szintjén, hanem a másodlagos trigeminális neuronok szintjén is kimutatható volt a központi idegrendszerben elhelyezkedő TNC-ben, mivel az előkezelés képes volt szignifikánsan csökkenteni a formalin-indukált *c-Fos* sejtszám emelkedést. A *c-Fos* egy nukleáris fehérje, transzkripció faktor, amit széleskörűen használnak a nociceptív ingerek hatására kialakuló neuronális aktiváció markereként (Harris J. A. 1998). Számos tanulmány azt sugallja, hogy a nocicepció szintjének növekedésével arányosan emelkedik a *c-Fos* expresszió (Harris J. A. 1998). Ezt alátámasztja egy korábbi kísérlet is, melynél patkány hátsó talppárnájába fecskendeztek 1,5 illetve 5%-os formalint. A gerincvelői *c-Fos* expresszió és a fájdalom által kiváltott viselkedés a formalin oldat töménységével egyenes arányban változott (Harris J. A. és mtsai. 1995). Mivel kísérletünkben az SZR81 előkezelés hatására szignifikánsan csökkent a TNC formalin kezelt ipszilaterális oldalán a *c-Fos* immunreaktív sejtek száma, így arra következtethetünk, hogy a magatartás vizsgálatban kapott eredményeket megerősítve az SZR81 a trigeminális aktivációra moduláló hatást fejtett ki.

Tanulmányunkkal összhangban más kutatások is kimutatták a KYNA származékok trigeminális aktivációt és szenzitizációt csökkentő hatását. Az SZR81 moduláló hatását vizsgálva az találták, hogy ez a KYNA származék kivédte a nitroglicerín-indukálta trigeminális aktiváció következtében kialakult morfológiai változásokat, azaz a calcitonin gén-relációs peptid expressziójának csökkenését, továbbá a *c-Fos*, a neuronális nitrogén-monoxid szintáz és a kalcium-kalmodulin-függő protein kináz II alfa immunreaktív sejtek számának emelkedését a TNC területén (Fejes A. és mtsai. 2014), amelyek szintén közreműködhetnek a trigeminális aktivációban és a szenzitizációs folyamatokban (Chacur M. és mtsai. 2010, Fang L. és mtsai. 2002, Edvinsson L. és Ho T. W. 2010). Hasonló eredményt kaptak egy korábbi nitroglicerín modellt használó kísérletben egy másik KYNA származékkal, ahol az SZR72 szintén képes volt csökkenteni a trigeminális aktivációt (Vámos E. és mtsai. 2009a), amire az önálló KYNA kezelés kisebb mértékben volt képes valószínűleg a vér-agy gáton való korlátozott átjutási képessége miatt (Knyihár-Csillik E. és mtsai. 2008).

Ezekben a korábbi kutatásokban a sejtszintű morfológiai változásokra gyakorolt moduláló hatás felderítése volt az elsődleges cél, míg jelenlegi kísérletünkben a morfológiai vizsgálatok mellett detektálható volt az SZR81 nociceptív magatartásra gyakorolt mérséklő hatása is.

Az SZR81 a trigeminális aktivációt csökkentő hatását részben direkt és részben indirekt módon is elérheti. Így valószínűsíthető, hogy egyrészt az alap, oldalláncal ellátott vegyület változatlan formában is hathat, vélhetően ugyanazokon a támadáspontokon, mint amiken a kiindulási vegyület, azaz a KYNA is képes hatni. Ugyanakkor irodalmi adatok

alapján a szervezetben – legalább részben – visszaalakulhat KYNA-vá és így is kifejtheti biológiai hatását (Fejes A. és mtsai. 2014).

A KYNA-nak több ismert támadáspontja van. Antagonista hatást fejt ki a glutamát receptorokra, alacsony $\mu\text{mol-os}$ koncentrációban az NMDA (Kessler M. és mtsai. 1989), míg magasabb koncentrációban az AMPA és a kainát receptorokat gátolja (Prescott C. és mtsai. 2006). Ezen kívül blokkolni képes az $\alpha 7$ -nACh receptorokat is (Hilmas C. és mtsai. 2001), továbbá agonistaként képes hatni a GPR35 receptorokon (Ohshiro H. és mtsai. 2008).

A glutamát elsődleges serkentő neurotranszmitter és fontos szerepet tölt be a trigeminális aktiváció során, így az elsődleges fejfájások, és a fájdalom pathomechanizmusában is. A glutamát és receptorai a primer afferens rostoktól kezdve egészen a gerincvelő hátsó szarvában lévő másodlagos neuronokig megtalálhatóak lényeges szerepet töltve be a neurotranszmisszió (Budai D. 2000) és a TNC-ben kifejlődő szenzitizáció folyamatában (Oshinsky M.L. 2006). A primer afferens rostok elektromos ingerlése glutamát és aszpartát felszabadulást indukált patkány gerincvelőben (Kangra I. és Randic M. 1991), illetve *in vitro* gerincvelő preparátumban elektromos vagy kémiai stimuláció hatására glutamát felszabadulást figyeltek meg (Hopkin J. Neal M.J. 1971). A glutamát központi idegrendszerbe való juttatása neuronális depolarizációt és neurotoxicitást is kiváltott (Nicoletti F. és mtsai. 1996), míg más kutatásban a glutamát felszabadulás gátlása csökkentette a fájdalmas stimulus, gyulladás vagy sérülés után fellépő hiperalgéziát (Klamt J. G. 1998).

A fájdalmas stimulus hatására kialakuló trigeminális aktivációban és szenzitizációban nagy szerepe van a pre- és posztzinaptikusan megtalálható metabotróp és ionotróp glutamát receptorok aktivitásának és ezen receptorok gátlása anti-nociceptív hatással bír (Du J. és mtsai 2001).

Az AMPA és a kainát receptorok aktiválódása elősegíti a fájdalmas információk továbbítását. Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy intratekálisan beadott agonisták hatására hő- és mechanikai hiperalgézia és allodynia lépett fel (Meller S. T. és mtsai. 1993). Ellenben egy iontoforetikusan bejuttatott szelektív AMPA/kainát antagonistá, a 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diol csökkentette a gerincvelőben a neuronális válaszokat fájdalmas stimulusokra (Radhakrishnan V. és Henry J. L. 1993) és egy LY293558 nevű antagonistá modulálta a kapszaicin indukált hiperalgéziát humán önkéntesekben (Sang C.N. és mtsai. 1998). A KYNA az AMPA/kainát receptorokat nagyobb koncentrációban blokkolja (Moroni F. 1999) az extracelluláris glutamát kötő helyhez kapcsolódva, így gátolva a szenzitizáció kialakulását (Prescott C. és mtsai. 2006).

A KYNA a trigeminális aktiváció modulálását az NMDA receptor blokkolásán keresztül is elérheti (Stone T. W. 2000). Az NMDA receptorok fontos szerepet játszanak a

trigeminális aktiváció, a fájdalom és a centrális szenzitizáció kialakításában, fájdalmas stimulus során folyamatos aktiváló hatást fejthet ki a primer afferens rostokra, illetve a másodlagos neuronokra (*Tallaksen-Greene S. J. és mtsai. 1992*). Az NMDA receptorok szerepét a fájdalom érzékelésében igazolja, hogy a patkány hátsó talpába adott NMDA nociceptív válaszreakciót, hiperalgéziát és allodyniát váltott ki (*Zhou S. és mtsai. 1996*), és az intratekálisan bejuttatott NMDA hatására emelkedett neuronális válasz lépett fel a gerincvelői hátsó szarvi neuronoknál fájdalmas és nem fájdalmas ingerekre egyaránt (*Sher G. D. és Mitchell D. 1990*). Az NMDA-antagonistákkal történő kezelések eredményesek voltak különböző fájdalom modellekben. Egy NMDA antagonistá MK-801-gyel történő kezelés hatására csökkent a kapszaicin indukált *c-Fos* immunreaktív sejtszámemelkedés a TNC-ben (*Mitsikostas D. D. és mtsai. 1999*). Egy másik NMDA-kompetitív antagonistá, az LY235959 beadása intratekális vagy szubkután módon, szignifikánsan csökkentette a magatartási válaszokat a formalin teszt második fázisában illetve a centrális szenzitizációt (*Davis A. M. és Inturrisi C. E. 2001*). A trigeminális fájdalom folyamatában játszott szerepét alátámasztják humán kísérleti adatok is, ahol az NMDA antagonistá ketaminnal történő kezelés csökkentette a migrénes fájdalmat (*Nicolodi M. és Sicuteri F. 1995*).

A KYNA a glutamát receptorok mellett egy nem-kompetitív gátlást képes kialakítani a kolinerg rendszerbe tartozó $\alpha 7$ -nACh receptorokon, amelyek érzékenyebben reagálnak a KYNA-ra mint az NMDA receptorok (*Hilmas C. és mtsai. 2001*). Az $\alpha 7$ -nACh receptorok megtalálhatóak a trigeminális ganglionban (*Liu L. és mtsai. 1998*), és részt vesznek a másodlagos neuronok aktivációjában (*Carstens E. és mtsai 2000*). A glutamát felszabadulást preszinaptikusan blokkolva (*Carpenedo R. és mtsai. 2001*) a nociceptív neurotransmisszió továbbterjedését is befolyásolják (*McGehee és mtsai. 1995, Gray és mtsai. 1996*). Az endogén KYNA szint és a kolinerg rendszer között egy funkcionális reciprok kapcsolat lehet, mivel a KYNA blokkolja az $\alpha 7$ -nACh receptorok működését, viszont egy kísérletben egy öt napos nikotinos kezelés lényegesen csökkentette az endogén KYNA szintet patkányokban (*Hilmas C. és mtsai. 2001*).

A KYNA az antagonistá hatások mellett képes agonista hatást is kifejteni a GPR35 receptorokon, amelyeket a közelmúltban azonosítottak mint potenciális KYNA receptort (*Wang J. és mtsai. 2006*). A GPR35 receptorok nagymértékű kolokalizációt mutatnak a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 szubtípusú receptorokkal (*Ohshiro H. és mtsai. 2008*), amelyeknek szintén szerepük van a nociceptív folyamatokban (*Caterina M. J. és mtsai. 1997*). A GPR35 receptorok modulálják a perifériás nocicepciót, amit alátámaszt az a kísérlet, ahol a KYNA a GPR35 receptorokon keresztül csökkentette a ciklikus adenzin monofoszfát *forskolin* által megemelt szintjét patkány hátsó szarvi érző neuronokból álló sejt kultúrában

(Ohshiro H. és mtsai. 2008). A GPR35 receptorok aktiválódása anti-nociceptív hatást fejt ki az adenilát cikláz negatív szabályozásával és a ciklikus adenosin monofoszfát szignalizáció csökkentésével a hátsó gyöki ganglionban elhelyezkedő neuronokban (Ohshiro H. és mtsai. 2008).

A KYNA a központi idegrendszeren kívüli gyulladásos folyamatokra is képes hatni. Egy 2,4,6-trinitro-benzol szulfonsavval kiváltott akut bélgyulladás modellben a KYNA kezelés szignifikánsan csökkentette a mieloperoxidáz, a xantin oxidoreduktáz, és a nitrogén-monoxid szintáz szintjét (Varga G. és mtsai. 2010).

Ezen kísérleti megfigyelések arra engednek következtetni, hogy az SZR81 trigeminális aktivációt moduláló hatásának hátterében nem csak a különböző receptoriális hatások állhatnak, hanem a KYNA-hoz hasonlóan az SZR81 akár közvetlenül a gyulladásos folyamatokra is hatást gyakorolhat és legalább részben ez is hozzájárulhat az általunk kapott eredményekhez.

Jelenlegi kísérletünkben az SZR81 előkezelés hatékony a trigeminális nocicepció és a trigeminális aktiváció csökkentésében egy olyan kísérletes állatmodellben, ami az egyik legalkalmasabb a klinikai fájdalom vizsgálatára. Mindezek alapján ez az új KYNA származék egy új terápiás lehetőséget jelenthet többek között olyan trigeminális aktivációval járó elsődleges fejfájások kezelésében, mint például a migrén.