

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

SZTE TTIK Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

és

SZTE ÁOK Neurológiai Klinika

XXXII. OTDK Biológia Szekció

P2X7 receptor antagonistá hatása a formalin indukált gyulladásos
fájdalommodellben

Vraukó Veronika

Molekuláris bionika BSc. 4. évfolyam

Témavezető:

Dr. Párdutz Árpád

Belső konzulens:

Dr. Kis Zsolt

2014

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	3
Ábrajegyzék	4
Bevezető	5
A fájdalom jellemzése	5
Fejfájások típusai	6
A migrén	6
A migrén típusai.....	7
A migrén szakaszai	9
A migrén kialakulása	10
Purinerg jelátvitel.....	11
P2X7 receptor	13
Brilliant Blue G.....	14
Formalin modell.....	15
c-Fos	17
Célkitűzés	18
Anyagok és módszerek.....	19
Eredmények és értékelésük	22
Diskusszió.....	26
Összefoglalás.....	28
Irodalomjegyzék.....	29
Köszönetnyilvánítás	35
Tételes szakmai hozzájárulás	36

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATP: adenzin-trifoszfát

BBG: Brilliant Blue G

CSD: cortical spreading depression, tovaterjedő kérgi gátlás

FHM: familiáris hemiplégiás migrén

IASP: International Association for the Study of Pain

IHS: International Headache Society

IR: immunreaktív

P2XR: P2X receptor

P2X7R: P2X7 receptor

PBS: foszfát puffereelt sóoldat

PBS-T: 1% Triton X-100-at tartalmazó foszfát puffereelt sóoldat

TNC: caudalis trigeminális mag

ÁBRAJEGYZÉK

1. sz. ábra Magatartásvizsgálat eredményei	22
2. sz. ábra. A TNC két oldalán lévő c-Fos IR sejtek	23
3. sz. ábra c-Fos IR sejtek gerincvelői metszeten	24
4. sz. ábra c-Fos IR sejtek száma az egyes csoportokban	25

BEVEZETŐ

A fájdalom jellemzése

A fájdalom egy összetett, szubjektív érzet, amelyet többféle szempontból is definiálhatunk. Általános értelemben egy szövetkárosító ingerre adott szubjektív reakcióra értjük, de emellett az idegrendszer adott pályarendszerén adott választ, illetve nociceptív inger hatására kialakuló érzelmet is jelent. Nemzetközileg elfogadott definícióját a Nemzetközi Fájdalomkutató Társaság (International Association for the Study of Pain, IASP) fogalmazta meg 1979-ben, miszerint a fájdalom egy kellemetlen szenzoros és emocionális tapasztalás, amelyet valós, vagy lehetséges szövetkárosodás kísér (IASP 1979). A fájdalom érzete több tényezőtől is függ, mint például az aktuális érzelmi, fizikai vagy mentális állapottól, új keletű, vagy megismétlődött fájdalmas inger ért-e minket, esetleg tanult fájdalomtűrésről van-e szó. Ezen okok miatt a fájdalom megítélése meglehetősen egyéni. A fájdalmat több szempont szerint is csoportosíthatjuk. Eredete szerint három osztályát különböztetjük meg: nociceptív, neuropátiás és pszichés. A leggyakoribb a nociceptív fájdalom, amit szöveti sérülés során érzünk, kiváltó okai szomatikus és viscerális jellegű ingerek, mint például az első-, másod-, és harmadfokú égések vagy a bőr megvágása. Az ilyen jellegű fájdalom csillapítható nem szteroid gyulladáscsökkentőkkel vagy opioidokkal (Zhang és mtsai. 2012). Idegi sérüléskor, illetve különböző diszfunkciók (agyvérzés, gerincvelő sérülése, cukorbetegség) okozta idegkárosodás során neuropátiás fájdalom keletkezik (Dworkin és mtsai. 2013). A nociceptív fájdalomnál említett nem szteroid gyulladáscsökkentők, mint a közismerten fájdalomcsillapító gyógyszerek (aszpirin, paracetamol), e fájdalomérzetnél elégtelenek vagy hatástalanok, helyettük Na csatorna blokkolók vagy anticonvusivumok ill. antidepresszánsok általi kezelés javasolt (Piano és mtsai. 2013). A harmadik csoport az ún. pszichés fájdalom, egyelőre még nem teljesen tisztázott, egyfajta lelki eredetű érzet, amelynek hátterében nem található testi elváltozás. Ennél a fájdalomtípusnál a diagnózistól függően kezelni kell az esetleges szervi megbetegedéseket, továbbá pszichológus vagy pszichiáter közreműködése is szükséges.

Fejfájások típusai

A fejfájás az egyik leggyakoribb betegség, szinte nincs olyan ember, aki ne élte volna át e kellemetlen állapotot. Leggyakrabban önálló fejfájásbetegség része, de ezen kívül rengeteg – akár komolyabb – betegség tünete, esetleg előjele is lehet, ami megnehezíti a fejfájás típusának meghatározását és a hozzá kapcsolódó vélt vagy valós betegség pontos diagnosztizálását. Ezek, valamint a fájdalom erősen szubjektív megítélése miatt szükségessé vált egy egységes követelményrendszer bevezetése. Ezen kritériumokat először a Nemzetközi Fejfájás Társaság (International Headache Society, IHS) tette közzé 1988-ban, majd 2004-ben egy felújított, korszerűbb változat lett publikálva.

E leírás szerint három fő csoportra lehet osztani a fejfájásokat (IHS 2004). A primer fejfájások a legelterjedtebbek, a fejfájások nagyjából 90%-a ebbe a típusba tartozik. Közös jellemzőjük, hogy nem egy másik betegség vagy strukturális zavar áll a háttérükben. Ebbe a típusba tartozik a migrén, a tenziós és a cluster fejfájás. A szekunder fejfájások ezzel ellentétben ritkábban jelentkeznek, általában valamilyen feji – vagy nyaki sérülés hatására lépnek fel, esetleg különböző megbetegedéseket kísérő tünetek is lehetnek. Ezt a csoportot a poszt-traumatikus fejfájások, a különböző gyulladásból eredő fejfájások, daganatok okozta fejfájások és a pszichiátriai fejfájások alkotják. A harmadik csoportba a cranialis neuralgiák és egyéb, a fentebb írt csoportokba nem sorolható fejfájások tartoznak.

A migrén

A fejfájások közül a migrén kiemelt jelentőséggel bír sajátos tulajdonságai és elterjedtsége miatt. A migrén a második leggyakoribb fejfájástípus a tenziós fejfájások után. Legjellemzőbb tünete a rohamokban jelentkező súlyos, lüktető fejfájás, illetve fokozott érzékenység a fény és a hangok iránt. Előfordulásának gyakorisága a népesség teljes élettartamát nézve 13-18%. A betegség nemi dimorfizmust mutat, a nők közel háromszor jobban érintettek a migrénes tünetekben, azaz a női lakosság 16-33%-a, míg a férfiak 7-12%-a migrénes.

A nemek közti különbség a 40-es korcsoportban a legmagasabb. Ebben az életkorban a nők körülbelül 28%-a, míg a férfiaknak csak 7%-a szenved migrénben, vagyis a nők érintettsége ebben az életkorban négyszerese a férfiakénak (Matthias Keidel: A migrén).

Magyarországon körülbelül 1,2 millió migrénes él. Közülük 43% fel sem keresi orvosát vagy nem is tesz említést migrénes tüneteiről (Bank és Marton 2000), mivel betegségük nem életet veszélyeztető vagy az orvosuk által felírt gyógyszer nem enyhíti panaszait. Így gyakran maguk gyógyszerelik magukat különböző fájdalomcsillapító, vény nélkül kapható gyógyszerekkel. Ez utóbbinak komoly következményei lehetnek, mivel e fájdalomcsillapítók túlzott használata központi szerepet játszik a gyógyszer indukálta fejfájásszindrómában (Zed és mtsai. 1999). A migrén fájdalmas, sokszor hosszantartó és ismétlődő tünete miatt rendkívül megnehezíti a betegséget elszenvedő személy életét. Mind a magánéletet, mind a szabadidős tevékenységeket negatívan befolyásolják a kellemetlen tünetek, amik az iskolai, munkahelyi teljesítőképességre is egyaránt kihatnak. Ez utóbbiak a gazdaságot is kedvezőtlenül érintik. A migrén a legköltségesebb neurológiai zavar, az Európai Közösségnek egy évben több mint 27 milliárd euró a költsége e betegséggel kapcsolatban (Andlin-Sobocki és mtsai. 2005).

A migrén típusai

A migrént több csoportra lehet osztani, eszerint létezik aurával járó vagy aura nélküli migrén, opthalmoplégiás migrén, retinális migrén, a gyermekkori perodikus szindrómához köthető migrén, migrén szövődmények, illetve olyan migrén, amely a felsorolt diagnosztikus feltételeknek nem felel meg (IHS 2004). Az aurával járó migrén ismertetőjegye, hogy a fejfájást megelőzően különböző neurológiai diszfunkciókkal, főképp látászavarokkal együtt járó, ún. aura figyelhető meg. Ilyenkor főként kápráztató, vibráló, fénylő alakzatok jelennek meg a látómezőben, amelyek fokozatosan elfoglalják az egész látóteret. Az aura tünetei fokozatosan fejlődnek ki 5-20 perc alatt és maximum 60 percig tartanak. Ez a jelenség hiányzik az aura nélküli migrénben. A fejfájások 4-72 óráig tartanak, jellemző a közepes vagy súlyos erősség, a féloldali, lüktető jelleg, melyet a fizikai aktivitás fokoz, továbbá a hányinger, photo- és phonophobia (IHS 2004).

A Nemzetközi Fejfájás Társaság a különböző fejfájásoknak diagnosztikus feltételeket állított. Az IHS kritériumrendszere szerint a fejfájás aura nélküli migrénnek számít, ha A. *Legalább öt roham teljesíti a B-D feltételeket.* B. *A fejfájásrohamok 4-72 óráig tartanak (kezeléssel vagy kezelés nélkül).* C. *Legalább kettő ráillik a felsoroltak közül: 1. Féloldali lokalizáció. 2. Lüktető jelleg. 3. Mérsékelt vagy súlyos fájdalomintenzitás 4. A fejfájás súlyosbodása miatt rutintevékenységek (séta, lépcsőzés) elkerülése.* D. *A fejfájás alatt a felsoroltak közül legalább egy teljesül: 1. Hányinger és/vagy hányás. 2. Fény- és zajérzékenység. 3. Más betegséghez nem köthető tünetek.*

A következő kritériumok a gyermekgyógyászati migrénre vonatkoznak: 1. A rohamok 1 óráig lehetnek. 2. Az occipitalis fejfájások fokozott körültekintést igényelnek. 3. A kisgyermekeknél a viselkedésből lehet következtetni a photophobiára és/vagy phonophobiára.

Aurával járó (klasszikus) migrénnek tekinthető az a fejfájás, amelyik A. *Legalább két rohamra ráillik a B feltétel.* B. *A felsorolt kritériumokból legalább 3 teljesül: 1. Egy vagy több teljesen reverzibilis aura tünet. 2. Legalább egy aura tünet, ami fokozatosan, több mint 4 perc alatt alakul ki, két vagy több tünet egymás után keletkezik. 3. Nincs olyan aura tünet, ami egy óránál tovább tart. Ha egynél több aura tünet van jelen, az időtartam arányosan nő. 4. Az aurát egy órán belül követi a fejfájás, de kezdődhet előtte vagy szimultán vele együtt is.*

A migrén szakaszai

A migrénnek 4 fő szakasza van: bevezető szakasz (prodroma), aura szakasz, fejfájás szakasz és lábadozási szakasz (rekonvaleszcencia vagy posztdroma).

A prodroma tünetei a fejfájást megelőzően órákkal, de akár napokkal előbb is megjelenhetnek. A legtöbb beteg a viselkedésében tapasztal változást (depresszió, ingerlékenység, felfokozott hangulat, fáradtság, dekoncentráltág), ám photophobia, phonophobia, étvágycsökkenés vagy kalóriadús ételek kívánása is előfordulhat. A bevezető szakasz a migréneselek több mint felénél jelentkezik, egyenlő mértékben az aurával járó és aura nélküli migrén esetén.

Az auraszakasz a cortex vagy az agytörzs átmeneti diszfunkciója által keletkezik. Jellemző tünetei a látászavarok, de felléphet apraxia, agnosia, végtaggyengeség és különböző beszédzavarok is.

A migrén fő tünete a fejfájás. A tipikus migrénes fejfájás lehet egy- vagy kétoldali, lüktető, görcsös jellegű, enyhétől a súlyos mértékig is terjedhet. A fejfájás fokozatosan, és a nap bármely szakaszában kialakulhat. Leggyakrabban a reggeli órákban jelentkezik (Selby és Lance 1960).

Az utolsó szakasz, a lábadozás, amit a legtöbb migrénes tapasztal. A beteg ebben a szakaszban rendszerint ingerlékeny, fáradt, figyelmetlen. A fejfájást követően általában 24 órával érik el a betegek szokásos napi ritmusukat, aktivitásukat.

A migrén kialakulása

Az évek során számos elmélet született a migrén kialakulásának magyarázatára, de napjainkig egyik elmélet sem bizonyult teljességében igazolhatónak. A legtöbb kutató azonban egyetért abban, hogy a trigemino-vascularis rendszerben létrejövő aktiváció és szenzitizáció lehet az egyik alapmechanizmus a betegség során (Moskowitz 2008).

Szenzitizációnak nevezzük a neuronokban a túlzott érzékenységet, azaz egy állandó stimulus által kiváltott fokozott választ. Két fő típusát különböztetjük meg: a perifériás és a centrális szenzitizációt. Periférás szenzitizáció alakul ki, ha a magas ingerküszöbű primer neuronoknak lecsökken az ingerküszöbük különböző gyulladásos mediátorok (bradikinin, hisztamin, szerotonin, citokinek, prosztaglandin E2) hatására (Strassman és mtsai. 1996). Centrális szenzitizáció megjelenésekor pedig a trigemino-cervikális komplexben lévő másodlagos és harmadlagos neuronok hiperexcitábilis állapotba kerülnek („wind up”), ami az NMDA receptorok megnövekedett glutamát érzékenysége, illetve a fokozott nitrogén oxid szintáz aktivitása miatt alakul ki. E folyamat szintén fokozza a fájdalomérzékelést (Tajti és Vecsei 2009).

Sok migrénben szenvedő személy számol be arról, hogy családtagjai, rokonai körében is található migrénes, ami felveti a betegség genetikai módon történő továbbadásának lehetőségét. A kutatások eredményei alapján az aurával járó migrén 4-szer gyakrabban fordul elő annál a személynél, akinek az elsőfokú rokonai között is található migrénes. míg az aura nélküli migrénnél nem találtak jelentős kockázati tényezőt (Russell 1995).

Egy másik feltevés, az ún. vascularis elmélet szerint a migrénnel együtt járó fájdalom az agyi erek tágulásának következménye. Először Wolff és munkatársai végeztek kísérleteket a vasodilatáció és a migrén közötti kapcsolat felderítésére. Eredményeik során arra jutottak, hogy az agyi artériák intracranialis érgörcse okozza az aurajelenséget, továbbá, hogy az extracranialis vasodilatáció lehet felelős a migrén alatt létrejövő fájdalomért (Wolff és mtsai. 1953).

Az évek során bebizonyosodott a vasodilatáció meghatározó szerepe a migrénben, így a legtöbb migrén elleni gyógyszer, mint az ergot származékok és triptánok is rendelkeznek vasokonstriktív képességgel, ami által szűkítik a kórosan kitágult extracranialis ereket, ezáltal megszüntetve a migrén alatt létrejövő fájdalmat (Shevel 2011).

Egy másik elmélet szerint a migrén kialakulásában az agytörzs játszik központi szerepet, mint „migrén generátor” (Diener és May 1996). Egy 1995-ös kutatásban jobb oldalon lokalizálódó aura és aura nélküli migréneseket vizsgáltak PET segítségével és a fejfájásrohamok alatt fokozott véráramlást figyeltek meg a cinguláris kéregben, a halló – és látókéregben, valamint az agytörzsben enyhén balra lokalizáltan (Weiller és mtsai. 1995). A migrén tüneteit enyhítő szumatriptán kezelés alatt, egyedül az agytörzs aktivációja maradt meg. Nitrogén-monoxid indukálta aura nélküli migrén vizsgálata során szintén ugyanezeket az eredményeket kapták (Afridi és mtsai. 2005).

Az aura kialakulásának vizsgálata egy újabb elméletet szült, amit cortical spreading depression (CSD), vagy más néven tovaterjedő kérgi gátlásnak nevezünk. Megfigyelték, hogy a cortex ingerlésekor tovaterjedő aktiváció majd átmeneti kérgi gátlás alakul ki, melynek időbeli lefolyása korrelál az aurajelenséggel (Milner 1958; Lauritzen 1985). Az eddigi eredmények alapján, ma már elfogadott tény, hogy az aura jelenség az CSD egyik tünete (Ayata 2010), ráadásul kísérletes körülmények között a CSD képes volt a trigeminalis rendszer aktiválására (Moskowitz 2008), megteremtve a lehetséges kapcsolatot az aurajelenség és a fejfájás között.

Purinerg jelátvitel

A purin és pirimidin vegyületek minden sejtben megtalálhatók, részt vesznek az egészséges és kóros sejtműködésben egyaránt. Hatásukat sejtfelszíni receptorokon fejtik ki, melyek közül megkülönböztetünk P1-purinerg receptorokat vagy adenosin receptorokat (altípusai: A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) (Daly 1985; Fredholm és mtsai. 2001), melyek adenilát-ciklázsal aktiválhatók és antagonisták a metilxantinok. A másik csoportot alkotják a P2 purinerg receptorok, melyeknek ligandjai a különböző purin és pirimidin nukleotidok (ADP, ATP, UDP, UTP stb.).

A P2 receptorok további két csoportra bonthatók: az ionotróp P2X és metabotróp P2Y receptorokra. A P2Y receptorok G-fehérjéhez kapcsolódnak, és 308-377 aminosavból állnak. Közöttük 8 altípus található ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$) (Nishiyama és mtsai. 2004) és 7 transzmembrán doménnel rendelkeznek.

Az ionotróp P2X receptoroknak hét altípusát különböztetjük meg ($P2X_{1-7}$), melyek 384-595 aminosavból állnak. Az alegységek rendelkeznek két transzmembrán doménnel, egy C és N terminálissal, továbbá egy nagy extracelluláris hurokkal, melyen az adenosin-trifoszfát (ATP) kötőhelye mellett antagonisták és modulátorok kötőhelyei is találhatóak (Khakh 2001; Vial és mtsai. 2004). Fő funkciójuk, hogy lehetővé teszik különböző kationok (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) átjutását, ezáltal depolarizálva a sejtet. Az ATP ezen kívül gyulladáskor, a sejt sérülésekor, mechanikai és metabolikus stressznél az extracelluláris térben is megjelenik, mint „veszély” jelző szignál és már önmagában is egy algogenikus anyag (Collier és Duchon 1966; Wang és mtsai. 2004; Davalos és mtsai. 2005; Sperlagh és Illes 2007).

A purinerg receptorok fájdalomban betöltött szerepéről több tanulmány is született az évek folyamán. Megfigyelték a P2X3 receptorok nociceptív idegvégződéseken való expresszióját és az endoteliális sejtekből felszabaduló ATP-t különböző betegségek és neurológiai zavarok (angina, ischemia, migrén, fájdalom, daganatos betegség) alatt. Humán kísérleteknél szintén hasonló eredményeket kaptak, P2X receptor ($P2XR$) agonista adáskor a nociceptív reakció felerősödését észlelték a perifériás gyulladás indukálta neuronális aktivitásnál (Sawynok 2007). További P2 receptorokról is kiderült, hogy fájdalom moduláló hatásuk van. Fokozott expresszióját figyelték meg a P2X4 receptornak neuropátiás fájdalom alatt, ahol a fájdalom csökkent P2X4 knockout genotípusú és P2X4 antagonistával kezelt állatoknál (Inoue és mtsai. 2004; Trang és Salter 2012).

Ezenkívül a P2Y receptor antagonisták neuropátiás fájdalom alatti fájdalomcsillapító hatását is sikerült kimutatni (Burnstock 2009), továbbá a P2X3 és P2X7 receptorok arthritis kezelésében is hatásosnak bizonyultak (Al-Shukaili és mtsai. 2008; Varani és mtsai. 2010). Mindemellett kimutatták, hogy a P2XR-ok aktiválódása révén mikroglialis faktorok is kölcsönhatásba léphetnek a szomszédos hátsó szarv neuronjai között létrejövő serkentő szinapszisokkal, így megnövelve a hátsó szarvi neuronok ingerelhetőségét. Valószínűsíthető, hogy a fájdalommal összefüggésbe hozható hátsó szarvi területeken lévő neuronok e hiperexcitábilis állapota lehet felelős a neuropátiás fájdalomért.

P2X7 receptor

A P2XR-ok közül kitüntetett szerepe van a P2X7 receptornak (P2X7R) egyedi felépítése és tulajdonságai miatt (Chessell és mtsai. 1998). A P2X7R-ok a P2XR-okkal hasonló szerkezetűek, azonban egy sokkal hosszabb, 240 aminosavból álló C terminálissal rendelkeznek, így összesen 595 aminosavból állnak. A P2X7R-ok szelektíven expresszálódnak hematopoetikus őssejtből származó sejtekben, beleértve a hízósejteket, limfocitákat, eritrocitákat, fibroblasztokat, perifériás makrofágokat és az epidermális Langerhens sejteket (Surprenant és mtsai. 1996). Mivel túlnyomórészt immunológiai funkciókat betöltő sejteken találhatók, immunológiai funkciókat is ellátnak, ugyanakkor széles körben elterjedtek a perifériás szövetekben is (Afework és Burnstock 1999; Bardini és mtsai. 2000; Lee és mtsai. 2000; Pannicke és mtsai. 2000). Az idegrendszeren belül kimutatták őket mikrogliaon, Schwann sejteken és asztrocitákon, viszont neuronokon még nem tisztázott előfordulásuk (Anderson és Nedergaard 2006).

A P2X7R egy ligand aktivált kation csatorna extrém magas Ca^{2+} permeabilitással (Egan és mtsai. 2006). A többi P2XR-ral szemben a P2X7R nem mutat deszenzitizációt, magas koncentrációjú ($>100 \mu\text{M}$) ATP hatására aktiválódik és hosszú ideig tartó ATP beáramlás esetén, a receptoron átfolyó áram a többszörösére növekszik, így egy sokkal nagyobb pórust alkot, mint a többi P2X csatorna (Ralevic és Burnstock 1998). Ennek következtében akár a 900 Da méretű molekulákra is permeábilissá válik és a pórus növekedése miatt még apoptózis is bekövetkezhet (Chiozzi és mtsai. 1996).

Egyelőre kérdéses, hogy maga a P2X7R növeli-e a pórust, vagy pórusképző fehérjét aktivál, esetleg olyan másodlagos jelátvivők közvetítenek, mint a Ca^{2+} vagy az interleukin 1β (Narcisse és mtsai. 2005). A pórusképzésnek az immunválaszban van funkciója, a fájdalom közvetítésében valószínűleg nincs kitüntetett szerepe.

A P2X7R-ok neuropátiás fájdalom alatti hatása csökkenthető illetve gátolható mind genetikai knockout, mind szelektív antagonisták által (McGaraughty és mtsai. 2007; Honore és mtsai. 2009). Jelenlegi ismereteink szerint a P2X7 antagonistáit négy fő csoportra lehet osztani. Az első csoport azokat az ionokat tartalmazza, amelyek gátolják az ATP által kiváltott áramokat. Ilyen a kalcium, réz, magnézium vagy a cink. A második csoportba a generikus és nem-szelektív P2X antagonisták tartoznak, mint a szuramin, pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate (PPADS) vagy a Brilliant Blue G (BBG).

A harmadik csoport tagjai tartalmazznak két nagy szerves kation csoportot, például az isoquinoline KN-62 (1-(N,O-bis[5-isoquinolinesulfonyl]-N-methyl-L-tyrosyl)-4-phenylpiperazine) és az imidazol calmidazolium, amelyek megakadályozzák a P2XR-ok által létrehozott áramok kialakulását, ezáltal gátolva a receptor aktivitását. A negyedik csoportban olyan monoklonális antitestek találhatók, amelyeket a P2X7R-ok *in vitro* gátlására használnak.

A legújabb vizsgálatok kimutatták, hogy a gyulladásos és neuropátiás hiperszenzitivitás - mind a mechanikai mind termális ingerekre – teljes mértékben hiányzik P2X7 knockout egerekben, míg a normál nociceptív ingerek feldolgozása megmaradt (Chessell és mtsai. 2005).

A P2X7R-ok e tulajdonságai miatt napjainkban kitüntetett figyelmet kapott és több tanulmány is igazolta a fájdalom kialakulásában betöltött kulcsfontosságú szerepét. Az bizonyos, hogy aktivációjakor megnöveli az intracelluláris kalcium szintet és a kalcium, mint fontos jelátvivő molekula, modulálja a neuronális excitabilitást a P2X7R expresszáló glia sejtekben. Emellett a glutamát felszabadulást is a P2X7R-ok szabályozzák az idegsejtekben (Khakpay és mtsai. 2010), - ami szintén egy lényeges eleme lehet a fokozott excitabilitásnak (Alves és mtsai. 2013).

A P2X7R ezen kívül gyulladáskeltő mediátorokkal is kapcsolatba léphet, mint az interleukin 1 és a tumor nekrozis faktor (Le Feuvre és mtsai. 2002).

Brilliant Blue G

A BBG, más nevén Coomassie Brilliant Blue G az FD&C 1-es számú festékcsalád egy származéka, amely széles körben használt élelmiszer színezékek családját takarja toxikus mellékhatások nélkül (Borzelleca és mtsai. 1990). A BBG-t többek között fehérjék kimutatására is előszeretettel használják gélelektroforézis során (Neuhoff és mtsai. 1988), mivel rendkívül hidrofób és hidrofíl fehérjékhez is hozzá tud kötődni, így láthatóvá téve őket a gélben. Mivel a P2X4 és P2X7 receptorok gyakorta expresszálódnak ugyanabban a sejtben, így nehezen lehet elkülöníteni őket. A BBG különböző koncentrációban kifejtett hatása miatt képes megkülönböztetni e két receptor aktivációját: a P2X7R-on 10 és 200 nM között, míg a P2X4 receptorokon 10 μ M koncentrációban hat (Jiang és mtsai. 2000).

A BBG-t többnyire olyan kísérleteknél használják, ahol a vizsgált betegség során apoptózis következik be. A legújabb tanulmányok szerint *in vivo* módon történő BBG kezelés kivédi az amiloid- β által indukált neurodegenerációt Alzheimer-kóros egér modellben, valamint csökkenti a neurális apoptózis és motoros zavarok mértékét Huntington-kóros egerekben is (Diaz-Hernandez és mtsai. 2009). Ezen kívül bebizonyosodott, hogy az intravénás BBG kezelés fokozza a sejtregenerációt és csökkenti a gyulladásos reakciókat gerincvelői sérülést szenvedett patkányokban, valamint gátolja az asztrociták, és mikrogliák aktiválódását, illetve a neutrofil infiltrációt. Megfigyelték, hogy a BBG szignifikánsan csökkentette a nitroglicerinnel okozta allodíniát, ám e hatás P2X7 knockout egerekben nem volt tapasztalható (Goloncser és Sperlagh 2014).

A BBG-ről ezen kívül bebizonyították, hogy gátolja a tetrodotoxin érzékeny nátrium csatornákat mikromoláris tartományban. A gátlás mind a gyorsan inaktiválódó és lassan inaktiválódó nátrium csatornákra is kihat, habár kevésbé hatékony, mint a P2XR-ra gyakorolt gátlása. A BBG jól átjut a vér-agy gáton, ezáltal bővítve felhasználási lehetőségeit (Wong és mtsai. 2011).

Formalin modell

A formaldehid a legegyszerűbb aldehid, egy szén, egy oxigén és két hidrogénatomból épül fel. Vizes oldatát köznapin nevének formalinnak hívjuk, általában 37%-os oldatban hozzák kereskedelmi forgalomba. A formaldehid egy ubiquiter anyag, természetes úton állatok és növények anyagcseretermékeként jön létre, de elvértve megtalálható az emberi szervezetben is. Felhasználása igen sokrétű, előszeretettel alkalmazzák sejtek és szövetek tartósítására és az iparban is széles körben gyártják.

Több tanulmány is bebizonyította, hogy a szubkután adott formalin szöveti sérüléseket és viselkedésbeli változásokat is okoz pár perctől több óráig is kiterjedően. A tipikus formalinra adott válaszreakció kétfázisú, az első, rövid ideig tartó fázis után egy nagyjából 10 perces nyugalmi időszak (interfázis) jelentkezik, amit egy második, elnyúlt (tónusos) fázis követ. Az első fázis azonnal megkezdődik az injekció beadását követően, és 5-10 percig folytatódik. A második fázis nagyjából 15 perccel az injekció beadása után kezdődik, és 60 percig vagy akár tovább is tarthat (Tjolsen és mtsai. 1992).

Az első fázist a nociceptorok formalinnal való direkt ingerlése okozhatja, míg a második fázist a gyulladások és fájdalom közvetítő anyagok megjelenésével továbbá a centrális szenzitizációval hozták összefüggésbe (Hunskar és Hole 1987). Különböző viselkedésvizsgálatok során azt találták, hogy a perifériás oldalon történő lidokain vagy QX-314 lidokain származék injekció a második fázisra jellemző nociceptív viselkedésmintázatot teljesen kivédte (Dallel és mtsai. 1995; Taylor és mtsai. 1995). Összhangban ezzel az eredménnyel, elektrofiziológiai kísérletek kimutatták, hogy a második fázis alatti lidokain injekció a perifériás oldalon megszüntette a formalin indukált aktivitást a hátsó szarv neuronokban (Dickenson és Sullivan 1987). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy primer afferens aktivitás szükséges a második fázis viselkedéseinek megnyilvánulásához és a centrális szenzitizáció önmagában nem elégséges. Megfigyelték továbbá, hogy formalin injekciót követően fokozott aktivitást mutattak a C-rostok mind az első mind a második fázis alatt, a nyugalmi időszakban viszont nem (McCall és mtsai. 1996).

Az életkori különbségeket is vizsgálták a formalin teszt által kiváltott szöveti sérülések és gyulladásos reakciók értékelésével, fiatal (3 hónapos), középkorú (18 hónapos), és idős (24 hónapos) patkányokon, ahol megállapították, hogy a középkorú patkányok mutatták a legerősebb válaszreakciót.

Az eredmény arra utalhat, hogy a tónusos fájdalomra való érzékenység a különböző életkori szakaszokban változó lehet, és ez az érzékenység a középkorú állatoknál a legmagasabb (Gagliese és Melzack 1999). Ezenkívül megállapították, hogy a nitrogén oxid szintáz gátlók rendszeres intratekális adagolása csökkenti a formalinra adott nociceptív válaszreakciókat patkány és egér modellben (Moore és mtsai. 1991; Haley és mtsai. 1992; Malmberg és Yaksh 1993; Yamamoto és mtsai. 1993; Sakurada és mtsai. 1996).

A formalin tesztet széles körben alkalmazzák akut és tónusos gyulladásos fájdalommodellnek. A tesztet először 1977-ben írták le patkány és macska modellben (Dubuisson és Dennis 1977).

A formalin injekció beadási területétől függően megkülönböztetünk a talpba, illetve a bajuszpárnába adott formalin tesztet, ahol előbbinél mérik az érintett területhez kapcsolódó nociceptív viselkedéssel eltöltött időt és az adott mancsra gyakorolt nyalogatások, harapások és remegések számát (Taylor és mtsai. 1998), míg utóbbinál az injekciózott bajuszpárna dörzsölését figyelik meg.

Az orofaciális régió testünk egyik legsűrűbben beidegzett területe (trigeminális idegekkel), amely elsősorban a leggyakoribb akut fájdalmakkal hozható összefüggésbe (például a fogak és a hozzá kapcsolódó struktúrák), de emellett a krónikus (posztherpeszes neuralgia, migrén) és egyéb fájdalmak közvetítésének helyszínéül is szolgál. E fájdalomtípusok pontos mechanizmusa ezen a területen még kevésbé ismert, mivel az arc és száj környékére lokalizálódó fájdalmak vizsgálatáról kevés tanulmány született a test többi részéhez viszonyítva. Az orofaciális fájdalmat a trigeminális rendszerbe adott formalin injekció segítségével is vizsgálták (Clavelou és mtsai. 1989), továbbá több tanulmány is sikeresen alkalmazta a formalin tesztet a trigeminális régióban kialakuló fájdalom értékelésére (Klein és mtsai. 1991; Aigouy és mtsai. 1992; Cadet és mtsai. 1993; Eisenberg és mtsai. 1993).

A trigeminális nocicepció szempontjából a caudális trigeminális mag (TNC) vizsgálata alapvető fontosságú, mivel az elsődleges trigeminális nociceptorok centrális nyúlványai a TNC neuronjain végződnek.

c-Fos

A c-Fos egy nukleáris proto-onkogén, a Fos transzkripciós faktorok családjának tagja, mely különböző jelátviteli utak során fejti ki hatását (Seternes és mtsai. 1998). Neuronális expressziójának mérése a Fos fehérje immunhisztokémiai festésével a leggyakrabban használt markere a neuronális aktivitásnak (Sagar és mtsai. 1988; Duncan és mtsai. 1993), ugyanakkor felhasználható funkcionálisan összekapcsolt idegpályák térképezésére is (Hunt és mtsai. 1987; Menetrey és mtsai. 1989). Termikus, kémiai, és mechanikus stimuláció is kiválthat Fos által indukált immunreaktivitást elsősorban a I, II és V laminában lévő neuronok sejtmagjában, azaz azokon a területeken ahol a legtöbb nociceptív primer afferens, illetve hátsó szarvi nociceptív neuron van jelen. Szubkután formalin injekció is kivált Fos immunreaktivitást a gerincvelői neuronokban, dózistól függően (Presley és mtsai. 1990).

CÉLKITŰZÉS

Kísérletünk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a P2X7R-ok szerepét a trigeminális rendszer gyulladásos fájdalommodelljében, az orofaciális formalin tesztben. Viselkedésbeli és a c-Fos aktivációban megfigyelhető változásokat vizsgáltunk, valamint, hogy a P2X7R szelektív antagonistá BBG befolyásolja-e ezen folyamatokat.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteinkhez 52 db hím Sprague-Dawley patkányt használtunk fel. Az alkalmazott eljárások megfeleltek Európai Közösség Tanácsának (86/609/ECC) és a Nemzetközi Fájdalomkutató Társaság (IASP) ajánlásának. A kísérleteket a Csongrád Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága (XXIV./352/2012.), és a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága engedélyezte. Mindent megtettünk annak érdekében, hogy a felhasznált állatok számát minimalizáljuk, illetve az okozott szenvedésüket mérsékeljük. Az állatokat standard körülmények között tartottunk elegendő étellel, ivóvízzel ellátva, 12 órás megvilágítási ciklust alkalmazva. A vizsgálatok az állatok fényciklusa alatt, reggel 8 és délután 2 óra között történtek.

Magatartásvizsgálat

Az állatokat két csoportra osztottuk, az első csoport (n=26) állatai fiziológiás sóoldat injekcióban részesültek, míg a második csoport (n=26) állatai 50 mg/kg dózisban BBG-t kaptak szintén intravénásan. A BBG-t fiziológiás sóoldatban oldottuk és 7,4-es pH-ra titráltuk. 110 perccel a kezeléseket követően az állatokat egy 30X30X30 cm méretű tükrös oldalú dobozba helyeztük 10 percre (habituációs idő). A tükrös kialakításra azért van szükség, hogy az állat fejre irányuló viselkedésformáit minél jobban meg tudjuk figyelni.

120 perccel az oltások után mindkét csoport fele (n=13) szubkután 50 µl 1,5%-os formalin injekciót kapott a jobb oldali bajuszpárnába, míg a csoportok másik felét 50 µl fiziológiás sóoldattal oltottuk. A bajuszpárna oltások után az állatokat azonnal visszahelyeztük a tükrös dobozba és viselkedésüket 45 percig videofelvételen rögzítettük. A rögzített 45 perces intervallumot 15 db 3 perces blokkra osztottuk, és megmértük a blokkok ideje alatt az oltott bajuszpárna oldal dörzsölésével eltöltött időt másodpercekben. A mérésnél figyelembe vettük mind a mellső mind a hátsó lábbal való dörzsölést is, kontrollként a sóoldattal oltott állatok normális mosakodási viselkedését regisztráltuk.

Immunhisztokémia

A 45 perc letelte után az állatokat visszahelyeztük ketrecekbe, majd a bajuszpárna oltástól számítva 4 óra múlva mély klorál-hidrát altatásban transzkardiálisan perfundáltuk őket 50 ml 0,1 M foszfát pufferelt sóoldattal (PBS) egy perisztaltikus pumpa segítségével. A PBS-ses átmosást követően az állatokat 250 ml 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk, és az agyat valamint a gerincvelő cervikális szakaszát eltávolítottuk és egy éjszakán át posztfixáltuk. Nem minden állat került immunhisztokémiai feldolgozásra, minden csoportból 5 állatot csak PBS-sel perfundáltunk majd mintáikat esetleges további vizsgálatok céljából lefagyasztottuk. Ebből adódik, hogy a magatartás vizsgálatok csoportlétszáma 13, míg az immunhisztokémiára csoportonként 7 állat került feldolgozásra.

A fixált mintákból emelkedő koncentrációjú szacharóz oldatban elvégzett krioprotekció után 30 μm vastagságú metszeteket készítettünk a TNC-ből kriosztát segítségével. Annak érdekében, hogy az azonos magasságból származó metszeteket tudjuk majd a későbbiekben összehasonlítani, a metszeteket a canalis centralis-4. agykamra átmenettől számítva kezdtük gyűjteni. Továbbá az oldalak elkülöníthetősége érdekében a kontroll (bal) oldalon ventrálisán egy hosszanti bemetszést ejtettünk

A metszeteket 18 PBS-t tartalmazó tégelybe gyűjtöttük, így az egymást követő metszetek közötti távolság 540 μm volt. A metszeteket az endogén peroxidáz aktivitás gátlása érdekében 30 percig 0,3% H_2O_2 oldatban inkubáltuk majd többször átmostuk 1% Triton X-100-at tartalmazó foszfát pufferelt sóoldatban (PBS-T). A nem specifikus kötőhelyek gátlása végett 10% normál kecske szérumos blokkolást alkalmaztunk mielőtt metszeteinket az 1:2000 koncentrációban alkalmazott poliklonális c-Fos ellenes antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, sc-52) inkubáltuk volna. A primer antitesttel való éjszakán át tartó inkubálás után metszeteinket többször átmostuk PBS-T-vel majd a másodlagos antitesttel (anti rabbit IgG made in goat, Vector Laboratories BA-1000) való 2 órás inkubálás következett. A színreakciót Vectastain Elite ABC kittel vizualizáltuk, 3'3-diaminobenzidin kromogén és nikkel enhancer jelenlétében. A festés specificitását az elsődleges antitest elhagyásával ellenőriztük. A metszeteket tárgylemezre vittük, megszáritottuk majd lefedtük. A sejtszámolást egy Nikon Optiphot fénymikroszkóp 20X nagyítású objektívje alatt végeztük, külön az oltott (jobb) és kontroll (bal) oldalakon.

Statisztikai elemzés

A statisztikai összehasonlításokat SPSS program segítségével végeztük (IBM SPSS Statistics 20). A magatartás vizsgálatokból kapott, másodpercekben kifejezett, a nociceptív viselkedést tükröző pontértékeket blokkonként hasonlítottuk össze. Mivel az egyes blokkok nem függetlenek egymástól ezért ismételt méréses varianciaanalízist alkalmaztunk (RM ANOVA). A csoportátlagok páronkénti összehasonlítását Sidak post hoc teszttel végeztük.

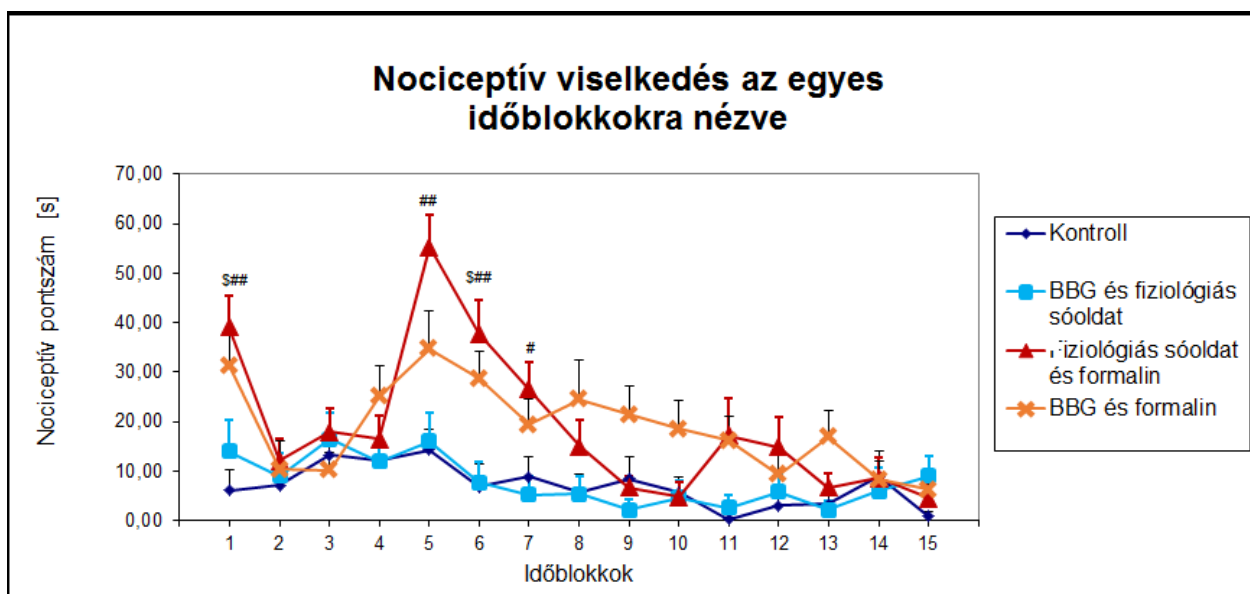
A sejtszámokat magasságonként hasonlítottuk össze, a kontroll és az oltott oldalakat külön csoportként kezelve szintén RM ANOVA segítségével, Sidak post hoc teszt alkalmazásával.

0,05-nél kisebb P érték esetén tekintettük a különbségeket statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az állatok a P2X7 antagonistá BBG kezelést követően kék árnyalatot mutattak. Albinó patkányokon végzett vizsgálatok alapján a BBG dózistól függetlenül beszínezi az állat szemét, továbbá 50 mg/kg dózis BBG-vel kezelt állatoknál a bőrszín is kékre színeződött, amely körülbelül egy hét alatt szűnt meg (Peng 2009).

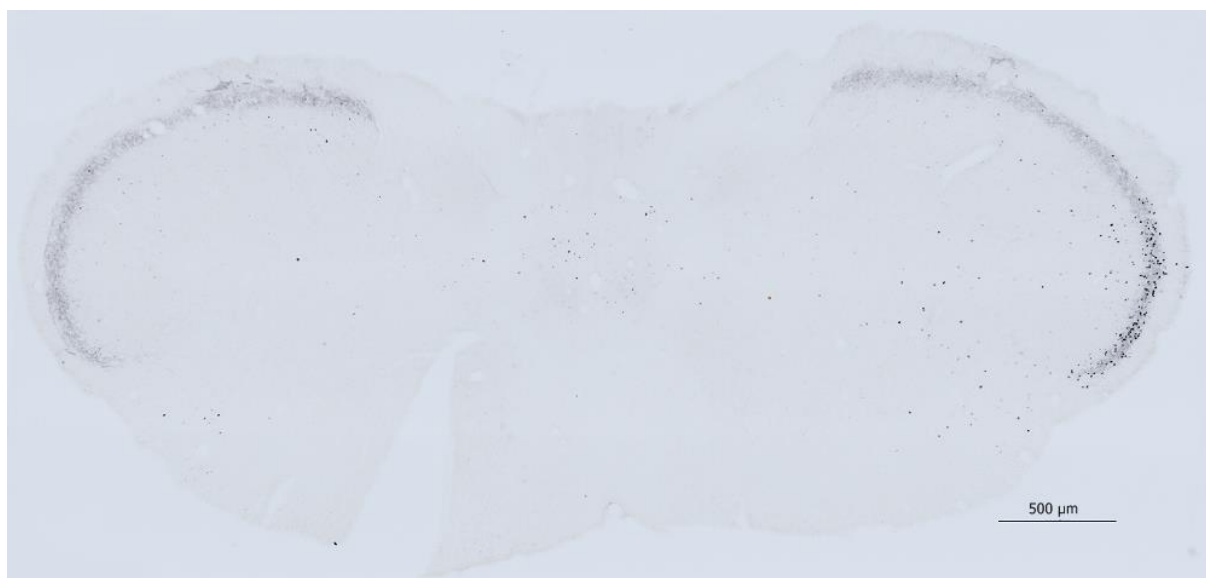
Az ismételt mérések varianciaanalízis alapján a BBG nem befolyásolta a szubkután formalin injekció után tapasztalható viselkedési választ, továbbá nem csökkentette az állatok formalin által kiváltott nociceptív viselkedését. A BBG-vel kezelt majd bajuszpárnába fiziológiás sóoldattal oltott állatoknál nem volt jelentős eltérés a viselkedésformában a nem kezelt kontroll csoporthoz képest. (2. ábra).



1. ábra A négy csoport nociceptív pontértékeinek csoportátlagai és a standard hiba ábrázolása az egyes időblokkokra vetítve. A # az 1. és 3. csoportba tartozó állatok összehasonlításának szignifikancia értékét, míg a \$ az 1. és 4. csoport összehasonlításának szignifikancia értékét jelöli. # $P < 0,05$; \$ $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; \$\$ $P < 0,01$

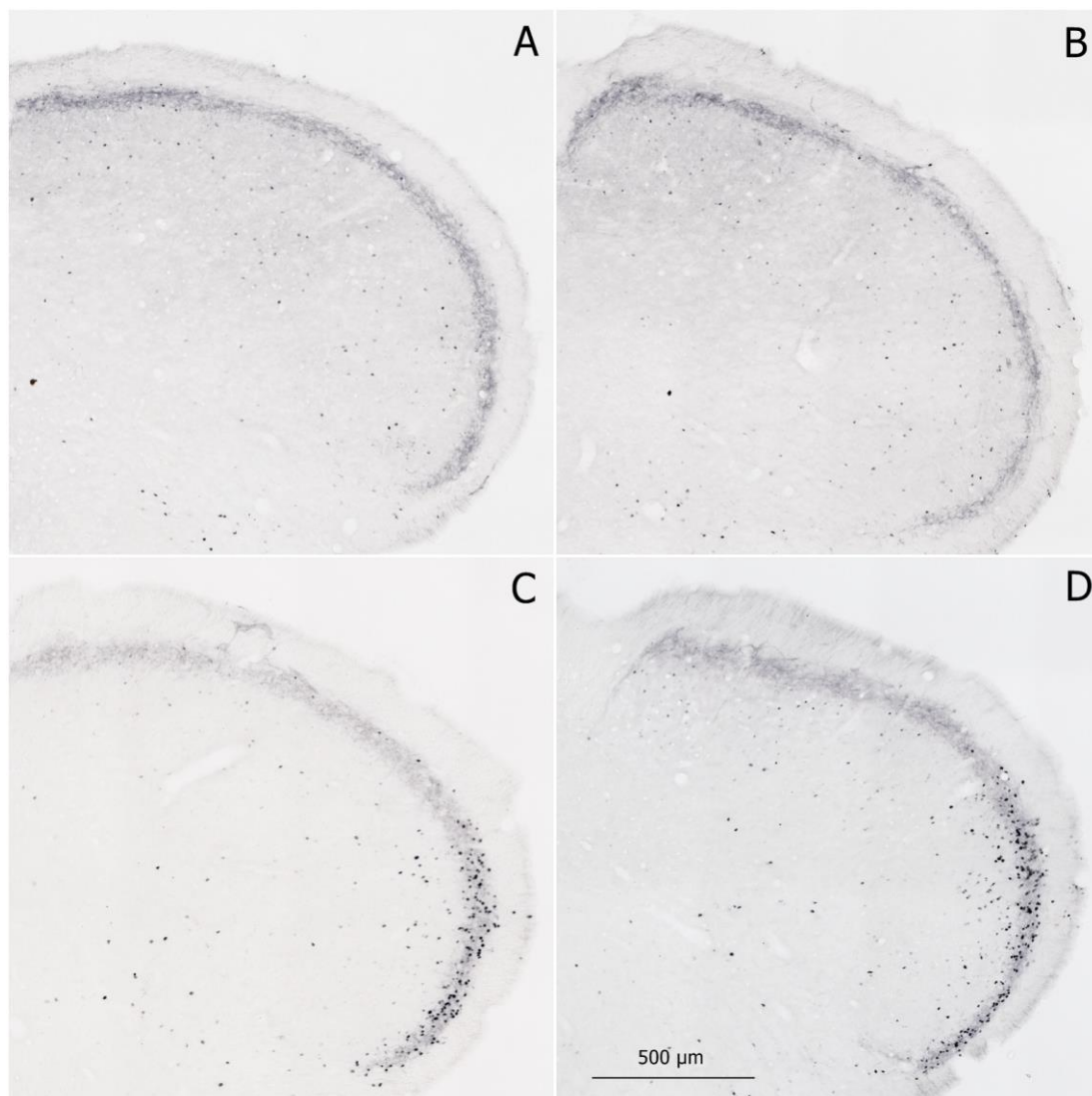
A formalin injekciót követően a korábbi kísérletekkel megegyezően tapasztaltuk a bifázisos viselkedésmintázatot, azaz az első és második fázis alatt az állatok többet dörzsölték a bajuszpárna azon helyét, ahová a formalin injekciót kapták, míg a két fázis közötti nyugalmi szakaszban nem volt szignifikáns különbség a sóoldattal kezelt állatokkal összehasonlítva.

A c-Fos immunhisztokémiai festés is jól összevethető volt korábbi eredményekkel. A formalin hatására jelentősen megnövekedett a c-Fos immunreaktív (IR) sejtek száma az oltással megegyező oldalon (3. ábra).



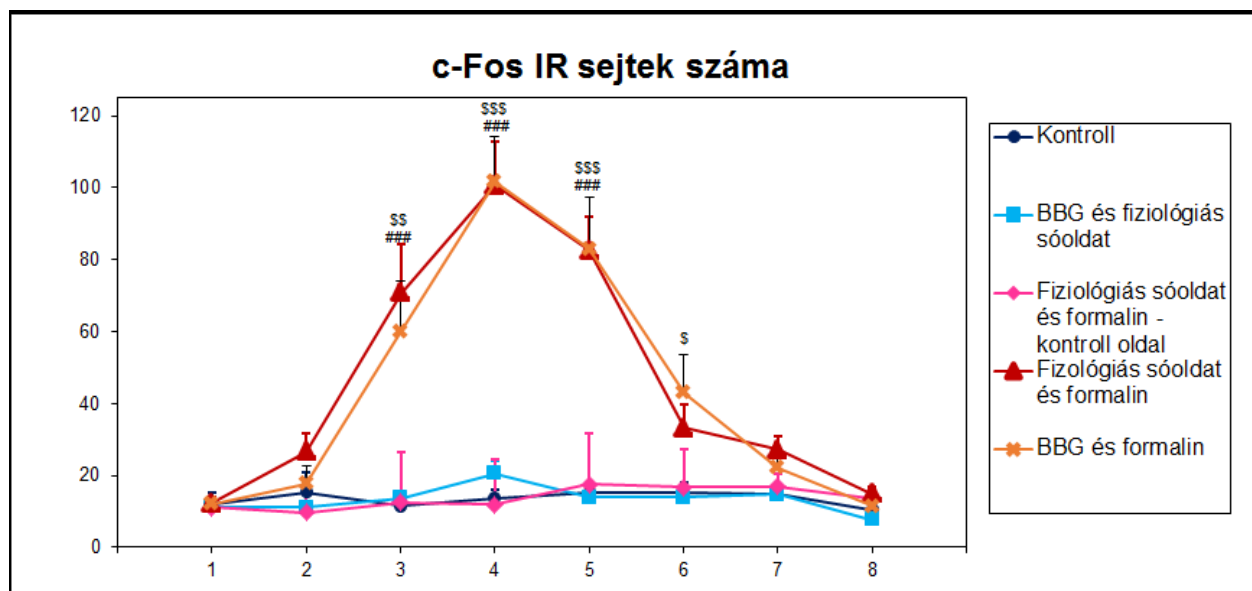
2. ábra C-Fos immunhisztokémiával jelölt, fiziológias sóoldattal és formalinnal oltott állatból származó transzverzális metszet. A kontroll oldalt a metszet bal oldalán látható bevágás jelöli. A caudalis trigeminális mag területén jól megfigyelhető, hogy csak az oltással azonos (jobb) oldalon mutatkozik emelkedés a c-Fos sejtek számában. A kép 20x nagyítású objektívvel, 500μm-es mértékkel lett készítve.

A fiziológiás sóoldattal oltott állatoknál nem látható jelentős változás az IR sejtszámokat tekintve a kontroll oldalhoz képest (4. ábra, A). A c-Fos IR sejtek száma a szomatotópiának megfelelően emelkedést mutatott a szubkután formalin injekciót követően (4. ábra C, 5. ábra). A BBG önmagában nem befolyásolta a c-Fos immnureaktivitást (4. ábra B, 5. ábra).



3. ábra A négy csoport (A - fiziológiás sóoldattal, B - BBG-vel és fiziológiás sóoldattal, C - formalinnal és fiziológiás sóoldattal, D - BBG-vel és formalinnal oltott állatok) TNC-ből nyert metszete, 20x nagyítású objektívvel, 500 μ m léptékkel. A metszetek a bajuszpárna oltásoknak megfelelő oldali metszet részleteket ábrázolják. Megfigyelhető hogy az A-B, illetve a C-D képeken közel azonos számú sejt látható.

A statisztikai elemzés szerint a P2X7 szelektív antagonistá, BBG-vel kezelt állatoknál nincs szignifikáns különbség a c-Fos IR sejtek számában a formalinos állatokhoz képest (5. ábra).



4. ábra C-Fos pozitív IR sejtek átlagos metszetenkénti száma a caudalis trigeminális mag rostrocaudalis tengelye mentén (csoportátlagok+standard hiba). A # az 1. és a 3. csoportba tartozó állatok összehasonlításának szignifikancia értékét, míg a \$ az 1. és a 4. csoport összehasonlításának szignifikancia értékét jelöli. # $P < 0,05$; \$ $P < 0,05$; \$\$ $P < 0,01$; \$\$\$ $P < 0,001$; \$\$\$ $P < 0,001$. A kontroll oldalak között nem volt szignifikáns eltérés, ezért a könnyebb áttekinthetőség érdekében csak egy kontroll csoportot, a 3. csoport kontroll oldalát tüntettük fel.

DISZKUSSZIÓ

A formalint már régóta használják, mint fájdalommodell, mivel szubkután adott injekció formájában szöveti sérüléseket okoz és a viselkedésben is megnyilvánuló, fájdalmat kifejező (nociceptív) viselkedést indukál, a fájdalmat közvetítő A δ és C rostok aktivációja következtében (Puig és Sorkin 1996). A formalin e tulajdonságai alapján alkották meg a formalin tesztet, mely az egyik legalkalmasabb módja a trigeminális rendszer aktivációjának és szenzitizációjának a tanulmányozására.

Irodalmi adatok alapján, a formalin fájdalomra vonatkozó hatásmechanizmusa bifázisos, az első fázis alatt jön létre az akut fájdalom, mely a formalin közvetlen szövetroncsoló hatásának tudható be, majd ezt egy nyugalmi szakasz követi (Tjolsen és mtsai. 1992). Az ezt követő második fázis során pedig tónusos fájdalom alakul ki, ami a gyulladásos folyamatok, és az ezeket követő gerincvelői hátsó szarvban létrejövő fokozott érzékenység (centrális szenzitizáció) folytán jön létre (Coderre és Melzack 1992).

Kísérletünk során tapasztaltuk a formalin kétfázisú jellegét: az első, illetve második fázis alatt az állatok szignifikánsan több időt töltöttek nociceptív viselkedéssel, míg a két fázis közötti nyugalmi szakaszban ilyen jellegű magatartás nem volt. Emellett megfigyeltük, hogy az állatok a szubkután adott formalin injekció után többet dörzsölték a bajuszpárnájukat a magatartásvizsgálat alatt. Eredményeink bizonyítékkul szolgálnak a formalin fájdalom kialakulásában betöltött szerepére.

A c-Fos proto-onkogén az egyik leggyakrabban használt markere a neurális aktivitásnak. A korábbi eredményekhez hasonlóan (Presley és mtsai. 1990), kísérletünkben is megfigyelhető volt a szubkután formalin injekciót követően a c-Fos IR sejtszám emelkedése az oltással azonos oldalon.

A purinerg receptorok meghatározó szerepet töltenek be a fájdalom létrejöttében. Számos tanulmány alapján feltehető, hogy a purinerg receptorok közé tartozó ionotróp P2X receptorok részt vesznek több, fájdalmat indukáló folyamatban, és vélhetően a neuropátiás fájdalom kialakulásában is közrejátszanak (Donnelly-Roberts és mtsai. 2008). Különösképpen a P2X7R kapott kitüntetett figyelmet sajátos jellemzői miatt, melyek szoros összefüggésben vannak a fájdalom létrejöttével (Zhang és mtsai. 2012).

A P2X7R-ok számos sejtben expresszálódhatnak, így antagonistáik hatékonysága erősen függ attól, hogy a különböző gerincvelői szinteken hogyan képesek kivédeni e receptorok aktiválódását. Ezenfelül gyulladások keltő faktorok, mint az interleukin 1 β felszabadulásában és feltehetően a centrális szenzitizáció kialakulásában is részt vesznek, mely folyamatok gátlása szintén elengedhetetlen a fájdalomcsillapítás eredményességéhez.

A BBG ismert szelektív P2X7R antagonistája, ezáltal feltételezhetően fájdalomcsillapító hatással bír. A BBG-t több fájdalommodelben is alkalmazták, köztük a formalin indukálta fájdalommodellben is sikeresnek bizonyult (Huang és mtsai. 2014).

Kísérletünkben az orofaciális régióba adott formalint vizsgáltuk, azonban a test többi területére adott szubkután formalin is hasonló gyulladásos reakciót vált ki. McGaraughty és munkatársai a patkány lábába adott formalin injekció hatását vizsgálták, továbbá a BBG lehetséges hatásait. A formalin második szakaszában a BBG fájdalomcsillapító tulajdonsága eredményesnek bizonyult, azonban ez az első szakaszban nem nyilvánult meg (McGaraughty és mtsai. 2007).

Egy másik kísérletben a BBG enyhe fájdalomcsillapító hatását figyelték meg neuropátiás fájdalommodellben, illetve gyulladásos reakciókban. A BBG nem volt hatásos akut fájdalom esetén sem, ráadásul a magatartásvizsgálat során 10 mg/kg dózisban adva termális hiperalgéziát okozott (Andó és mtsai. 2010).

Eredményeink és az irodalmi adatok alapján megállapítható, hogy a BBG hatásmechanizmusa eltérő lehet a különböző fájdalommodellek esetén, továbbá a más időszakban vagy dózisban adott BBG is szignifikánsan befolyásolja fájdalomcsillapító jellegét. Korábbi tanulmányok szerint akut fájdalom esetén számos esetben nem nyilvánul meg antinociceptív hatása, azonban a gyulladás kialakulásakor, tónusos fájdalom esetén rendszerint eredményesnek bizonyult. A BBG tónusos fájdalom alatt lévő hatástalanságának egy lehetséges oka lehet, hogy a trigeminális rendszerben másképpen modulálja a fájdalmat, mint a test többi területén.

ÖSSZEFOGLALÁS

A migrén az egyik leggyakoribb neurológiai megbetegedés, mely a rohamok súlyossága miatt kiemelt jelentőségű. A betegség patomechanizmusával kapcsolatban számos elmélet született, ám egyik sem tudta a betegség minden tünetét magyarázni. A rohamok kapcsán valószínűsíthető a trigeminovascularis rendszer aktiválódása és szenzitizációja, mely utóbbi jelenség meghatározó a klinikum szempontjából. Irodalmi adatok alapján a fájdalomérző rendszer szenzitizációs folyamataiban a purinreceptorok közé tartozó P2X7R meghatározó szerepet játszik, mivel aktivációja közvetetten növeli a neuronok excitabilitását, továbbá különböző gyulladáskeltő anyagok expresszáldását váltja ki, ezáltal kulcsszerepet játszik a fájdalom modulálásában.

Kísérletünk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a P2X7R szelektív antagonistá BBG esetleges moduláló hatását a trigeminális rendszer aktivációjának ill. szenzitizációjának egyik állatkísérletes modelljében a formalin indukált orofaciális gyulladásos fájdalom esetén.

Ehhez 52 db hím Sprague-Dawley patkányt használtunk fel. Az állatokat 2 csoportra osztottuk, az első csoport (n=26) fiziológiás sóoldatot kapott, míg a második (n=26) 50 mg/kg BBG-t előkezelésként iv. 110 perccel az injekció után egy 30X30X30 méretű tükrös dobozba helyeztük az állatokat 10 percre habituáció céljából. 10 perccel a szoktatás után mindkét csoport fele (n=13) szubkután 50 µl 1,5%-os formalin injekciót kapott a jobb oldali bajuszpárnájába, míg a másik fele (n=13) fiziológiás sóoldatot. Ezt követően visszahelyeztük az állatokat és mértük az oltott bajuszpárna oldal dörzsölésével eltöltött időt 45 percig. A viselkedésvizsgálatok után a patkányokat mély altatásban perfundáltuk, a TNC-t eltávolítottuk és metszeteket készítettünk a neuronális aktivitás markereként használt c-Fos immunhisztokémiai festése céljából.

Eredményeink azt mutatták, hogy BBG nem befolyásolta a formalin indukált nociceptív viselkedésmintát és nem volt képes kivédeni a formalin kezelés okozta ipsilaterális c-fos sejtszám emelkedést a TNC-ben. Annak ellenére, hogy a BBG más fájdalom modellekben antinociceptív hatásának bizonyult, jelen kísérleteinkben ezt nem sikerült igazolni.

Felvetődik, hogy a trigeminális nocicepcióban a P2X7R funkciója eltér az egyéb lokalizációjú fájdalomban játszott szerepétől.

IRODALOMJEGYZÉK

- Afework, M. and G. Burnstock (1999). "Distribution of P2X receptors in the rat adrenal gland." Cell Tissue Res **298**(3): 449-456.
- Afridi, S., H. Kaube, et al. (2005). "Occipital activation in glyceryl trinitrate induced migraine with visual aura." J Neurol Neurosurg Psychiatry **76**(8): 1158-1160.
- Aigouy, L., J. C. Fondras, et al. (1992). "Intrathecal Midazolam Versus Intrathecal Morphine in Orofacial Nociception - an Experimental-Study in Rats." Neuroscience Letters **139**(1): 97-99.
- Al-Shukaili, A., J. Al-Kaabi, et al. (2008). "A comparative study of interleukin-1beta production and p2x7 expression after ATP stimulation by peripheral blood mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis patients and normal healthy controls." Inflammation **31**(2): 84-90.
- Alves, L. A., R. J. Bezerra, et al. (2013). "Physiological roles and potential therapeutic applications of the P2X7 receptor in inflammation and pain." Molecules **18**(9): 10953-10972.
- Anderson, C. M. and M. Nedergaard (2006). "Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons." Trends Neurosci **29**(5): 257-262.
- Andlin-Sobocki, P., B. Jonsson, et al. (2005). "Cost of disorders of the brain in Europe." Eur J Neurol **12 Suppl 1**: 1-27.
- Ando R. D., Mehesz B., Gyires K., Illes P., Sperlagh B. (2010). "A comparative analysis of the activity of ligands acting at P2X and P2Y receptor subtypes in models of neuropathic, acute and inflammatory pain." Br J Pharmacol; **159**(5): 1106-17.
- Ayata, C. (2010). "Cortical spreading depression triggers migraine attack: pro." Headache **50**(4): 725-730.
- Bank, J. and S. Marton (2000). "Hungarian migraine epidemiology." Headache **40**(2): 164-169.
- Bardini, M., H. Y. Lee, et al. (2000). "Distribution of P2X receptor subtypes in the rat female reproductive tract at late pro-oestrus/early oestrus." Cell Tissue Res **299**(1): 105-113.
- Borzelleca, J. F., K. Depukat, et al. (1990). "Lifetime toxicity/carcinogenicity studies of FD & C Blue No. 1 (brilliant blue FCF) in rats and mice." Food Chem Toxicol **28**(4): 221-234.
- Burnstock, G. (2009). "Purinergic receptors and pain." Curr Pharm Des **15**(15): 1717-1735.
- Cadet, R., L. Aigouy, et al. (1993). "Sustained Hyperalgesia Can Be Induced in the Rat by a Single Formalin Injection and Depends on the Initial Nociceptive Inputs." Neuroscience Letters **156**(1-2): 43-46.
- Chessell, I. P., J. P. Hatcher, et al. (2005). "Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain." Pain **114**(3): 386-396.
- Chessell, I. P., A. D. Michel, et al. (1998). "Effects of antagonists at the human recombinant P2X7 receptor." Br J Pharmacol **124**(6): 1314-1320.

- Chiozzi, P., M. Murgia, et al. (1996). "Role of the purinergic P2Z receptor in spontaneous cell death in J774 macrophage cultures." Biochem Biophys Res Commun **218**(1): 176-181.
- Clavelou, P., J. Pajot, et al. (1989). "Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat." Neurosci Lett **103**(3): 349-353.
- Coderre, T. J. and Melzack, R. (1992). "The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury", J. Neurosci.**12**(9): 3665-70.
- Collier, H. B. and G. Duchon (1966). "Determination of traces of calcium in commercial adenosine triphosphate (ATP)." Anal Biochem **15**(2): 367-368.
- Dallel, R., P. Raboisson, et al. (1995). "Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin." Pain **61**(1): 11-16.
- Daly, J. W. (1985). "Adenosine receptors." Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res **19**: 29-46.
- Davalos, D., J. Grutzendler, et al. (2005). "ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo." Nat Neurosci **8**(6): 752-758.
- Diaz-Hernandez, M., M. Diez-Zaera, et al. (2009). "Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration." FASEB J **23**(6): 1893-1906.
- Dickenson, A. H. and A. F. Sullivan (1987). "Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones." Neurosci Lett **83**(1-2): 207-211.
- Diener, H. C. and A. May (1996). "New aspects of migraine pathophysiology: lessons learned from positron emission tomography." Curr Opin Neurol **9**(3): 199-201.
- Donnelly-Roberts, D., et. al. (2008). "Painful purinergic receptors." J Pharmacol Exp Ther. **324**(2): 409-15.
- Dubuisson, D. and S. G. Dennis (1977). "The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats." Pain **4**(2): 161-174.
- Duncan, G. E., K. B. Johnson, et al. (1993). "Topographic Patterns of Brain Activity in Response to Swim Stress - Assessment by 2-Deoxyglucose Uptake and Expression of Fos-Like Immunoreactivity." Journal of Neuroscience **13**(9): 3932-3943.
- Dworkin, R. H., A. B. O'Connor, et al. (2013). "Interventional management of neuropathic pain: NeuPSIG recommendations." Pain **154**(11): 2249-2261.
- Egan, T. M., D. S. K. Samways, et al. (2006). "Biophysics of P2X receptors." Pflugers Archiv-European Journal of Physiology **452**(5): 501-512.

- Eisenberg, E., B. P. Vos, et al. (1993). "The Nmda Antagonist Memantine Blocks Pain Behavior in a Rat Model of Formalin-Induced Facial-Pain." Pain **54**(3): 301-307.
- Fredholm, B. B., I. J. AP, et al. (2001). "International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors." Pharmacol Rev **53**(4): 527-552.
- Gagliese, L. and R. Melzack (1999). "Age differences in the response to the formalin test in rats." Neurobiol Aging **20**(6): 699-707.
- Goadsby, P. (2006). "Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics", TRENDS in Molecular Medicine **13**(1): 39-44.
- Goloncser, F. and B. Sperlagh (2014). "Effect of genetic deletion and pharmacological antagonism of P2X7 receptors in a mouse animal model of migraine." Journal of Headache and Pain **15**.
- Haley, J. E., A. H. Dickenson, et al. (1992). "Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat." Neuropharmacology **31**(3): 251-258.
- Honore, P., D. Donnelly-Roberts, et al. (2009). "The antihyperalgesic activity of a selective P2X7 receptor antagonist, A-839977, is lost in IL-1alpha knockout mice." Behav Brain Res **204**(1): 77-81.
- Huang, Z. X., et. al. (2014). "Involvement of RVM-expressed P2X7 receptor in bone cancer pain: mechanism of descending facilitation." Pain. **155**(4):783-91.
- Hunskar, S. and K. Hole (1987). "The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain." Pain **30**(1): 103-114.
- Hunt, S. P., A. Pini, et al. (1987). "Induction of C-Fos Protein in Spinal-Cord Neurons Following Sensory Stimulation." Regulatory Peptides **18**(5-6): 358-358.
- IASP (1979). "Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy." Pain **6**(3): 249.
- IHS (2004). "The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition." Cephalalgia **24 Suppl 1**: 9-160.
- Inoue, K., M. Tsuda, et al. (2004). "[ATP and neuropathic pain]." Seikagaku **76**(11): 1431-1439.
- Jiang, L. H., A. B. Mackenzie, et al. (2000). "Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors." Mol Pharmacol **58**(1): 82-88.
- Khakh, B. S. (2001). "Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses." Nat Rev Neurosci **2**(3): 165-174.
- Khakpay, R., D. Polster, et al. (2010). "Potentiation of the glutamatergic synaptic input to rat locus coeruleus neurons by P2X7 receptors." Purinergic Signal **6**(3): 349-359.
- Klein, B. G., B. R. Misra, et al. (1991). "Orofacial Pain Sensitivity in Adult-Rats Following Neonatal Infraorbital Nerve Transection." Behavioural Brain Research **46**(2): 197-201.
- Lauritzen, M. (1985). "On the possible relation of spreading cortical depression to classical migraine." Cephalalgia **5 Suppl 2**: 47-51.

- Le Feuvre, R., D. Brough, et al. (2002). "Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration." Eur J Pharmacol **447**(2-3): 261-269.
- Lee, H. Y., M. Bardini, et al. (2000). "Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat." J Urol **163**(6): 2002-2007.
- Malmberg, A. B. and T. L. Yaksh (1993). "Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats." Pain **54**(3): 291-300.
- Matthias Keidel (2007): *A migrén Okok, fajták, terápiák*. Corvina Tudástár, München
- McCall, W. D., K. D. Tanner, et al. (1996). "Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat." Neurosci Lett **208**(1): 45-48.
- McGaraughty, S., K. L. Chu, et al. (2007). "P2X7-related modulation of pathological nociception in rats." Neuroscience **146**(4): 1817-1828.
- Menetrey, D., A. Gannon, et al. (1989). "Expression of C-Fos Protein in Interneurons and Projection Neurons of the Rat Spinal-Cord in Response to Noxious Somatic, Articular, and Visceral Stimulation." Journal of Comparative Neurology **285**(2): 177-195.
- Milner, P. M. (1958). "Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leao." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **10**(4): 705.
- Moore, P. K., A. O. Oluyomi, et al. (1991). "L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse." Br J Pharmacol **102**(1): 198-202.
- Moskowitz, M. A. (2008). "Defining a pathway to discovery from bench to bedside: the trigeminovascular system and sensitization." Headache **48**(5): 688-690.
- Narcisse, L., E. Scemes, et al. (2005). "The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes." Glia **49**(2): 245-258.
- Neuhoff, V., N. Arold, et al. (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." Electrophoresis **9**(6): 255-262.
- Nishiyama, A., M. Rahman, et al. (2004). "Role of interstitial ATP and adenosine in the regulation of renal hemodynamics and microvascular function." Hypertens Res **27**(11): 791-804.
- Pannicke, T., W. Fischer, et al. (2000). "P2X7 receptors in Muller glial cells from the human retina." J Neurosci **20**(16): 5965-5972.
- Peng W. et. al. (2009) "Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury." Proc Natl Acad Sci USA **106**(30): 12489-93.
- Piano, V., S. Verhagen, et al. (2013). "Diagnosing neuropathic pain in patients with cancer: comparative analysis of recommendations in national guidelines from European countries." Pain Pract **13**(6): 433-439.

- Presley, R. W., D. Menetrey, et al. (1990). "Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord." J Neurosci **10**(1): 323-335.
- Puig, S., Sorkin L., S. (1996). "Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity." Pain **64**(2): 345-55.
- Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." Pharmacological Reviews **50**(3): 413-492.
- Russell, M. B. and Olesen J. (1995). "Increased familial risk and evidence of genetic factor in migraine." BMJ **311**(7004): 541-544.
- Sagar, S. M., F. R. Sharp, et al. (1988). "Expression of C-Fos Protein in Brain - Metabolic Mapping at the Cellular-Level." Science **240**(4857): 1328-1331.
- Sakurada, T., A. Sugiyama, et al. (1996). "Effect of spinal nitric oxide inhibition on capsaicin-induced nociceptive response." Life Sci **59**(11): 921-930.
- Sawynok, J. (2007). "Adenosine and ATP receptors." Handb Exp Pharmacol(177): 309-328.
- Selby, G. and J. W. Lance (1960). "Observations on 500 cases of migraine and allied vascular headache." J Neurol Neurosurg Psychiatry **23**: 23-32.
- Seternes, O. M., R. Sorensen, et al. (1998). "Synergistic increase in c-fos expression by simultaneous activation of the ras/raf/map kinase- and protein kinase A signaling pathways is mediated by the c-fos AP-1 and SRE sites." Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression **1395**(3): 345-360.
- Shevel, E. (2011). "Confirmation of the extracranial site of action of sumatriptan." Ann Neurol **70**(5): 862; author reply 862-863.
- Sperlagh, B. and P. Illes (2007). "Purinergic modulation of microglial cell activation." Purinergic Signal **3**(1-2): 117-127.
- Strassman, A. M., S. A. Raymond, et al. (1996). "Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches." Nature **384**(6609): 560-564.
- Surprenant, A., F. Rassendren, et al. (1996). "The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)." Science **272**(5262): 735-738.
- Tajti, J. and L. Vecsei (2009). "[The mechanism of peripheral and central sensitization in migraine. A literature review]." Neuropsychopharmacol Hung **11**(1): 15-21.
- Taylor, B. K., S. F. Akana, et al. (1998). "Pituitary-adrenocortical responses to persistent noxious stimuli in the awake rat: endogenous corticosterone does not reduce nociception in the formalin test." Endocrinology **139**(5): 2407-2413.
- Taylor, B. K., M. A. Peterson, et al. (1995). "Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input." J Neurosci **15**(11): 7575-7584.

- Tjolsen, A., O. G. Berge, et al. (1992). "The formalin test: an evaluation of the method." Pain **51**(1): 5-17.
- Trang, T. and M. W. Salter (2012). "P2X4 purinoceptor signaling in chronic pain." Purinergic Signal **8**(3): 621-628.
- Varani, K., M. Padovan, et al. (2010). "The role of adenosine receptors in rheumatoid arthritis." Autoimmun Rev **10**(2): 61-64.
- Vial, C., J. A. Roberts, et al. (2004). "Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels." Trends Pharmacol Sci **25**(9): 487-493.
- Wang, X., G. Arcuino, et al. (2004). "P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury." Nat Med **10**(8): 821-827.
- Weiller, C., A. May, et al. (1995). "Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks." Nat Med **1**(7): 658-660.
- Wolff, H. G., M. M. Tunis, et al. (1953). "Studies on headache; evidence of damage and changes in pain sensitivity in subjects with vascular headaches of the migraine type." AMA Arch Intern Med **92**(4): 478-484.
- Wong, H. E .et.al. (2011). "A safe, blood-brain barrier permeable triphenylmethane dye inhibits amyloid-beta neurotoxicity by generating non-toxic aggregates." ACS Chemical Neuroscience, **2** (11): 645-657.
- Yamamoto, T., N. Shimoyama, et al. (1993). "Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw." Anesth Analg **77**(5): 886-890.
- Zed, P. J., P. S. Loewen, et al. (1999). "Medication-induced headache: overview and systematic review of therapeutic approaches." Ann Pharmacother **33**(1): 61-72.
- Zhang, X. Q., Y. Cui, et al. (2012). "Activation of p38 signaling in the microglia in the nucleus accumbens contributes to the acquisition and maintenance of morphine-induced conditioned place preference." Brain Behav Immun **26**(2): 318-325.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ez úton szeretném megköszönni Prof. Dr. Vécsei Lászlónak, hogy kísérleteimhez biztosította a szükséges feltételeket.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Párdutz Árpádnak szakmai segítségéért és iránymutatásáért.

Köszönöm Bohár Zsuzsannának, Fejes–Szabó Annamáriának, Nagy-Grócz Gábornak és Vékonyé Széll Valériának, a labor munka során nyújtott segítségüket és töretlen támogatásukat.

Végül, külön köszönet illeti családomat és barátaimat végtelen türelmükért és bátorításukért.