

**Új állatmodell potenciális helyi érzéstelenítőszeres *in vivo*  
vizsgálatára**

PhD Tézis

Dr. Sáfrány-Fárk Árpád

Témavezető: Dr. Horváth Gyöngyi

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola  
Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Élettani Intézet

Szeged

2018

## **Publikációk:**

### **A tézis alapját képező közlemények:**

- I. **Safrany-Fark A.**, Petrovszki Z., Kekesi G., Liszli P., Benedek G., Keresztes C., Horvath G. In vivo potency of different ligands on voltage-gated sodium channels. *Eur J Pharmacol.* 2015, 762:158-64.
- II. Tuboly G., Tar L., Bohar Z., **Safrany-Fark A.**, Petrovszki Z., Kekesi G., Vecsei L., Pardutz A., Horvath G. The inimitable kynurenic acid: the roles of different ionotropic receptors in the action of kynurenic acid at a spinal level. *Brain Res Bull.* 2015, 112:52-60.

### **A tézis témájához nem kapcsolódó közlemények:**

**Safrany-Fark A.**, Petrovszki Z., Kekesi G., Keresztes C., Benedek G., Horvath G. Telemetry monitoring for non-invasive assessment of changes in core temperature after spinal drug administration in freely moving rats. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2015, 72:19-25.

## **Absztraktok:**

**Safrany-Fark A.**, Petrovszki Z., Kekesi G., Liszli P., Benedek G., Nagy K., Horvath G. Motor nerve sensitivity changes caused by N-arachidonoyl-dopamine and capsaicin in rats. XIVth Conference of the Hungarian Neuroscience Society, Budapest, January 17-19, 2013

Horvath G., **Safrany-Fark A.**, Petrovszki Z., Kekesi G., Benedek G. Thermoregulatory and motor disturbances after intrathecal injections in freely moving rats. IBRO International Workshop, Szeged, January 16-17, 2014

Pinke I., **Safrany-Fark A.**, Daubner B., Segatto E. Detection of positional disorders of maxillary first molars in cleft palate patients. 8th International Orthodontic Congress, WFO London, September 27-30, 2015

**Safrany-Fark A.**, Segatto E., Voros L., Pinke I. Analysis of transversal and sagittal dental cast measurements in cleft and control patients. 8th International Orthodontic Congress, WFO London, September 27-30, 2015

**Safrany-Fark A.**, Harsanyi R., Kenyeres K., Pinke I. Determination of survival rate of primary molars in control population, and assessment of the dental age for cleft and control groups. 8th International Orthodontic Congress, WFO London, September 27-30, 2015

## Bevezetés

A nociceptív rendszer figyelmeztető funkciót lát el, ezért megfelelően alacsony az ingerküszöbe ahhoz, hogy a tényleges szövetkárosodás kialakulása előtt aktiválódjon. A jelenlegi fájdalomcsillapítási stratégiák elsősorban nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek, ópíoidok és helyi érzéstelenítők alkalmazásán alapulnak. Adhatók szisztémásan, vagy regionális fájdalomcsillapítási céllal is (epidurális, topikális és infiltratív analgészia). Az elmúlt évtizedekben a helyi érzéstelenítés kiemelkedő szerephez jutott számos műtét során. A fogászati beavatkozásokkal járó akut fájdalom is kiküszöbölhető ezekkel a szerekkel. Analgetikus hatásuk mellett ezek a készítmények jelentősen befolyásolják a motoros funkciókat is. Hatásuk az akciós potenciál, és ezáltal az axonális aktivitás csökkentésén, illetve teljes gátlásán alapul. Elsődleges célpontjaik a feszültségfüggő nátrium csatornák (VGSCs), melyek a nátrium ionok beáramlásához szükséges transzmembrán fehérjék. Szerepük létfontosságú az ideg- és izomsejtek elektromos aktivitásának kialakításában és továbbításában.

A perifériás idegrendszerben található axonok nagymértékben különböznek fiziológiai tulajdonságaikban és működésükben. A C-típusú érző rostokon számos ligandkötő hely van, melyek befolyásolhatják azok működését (pl. interleukin-6 receptor, gamma-amino-vajsav receptor, proteáz aktiválta receptor 1, tranziens receptor potenciál vanilloid 1 [TRPV1] és inzulin receptorok), míg ezek nem jellemzőek a motoros idegekre. A motoros idegek tehát megbízhatóbb modellt nyújthatnak különböző farmakológiai ágensek VGSC-mediált hatásának szelektív vizsgálatához.

Gyógyszerek és farmakológiailag aktív ligandok széles spektruma képes jelentős mértékben befolyásolni a feszültségfüggő nátrium csatornák funkcióját, melyek gyakran nagyon különböző kémiai jellemzőkkel bírnak.

### *Helyi érzéstelenítő szerek*

A klinikumban használatos helyi érzéstelenítők terciér aminok (pl.: lidocain, bupivacain és ropivacain). Az általuk kiváltott érző, motoros és vegetatív rostok egyidejű gátlása elfogadható néhány esetben, mint például műtétek során, de más klinikai körülmények között szelektív hatás volna kívánatos. A nocicepció blokkolása a motoros és vegetatív funkció érintettsége nélkül komoly segítséget jelenthet a betegek korai mobilizálásban, például térd és csípő protézisek beültetését követően. Régióta cél az érző funkcióra szelektív szerek kifejlesztése a gyógyszeriparban. Strichartz először 1973-ban írta le a lidocain hidrofil kvaterner származékát, az N-etil-bromidot (QX-314), melyre nézve a melinizált

rostok sejtmembránja impermeábilis. Kimutatták azonban, hogy a QX-314 képes átjutni az aktivált TRPV1 csatornákon (capsaicinnel aktivált), ezzel szelektíven blokkolva az érző rostokat. Ugyancsak képes kevert idegeken (nervus ischiadicus) erősíteni a hagyományos helyi érzéstelenítők hatását mind az érző, mind pedig a motoros funkciógátlás tekintetében. A kevert idegek esetében azonban nem lehet kizárni az érző idegek reflexkörökön át gyakorolt indirekt hatását a motoros funkcióra, ami jelentősen befolyásolhatja az eredményeket.

### ***Nisoxetin***

A nisoxetin egy noradrenalin újrafelvételt gátló szer, melyet affektív kórképek kezelésében használnak. Kémiai szerkezete nagyban hasonlít a klasszikus helyi érzéstelenítőkére: egy lipofil rész található a molekula egyik végén, amin csoport a másikon. Így nem meglepő, hogy *in vitro* vizsgálatok szerint a nisoxetin szintén blokkolja a VGSC-eket, és subcutan beadást követően helyi érzéstelenítő hatással is rendelkezik, mely a VGSC-k blokkolásával lehet összefüggésben.

### ***Capsaicin, arachidonsav és arachidonil-etanolamid***

A vanilloid származék capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamid) felelős az erős paprika által kiváltott, mindenki által jól ismert csípős érzetért. Így ez az egyik legénigmatikusabb molekula, amit növény termel. Hatását a TRPV1 csatormán keresztül fejti ki. Néhány *in vitro* eredmény rámutatott, hogy a capsaicin képes befolyásolni a VGSC aktivitást is.

Egyéb zsírolékony molekulák, köztük a többszörösen telítetlen zsírsavak, mint például az arachidonsav (AA) és származéka, az anandamid (arachidonil-etanolamid: AEA; endogén ligandja a cannabinoid (CB) és TRPV1 csatornáknak), gátolják a VGSC aktivitást *in vitro* körülmények között, azonban *in vivo* eredmények nem állnak rendelkezésre.

### ***Kinurénsav***

Az esszenciális aminosav, triptofán lebontása a kinurenin útvonalon, számos neuroaktív molekula (kinureninek) keletkezéséhez vezet, mint például a kinurénsav (KYNA). A kinureninek részt vesznek az immunregulációban és a gyulladási folyamatokban, ahol exitotoxikus vagy épp neuroprotektív hatással is bírhatnak. Szerephez juthatnak az oxidatív stresszben, Alzheimer-kórban, Parkinson-kórban, Huntington-kórban, amiotrófiás laterálsklerózisban és szkelórizs multiplexben is. Korábbi eredmények alapján a KYNA intrathecalis beadása patkányban antinociceptív hatással bír, melyhez reverzibilis, dóziszfüggő motoros kiesés is társul, hasonlóan a lokálanesztetikumoknál

tapasztaltakhoz. Mivel a KYNA VGSC által mediált hatása még ismeretlen, nem zárható ki, hogy hatását ezen csatornák blokkolásával érte el, részben vagy egészben.

### **Célkitűzések**

1. Elsődleges célunk egy *in vivo* modell kifejlesztése volt, mely alkalmas feszültségfüggő nátrium csatornákon keresztül kifejtett hatások vizsgálatára kizárólagosan motoros rostokat tartalmazó idegen; valamint a modell felhasználása különböző kémiai jellemzőkkel bíró anyagok tesztelésére.
2. Második célunk a modell megbízhatóságának tesztelése volt három klasszikus helyi érzéstelenítő szerrel (lidocain, bupivacain, ropivacain).
3. Harmadik kitűzött célunk a töltéssel rendelkező QX-314 molekula *in vivo* potenciáljának tesztelése motoros rostokon, illetve a lehetséges gyógyszerkölcsonhatások vizsgálata QX-314 és lidocain kombinált beadása esetén, mely új stratégia lehet a helyi érzéstelenítésben.
4. Vizsgáltuk továbbá a nisoxetin akcióspotenciál gátló hatását *in vivo* modellünkben.
5. Célunk volt még *in vivo* adatokat szolgáltatni a capsaicin, az AA és AEA VGSC blokkoló hatásáról is.
6. Végző célunk az volt, hogy információt szerezzünk a KYNA VGSC-t gátló potenciáljáról.

### **Módszertani háttér**

Mint fent említésre került, a motoros idegek elsősorban feszültségfüggő nátrium csatornákat tartalmaznak, míg az érzők számos egyéb kötőhellyel is bírnak, ami befolyásolhatja ingerelhetőségüket. Azok a modellek, melyek csak motoros idegeket tartalmaznak, egyszerű és megfelelő módszert biztosíthatnak az akciós potenciálban szerepet játszó feszültségfüggő csatornák, elsősorban a VGSC-k, *in vivo* modulációjának vizsgálatához. A patkányok arcidegének marginalis mandibulae ága kontrollálja a bajusz szőrök (vibrissae) izmainak aktivitását. Ez az ideg csak motoros rostokat tartalmaz, és mivel még izomorsók sem találhatóak ezekben az izmokban, megfelelő modell lehet a VGSC-k vizsgálatához. A bajusz szőrök mozgása az egyik legjellegzetesebb és legkönnyebben detektálható arcmozgás a patkányokon. A modellünkhöz a marginalis mandibulae ágat választottuk, többek között azért is, mert anatómiai elhelyezkedése ideális a sebészi feltáráshoz. Az elektrodiaosztikai vizsgálatok (beleértve az elektromiográfiát [EMG]) a 19. századból erednek, és

az utóbbi 30-40 évben már folyamatosan alkalmazzuk őket, mind a klinikumban, mind a tudományos munka során.

## **Módszerek**

### ***Kísérleti állatok, anyagok, és kísérleti protokoll***

Wistar patkányokat intraperitoneális ketamin (72 mg/kg) és xylazin (8 mg/kg) kombinációval altattunk. Az arc oldalsó területét leborotváltuk, és egy „L” alakú metszés után a pofabőr óvatosan felemelésével láthatóvá vált az arcideg marginalis mandibulae ága a bukkális területen. A bajuszmozgás kiváltásához az ideg proximális részét unipoláris (0,1 mm) elektróddal stimuláltuk. Unipoláris tüelektródákat (26-gauge) helyeztünk a bajusz szőrök területére, hogy mérhessük az izmok aktivitását. A föld elektróda subcutan, az izom és az ideg közelébe került. A stimulációk bifázisos, szupramaximális négysszögingerléssel történtek (1 mA for 250  $\mu$ s), és az EMG aktivitást az ismételt egyszeri stimulációk után rögzítettük. Az alapaktivitás meghatározása után a beadott szerek hatását vizsgáltuk. Az anyagokat perineurálisan, a stimulációs elektródtól distalisan adtuk 20  $\mu$ l-es térfogatban.

A csoportokban az állatszám 6-10 között változott. A méréseket a vizsgált anyagok beadása után 30, 60, 90, 120 másodperccel, azt követően pedig 2 perccenként végeztük 30 percig. Az adatok átlagai 0,5-2, 4-10, 12-20 és 22-30 perces időintervallumokban kerültek elemzésre, mint 1., 2., 3., és 4. időperiódus. Az amplitúdók százalékos eltérését számoltuk ki az alpmérések átlagához képest az egyes mérési pontok esetén, az anyagok beadása után.

A görbe alatti területek (AUC) értékét kiszámoltuk a 30 perces időszakban, hogy megkapjuk a dózis-hatás görbéket az egyes ligandok esetén. A hatások időbeli vizsgálatára ismételt méréses variancia analízist használtunk. A post-hoc elemzésekhez Newmann-Keuls tesztet használtunk ( $p$  érték  $<0,05$  értékeljük szignifikánsnak).

## **Eredmények**

A perineurálisan adott oldószer nem befolyásolta az ismételt kiváltott válaszokat a vizsgált 30 perc alatt.

### **Klasszikus lokálanesztikumok**

Az összes készítmény (lidocain, bupivacain és ropivacain) elhúzódo hatást váltott ki, és csökkentette az EMG hullámokat a nagyobb dózisok esetén. A lineáris regressziós görbék az AUC adatokon dózisfüggő hatást írtak le mindegyik anyag esetben, enyhe különbségekkel az effektivitásban; így az ED<sub>50</sub> a lidocain esetén volt a legmagasabb, míg a bupivacain és ropivacain némiképp nagyobb potenciállal bírt. A hatásokat vizsgálva megállapítható, hogy az 1. időperiódusban a lidocain hatásosabb volt, mint a másik két szer, ami az irodalmi adatoknak megfelelően a gyorsabb hatáskifejlődést igazolja. A lidocain hatása csökkent a 4. időperiódusra, míg a ropivacain és bupivacain elhúzódo blokádot okozott. A QX-314 önmagában hatástalan volt (380 nmol), de kombinációkban alkalmazva elnyújtotta a lidocain hatását.

### **Nisoxetin**

A lineáris regressziós görbe a nisoxetin esetén limitált hatásosságot írt le a klasszikus helyi érzéstelenítőkhöz képest.

### **Capsaicin, arachidonsav és arachidonil-etanolamid**

Az AA még nagy dózisban sem okozott szignifikáns változást a kiváltott válaszokban. Ugyanakkor, mind a capsaicin (663 nmol), mind az AEA (567 nmol) az általunk alkalmazott középső dózisban 50%-os gátlást eredményezett, de mind az alacsonyabb, mind a magasabb dózis hatástalan volt.

### **Kinurénsav**

A KYNA perineurális alkalmazása (528.6 nmol, 100 µg; mely motoros kiesést és érzéskiesést okozott gerincvelői szinten) nem befolyásolta a kiváltott válaszokat.

## **Megbeszélés**



Eredményeink bizonyítják, hogy ez az *in vivo* modell megbízhatóan szolgáltat adatokat legalább 30 percen keresztül a motoros ideg ingerlékenységéről, mivel ez idő alatt az ismételt kiváltott válaszok nem változtak, és egyik oldószert sem okozott változást a válaszgörbében.

Igazoltuk, hogy a klasszikus helyi érzéstelenítők kismértékű potenciál különbséggel, de nagy hatékonysággal gátolják a kiváltott akciós potenciálokat a csak motoros rostokat tartalmazó idegben. Kimutattuk továbbá, hogy a QX-314 önmagában nem okoz változást a motoros funkcióban, de korábbi vizsgálatokkal megegyezően elnyújtja a lidocain hatását, ami megmagyarázza a perisciatikus beadás motoros paralizisét lidocainnal és ropivacainnal együtt alkalmazva.

Eredményeink rávilágítottak, hogy a nisoxtetin gyenge potenciállal bír ezen a modellen. Néhány korábbi irodalmi adat azt igazolta, hogy a nisoxtetin gátolja a VGSC-eket *in vitro* modelleken, és dózisfüggő gátlás érhető el vele spinális anesztézia esetén patkányokban. Az ellentmondás oka az alkalmazott modellek közötti különbségekben keresendő. A korábbi modellek a szenzoros funkcióra fókuszáltak, így feltehetően a motoros és szenzoros rostok közötti különbségek okozhatják ezt az eltérést a hatékonyságban.

Feltérképeztük a többszörösen telítetlen zsírsavak, mint az arachidonsav és az arachidonil-etanolamid, illetve a capsaicin EMG aktivitásra gyakorolt hatásait is. Az AA hatástalannak bizonyult, míg az AEA és a capsaicin U-alakú dózishatás görbéje U-alakú volt. Ellentétben a korábbi *in vitro* eredményekkel, a mi eredményeink azt sugallják, hogy ezek a ligandok alacsony dózisban hatástalanok.

A KYNA intrathecalis alkalmazása fájdalomcsökkentő hatással bír különböző modelleken. A hatékony dózis motoros paralizist is okozott a klasszikus helyi érzéstelenítőkhez hasonlóan. Mivel a perineurálisan alkalmazott KYNA nagy dózisban sem volt semmilyen hatással a motoros funkcióra, feltételezhetjük, hogy gerincvelői szinten sem a VGSC-ken hatott, hanem feltételezhetően az NMDA receptorokon.

**Köszönetnyilvánítás**

Legmélyebb hálámat szeretném kifejezni Horváth Gyöngyi professzorasszony felé, az egy évtizednyi iránymutatás és támogatás miatt. Őnzetlen munkája több volt, mint hatalmas segítség, amit a tézis írásához és a kísérletek elvégzéséhez nyújtott. Tudományos és kritikus gondolkodásra tanított, ami az egyik legfontosabb eszköz a klinikai munkám során, de a mindennapi életben is. Amellett, hogy kivételes tudós, valódi mentor is számomra.

Meg szeretném köszönni a folyamatos segítséget és támogatást Kékesi Gabriellának, ami esszenciális volt a tézis megírásakor, valamint a munka végső fázisaiban is.

Szintén szeretném hálámat kifejezni Petrovszki Zitának a kísérleti munkához nyújtott óriási segítséget.

Köszönöm Tuboly Gábornak a lehetőséget, hogy csatlakozhattam kiváló munkájához.

Köszönöm Ábrahám-Tandari Ágnesnek a türelmet és a fáradhatatlan munkát, számtalan módon segített a munka során.

Hálámat szeretném kifejezni Liszli Péternek a segítségért, amit a kísérleti protokoll és az eszközök összeállításában nyújtott.

Őszinte hálával tartozom az egész csapatnak, és kiváltképp Jancsó Gábor és Benedek György professzor uraknak, amiért csatlakozhattam intézetükhöz, és hozzáférést biztosítottak a kutatási infrastruktúrához.

Hálával tartozom Szikszay Margitnak, amiért bemutatott ennek a nagyszerű csapatnak. Bízott, hogy folytassam tudományos képzésemet, és mikor szükségem volt rá, bölcsen és ellentmondást nem tűrve ráterelt a megfelelő útra.