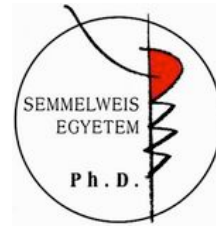


# Peptid és nem peptid $\mu$ -opioid agonisták: perifériás és centrális opioid fájdalomcsillapítás

Doktori értekezés

**Lackó Erzsébet**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Al-Khrasani Mahmoud, PhD, egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Szily Erika, PhD, egyetemi adjunktus  
Dr. Szentmiklósi József, PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Wenger Tibor, D.Sc., egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tekes Kornélia, D.Sc., egyetemi tanár  
Dr. Világi Ildikó, PhD, egyetemi docens

Budapest  
2016

## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
1. BEVEZETÉS.....	6
1.1. Irodalmi háttér.....	7
1.1.1. A fájdalom útvonala.....	7
1.1.2. Szupraspinális gátlás.....	10
1.1.3. Spinális gátlás.....	12
1.1.4. Az opioid receptorok típusai.....	12
1.1.5. Perifériás opioid receptorok.....	13
1.1.6. Szöveti sérülés és a perifériás opioid receptorok.....	15
1.1.7. Endogén opioidok.....	17
1.1.8. Endogén opioid tartalmú immunsejtek.....	18
1.1.9. Opioid tartalmú sejtek migrációja a szöveti sérüléshez.....	19
1.2. A kutatási témához közvetlenül kapcsolódó kutatási eredmények ismertetése.....	21
1.2.1. A DAMGO-val végzett kísérletekhez kapcsolódó kutatások.....	21
1.2.2. Az új opioid agonista 14-O-MeM6SU-al végzett kísérletekhez kapcsolódó kutatások.....	22
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	24
3. MÓDSZEREK.....	25
3.1. A DAMGO centrális és perifériás fájdalomcsillapító hatásának vizsgálata.....	25
3.1.1. Állatok.....	25
3.1.2. Vegyületek.....	25
3.1.3. Ecetsav által kiváltott vonaglásos teszt.....	25
3.1.4. Kezelések.....	27
3.1.5. A kísérlet kivitelezése.....	27
3.2. 14-O-Metilmorfin-6-O-szulfáttal végzett kísérletek.....	27
3.2.1. Állatok.....	27
3.2.2. Vegyületek.....	28
3.2.3. A 14-O-metilmorfin-6-O-szulfát szintézise.....	29
3.2.4. Receptor kötési kísérletek.....	29
3.2.4.1. Membránpreparálás.....	29
3.2.4.2. Kompetíciós kötési kísérletek.....	29
3.2.4.3. Funkcionális [ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S kötési kísérletek.....	30
3.2.5. Izolált szervek.....	31
3.2.5.1. Egér vas deferens (MVD).....	31
3.2.5.2. Patkány vas deferens (RVD).....	31
3.2.5.3. Kísérleti protokoll.....	32
3.2.6. Antinociceptív teszt.....	32
3.3. Statisztikai analízis.....	33
4. EREDMÉNYEK.....	35
4.1. DAMGO-val végzett kísérletek eredményei.....	35
4.1.1. A morfin és a DAMGO fájdalomcsillapító hatása zsigeri fájdalom modellen.....	35
4.1.2. Az antagonist hatása a fájdalomcsillapításra.....	37
4.1.2.1. Az i.p. adagolt, perifériásan ható opioid antagonist NAL-M hatása az i.p. adagolt morfinra és DAMGO-ra.....	37
4.2. 14-O-Metilmorfin-6-O-szulfát-al végzett kísérletek eredményei.....	39
4.2.1. In Vitro tesztek.....	39
4.2.1.1. Receptor kötési kísérletek.....	39
4.2.1.2. 14-O-MeM6SU-tal stimulált [ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S kötés.....	41
4.2.1.3. Az opioid agonisták aktivitása MVD-n és RVD-n.....	43

4.2.2. Fájdalomesillapító hatás .....	46
5. MEGBESZÉLÉS .....	48
5.1. DAMGO .....	48
5.2. 14- <i>O</i> -Metilmorfin-6- <i>O</i> -szulfát .....	53
6. KÖVETKEZTETÉSEK .....	61
7. ÖSSZEFOGLALÁS .....	63
8. SUMMARY .....	64
9. IRODALOMJEGYZÉK .....	65
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....	81
10.1. Az értekezés anyagát képező közlemények .....	81
10.3. Egyéb közlemények .....	81
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	83

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

14- <i>O</i> -MeM6SU	14- <i>O</i> -metilmorfin-6- <i>O</i> -szulfát
β-FNA	β-funaltrexamin
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
DADLE	[d-Ala <sup>2</sup> , d-Leu <sup>5</sup> ] enkefalin
DAMGO	[D-Ala <sup>2</sup> , N-MePhe <sup>4</sup> , Gly-ol <sup>5</sup> ] enkephalin
DIDII	Ile <sup>5,6</sup> deltorfin II
DOR	δ-opioid receptor
DR	dose ratio, az azonos biológiai hatást kifejtő agonista koncentrációk hányadosa
EC <sub>50</sub>	az E <sub>max</sub> 50%-át kifejtő hatóanyag-koncentráció biológiai teszten
ED <sub>50</sub>	az a dózis, amely a maximális hatás 50%-át hozza létre (az ED effektív dózist jelent)
EKC	etilketociklazocin
E <sub>max</sub>	maximális biológiai hatás
i.c.v.	intracerebroventrikuláris
i.p.	intraperitoniális
i.t.	intratekális
i.v.	intravénás
K <sub>e</sub>	equilibrium disszociációs konstans
KOR	κ-opioid receptor
KIR	központi idegrendszer
mtsai	munkatársai
MOR	μ-opioid receptor
MVD	mouse <i>vas deferens</i> (egér ondóvezeték)
M6G	morfin-6-glükuronid
M6SU	morfin-6- <i>O</i> -szulfát
NAL	naloxon hidroklorid
NAL-M	naloxone methiodide
NRM	nucleus raphe magnus – raphe magvak

NTI	naltrindol
NTX	naltrexon hidroklorid
nor-BNI	norbinaltorfimin
PAG	periaquaduktális szürkeállomány
POMC	proopiomelanokortin
RTF	rat tail-flick test (patkány tail-flick teszt)
RVD	rat <i>vas deferens</i> (patkány ondóvezeték)
s.c.	szubkután
S.E.M	standard error of mean
ttkg	testtömeg kilogramm

## 1. BEVEZETÉS

Az opioidok ma is a legelterjedtebben alkalmazott analgetikumok, mind akut, mind krónikus fájdalomban. Sajnos azonban erős fájdalomcsillapító hatásuk mellett jelentős mellékhatásaikkal is számolnunk kell, mint az obstipáció, légzés depresszió, hányinger-hányás, szedáció, dependencia és a tolerancia kialakulása, amelyek nagymértékben korlátozzák mindennapi használatukat. Az akut fájdalom csillapítása megoldottnak tekinthető, ellenben a krónikus daganatos és neuropáthiás fájdalommal, amelyek jelenleg is intenzív kutatások tárgyát képezik, azonban eddig nem találtak igazán hatékony és biztonságos gyógyszert ellenük (Eisenberg és Suzan, 2014; Furst, 2008).

A fájdalom kutatásában nagy áttörést jelentett, amikor a kutatók az 1980-as évek végén perifériás opioid receptorokat azonosítottak a szenzoros neuronokon, majd ezek endogén ligandjait is megismerték. Így olyan új típusú opioidok kerültek az érdeklődés központjába, melyek nem a központi idegrendszerben, hanem csak a periférián hatnak, következésképpen centrális mellékhatásaik sem jelentkeznek.

Kutatásainkat a fenti célok vezérelték, nevezetesen olyan új vegyületek (14-*O*-metilmorfin-6-*O*-szulfát) megtervezése és vizsgálata melyek fájdalomcsillapító hatásukat a periférián fejtik ki.

Kísérleteink során az enkefalin analóg DAMGO ([D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol<sup>5</sup>] enkephalin) perifériás hatásának alapos vizsgálata arra ösztönzött bennünket, hogy egy hasonló tulajdonságokkal rendelkező vegyületet alkossunk meg, mely nem jut át a vér-agy gáton, így hatását csak a fájdalom helyén fejt ki. Ezen kísérleteinket és törekvéseinket foglalja össze az alábbi munka.

## **1.1. Irodalmi háttér**

A klinikai fájdalom kezelése során azt, hogy milyen fájdalomcsillapítót választunk, a fájdalom típusa határozza meg. Az opioid agonisták, mint a morfin és származékai a leghatékonyabb vegyületek melyekkel a súlyos fájdalmakat csillapítani tudjuk. Rövid és hosszútávú használatuk azonban nemkívánatos mellékhatásokat von maga után, mint az obstipáció, légzésdepresszió, hányinger, hányás, szedáció, testi-lelki függőség (dependencia) és tolerancia kialakulása, amelyek nagymértékben korlátozzák mindennapi használatukat.

Az 1980-as években nagy áttörést jelentett a fájdalom kutatásában, hogy a primer érző neuronok perifériás idegvégkészülékén is azonosítottak opioid receptorokat, melyek részt vesznek az opioid fájdalomcsillapításban. Azóta számos tanulmány bizonyította, hogy az opioidok képesek hatékony fájdalomcsillapításra a primer érző neuronon lévő perifériás opioid receptorok aktiválásán keresztül (Stein és mtsai, 2003). Ezek a perifériás opioid receptorokon ható vegyületek megoldást jelenthetnének a centrális nemkívánatos mellékhatások kiküszöbölésére.

### ***1.1.1. A fájdalom útvonala***

Az IASP (International Association for the Study of Pain) 1996-ban a fájdalmat a következőképpen definiálta: olyan kellemetlen szenzoros és emocionális élmény, amelyet a szövetek aktuális vagy potenciális károsodása okoz. Mc Caffery 1968-ban így írta le: a fájdalom az, amit a beteg annak érez.

A fájdalom komplex élmény, mely megítélése szubjektív, befolyásolják érzelmi, értelmi és kulturális nézetek. A fájdalom bonyolult összjátéka a jeltovábbító rendszernek, a magasabb agyi központok modulációjának és az egyén egyedi érzékelésének (Steeds, 2009).

Nocicepciónak nevezzük a fájdalom keletkezését, transzmisszióját és tudatosulását. A nociceptorok, a fájdalmat felvevő szabad idegvégződések, szinte minden szövetben fellelhetőek, a bőrtől, az izmokon, ízületeken át, egészen a zsigerekig. Amint az erős mechanikai, kémiai, elektromos és hő hatások eléri a

fájdalomküszöböt, fájdalommediátorok szabadulnak fel, melyek ingerlik a nociceptorokat.

A nociceptoroknak 2 fő típusa ismert.

A $\delta$  rostok, melyek kis átmérűjek, mielinhüvelyesek, szabad idegvégződéseik a bőrben találhatóak. Magas ingerküszöbűek, csak extrém mechanikai és termikus hatásokra jönnek ingerületbe. Az ingerületvezetés sebessége gyors, 15m/s, ezek a rostok felelősek az éles, primer, szomatikus fájdalom továbbításáért.

A polimodális nociceptorok, nagy átmérűjű mielinhüvely nélküli C rostok, melyeket mechanikai, kémiai, termikus ingerek széles skálája hoz ingerületbe. Ingerületvezetési sebességük lassú, 1m/s, ezek a rostok felelősek a másodlagos, zsigeri, diffúz fájdalomért. A C-rostok megközelítőleg 15%-a „csendes nociceptor”, ezek csak szöveti sérüléseknél vagy gyulladásos körülmények között jönnek ingerületbe.

A fájdalmat két hullámban érzékeljük. A fájdalmas ingert követően éles, intenzív, jól lokalizálható fájdalmat érzünk, ezért az A $\delta$  rostok felelősek, majd később ez egy diffúz, tompa, égő érzésbe megy át, amit a C rostok közvetítenek.

Mindkét típusú afferens rost pseudounipoláris idegtestje a hátsó gyöki ganglionban található, centrális axonjaik a gerincvelő hátsó gyökén keresztül a hátsó szarv felületen zónáiban lévő neuronokon végződnek. A C rostok és néhány A $\delta$  rost főleg a lamina I-ben és II-ben (substantia gelatinosa) végződnek, itt kapcsolódnak át, míg a többi A $\delta$  rost többnyire a lamina V-ben szinaptizál a felszálló pálya neuronjaival. A lamina II és V fontos területek a fájdalom lokalizációja és modulációja szempontjából (Steeds, 2009).

A nociceptorok nem, vagy alig adaptálódnak a tartós behatáshoz, sőt, tartós ingerlés hatására fokozódik az érzékenységük.

A fájdalom és hőimpulzusokat másodrendű neuronok szállítják tovább a gerincvelő hátsó szarvából. A felszálló afferensek kétféleképpen kapcsolódhatnak át a másodrendű neuronokra, vagy közvetlenül szinaptizálnak, vagy interneuron közbeiktatásával. A másodrendű neuronoknak három típusát különböztetjük meg. Az első, a specifikus nociceptív neuronok (nociceptive specific), itt csak magas ingerküszöbű A $\delta$  és C rostok kapcsolódnak át. Az átkapcsolás a lamina I-ben és III-ban található. A második a széles dinamikus sávú neuronok (wide dynamic range), ezeken



magas ingerküszöbű nociceptív és alacsony ingerküszöbű mechanoreceptor afferensek (ezek az A $\beta$  rostok, melyek érintési és nyomási afferensek) végződnek. A lamina V-ben és VI-ban található az átkapcsolás. Ez az afferens nociceptív és nem nociceptív impulzusokat is szállít, ezért az innen kiinduló pályákat multimodálisnak nevezzük. A harmadik típus a nem nociceptív neuronok (low-threshold), ezek kis intenzitású, nem fájdalmas mechanikai/ hő ingereket szállítanak.

Átkapcsolás után a felszálló pályák nagy része kereszteződik, azaz a kontralaterális oldalon halad tovább, míg kis részük a belépés oldalán, ipsilaterálisan marad és halad a magasabb régiók felé.

A felszálló pályák közül az egyik legfontosabb a *tractus spinothalamicus*. Mindhárom típusú másodrendű neuront megtalálhatjuk itt, elsősorban a lamina I-ből és V-ből erednek és kontralaterálisan haladnak (Almeida és mtsai, 2004). A *tractus spinothalamicus*-t két részre oszthatjuk, a filogenetikailag régebbi *tractus paleospinothalamicus*-ra mely a thalamus nem specifikus intralamináris és posterior mediális magjain végződik. Általános fájdalmi reakciókat közvetít (ébredtetés, autonóm válaszok, affektív reakció), nincs finom lokalizáció és diszkrimináció. A másik a *tractus neospinothalamicus*, mely a thalamus specifikus magjaiban végződik. A ventrális posterolaterális maghoz futnak a törzsből és végtagokból érkező ingerek, míg a fejből érkező információk a ventrális posteromediális magba jutnak. Finom lokalizáció és mennyiségi értékelés jellemzi, ezt érzékeljük akut fájdalomként.

Kisugárzó fájdalom. A hátsó szarv V-laminájában a bőrből, illetve a zsigeri szervekből származó primer afferensek azonos felszálló pályán haladnak tovább, ezért a thalamus és az agykéreg már nem képes a fájdalom keletkezésének tényleges helyét megállapítani, így a zsigeri fájdalom nem a keletkezés helyén, hanem a test felszínén, kisugárzó fájdalomként jön létre. Head írta le azt először, hogy a viscerális fájdalom kisugárzik a megfelelő dermatómákba, ezeket nevezzük Head-féle zónáknak (Greenberg, 2003). Például a szívizom oxigénhiányát jelentő anginás fájdalom jellemzően a bal felső végtagba sugárzik ki.

*Tractus spinomesencephalicus*, a középgy periaquaeductális szürkeállományában végződik, itt megy végbe a fájdalomérzet modulációja. A felszálló rostok a gerincvelő két oldalán haladnak felfelé és a középgy centrális szürkeállományában, főleg szerotoninerg neuronokon végződnek.

*Tractus spinoreticulothalamicus*, főleg a lamina V, VII, VIII-ból ered, kollaterálisokat ad az agytörzs formatio reticulárisában lévő neuronokhoz. Az innen kiinduló neuronok csatlakoznak a felszálló *spinoreticulothalamicus* pályához, majd a thalamusból kilépve a limbikus kéreghez szállítják az információkat. Ez a pálya főleg a hangulati elemeket, a fájdalom pszichés komponensét közvetíti.

*Tractus spinohypothalamicus*, neuronjai főképp a lamina I, V, X-ből erednek. Fájdalmas és nem fájdalmas ingereket közvetítenek az izmokból, ínakkból, ízületekből, bőrből és zsigerekből. A fájdalom kiváltotta hormonális válaszok kialakításában játszanak szerepet, a válasz a hipofízisen és mellékvesén át érvényesül (Komoly, 2010).

Harmadrendű neuronok. *Thalamocorticális* pályák adják a fájdalomvezetés ezen szakaszát. A nociceptív információk több különböző úton érik el az agykéreg szenzoros területét (szomatoszenzoros kéreg, insula, prefrontális kéreg, anterior cinguláris kéreg), ahol a fájdalom lokalizálása, feldolgozása, tudatosulása történik. Eddig nem sikerült az agykéregben a nocicepció szomatotópiás elrendezését megfigyelni. A szenzoros területről a fájdalom a frontális lebenybe továbbítódik, ahol az affektív komponense keletkezik. A thalamus adja a fájdalom negatív élményét. Ha ez sérül, rendkívül erős fájdalom jelentkezik az ellenkező testfélén, valódi fájdalmas inger jelenléte nélkül (thalamus szindróma). Viszont ha megszakítjuk az agykéreg összeköttetéseit, a fájdalom pszichés megélése marad el.

### ***1.1.2. Szupraspinális gátlás***

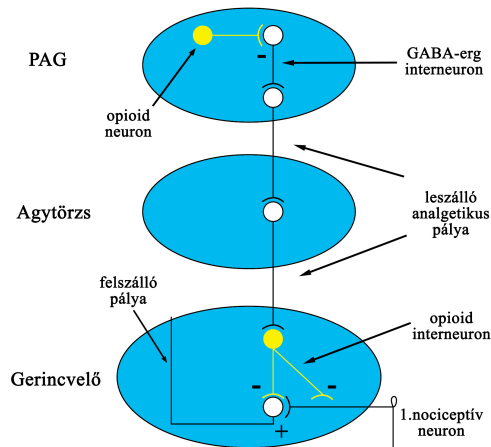
A szupraspinális gátlás az endogén leszálló analgetikus rendszer révén valósul meg. Központi részét a középagy periaqueductalis szürkeállományból (PAG) és a nyúltvelői raphe magvakból (NRM) induló leszálló monoaminerg (noradrenerg és szerotonerg) neuronok képezik, amelyek interneuronok közvetítésével gátolják a primer nociceptív afferensek gerincvelői átkapcsolódását a felszálló pályákra.

A PAG elektromos ingerlése fájdalomcsillapító hatású, az ide injektált morfin sokkal erősebb fájdalomcsillapító hatással rendelkezik, mint bárhol másutt a központi idegrendszerben. A PAG bejövő információt kap a thalamusból, a hypothalamusból, a cortexből és a spinothalamikus traktusból. Az innen kiinduló neuronok aktiválják a

NRM sejtjeit, melyek leszállva a gerincvelő hátsó szarvába gátolják a fájdalom továbbítását a magasabb régiók felé (Steeds, 2009).

Az NRM neuronjainak sejttestjei a nyúltvelő raphe magvaiban találhatóak, ezek szerotininerg neuronok, axonjaik a gerincvelői szürkeállomány lamina II-ben található sejtjeivel szinaptizálnak, de szinapszisokat hoznak létre a lamina III-ban is. A raphe magvak stimulációjának következménye erős fájdalomcsillapító hatás, amely úgy jön létre, hogy a stimuláció hatására felszabaduló szerotonin aktiválja a gátló interneuronokat, így gátolva a fájdalom útját (Steeds, 2009).

Fiziológiás esetben a fent leírt leszálló pálya GABA-erg neuronok tónusos gátlása alatt áll. A monoaminerg pályák elektromos stimulálása, vagy a GABA-erg gátlás gátlása opioidokkal, csökkenti a fájdalom továbbítását, és ezzel a fájdalomérzetet. Az opioidok az idegsejtek membránjában lévő opioid receptorokhoz kötődnek, majd azok aktiválásával  $K^+$ -csatornák nyitása és/vagy  $Ca^{2+}$ -csatornák zárása útján, a receptort expresszáló neuron - jelen esetben a GABA-erg neuron - gátlásához vezetnek. Az opioid receptoroknak vannak endogén ligandjaik is, ezek az endogén opioidok. A középgyban vannak endogén opioidokat tartalmazó neuronok, amelyek a GABA-erg neuronokon végződnek, így a gátlás gátlásával a leszálló analgetikus pályát aktiválják. Továbbá a gerincvelőben a leszálló monoaminerg pálya opioid interneuron közvetítésével gátolja a fájdalom transzmisszióját. Ez az opioid interneuron preszinaptikusan csökkenti a neurotranszmitter felszabadulást és posztzinaptikusan gátolja az akciós potenciálok továbbítását a spinothalamikus pályákon (1.ábra). Endogén opioidok felszabadulásával magyarázható, hogy az extrém helyzetekben súlyos sérülések ellenére sem jelentkezik fájdalomérzet. Talán ennek a rendszernek éppen ez a feladata, hogy az igen erős fájdalom ne bénítsa meg a szervezetet (Furst, 2007).



*1.ábra. Szupraspinális gátlás (saját ábra).*

### **1.1.3. Spinális gátlás**

A fájdalom jelentősen módosulhat a gerincvelő hátsó szarvában. A nociceptív afferensek kollaterálisai révén gátolják a gátló interneuronokat, így a fájdalom továbbítódik. Ha a gerincvelő hátsó szarvába a fájdalmas ingeren kívül mechanoreceptorokból származó ingerület is érkezik, akkor az A $\beta$  rostokon szállított impulzusok ingerületbe hozzák a gátló neuronokat, így a fájdalominger gerincvelői szinten megreked, azaz a taktilis primer afferens neuron gátolja a nociceptív afferens átkapcsolását. Például a sérült bőrfelület fájdalma csökkenthető a szomszédos rész gyengéd érintésével. Ez a gerincvelői kapukontroll.

### **1.1.4. Az opioid receptorok típusai**

Háromféle opioid receptortípust különböztetünk meg, ezek a  $\mu$  (MOR),  $\kappa$  (KOR) és  $\delta$  (DOR). Ezek főbb altípusai a  $\mu_1$  (fájdalomérző pálya),  $\mu_2$  (légzőközpont),  $\mu_3$  (immunsejtek),  $\kappa_{1a}$ ,  $\kappa_{1b}$ ,  $\kappa_2$ ,  $\kappa_3$ ,  $\delta_1$  és  $\delta_2$ . Az opioidok szerkezetüktől függően, különböző affinitással kötődnek ezekhez a receptorokhoz, így farmakológiai hatásuk is eltérő (Fowler és Fraser, 1994; Traynor, 1994).

Az opioid receptorok a G-protein-kapcsolt receptorok családjába tartoznak (Pasternak és Pan, 2013). 7 transzmembrán hélixszel rendelkeznek, mely a membránban

található, ez a receptor ligandkötő része, valamint egy funkcionálisan kapcsolódni képes, 3 alegységből álló ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) G-proteinből.

Hatásmechanizmusukra jellemző, hogy az adenilát-cikláz gátlásával csökkentik az intracelluláris cAMP (ciklikus adenzin monofoszfát) szintet, így zárják a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákat a preszinaptikus idegvégződéseken (Womack és McCleskey, 1995). Ezenkívül  $\text{K}^{+}$ -csatornák nyitásával hiperpolarizálják a posztzinaptikus neuronokat, így csökkentik a másodlagos érző idegsejtek ingerelhetőségét, gátolják az akciós potenciál továbbterjedését (Schneider és mtsai, 1998). A C és A $\delta$  rostok gerincvelői átkapcsolódásán a preszinaptikus MOR aktivációja az N típusú, és kisebb mértékben a P/Q típusú feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna gátlásán keresztül a serkentő neurohormonok és neuropeptidok, úgymint a glutamát és P-anyag, felszabadulását csökkenti, tehát az opioidok fájdalomcsillapító hatása ezen mechanizmusoknak köszönhető (Heinke és mtsai, 2011).

Az opioid receptorok az endogén és exogén opioidok célpontjai. Funkcionális opioid receptorok találhatóak számos perifériás szövetben, immunsejtekben, preszinaptikusan a centrális és perifériás elsődleges érző neuronok terminálisiban, a hátsógyöki ganglionban, a gerincvelői átkapcsolódásnál, interneuronokon, valamint a középagyban és az agykéregben is (Coggeshall és mtsai, 2004; Hassan és mtsai, 1993; Mousa és mtsai, 2010; Schafer és mtsai, 1995; Stein, 2013; Stein és mtsai, 1990).

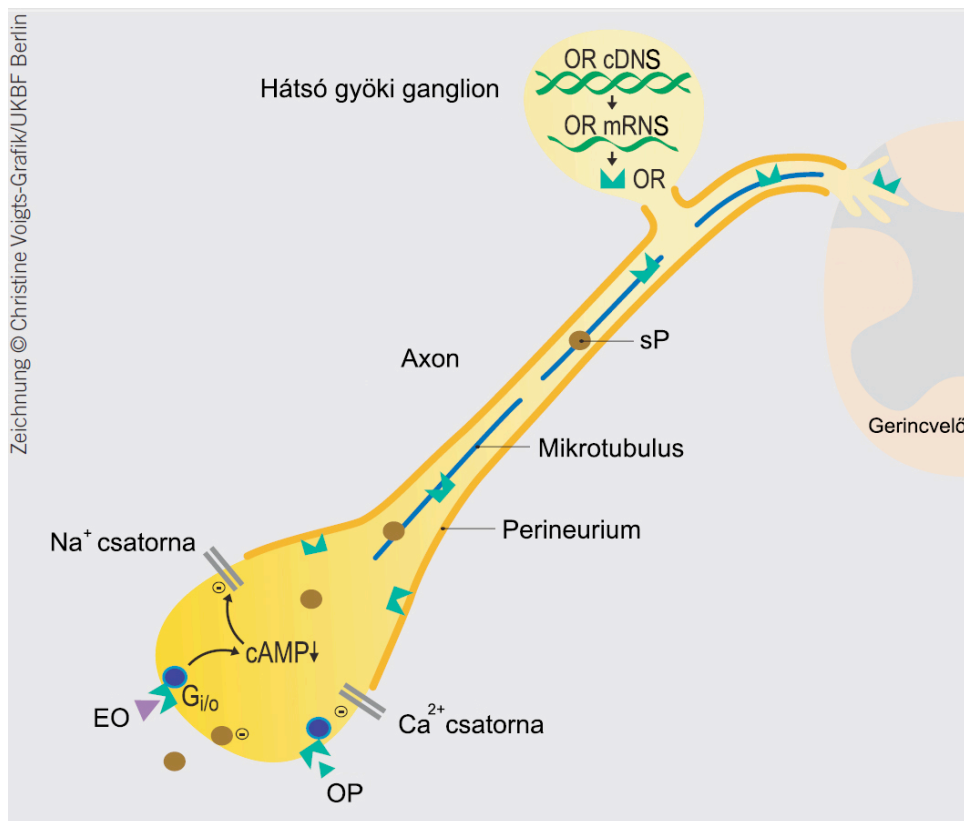
A  $\mu$ -opioid receptorok mind a gerincvelői, mind a szupraspinalis szinten (thalamus, hypothalamus, amygdala, PAG) nagy sűrűségben fordulnak elő (Mansour és mtsai, 1995). Az is jól ismert, hogy ezen MOR-ok aktivációja gátolja az akut és gyulladásszerű fájdalmat is (Furst és mtsai, 2005; Ossipov és mtsai, 2004).

### ***1.1.5. Perifériás opioid receptorok***

A perifériás opioid receptorok a vékony, a közepes és vastag átmérőjű érző neuronokon helyezkednek el. A primer pseudounipoláris neuron idegtestje a hátsógyöki ganglionban van, itt expresszálódik mindhárom receptor típus mRNS-e és proteinjei a P-anyaggal és a CGRP-vel együtt (Stein és mtsai, 2003). Emberben és állatban a szintézist követően az opioid receptorok axonális transzporttal szállítódnak a neuron

nyúlványain keresztül a periféria, valamint a központ felé (Hassan és mtsai, 1993). A neuron terminálisok membránjába beépülve funkcióképes receptorokká válnak.

Ezt követően exogén, illetve endogén opioidok hatására, a receptorok gátló G-proteineken ( $G_i/G_o$ ) keresztül direkt, vagy indirekt módon (cAMP csökkenésén keresztül) a  $Ca^{2+}$  és  $Na^+$  áramlását akadályozza, és csökkenti a P-anyag felszabadulását, mint ahogyan a 2. ábra szemlélteti (Stein és mtsai, 2003). A centrális neuronokon az opioidok a  $K^+$  kiáramlás fokozásán keresztül hyperpolarizálják a membránt, hátsó gyöki ganglionokban ezt még nem sikerült kimutatni. Ebből kiindulva az opioidok perifériás szenzoros neuronon kifejtett gátló hatásáért feltehetően elsősorban a  $Ca^{2+}$  csatornák befolyásolása lehet a felelős (Akins és McCleskey, 1993).



**2.ábra.** Opioid receptor transzport és jeltovábbítás a primer afferens neuronon. Az opioid receptorok és a neuropeptidek (pl. P-anyag) a hátsógyöki ganglionban szintetizálódnak és intra-axonális mikrotubulusok segítségével transzportálódnak a primer afferens neuronban. A terminálisokon az opioid receptorok egyesülnek a membránnal és funkcióképes receptorokká válnak. Endogén vagy exogén opioidok hatására gátló G-fehérjékkel kapcsolódnak. Ennek következményeként direkt vagy indirekt módon (cAMP csökkentésén keresztül) gátolják a  $Ca^{2+}$  és  $Na^+$  áramlását valamint csökkentik a P-anyag felszabadulást. OR - opioid receptor, sP - P-anyag, EO – exogén opioid, OP – endogén opioid peptid,  $G_{i/o}$  – gátló G-fehérje, cAMP – ciklikus adenzin monofoszfát (Stein és mtsai, 2003).

A tetrodotoxin rezisztens  $\text{Na}^+$  csatornák a nociceptorok membránjában expresszálódnak, ahol jelentős szerepük van a fájdalomimpulzus kialakulásában és az akciós potenciálok vezetésében. A szenzitizált nociceptorokon ezen csatornák spontán aktivitást mutatnak, a sérült idegeknél a sérülés helyén felhalmozódnak (Stein és mtsai, 2003). Az opioidok az adenil-cikláz gátlásán keresztül csökkentik ezen tetrodotoxin rezisztens  $\text{Na}^+$ -szelektív csatorna és más nem szelektív kation csatorna működését (Gold és Levine, 1996). Az opioidok ioncsatornákon kifejtett hatásaik révén csökkentik a nociceptor végkészülékek ingerlékenységét, az akciós potenciálok továbbítását, valamint a perifériás idegvégződésekből a serkentő proinflammatorikus neuropeptidek (P-anyag, CGRP) felszabadulását gátolják, és megakadályozzák a C rostok ingerlése által kiváltott vazodilatációt. Mindezek alapján elmondható hogy összetett módon csillapítják a fájdalmat (Stein és mtsai, 2001).

Több tanulmány is megerősítette a perifériás opioid receptorok jelenlétét az  $\text{A}\delta$ - és C-rostokon, a capsaicin receptorral rendelkező viscerális rostokon, valamint a P-anyagot, CGRP-et és izolektin B4-et szintetizáló neuronokon is (Borgland és mtsai, 2001).

További megfigyelés még, hogy a bradykinin az intracelluláris DOR-okat a szenzoros neuronok plazma membránjához irányítja. Ezt bizonyítja, hogy bradykininnel előkezelve ezen neuronokat, a DOR agonisták erősebb gátló hatást fejtettek ki a CGRP felszabadulásra és nagyobb mértékben csökkentették a cAMP szintet (Stein és Lang, 2009).

### ***1.1.6. Szöveti sérülés és a perifériás opioid receptorok***

Egyre több tanulmány számol be a perifériás opioid receptorok kiemelkedő szerepéről gyulladáisos eredetű, valamint viscerális-, hő-, csont-, és daganatos fájdalmak csillapításában (Al-Khrasani és mtsai, 2007; Bedini és mtsai, 2010; Furst és mtsai, 2005; Iwaszkiewicz és mtsai, 2013; Mousa és mtsai, 2010; Obara és mtsai, 2007; Stein és Lang, 2009). A neuropáthiás fájdalmakban is felvetették szerepüket, de ennek bizonyításához egyenlőre nincs elég adat (Guan és mtsai, 2008).

A hátsó gyöki ganglionban a szöveti gyulladás következtében a perifériás opioid receptorok szintézise és expressziója fokozódhat, axonális transzportjuk is felgyorsul. Feltehetőleg ennek kiváltó oka, hogy citokinek hatására transzkripciós faktorok kapcsolódnak az opioid receptor gén promoteréhez (Kraus és mtsai, 2001). Mivel a szintézis, az expresszió és a transzportálás hosszadalmasabb folyamat rövid, pár percig tartó gyulladást kiváltó stimulusban nem nő meg az opioid receptorok száma a szenzoros idegvégződéseken. Az opioid receptorok axonális transzportját a sérült szövetből felszabaduló citokinek és növekedési faktorok stimulálják, emelkedett opioid receptor sűrűséget eredményezve a perifériás idegvégeken (Stein és Lang, 2009). A gyulladás okozta alacsony pH és prosztaglandin felszabadulás mind növelik az opioid agonisták hatását a fokozott G-protein kapcsolódáson keresztül. Ezenkívül ilyen esetekben a szenzoros idegvégkészülékek száma is megnő, továbbá a perineurium permeabilitás fokozódása segíti az opioidok hozzáférését receptoraikhoz (Machelska és Stein, 2002). A gyulladásos szövetekben fokozódik az endogén opioid peptidok szekréciója is, ami additív vagy szinergista módon hat a perifériás opioid receptorokra. Hassan és munkatársai is megfigyelték, hogy gyulladásban emelkedik az opioid receptor szám és gyorsul az axonális transzportjuk, továbbá funkciójuk is megsokszorozódik (Hassan és mtsai, 1993). A gyulladás korai szakaszában még alacsony a perifériásan található opioid receptor mennyiség, majd az endogén analgészia fokozódik a gyulladás előrehaladtával (Mousa és mtsai, 2001). Gyulladásos fájdalomban a lokálisan injektált opioid agonisták kis dózisa, mely dózis szisztémásan adva hatástalan, aktiválja a perifériás opioid receptorokat és erős, klinikailag mérhető, dóziszfüggő fájdalomcsillapító hatással rendelkezik. Ez a perifériás MOR, DOR és KOR aktivációját jelenti (Stein és mtsai, 2003).

A szisztémásan vagy helyileg adott MOR, DOR és KOR agonisták más vizsgálatokban is sokkal kifejezettebb fájdalomcsillapító hatást fejtettek ki gyulladásos környezetben, mint ép viszonyok között. Tegeder és munkatársai háromféle ártalmas ingert használtak a fájdalom kiváltására, kriolízist, izomkontrakciót és elektromos stimulust. Morfin-6-glükuronid, ami csak gyengén penetrál az agyba, és morfin adása után, az első két esetben fájdalomcsillapítást tapasztaltak, mert ezek a fájdalmak gyulladásos eredetűek voltak. Az elektromos stimulussal létrehozott fájdalom azonban csak morfínnal volt csillapítható. Ebből azt a következtetést vonták le a kutatók, hogy a



periférás opioid fájdalomcsillapítás csak gyulladáson alapuló környezetben lehetséges (Tegeđer és mtsai, 2003).

Ezzel ellentétben, Coggeshal és mtsai (Coggeshall és mtsai, 1997), nem gyulladáson alapuló körülmények között kimutatták, hogy a helyileg injektált DAMGO (szintetikus opioid fehérje, magas MOR szelektivitással és affinitással) patkányoknál aktiválta a bőrben található, mielinhévely nélküli érző idegsejtekben található MOR-okat. A morfin ezzel szemben nem gyulladáson alapuló modellen, szisztémásan adva, elsődlegesen centrális fájdalomcsillapító hatással rendelkezik (Al-Khrasani és mtsai, 2007; Furst és mtsai, 2005).

Több vizsgálatra lenne szükség ahhoz, hogy meg tudjuk különböztetni a perifériás opioid receptorok szerepét ép környezeti viszonyok, idegi sérülés, valamint állandó gyulladás esetén.

### ***1.1.7. Endogén opioidok***

A emberi szervezetben megtalálható fájdalomcsillapító vegyületeket endogén opioidoknak nevezzük, amelyek az opioid receptorok természetes endogén peptid ligandjai. Az 1980-as években mutatták ki jelenlétüket a primer szenzoros neuronokban és a hátsó gyöki ganglionokban is. Elsősorban a gerincvelő hátsó szarvában találhatóak meg, ahol a primer szenzoros neuron centrális terminálján hatva akadályozzák meg, hogy a fájdalom a felsőbb szintekre jusson. Ezen kívül jelen vannak még a bőrben, szubkután szövetekben, a synovium sejtjeiben, a hízósejtekben, a granulocitákban, a limfocitákban és a makrofágokban is.

Három fő csoportjuk ismeretes, az enkefalinok, endorfinok és dinorfinok. Jellemzőjük, hogy különböző gének kódolják őket, prekursorokból képződnek, hatásukban különböznek, receptor szelektivitást mutatnak, valamint jellegzetes az anatómiai elhelyezkedésük. A jelenlétükkel hozható összefüggésbe, hogy nagy szöveti traumánál alacsonyabb szintű fájdalom érzet jelentkezik (Furst, 2007).

Az enkefalinok a proenkefalin, illetve a prodinorfin prekursorból képződnek. Az enkefalinok a DOR-t preferálják (Lord és mtsai, 1977).

Az endorfinok közé soroljuk a legerősebb farmakológiai hatással rendelkező  $\beta$ -endorfint, amely a hipofízisben a proopiomelanokortinból (POMC) képződik, hatástartama hosszú, így hatását keletkezési helyétől távolabb is képes kifejteni, ezért

neurohormonnak tartják. Nagy mennyiségben található a thalamusban, a hypothalamusban, a hypophysisben és a locus coeruleusban. Az endorfinok a MOR-hoz és a DOR-hoz egyaránt nagy affinitással kötődnek (Dores és mtsai, 1984).

A harmadik ismert endogén opioid a dinorfin. Ezen belül dinorfin A-t és dynorphin B-t különböztetünk meg, amelyek szintén a prodinorfinból képződnek. Jelentős mennyiségben fordulnak elő a gerincvelő hátsó szarvában, és szerepet játszhatnak a hyperalgézia kialakulásában, amely hatást az NMDA receptoron fejtik ki. Legnagyobb affinitással a KOR-hoz kötődnek (Chavkin és mtsai, 1982).

Ezek az endogén vegyületek a leszálló analgetikus pálya agytörzsi, illetve a gerincvelői opioid receptorok neuromodulátorai illetve neurotranszmitterei, amelyek az exogén opioidokkal együtt fejtenek ki fájdalomcsillapító hatást. Továbbá a primer szenzoros neuronon lévő opioid receptoroknak is endogén ligandjai. Sokan vizsgálták már ezen peptidek hatását gyulladásos fájdalomban is. Egyik kísérletben proenkephalin cDNS-t tartalmazó herpesz vírus vektort használva, a szenzoros neuronokban az enkephalin szintézise, transzportja és perifériás felszabadulása növekedett, ami a patkányokban kiváltott polyarthritises krónikus fájdalom és gyulladás csökkenéséhez vezetett (Braz és mtsai, 2001).

A kutatások további endogén opioid peptideket mutattak ki. A szarvasmarha agyból izolált endomorfín-1 és endomorfín-2 analgetikus hatását szelektíven a MOR-on fejtik ki, de mostanáig nem sikerült a prekursorukat azonosítani (Ronai és mtsai, 1999; Zadina és mtsai, 1997). Szerkezetileg nem hasonlítanak az eddig ismert opioidokhoz, és főleg olyan helyeken fordulnak elő ahol nagy a MOR sűrűség, mint például a primer szenzoros neuronok és a gerincvelői hátsó szarv. Rónai A. és Király K. felvetette az endomorfín-2 de novo szintézisének lehetőségét a hátsó gyöki ganglionban (Király és mtsai, 2009; Ronai és mtsai, 2006).

### ***1.1.8. Endogén opioid tartalmú immunsejtek***

Az immunsejtek a legtöbbet vizsgált olyan sejtek, amelyek endogén opioid tartalma a perifériás opioid receptorokkal kapcsolatba lép. POMC-ból képződő opioid peptideket kimutattak számos gerinces és gerinctelen faj leukocita sejtjeiben (Machelska és Stein, 2002). Ezekben a sejtekben megtalálhatóak az opioid prekursorokból származó peptidek, továbbá a prohormon konvertázok és

karboxipeptidázok, illetve a poszttranszlációhoz szükséges enzimek is (Mousa és mtsai, 2004). Az immunsejtekben és a neuronokban is ugyanazon prekursorokból képződnek ezen peptidek. Számos vizsgálat igazolta, hogy a sérült szövetekben az endogén peptidek a limfocitákban, monocitákban, makrofágokban és a granulocitákban termelődnek. Ezen sejtek az opioidokat vezikulákba csomagolják, majd stimuláció hatására plazmamembránjukba juttatják (Rittner és mtsai, 2007). Nemrég megállapították, hogy az immunsejtek gyulladáshoz való irányítása neurokinin-1 receptor függő. Erős fájdalommal járó gyulladásban a POMC mRNS-e,  $\beta$ -endorfin, met-enkefalin és dinorfin találhatóak a keringő immunsejtekben és a nyirokcsomókban.

Az immunsejteken kívül a hipofízis és a mellékvese is endogén opioid forrás, de eddig úgy tűnik, egyik sem vesz részt a perifériás fájdalomcsillapításban. Továbbá nem gyulladt szövetben is észleltek perifériás fájdalomcsillapítást keratinocitákból endothelin-1 és cannabinoid agonisták stimuláló hatására felszabaduló  $\beta$ -endorfinon keresztül (Ibrahim és mtsai, 2005; Stein és Lang, 2009). A T-limfocitákról azt írták le, hogy a viscerális fájdalmat  $\beta$ -endorfin felszabadításon keresztül csillapítják (Verma-Gandhu és mtsai, 2006).

### ***1.1.9. Opioid tartalmú sejtek migrációja a szöveti sérüléshez***

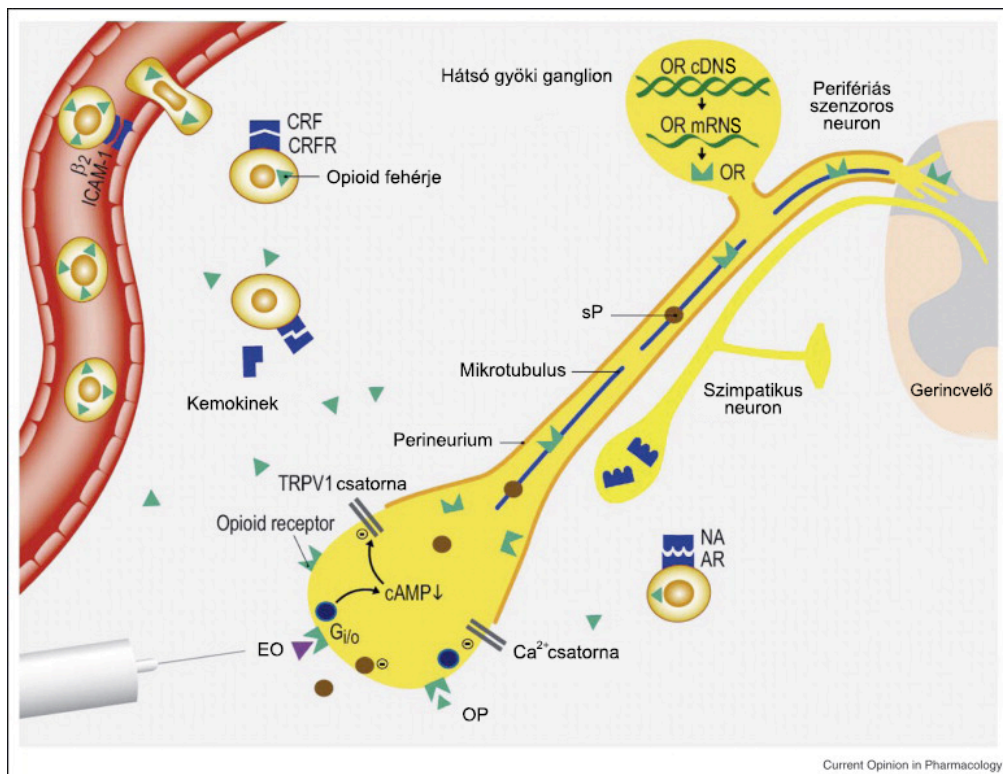
Az endogén opioid termelő sejtek jól szabályozott lépéseken keresztül érik el a felszabadulás helyét, ezt nevezik migrációnak. Az adhéziós molekulák irányítják a keringő leukocitákat a sérüléshez. Az első lépés a „rolling”, ami szelektíven keresztül megy végbe. A szelektíven a vérereket belülről határoló endoteliális sejtek felszínén találhatóak, ahol segítenek „kipányvázni” az elhaladó fehérvérsejteket a gyulladás körzetében. A fehérvérsejtek felszínén L-szelektin, míg az endothelsejteken a P- és E-szelektin van.

A szövet eredetű kemokinek szabályozzák az integrineket, amelyek segítik a sejtek erős kapcsolódását az endothelhez, kölcsönhatásba lépve az immunoglobulinok családjába tartozó intercelluláris adhéziós molekulával (ICAM1). Tehát az ICAM1 segíti a fehérvérsejtek biztonságos kapcsolódását az endothelhez és a diapedesist (az érfalon való átjutást).

Az összes adhéziós molekulának megvan a saját ligandja, amihez kapcsolódni tud. Ezt a folyamatot megszakítva blokkolható az immunocita érből való kilépése,

illetve a szelektineket vagy az ICAM1-et gátolva csökken az opioid termelő immunsejtek száma a gyulladt szövetben (Stein és mtsai, 2003). Megfigyelték, hogy a  $\beta$ -endorfin tartalmazó fehérvérsejtek L-szelektint is expresszálnak gyulladásos körülmények között.

A keringő immunsejtek miután a sérüléshez jutottak, stressz vagy serkentő faktorok hatására a termelt opioidot szekretálják, ilyen serkentő faktor lehet a CRH (corticotropin-releasing faktor) vagy az IL-1 (interleukin-1), amik saját receptorral rendelkeznek az immunsejtek felszínén. Ezt követően a felszabadult endogén opioidok kapcsolódnak a primer szenzoros neuron végkészülékén elhelyezkedő opioid receptorukhoz, és kiváltják fájdalomcsillapító hatásukat (Stein és mtsai, 2003). Végül a kiürült immunociták a regionális nyirokcsomókba vándorolnak („homing”) (3. ábra).



**3.ábra.** Opioidok a periférián. ICAM 1: intercellular adhéziós molekula 1, CRF: corticotropin-releasing faktor(=CRH), CRFR: corticotropin-releasing faktor receptor, OR cDNS: opioid receptor komplementer dezoxiribonukleinsav, OR mRNS: opioid receptor messenger ribonukleinsav, SP: P-anyag, TRPV<sub>1</sub> receptor: tranziens receptor potenciál vanilloid 1 receptor, EO: exogén opioid, OP: endogén opioid peptid, cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát, NA: noradrenalin, AR: adrenerg receptor (Stein és Lang, 2009).

Az opioid tartalmú sejtek migrációja a perifériás sérült szövetben egyre inkább úgy tűnik, hogy centrális mechanizmusok által szabályozott folyamat (Heurich és mtsai,

2007). Ezt bizonyítja, hogy morfin fájdalomcsillapító dózisának intratekális adása után, csökkent a  $\beta$ -endorfin tartalmú leukocyták perifériás sérüléshez való vándorlása. Ezt klinikai vizsgálattal is megerősítették, amikor epidurális analgeziát alkalmaztak műtéten átesett betegeken. Tehát a hatásos centrális fájdalomcsillapítás csökkenti ezen sejtek gyulladáshoz történő kivándorlását, mivel mérsékli szükségességüket (Schmitt és mtsai, 2003).

## **1.2. A kutatási témához közvetlenül kapcsolódó kutatási eredmények ismertetése**

### ***1.2.1. A DAMGO-val végzett kísérletekhez kapcsolódó kutatások***

Bentley és mtsai (Bentley és mtsai, 1981) leírtak több anyagot, többek között az ecetsavat is, mint olyan vegyületet mellyel zsigeri fájdalmat válthatnak ki. Az ezen vegyületek által kiváltott reakciót vonaglásként írták le. Az ecetsav által kiváltott zsigeri fájdalom mértékét egereknél és patkányoknál is a vonaglások száma alapján becsüljük meg, mely szám szorosan összefügg a sav által kiváltott kártékony hatással (Harada és mtsai, 2000; Mu és mtsai, 2010).

Az ecetsav által kiváltott vonaglásokos teszt napjainkban a legelfogadottabb és legrészletesebben használt kísérleti módszer, mellyel modellezni tudjuk mind a nemszteroid gyulladáscsökkentők mind az opioidok fájdalomcsillapítók hatását, valamint alkalmas arra is hogy ezen utóbbiak fájdalomcsillapítók hatásának centrális és perifériás oldalát elkülönítsük.

Az i.p. ecetsav által kiváltott vonaglások legalább 120 percre fennmaradnak (Harada és mtsai, 2000; Mu és mtsai, 2010). A fájdalmas válaszok száma az i.p. injektálást követő első 30 percben ér el egy csúcspontot, majd fokozatosan csökken a következő 90 percben, a vonaglásokot s.c. morfinnal való előkezelés megszünteti (Harada és mtsai, 2000). Kevés vonaglásokos patkánykísérlet van nagy szelektivitású MOR agonistákkal tartós viscerális fájdalomban tudomásunk szerint előtünk senki sem vizsgálta a DAMGO illetve a morfin opioid agonista késői zsigeri fájdalomban való hatását.

Jelen vizsgálat célja a fenti teszt segítségével annak meghatározása volt, hogy a MOR agonista DAMGO, illetve a morfin által kiváltott fájdalomcsillapításban milyen szerepe van a centrális és a perifériás hatásoknak. Újdonság a kísérletsorozatban, hogy a vegyületeket nem előre, a zsigeri fájdalom kifejlődése előtt, hanem csak azt követően kapták meg az állatok.

### ***1.2.2. Az új opioid agonista 14-O-MeM6SU-al végzett kísérletekhez kapcsolódó kutatások***

Sok, jelenleg használt opioid agonista mutat jelentős - opioid receptor közvetítette - fájdalomcsillapító hatást helyileg, a sérült szövetek kezelésénél, mind rágszálóknál, mind embernél, olyan dózisban mely egyébként szisztémásan hatástalan lenne (Stein és Yassouridis, 1997).

Számos kutatás célja, és a jelenlegi is azok közé tartozik, olyan fájdalomcsillapító vegyület létrehozása mely perifériás adagolást követően nem, vagy csak nagyon kevésbé jut be a központi idegrendszerbe. Egyik módja, hogy ilyen vegyületet kapjunk, ha poláris és hidrofíllé tesszük őket (Machelska és mtsai, 1999).

A klinikai gyakorlatban a morfin az egyik legismertebb vegyület melyet évszázadok óta használnak súlyos fájdalomknál a terápiás gyakorlatban. A morfin az ópium fő alkaloidja és az opioid agonisták fő prototípusa.

Emlősökben a morfint a máj enzimek bontják le metabolitokra, mint a morfin-3-glükuronid (M3G), morfin-3-szulfát (M3SU) és a morfin-6-glükuronid (M6G). Ezeknek a metabolitoknak, nincs vagy csak kis hatásuk van perifériásan adagolva, míg i.c.v. injektálva, a morfinhoz hasonlóan, fájdalomcsillapító hatással rendelkeznek (Brown és mtsai, 1985; Mori és mtsai, 1972; Shimomura és mtsai, 1971; Woods, 1954). A morfin metabolitjai közül a M6G i.c.v. adagolva sokkal nagyobb fájdalomcsillapító hatással rendelkezik, mint a morfin (Mori és mtsai, 1972; Shimomura és mtsai, 1971).

A szintetikus analóg morfin-6-O-szulfát (M6SU) a M6G-hoz hasonló fájdalomcsillapító hatással rendelkezik (Mori és mtsai, 1972), az eredmények azonban azt mutatják, hogy emlős szövetekben a morfin biotranszformációja során nem keletkezik M6SU (Donnerer és mtsai, 1987; Nagano és mtsai, 2000).

A klinikai gyakorlatban, a morfin mellett, a félszitetikus, az oximorfon származékot is alkalmazzák a súlyos fájdalmak csillapításában. A vegyület a morfinnál háromszor nagyobb affinitással kötődik a MOR-hoz (Riba és mtsai, 2010).

Új, erős fájdalomcsillapító hatással rendelkező morfin származékok kifejlesztésénél az oximorfonon (14-*O*-metiloximorfon) 14-*O*-metoxi csoportja jó kiindulási alapnak bizonyult (Schmidhammer és mtsai, 1984). Az így kapott analógok magasabb affinitást mutattak a MOR-hoz, megtartották  $\mu$ -receptor szelektivitásukat, csakúgy mint a kiinduló vegyülethez, az oximorfonhoz, hasonló fájdalomcsillapító hatásukat (Furst és mtsai, 2005; Lattanzi és mtsai, 2005; Riba és mtsai, 2010; Schmidhammer és mtsai, 1984).

A fenti kísérletekből kiindulva alkalmaztuk ezt a stratégiát a M6SU esetében is, azaz 14-*O*-metoxi csoporttal módosítottuk a kiindulási vegyületet. A jelen munka egyik célja a 14-*O*-MeM6SU szintézise volt, valamint opioid receptrokhoz való szelektivitásának és affinitásának vizsgálata biológiai (mouse *vas deferens* - MVD, rat *vas deferens* - RVD) és biokémiai (egyensúlyi kompetíciós kötés) tesztek segítségével. További célunk volt, hogy megvizsgáljuk a 14-*O*-MeM6SU hatáserősségét és hatékonyságát a kiinduló vegyülethez, a M6SU-hoz képest, illetőleg hogy összehasonlítsuk a kapott eredményeket két MOR szelektív vegyülettel a morfinnal és az enkefalin analóg DAMGO-val MVD-n, RVD-n valamint funkcionális [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési kísérletekben. Végül tail-flick teszttel összehasonlítottuk a 14-*O*-MeM6SU, M6SU, morfin és DAMGO fájdalomcsillapító hatását.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataim során két részben összefüggő témakört jártam körül.

I. DAMGO és morfin farmakológiai hatásának vizsgálata új tesztrendszerünkben (vonaglásos teszt, patkányon).

- 1) Összehasonlítani az opioid agonista peptid DAMGO fájdalomcsillapító hatását a nem peptid opioid agonista morfinéval intraperitonális (i.p.) és intracerebroventrikuláris (i.c.v.) adagolást követően.
- 2) Igazolni a perifériás opioid receptoriális hatást i.p. és i.c.v. injektált, perifériásan ható opioid antagonistá, a naloxone methiodide (NAL-M) segítségével az agonisták i.p. adagolása mellett.
- 3) A tesztrendszer segítségével demonstrálni a DAMGO és morfin fájdalomcsillapító hatásának centrális illetve perifériás jellegét.

II. 14-O-MeM6SU farmakológiai hatásainak és támadáspontjának vizsgálata.

- 1) In vitro tesztek
  - a) biokémiai tesztek (receptor kötési vizsgálatok, G-fehérje aktiváció): affinitás, szelektivitás és hatáserősség meghatározása
  - b) biológiai tesztek (egér vas deferens, patkány vas deferens): szelektivitás, hatékonyság és hatáserősség meghatározása
- 2) In vivo teszt (patkány tail-flick teszt)
  - a) a 14-O-MeM6SU és a referencia vegyületek (morfin-6-szulfát, morfin) fájdalomcsillapító hatásának összehasonlítása szubkután (s.c.) és i.c.v. adagolásnál.
  - b) a i.c.v./s.c. arányok meghatározása



### 3. MÓDSZEREK

#### 3.1. A DAMGO centrális és perifériás fájdalomcsillapító hatásának vizsgálata

##### 3.1.1 Állatok

A kísérleteket 100-140 g-os hím Wistar patkányokon végeztük (Toxicop és Charles River, Budapest, Magyarország). Az állatok közös ketrecekben voltak elhelyezve (5-7 állat), kontrollált hőmérsékletű állatházban ( $22 \pm 2$  °C). Az állatházban 12 órás ciklusokban váltakoztak a sötét és világos periódusok (7-19 óráig világos periódus), az állatok a vizet és a táplálékot *ad libitum* kapták.

A kísérleteket a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának szabályai szerint végeztük, mely szabályzat a Helsinki Egyezményen alapul (EC Directive 86/609/EEC). Minden állatot csak egyszer használtunk kísérleteink során.

##### 3.1.2. Vegyületek

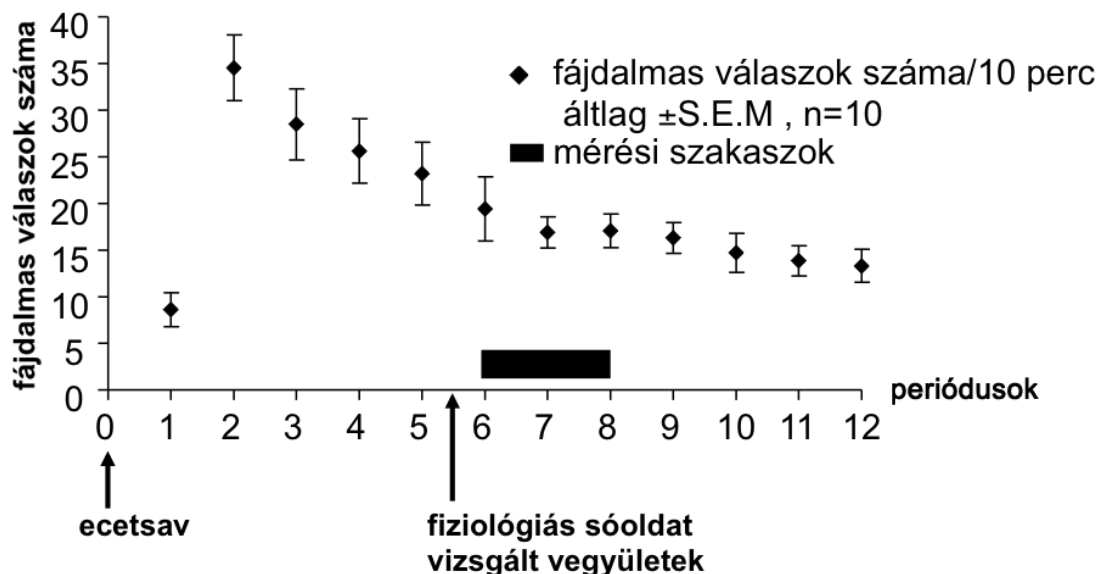
Kísérleteink során felhasznált vegyületek: morfin hidroklorid, naloxon (ICN, Tiszavasvári) DAMGO, NAL-M (Sigma-Aldrich, Budapest). A vegyületek 0,9 %-os fiziológiás sóoldatban lettek feloldva.

##### 3.1.3. Ecetsav által kiváltott vonaglások teszt

A fájdalmas válaszokat i.p. injektált ecetsavval váltottuk ki, a tesztet Hayashida (Hayashida és mtsai, 2003) korábban közölt módszere alapján végeztük, kisebb módosításokkal. Nulla percnél az állatoknak 2%-os ecetsav oldatot adagoltunk i.p. 3 ml/ttkg mennyiségben. Ezután az állatokat plexiüvegből készült ketrecekben (25 cm x 25 cm x 25 cm) helyeztük el, minden ketrecben 1 állat volt. A továbbiakban lejegyeztük az ecetsav okozta fájdalmas válaszokat azaz a vonaglások számát. A fájdalom jeleként értékeltük a következőket: egyik vagy mindkét hátsó végtag kinyújtása, a hát hátrafeszülése, az állat normál testtartásból való oldalra dőlése, az abdominális izmok

összehúzódása. Az előzetes kísérletekben, az i.p. ecetsav injektálását követően, a vonaglások számát a nulladik perctől a 120. percig számoltuk, hogy megbizonyosodjunk, a későbbi reprodukálhatóság érdekében, melyek azok az időpontok, amikor a vonaglások száma állandónak tekinthető (4. ábra). Azokat az állatokat melyek nem mutattak semmiféle fájdalmas választ 10 perccel az i.p. ecetsavas kezelést követően, kizártuk a kísérletből a kontroll kísérleteknél és a további kísérleteknél egyaránt.

Maga a vizsgálat 120 percig tartott. Ezt a 120 perces megfigyelési időt 12 szakaszra bontottuk, minden szakasz 10 percig tartott. A vonaglások száma a második és a harmadik szakaszban volt a legmagasabb (10 és 30 perc között), majd fokozatosan csökkent, mígnem az 50. percre stabilizálódott és ez a stabilitás fennmaradt a 90. percig. Ennek megfelelően a továbbiakban a vizsgálati szakasznak is ezt az időszakot választottuk (4. ábra). A fiziológias só oldatot illetve a vegyületeket az 55. percben injektáltuk i.p. vagy i.c.v., majd hatásukat a vonaglások számára a 60.-80. perc között (6. és 7. szakasz az 4. ábrán) mértük. Ezen időszakokra eső fájdalmas válaszokat „késői permanens/tartós fájdalomnak” nevezzük. Az i.p./i.c.v. arányokat a dózishatásgörbékből kapott ED<sub>50</sub> értékek alapján számoltuk ki (ED<sub>50</sub> (nmol/kg) i.p. / ED<sub>50</sub> (nmol/patkány) i.c.v)



**4.ábra.** A fájdalmas válaszok időbeni lefutása 2%-os i.p. ecetsav injektálása után. A pontok a 10 perces periódusokban megfigyelt fájdalmas válaszok számát mutatják (átlag ± S.E.M., n=10).

### **3.1.4. Kezelések**

A fiziológias sóoldatot, a morfint és a DAMGO-t i.p. vagy i.c.v. adagoltuk. I.p. injektálás esetén az állatok 5ml/ttkg-os mennyiséget kaptak a fiziológias sóoldatból, illetve a vegyületek különböző koncentrációjú oldataiból. Az i.c.v. injektálást 250 µl-es 27-s tűvel rendelkező Hamilton fecskendővel, 3 mm hosszú tűvel végeztük. A szúrás helye a bregma vonalától 2 mm-re kaudálisan és 2 mm-re laterálisan volt. A fiziológias sóoldatot illetve a vegyületeket 10 µl/állat térfogatban adagoltuk. I.c.v. adagolás esetében a kísérlet végeztével, az állatok leölését követően, minden esetben megvizsgáltuk a szúrás pontosságát. Ezt először a koponya felületén néztük meg, majd felnyitva a koponyát az eltávolított agyon megvizsgáltuk magát az oldalkamrát is. Azon állatokat ahol kétség merült fel a szúrás pontosságát illetően, kizártuk a kísérletből. A kísérletek során csoportonként 4-15 állattal dolgoztunk.

### **3.1.5. A kísérlet kivitelezése**

A vegyületek és a fiziológias sóoldat i.p. és i.c.v. adagolása 55 perccel az ecetsav injektálása után történt. A morfin és DAMGO dózishatásgörbéit a 60-80 perc közötti vonaglások száma alapján vettük fel. A továbbiakban az antagonistá NAL-M jelenlétében végzett kísérletek során az agonisták azon dózisait választottuk, melyek dózis-hatás görbéik alapján 60-80% fájdalomcsillapító hatással rendelkeztek i.p. adagolást követően. A NAL-M-et az i.p. adagolás során a morfinnal illetve a DAMGO-val együtt injektáltuk. I.c.v. adagolás esetén a NAL-M beadása után 5 perccel adagoltuk az i.p. morfint, DAMGO-t illetve fiziológias sóoldatot.

## **3.2. 14-O-Metilmorfin-6-O-szulfáttal végzett kísérletek**

### **3.2.1. Állatok**

A receptor kötési kísérleteknél 250-300g-os hím Wistar patkányokat és R9-es törzsből származó tengerimalacokat használtunk. Az állatok Szegeden a Biológiai

Kutató Központ saját állatházában voltak 4-8 állatot tartalmazó ketrecekben elhelyezve. Az állatházban 12 órás ciklusokban váltakoztak a sötét és világos periódusok.

Az RVD, MVD illetve Tail-flick teszthez használt Wistar patkányok (RVD esetén 170-250g-, tail-flick esetén 120-160g súlyúak voltak és a SE-NET központi állatházából származtak) és NMRI egerek (35-45g súlyúak voltak és a Toxicoop-ból származtak) a Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet állatházában voltak elhelyezve 5 állatot tartalmazó ketrecekben, a fent leírtakhoz hasonlóan 12 órás ciklusokban váltakoztak a sötét és világos periódusok. Az állatok a táplálékot és a vizet minden esetben *ad libitum* kapták. A kísérleteket a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának szabályai szerint végeztük, mely szabályzat a Helsinkii Egyezményen alapul (EC Directive 86/609/EEC) és azon magyar törvény szerint mely az állatok védelméről és kíméletéről szól kísérletes munkában (XXVIII.tv. 32.§). Az állatokat csak egyszer használtunk kísérleteink során.

### 3.2.2. Vegyületek

A 14-*O*-metilmorfin-6-*O*-szulfát (14-*O*-MeM6SU), a morfin-6-*O*-szulfát (M6SU, szintézisét korábban közöltük (Varadi és mtsai, 2011)), a naloxon hidroklorid (NAL) és a naltrexon hidroklorid (NTX) a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézetében szintetizálták, a szintézist Dr. Hosztafi Sándor végezte. A morfin hidrokloridot az Alkaloida-INC-től (Tiszavasvári, Magyarország) rendeltük, az etilketociklazocint (EKC) a Sterling Winthrop-tól (Rensselaer, NY, USA), a [d-Ala<sup>2</sup>, d-Leu<sup>5</sup>] enkefalin-t (DADLE) és a naltrindol-t (NTI) a Sigma-Aldrich-től (Budapest, Magyarország). Minden vegyületet 0,9%-os fiziológiás sóoldatban oldottunk.

A 5- $\alpha$ ,7- $\alpha$ ,8- $\alpha$ -(-)-N-methyl-N-[7-(1-pyrrolidiny)-1-oxaspiro-(4,5)-dec-8yl]-benzeneacetamide-t (U-69,593) az Upjohn Co.-tól szereztük be (Kalamazoo, MI), a [D-Ala<sup>2</sup>, NMePhe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol]enkephalin-t (DAMGO) a Bachem Holding AG-től származik (Bubendorf, Switzerland). Az Ile<sup>5,6</sup>deltorphan II (DIDII), a [<sup>3</sup>H]DAMGO-t (41 Ci/mmol) és a [<sup>3</sup>H]DIDII-t (49 Ci/mmol) Szegeden a Biológiai Központ Izotóp laboratóriuma szintetizálta, ez utóbbi vegyületeket Dr. Tóth Gézától kaptuk. A [<sup>3</sup>H] U-69,593 (44 Ci/mmol) Amersham-tól szereztük be. Minden további, a kísérletek során felhasznált, vegyületet a Sigma Aldrich-től származik.

### ***3.2.3. A 14-O-metilmorfin-6-O-szulfát szintézise***

A 14-O-MeM6SU-ot Budapesten, a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézetében Dr. Hosztafi Sándor és Dr. Váradi András szintetizálta Professzor Dr. Noszál Béla vezetésével.

### ***3.2.4. Receptor kötési kísérletek***

A receptorkötési kísérleteket Szegeden, a Magyar Tudományos Akadémia, Biológiai Kutató Központ, Biokémia Intézetében végeztük, Dr. Zádor Ferenc és Rapavi Réka, Dr. Benyhe Sándor és Professzor Dr. Borsodi Anna vezetésével.

#### ***3.2.4.1. Membránpreparálás***

A patkányági membránpreparátumot korábban publikált protokoll alapján készítettük el (Benyhe és mtsai, 1997). A patkányokat dekapitáltuk, az agyakat egészben, gyorsan eltávolítottuk, majd jégen homogenizáltuk 50nM-os Tris-HCl pufferben (pH 7.4) Teflon-üveg homogenizálóval. A homogenátumot 4°C-on, 40000 × g-n 20 percig centrifugáltuk, az üledéket friss pufferrel újra szuszpendáltuk majd 30 percig 37°C-on inkubáltuk. Ezt követően megismételtük a centrifugálást. Az így kapott végső üledéket 0.32 M szacharózt tartalmazó 50mM-os Tris-HCl pufferrel (pH 7.4) szuszpendáltuk. A membrán homogenátumot felhasználásig -80°C-on tároltuk. A tengerimalac agyból készült membránpreparátumok a fentiekkel azonos módon készültek.

#### ***3.2.4.2. Kompetíciós kötési kísérletek***

A kompetíciós kötési tesztek során fagyasztott patkány és tengerimalac agyi membránpreparátumokat előbb lecentrifugáltuk (40000 × g, 20 perc, 4°C) a szacharóz eltávolítása céljából, majd a kapott pelletet 50nM Tris-HCl pufferben szuszpendáltuk (pH 7.4).

A membránhomogenátumokat a radioaktív ligandoknak megfelelően inkubáltuk, a [ $^3\text{H}$ ]DAMGO és a [ $^3\text{H}$ ]DIDII radioligandokat 35°C-on 45 percig, a [ $^3\text{H}$ ]U-69,593 radioligandot pedig 30°C-on 30 percig. Az inkubációs elegy végső térfogata a jelöletlen 14-*O*-MeM6SU és M6SU ( $10^{-11}$ – $10^{-5}$  M) ligandokkal, illetve a  $\sim 1$  nM-os [ $^3\text{H}$ ]DAMGO, [ $^3\text{H}$ ]DIDII, vagy  $\sim 3$  nM-os [ $^3\text{H}$ ]U-69,593-al együtt minden esetben 1 ml volt. A radioaktív ligandok teljes kötését a jelöletlen ligandok jelenléte nélkül állapítottuk meg, míg a nem specifikus kötés szintjét, a vizsgált opioid receptortól függően, 10  $\mu\text{M}$  jelöletlen DAMGO, DIDII vagy U69,593 jelenlétében határoztuk meg. Az inkubációt követően a receptorhoz kötődött és nem kötődött radioligandokat gyors vákuumszűréssel választottuk szét (Brandel M24R Cell Harvester), melyet 5 ml, 50 mM-os jeges Tris-HCl (pH 7.4) pufferrel történő háromszori átmosás követett. A vákuumszűrés Whatman GF/C ([ $^3\text{H}$ ]DAMGO, [ $^3\text{H}$ ]DIDII) vagy GF/B ([ $^3\text{H}$ ]U-69,593) üvegszálás filteren keresztül történt. A kiszáritott filter korongok radioaktivitását UltimaGoldTM F szcintillációs koktél segítségével (PerkinElmer) Packard Tricarb 2300TR folyékony szcintillációs számlálóval detektáltuk. A kompetíciós kötési vizsgálatokat mindig két párhuzamos méréssel hajtottuk végre, háromszor megismételve.

### 3.2.4.3. *Funkcionális [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S kötési kísérletek*

A funkcionális kötési kísérletek, néhány apróbb változtatást leszámítva Sim és mtsai (Sim és mtsai, 1995) illetve Traynor és Nahorski (Traynor és Nahorski, 1995) közleményei alapján lettek kivitelezve. A patkány és tengerimalac agyi membrán preparátumokat 50 mM-os Tris HCl pufferrel (pH 7.4) hígítottuk, hogy megfelelő fehérje mennyiséget kapjunk a vizsgálatokhoz ( $\sim 10$   $\mu\text{g}$  fehérje/minta). A membrán frakciók 30°C-on 60 percig inkubálódtak Tris-EGTA pufferben (pH 7.4), 1 ml végtérfogatban. A puffer összetétele 50 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl és 30  $\mu\text{M}$  GDP volt. Továbbá tartalmazott 20 MBq/0.05 cm<sup>3</sup> [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S radioaktív nukleotid analógot (0.05 nM), valamint növekvő koncentrációban ( $10^{-10}$  –  $10^{-5}$  M) 14-*O*-MeM6SU, M6SU, DAMGO, DIDII és U-69,593 jelöletlen ligandokat. A teljes kötés értékét a jelöletlen ligandok jelenléte nélkül, míg a nem-specifikus kötés szintjét 10  $\mu\text{M}$  jelöletlen GTP $\gamma$ S jelenlétében állapítottuk meg. A [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S specifikus kötésének értékét a kettő különbsége (T-NS) adja meg. A jelöletlen ligandok jelenléte

nélkül meghatározott [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S specifikus kötési értéke a receptor G-fehérje alapaktivitását jelöli, melyet 100 %-nak vettünk. A kötődött és nem kötődött [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S szétválasztását, valamint a minták detektálását a kompetíciós kötési tesztekhez hasonlóan végeztük el. A vákumszűrést Whatman GF/B üvegszálalás filteren keresztül történt, a filterek radioaktivitását pedig OptiPhase Supermix szcintillációs koktél segítségével (PerkinElmer) detektáltuk. A [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S kötési vizsgálatokat mindig három párhuzamossal hajtottuk végre és legalább háromszor megismételtük.

### 3.2.5. Izolált szervek

#### 3.2.5.1. Egér vas deferens (MVD)

A szerv kiperarálását és a kísérleti protokollt egy, korábban a csoport által közölt módszer alapján hajtottuk végre (Ronai és mtsai, 1977). A hím NMRI egerekből eltávolítottuk a *vas deferens*-t, majd 5 ml-es szervedényben lévő szervfürdőbe helyeztük. A szervfürdő Mg-mentes Krebsz oldatból állt, ennek összetevői mmol/dm<sup>3</sup> (mM) számolva: NaCl= 118, NaHCO<sub>3</sub>= 25, KCl= 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>= 1,2; glukóz= 11, CaCl<sub>2</sub>= 2,5. A szervfürdőbe karbogén (95O<sub>2</sub> + 5CO<sub>2</sub>) áramlott folyamatosan, hőmérséklete 31°C volt. A szerveket két elektród közé függesztettük (a felső elektród gyűrű formájú volt, míg az alsó egyenes). A szerveket 0,1 g előfeszítésnek tettük ki. Az elektromos ingerlés paraméterei a következők voltak: páros négyszögimpulzusokat (1 ms-os 9 V/cm jelerősség) alkalmaztunk 100 ms pulzus távolságban, 10 s-onként ismételve. Az izomkontrakciók amplitúdóját számítógépen követtük.

#### 3.2.5.2 Patkány vas deferens (RVD)

Hím Wistar patkányokból eltávolítottuk a vas deferens-t, az ezt követő protokoll néhány módosítást leszámítva ugyanaz volt, mint az MVD esetében. Ebben az esetben Krebsz-oldatot használtunk (NaCl= 118, NaHCO<sub>3</sub>= 25, KCl= 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>= 1,2; glukóz= 11, CaCl<sub>2</sub>= 2,5; MgSO<sub>4</sub>=1,2 mM/L). A kezdeti szervfeszesség 0,5 g volt, négyszögimpulzusokkal (1 ms széles, 9 V/cm intenzitású) ingereltük 0,1 Hz frekvenciával.

### 3.2.5.3. *Kísérleti protokoll*

Az izolált szervekkel végzett kísérleteknél, a szerveket kipreparáltuk, szervfürdőbe helyeztük és két elektród közé függesztettük, majd a fenti paraméterek alapján stimuláltuk. A szervek stimulálást követően MVD esetén 30-40 perc, míg az RVD esetén 90-120 perc volt a kalibrációs idő, ezt követően adtuk az első dózis agonistát. A koncentráció-függő dózishatásgörbéket az agonisták kummulatív adagolásával kaptuk meg. A dózishatásgörbe felvétele után a preparátumokból kimostuk az agonistát. A mosást mindaddig folytattuk, amíg a szervek izomkontrakciói vissza nem álltak az agonsita adagolása előtti állapotukba. Ezt követően a szerveket antagonistá jelenlétében 20 percig inkubáltuk, majd mosás nélkül ráadtunk egy dózis agonistát. A kísérletek során, hogy megállapíthassuk a morfin és M6SU  $K_e$  értékét NAL-al szemben, felvettünk egy teljes dózishatásgörbét az említett agonistákkal NAL jelenlétében. Az agonisták disszociációs konstansának megállapításához a dózis arány (DR) értékeket single-dose módszer segítségével kaptuk meg melyet Kosterlitz és Watt dolgozott ki (Kosterlitz és Watt, 1968).

### 3.2.6. *Antinociceptív teszt*

Patkány tail-flick tesztet (RTF) alkalmaztunk. A patkányoknak a fiziológiás sóoldatban oldott anyagokat s.c. vagy i.c.v. injektáltuk. A kísérleteket, a korábban a csoport által leírtak szerint végeztük el (Furst és mtsai, 1993).

A mérést a farok középső-disztális harmadának dorzális felén végeztük. A kísérlet kezdetén meghatároztuk az elrántás alap latenciaértékét. Az anyagok hatását s.c. beadását követően a 20., 30., 60. és 120. percben mértük. I.c.v. adagolást követően a mérések a 10., 20., 30., 60. és 120. percben történtek. Maximális hatásnak a latencia kétszeres megnyúlását tekintettük, ezt elérve a mérést a szövetsérülés elkerülése végett megszakítottuk. A kapott értékeket százalékban fejeztük ki („beadást követő latencia”- „alap latencia” / 2x „alap latencia”).



### 3.3. Statisztikai analízis

Az eredményeket átlag  $\pm$  S.E.M.-ben (standard error of mean) fejeztük ki.

Az *ecetsav által kiváltott vonaglósos tesztben* a fájdalomcsillapító hatást a fájdalmas válaszok száma alapján számoltuk ki és százalékban fejeztük ki a következő egyenlet alapján: fájdalomcsillapító hatás (%) =  $(C-T)/C \times 100$ , ahol a C a fájdalmas válaszok átlaga a csak fiziológiás sóoldatot kapott állatoknál, a T a fájdalmas válaszok átlaga a vegyületekkel kezelt állatoknál. A dózishatásgörbéknél a fájdalmas válaszok gátlását százalékban, illetve az 50%-os fájdalomcsillapító hatás eléréséhez szükséges dózist ( $ED_{50}$ ) a következő log-lineáris modell alapján számoltuk ki:  $E = S \times (\log D) + I$ , ahol az E a vegyület hatása, a D a vegyület dózisa, az S a dózis-hatás görbe egyenes szakaszának meredeksége és az I az y tengelymetszete. A 95%-os konfidencia intervallumokat a korábban leírtak alapján számoltuk ki (Litchfield és Wilcoxon, 1949). Variancia analízist (egyszempontos ANOVA) követően Tukey's post-hoc tesztet végezve állapítottuk meg a fiziológiás sóoldattal, az agonistával és az agonista + NAL-M-el kezelt állatcsoportok közötti különbséget. Az eredményeket statisztikailag szignifikánsnak ítéltük, ha a  $p < 0,05$  volt.

A *kompetíciós kötési kísérleteket* GraphPad Prism 5.0 segítségével értékeltük, meghatároztuk azt a vegyület koncentrációt mely leszorította a megfelelő radioaktív ligandok 50%-át ( $IC_{50}$ ).

A *funkcionális  $[35S]GTP\gamma S$  kötési kísérleteknél* a  $LogEC_{50}$  és  $E_{max}$  értékek, valamint a szignifikancia szintek szintén GraphPad Prism 5.0-val számoltuk (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

Az *MVD és RVD kísérletekben* az 50%-os effektív koncentrációt ( $EC_{50}$ ) valamint a maximális hatást ( $E_{max}$ ) nem-lineáris regresszióval számoltuk ki (Hill 3 paraméter egyenlettel) az egyéni logaritmusos dózishatásgörbékből. MVD esetén a NAL egyensúlyi disszociációs konstansát ( $K_e$ ) single-dose módszerrel (Kosterlitz és mtsai, 1981) számoltuk ki.

Az *antagonista affinitása ( $K_e$  érték)* a következőképpen lett kiszámolva:  $K_e = [\text{antagonista koncentrációja}] / \text{dose ratio} - 1$ . Mivel a morfin és a M6SU MVD-n részben képes gátolni az elektromosan kiváltott izomkontrakciókat, ezért, hogy ezeknek a vegyületeknek is meghatározhatjuk a  $K_e$  értékét NAL-al szemben, null módszert

alkalmaztunk. A dose ratio-t (DR) az  $EC_{50}$  értékéből számoltuk ki NAL jelenlétében és anélkül.

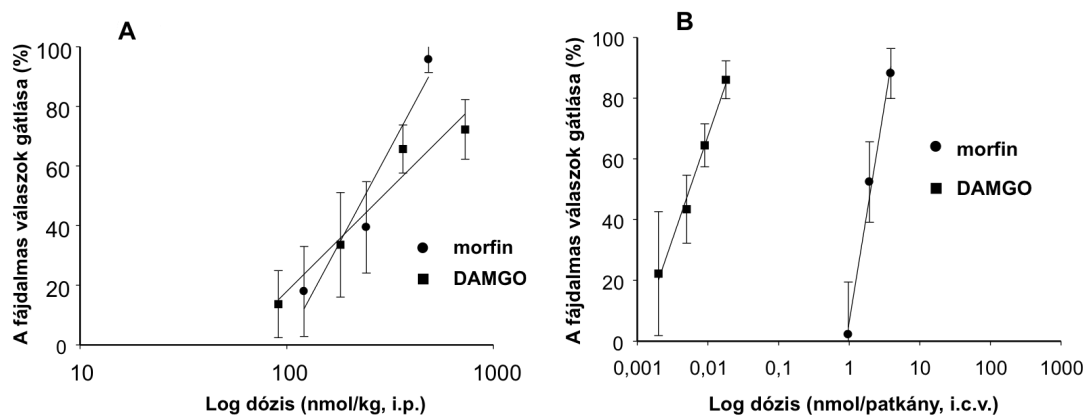
*RTF* esetén megvizsgáltuk a dózishatásgörbék közötti összefüggéseket, meghatároztuk az 50%-os fájdalomcsillapító hatáshoz ( $ED_{50}$ ) szükséges dózisokat, majd Litchfield-Wilcoxon módszerével (Litchfield és Wilcoxon, 1949) kiszámoltuk a 95%-os konfidencia intervallumokat. A csoportok közötti különbségeket egyszempontos ANOVA (analysis of variance) segítségével határoztuk meg, Tukey post hoc tesztjét alkalmazva. A  $p < 0,05$  érték statisztikailag szignifikánsnak számított.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. DAMGO-val végzett kísérletek eredményei

#### *4.1.1. A morfin és a DAMGO fájdalomcsillapító hatása zsigeri fájdalom modellen*

A 5/A és B ábra mutatja a morfin és a DAMGO fájdalomcsillapító hatását i.p. adagolt ecetsav által kiváltott vonaglászós teszten. A vegyületeket az ecetsavat követő 55. percben injektáltuk, hatásukat a 60. és 80. perc közé eső periódusban mértük. A DAMGO i.p. adagolást követően a morfinéhoz hasonló dózisfüggő fájdalomcsillapító hatással rendelkezik (5/A ábra). A morfin  $ED_{50}$  értéke 238,57 nmol/kg, míg a DAMGO-é 289,52 nmol/kg-nak bizonyult (1. táblázat). Ezen értékek azt mutatják, hogy a két vegyület fájdalomcsillapító hatása összemérhető i.p. adagolást követően. I.c.v. adagolásnál szintén mindkét vegyület dózisfüggő fájdalomcsillapító hatást mutatott (5/B ábra). A kiszámított  $ED_{50}$  értékek alapján a morfin (2,02 nmol/állat) és a DAMGO (0,006 nmol/állat) is sokkal hatékonyabbnak bizonyult mint i.p. injektálás esetén (1. táblázat). Az is megállapítható, hogy i.c.v. adagolást követően a DAMGO lényegesen hatékonyabb a morfinnál. A fentieknek megfelelően a DAMGO  $ED_{50}$  értékeinek i.p./i.c.v aránya szintén magasabb, mint a morfiné (1. táblázat).



**5.ábra.** A morfin és a DAMGO dózisfüggő fájdalomcsillapító hatása i.p. (5/A) és i.c.v. (5/B) adagolás után ecetsav által kiváltott vonaglászós teszten. A vegyületeket 55 perccel az i.p. ecetsav kezelés után injektáltuk. A vonaglászókat az ecetsavas kezelést követő 60 és 80 perc közé eső 20 perces periódusban számoltuk. Az adatok százalékban vannak kifejezve a fiziológias sóoldattal kezelt kontrol kísérletekhez viszonyítva (átlag  $\pm$  S.E.M.)

**1. táblázat.** A morfin és a DAMGO fájdalomcsillapító hatása i.p. és i.c.v. adagolás után, ecetsav által kiváltott vonaglászós teszten, patkányokon.

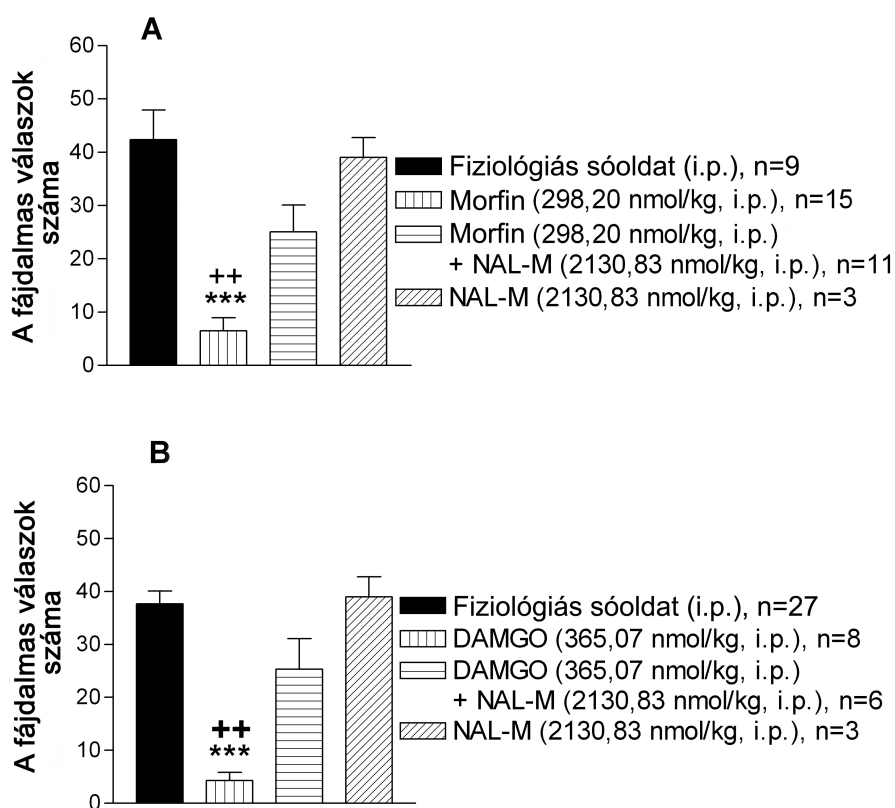
A dózishatásgörbét az i.p. ecetsavas kezelést követő 60 és 80 perc közé eső 20 perces periódusban - a vegyületek 55. percnél való i.p. és i.c.v. adagolása után - vettük fel, az  $ED_{50}$  értékek ezen dózishatásgörbék alapján lettek kiszámítva.

Vegyületek	$ED_{50}$		i.p./i.c.v.
	i.p. (nmol/kg)	i.c.v. (nmol/állat)	
<b>Morfin</b>	<b>238,57 (156,77-362,99)</b>	<b>2,02 (1,33-3,08)</b>	<b>118</b>
<b>DAMGO</b>	<b>289,52 (151,87-551,40)</b>	<b>0,006 (0,002-0,015)</b>	<b>48253</b>

#### 4.1.2. Az antagonistá hatása a fájdalomcsillapításra

##### 4.1.2.1. Az i.p. adagolt, perifériásan ható opioid antagonistá NAL-M hatása az i.p. adagolt morfinra és DAMGO-ra

A vártnak megfelelően az önmagában i.p. injektált NAL-M-nek (2130,83 nmol/kg) nem volt hatása a vonaglások számára, azonban szignifikánsan csökkentette az i.p. injektált morfin, illetve DAMGO fájdalomcsillapító hatását (6/A és B ábra).



**6.ábra.** Az i.p. adagolt NAL-M hatása az i.p. adagolt morfin (6/A) és DAMGO (6/B) fájdalomcsillapító hatására ecetsav által kiváltott vonaglások teszten, patkányokon.

Meghatároztuk az i.p. adagolt morfin (298,20 nmol/kg) és DAMGO (365,07 nmol/kg) fájdalomcsillapító hatását önmagában illetve NAL-M-el együtt adva (2130,83 nmol/kg).

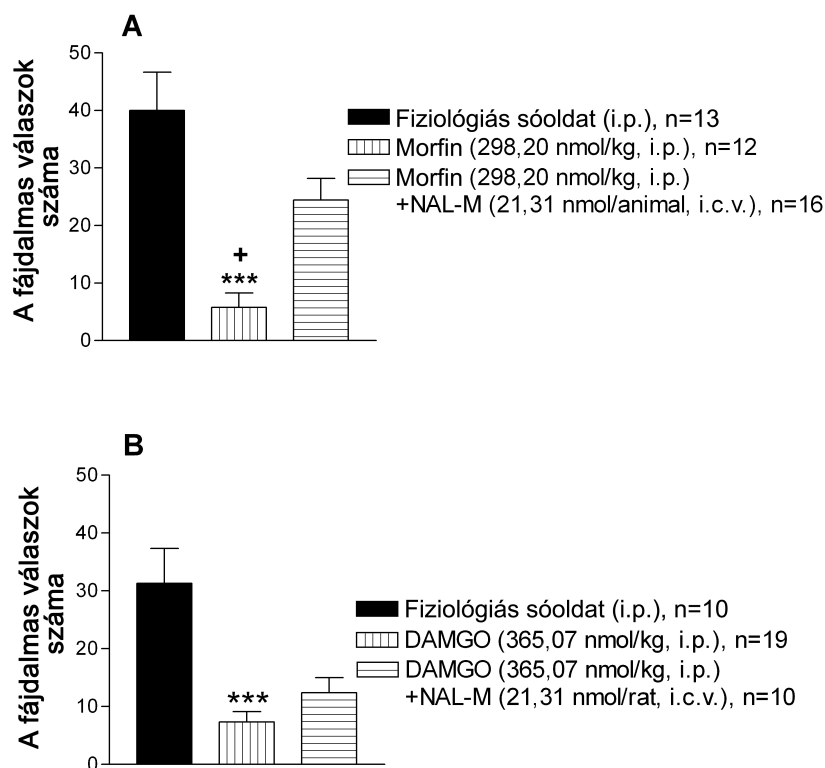
Az adatok minden csoportnál átlagban ( $\pm$  S.E.M.) fejezik ki a fájdalmas válaszok számát, a 20 perces megfigyelési szakasz az i.p. ecetsav injekciót követő 60. és 80. perc közé esett.

\*\*\* $p < 0,001$  fiziológiás sóoldathoz viszonyítva

++ $p < 0,01$  a morfin + NAL-M illetve DAMGO + NAL-M -hez viszonyítva.

#### 4.1.2.2. Az i.c.v. adagolt perifériásan ható opioid antagonistá NAL-M hatása az i.p. adagolt morfinra és DAMGO-ra

Hogy letezteljük milyen szerepük van a centrálisan elhelyezkedő opioid receptoroknak a szisztémásan injektált morfin és DAMGO által kiváltott fájdalomcsillapításban, a NAL-M-et i.c.v., míg ezzel egyidejűleg a morfint és a DAMGO-t i.p. adagoltuk. Az i.c.v. injektált NAL-M (21,31 nmol/állat) szignifikánsan csökkentette az i.p. injektált morfin hatását (7/A ábra), ugyanakkor nem volt hatása a szisztémásan adagolt DAMGO fájdalomcsillapító hatására (7/B ábra).



**7. ábra.** Az i.c.v. adagolt NAL-M (21,31 nmol/állat) antagonistáló hatása az i.p. adagolt morfin (298,20 nmol/kg, 7/A) és DAMGO (365,07 nmol/kg, 7/B) fájdalomcsillapító hatására ecetsav által kiváltott vonaglásos teszten, patkányokon.

A morfin és a DAMGO 55 perccel az i.p. ecetsav után lett injektálva, míg a NAL-M illetve a fiziológiás sóoldat a 60. percnél.

Az adatok minden csoportnál átlagban fejezik ki a fájdalmas válaszok számát  $\pm$  S.E.M, a 20 perces megfigyelési szakasz az i.p. ecetsav injekciót követő 60. és 80. perc közé esett.

\*\*\* $p < 0,001$  fiziológiás sóoldathoz viszonyítva

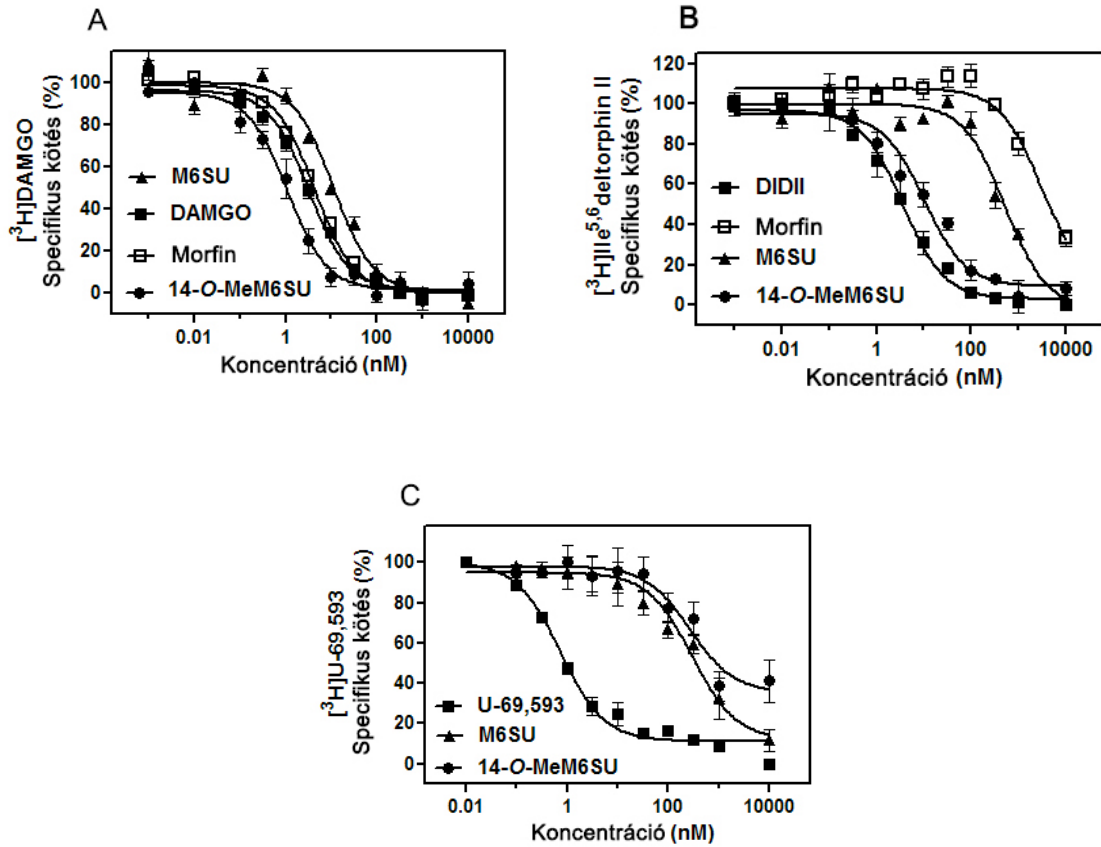
+ $p < 0,05$  az agonisták önmagukban szemben a morfin + NAL-M illetve DAMGO + NAL-M csoportokhoz viszonyítva

## 4.2. 14-*O*-Metilmorfin-6-*O*-szulfát-al végzett kísérletek eredményei

### 4.2.1. *In Vitro* tesztek

#### 4.2.1.1. Receptor kötési kísérletek

Megvizsgáltuk az új opioid ligand, a 14-*O*-MeM6SU, kötési affinitását és szelektivitását MOR-ra és DOR-ra patkány agyi-, míg KOR-ra tengerimalac agyi membránpreparátumokon, ehhez radioligandként [<sup>3</sup>H]DAMGO ( $\mu$ ), [<sup>3</sup>H]DIDII ( $\delta$ ) és [<sup>3</sup>H]U69,593 ( $\kappa$ ) használtunk (8/A, 8/B és 8/C ábrák). A 14-*O*-MeM6SU gátolta a [<sup>3</sup>H]DAMGO, [<sup>3</sup>H]DIDII és a [<sup>3</sup>H]U69,593 specifikus kötődését. A kompetíciós kötési görbék alapján a következő  $K_i$  értékeket kaptuk: 1,12; 10,23 és 295,12 nM (2. táblázat). Összevetve a tesztvegyületekkel (M6SU, morfin és homológ opioid ligandok) a legjobb MOR affinitással a 14-*O*-MeM6SU rendelkezett, illetve jelentős a DOR-hoz való affinitása is, bár 9-szer alacsonyabb a MOR-hoz képest (2. táblázat, 8/A, 8/B és 8/C ábrák).



**8.ábra.** 8/A. A  $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$  kompetíciós kötési görbéi patkány agyi membránpreparátumokon. A radioligand specifikus kötési értékeit növekvő koncentrációjú jelöletlen DAMGO, morfin, M6SU és 14-O-MeM6SU jelenlétében határoztuk meg. 8/B.  $[^3\text{H}]\text{DIDII}$  kompetíciós kötési görbéi patkány agyi membránpreparátumokon. Az adatokat növekvő koncentrációjú jelöletlen DIDII, morfin, M6SU és 14-O-MeM6SU jelenlétében kaptuk. 8/C. A  $[^3\text{H}]\text{U69,593}$  kompetíciós kötési görbéi tengerimalac agyi membránpreparátumokon. Az adatokat növekvő koncentrációjú jelöletlen U-69,593, morfin, M6SU és 14-O-MeM6SU jelenlétében kaptuk.



**2. táblázat.** A 14-*O*-MeM6SU, M6SU és a referencia vegyületek  $K_i$  értékei ( $\pm$  S.E.M.) kompetíciós kötési kísérletekben, jelölt radioligandok jelenlétében patkány és tengerimalac agyi membránpreparátumokon.

<sup>a</sup>: patkány agy

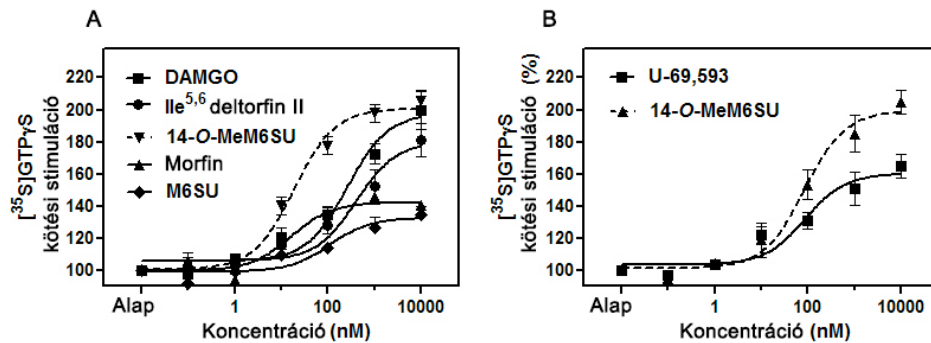
<sup>b</sup>: tengerimalac agy

Vegyület	$K_i$ (nM) $\pm$ SEM			Szelektivitási arány	
	[ <sup>3</sup> H]DAMGO ( $\mu$ ) <sup>a</sup>	[ <sup>3</sup> H]ILe <sup>5,6</sup> deltorfin II ( $\delta$ ) <sup>a</sup>	[ <sup>3</sup> H]U69,593 ( $\kappa$ ) <sup>b</sup>	$\delta/\mu$	$\kappa/\mu$
<b>Morfin</b>	4,37 $\pm$ 0,30 (n=6)	2951,21 $\pm$ 1039,70 (n=4)	nem értékelhető	621	
<b>M6SU</b>	11,48 $\pm$ 1,59 (n=6)	524,81 $\pm$ 109,54 (n=4)	275,42 $\pm$ 138,43 (n=6)	56	24
<b>14-<i>O</i>-MeM6SU</b>	1,12 $\pm$ 0,27 (n=6)	10,23 $\pm$ 2,62 (n=6)	295,12 $\pm$ 96,79 (n=6)	9	269
<b>Homológ ligand</b>	3,24 $\pm$ 0,37 (n=5)	3,63 $\pm$ 0,50 (n=4)	0,74 $\pm$ 0,12 (n=4)	-	-

#### 4.2.1.2. 14-*O*-MeM6SU-tal stimulált [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötés

A 14-*O*-MeM6SU agonista, parciális agonista vagy antagonistának karakterének meghatározására mindhárom opioid receptoron funkcionális [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési kísérleteket végeztünk. E kötési teszt típus segítségével meghatározhatjuk a vizsgált G-fehérje kapcsolt receptorok G-fehérjéjének maximális hatékonyságát ( $E_{max}$ ), illetve a receptort aktiváló ligand aktiváló képességét ( $EC_{50}$ ) a receptor aktivációja során. A G-fehérje vizsgálatokat patkány és tengerimalac agyi membránpreparátumokon végeztük. A patkány agyi membránpreparátumokban a 14-*O*-MeM6SU által kiváltott receptor mediált G-protein maximális aktivációja ( $E_{max}$ ) lényegesen magasabb volt, mint a morfiné vagy a M6SU-é ( $p < 0,0001$ ) és hasonló, mint a DAMGO-é, mely egy rendkívül hatékony szintetikus MOR agonista peptid (9/A ábra, 3. táblázat). A morfin és a M6SU  $E_{max}$  értékei, a DAMGO teljes agonista hatásához hasonlítva, megegyeznek a részleges agonista tulajdonsággal. Hatáserősségük sorrendben, a következőképp alakult: morfin > 14-*O*-MeM6SU > M6SU > DAMGO > DIDII. Az opioid antagonisták NAL (10  $\mu$ M), a patkány agyi membránhomogenátumokhoz adva, a vákozásoknak megfelelően, jobbra

tolta a 14-*O*-MeM6SU-tal stimulált [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési görbét, megerősítve a kísérlet opioid specifikusságát (az adatok nincsenek feltüntetve). A tengerimalac agy, melyben a patkány agyhoz képest nagyobb mértékben expresszálódnak KOR-ok, a 14-*O*-MeM6SU hatékonyan stimulálta a KOR mediált G-protein aktivációt, mindezt nagyobb hatékonysággal, mint az U-69,593 KOR szelektív ligand (9/B ábra, 3. táblázat).



**9.ábra.** 9/A. A [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötés stimulációja patkány agyi membránpreparátumon különböző koncentrációjú 14-*O*-MeM6SU-tal és M6SU-tal. Összehasonlításképpen a stimulációt megnéztük DAMGO, morfin és DIDII esetében is. A pontok az átlag értékeket jelentik  $\pm$  S.E.M. 9/B. A [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötés stimulációja tengerimalac agyi membránpreparátumokhoz különböző koncentrációjú 14-*O*-MeM6SU-al. Összehasonlításképpen a stimulációt megnéztük U-69,593-al is. A pontok az átlag értékeket jelentik  $\pm$  S.E.M.

**3.táblázat.** 14-O-MeM6SU, M6SU és morfin hatékonysága ( $E_{max}$ ) és hatáserőssége ( $EC_{50}$ ) összehasonlítva a MOR agonista DAMGO-val, a DOR agonista DIDII-vel és a KOR agonista U-69,593-al funkcionális [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S kötési kísérletekben.

Vegyület	$E_{max} \pm S.E.M.$ n	$EC_{50} \pm S.E.M.$ (nM) n
<b>Morfin</b>	<b>142,1 <math>\pm</math> 3,3</b> n= 4	<b>15,85 <math>\pm</math> 9,64</b> n= 4
<b>M6SU</b>	<b>132,5 <math>\pm</math> 3,3</b> n= 3	<b>104,71 <math>\pm</math> 63,66</b> n= 3
<b>14-O-MeM6SU</b>	<b>200,7 <math>\pm</math> 3,4</b> n= 10	<b>19,05 <math>\pm</math> 4,43</b> n= 10
<b>DAMGO</b>	<b>197,7 <math>\pm</math> 6,3</b> n= 5	<b>257,04 <math>\pm</math> 90,55</b> n= 5
<b>DIDII</b>	<b>180,3 <math>\pm</math> 7,4</b> n= 3	<b>407,38 <math>\pm</math> 204,75</b> (n= 3)
<b>U-69,593</b>	<b>164,0 <math>\pm</math> 5,0</b> n= 5	<b>85,11 <math>\pm</math> 29,99</b> (n= 5)

#### 4.2.1.3. Az opioid agonisták aktivitása MVD-n és RVD-n

MVD-n a 14-O-MeM6SU, M6SU, morfin és DAMGO  $EC_{50}$  (nM) értékei a felsorolás sorrendjében a következők voltak, 4,38; 102,81; 346,63 és 238,47 (4. táblázat). A 10/A ábrán jól látszik, hogy a 14-O-MeM6SU, a DAMGO-hoz hasonlóan, koncentráció függően erősen gátolja MVD-n az elektromosan kiváltott izom kontrakciókat. Ezzel szemben a morfin és a M6SU nem képes maximális gátlás kifejtésére. A kapott  $E_{max} \pm S.E.M$  értékek százalékban:  $99,10 \pm 0,90$  a 14-O-MeM6SU,  $96,99 \pm 1,88$  a DAMGO,  $36,87 \pm 3,36$  a M6SU és  $42,51 \pm 6,43$  a morfin esetében (4. táblázat). A NAL  $K_e$  értékei 0,66 és 1,92 között változtak mind a négy vegyületnél (4. táblázat). Ha a  $K_e$  értékeket naltrindol (NTI - DOR antagonist) vagy norbinaltorfimin (nor-BNI - KOR antagonist) jelenlétében vizsgáltuk, 14-O-MeM6SU esetében a következő eredményeket kaptuk a fent leírtak sorrendjében:  $12,95 \pm 5,30$  (n=7) és  $34,24 \pm 11,37$  (n=5). [d-Ala<sub>2</sub>, d-Leu<sub>5</sub>] enkefalin (DADLE, DOR agonista) esetén a  $K_e$  értékek

NTI-vel szemben  $0,14 \pm 0,05$  ( $n=8$ ) voltak, míg etilketociklazocin (EKC - KOR agonista) esetén nor-BNI-vel szemben  $0,51 \pm 0,17$  ( $n=3$ ). 10 nM NTI jelenlétében kapott dose ratio (DR) 14-*O*-MeM6SU-al és DAMGO-val szemben  $2,16 \pm 0,26$  ( $n=7$ ) és  $1,20 \pm 0,23$  ( $n=3$ ) volt.

RVD-n mind a 14-*O*-MeM6SU, mind a DAMGO koncentráció függően gátolta az elektromosan kiváltott izomkontrakciókat, míg a morfin és a M6SU nem volt képes erre (10/B. ábra). A 5. táblázatból látszik, hogy a 14-*O*-MeM6SU körülbelül 5-ször hatékonyabb volt a DAMGO-nál. A százalékban kifejezett  $E_{max}$  14-*O*-MeM6SU esetében 85,16; míg DAMGO esetében 80,58 volt. A 14-*O*-MeM6SU és a DAMGO mutatták a legerősebb hatásereőséget és a legmagasabb hatékonyságot, míg a morfinnak és a M6SU-nak nem volt hatása, ez alacsonyabb hatékonyságra utal.

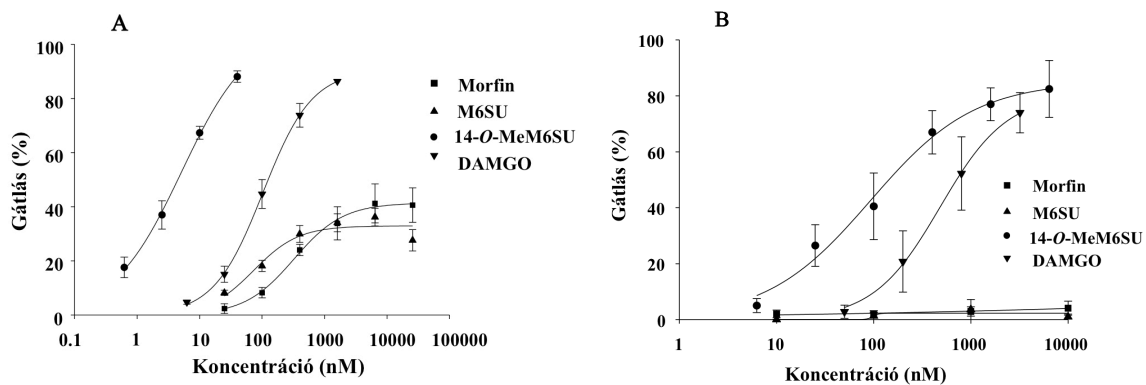
**4.táblázat.** A 14-O-MeM6SU, M6SU és a referencia vegyületek opioid tulajdonságai izolált egér vas deferensen.

$EC_{50}$ : 50%-ban hatékony koncentráció.

$E_{max}$ : maximális hatás

$K_e$ : a NAL egyensúlyi disszociációs állandója

Vegyület	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}$	$K_e$ (nM)
Morfin	$346,63 \pm 22,26$ n= 4	$42,51 \pm 6,43$ n= 4	$0,66 \pm 0,16$ n= 4
M6SU	$102,81 \pm 8,79$ n= 12	$36,87 \pm 3,36$ n= 12	$1,40 \pm 0,22$ n= 6
14-O-MeM6SU	$4,38 \pm 0,77$ n= 4	$99,10 \pm 0,90$ n= 4	$1,92 \pm 0,21$ n= 4
DAMGO	$238,47 \pm 65,54$ n= 6	$96,99 \pm 1,88$ n= 6	$1,66 \pm 0,26$ n= 4



**10.ábra.** 10/A. A 14-O-MeM6SU, M6SU, morfin és DAMGO dózishatás görbéi, elektromosan ingerelt egér vas deferensen. Az adatok átlagban vannak ábrázolva  $\pm$  S.E.M. 10/B. A 14-O-MeM6SU, M6SU, morfin és DAMGO dózishatás görbéi, elektromosan ingerelt patkány vas deferensen. Az adatok átlagban vannak ábrázolva  $\pm$  S.E.M.

**5.táblázat.** A 14-*O*-MeM6SU, M6SU és a referencia vegyületek opioid tulajdonságai izolált patkány vas deferensen.

*EC*<sub>50</sub>: 50%-ban hatékony koncentráció.

*E*<sub>max</sub>: maximális hatás

<b>Vegyület</b>	<b>E<sub>max</sub></b>	<b>EC<sub>50</sub> (nM)</b>
<b>Morfin</b>	<b>nincs hatás</b> <b>n= 6</b>	<b>N.D.</b>
<b>M6SU</b>	<b>nincs hatás</b> <b>n= 4</b>	<b>N.D.</b>
<b>14-<i>O</i>-MeM6SU</b>	<b>85,16 ± 4,85</b> <b>n= 6</b>	<b>92,80 ± 23,42</b> <b>n= 6</b>
<b>DAMGO</b>	<b>80,58 ± 3,74</b> <b>n= 4</b>	<b>483,1 ± 57,29</b> <b>n= 4</b>

#### 4.2.2. Fájdalomcsillapító hatás

Tail-flick teszen, patkányokon, s.c. injektálást követően a 14-*O*-MeM6SU, a M6SU és a morfin dózis függően váltotta ki a fájdalomcsillapító hatását. Az így kapott s.c. ED<sub>50</sub> értékek alapján a 14-*O*-MeM6SU 51-szer volt hatékonyabb, mint a M6SU és 34-szer hatékonyabb, mint a morfin (6. táblázat).

Intracerebroventrikuláris injektálás után a 14-*O*-MeM6SU 23-szor bizonyult hatékonyabbnak a M6SU-nál, ez az érték a morfinnal szemben 2456-volt (7. táblázat). A NAL (1 mg/kg, s.c.) teljes mértékben antagonizálta mindhárom vegyület (14-*O*-MeM6SU, M6SU, morfin) fájdalomcsillapító hatását. A hatásmaximumon a s.c./i.c.v. dózis arány 12242 volt a 14-*O*-MeM6SU-, 26137 a M6SU-, és 161 a morfin esetében. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a fenti opioid vegyületek különböző analgetikus hatékonysággal rendelkeznek, mely függ a beadás módjától.

**6.táblázat.** A 14-O-MeM6SU, M6SU és morfin fájdalomcsillapító hatása, hőszugár által kiváltott fájdalomra, patkány tail-flick teszten 30, 60 és 120 perccel a vegyületek s.c. beadását követően.

A zárójelben lévő adatok a 95%-os konfidencia intervallumok. Dózisonként minimum 5 állat volt egy csoportban és 3-4 dózist használtunk, hogy meghatározzuk az ED<sub>50</sub> értékét.

<sup>a</sup> a hatás maximuma.

Vegyület	ED <sub>50</sub> (nmol/kg, s.c.)		
	30'	60'	120'
<b>Morfin</b>	<b>6220,84<sup>a</sup></b> (4354,59–8709,18)	<b>6842,92</b> (4976,67–9642,30)	<b>40435,46</b> (14930,02-109797,82)
<b>M6SU</b>	<b>9578,54</b> (6568,14–13683,63)	<b>9304,87<sup>a</sup></b> (6020,80–13957,31)	<b>11220,58</b> (6841.82–18883.42)
<b>14-O-MeM6SU</b>	<b>267,32</b> (167,17–427,67)	<b>182,35<sup>a</sup></b> (110,52–300,46)	<b>366,97</b> (155,27–867,22)

**7.táblázat.** A 14-O-MeM6SU, M6SU és morfin fájdalomcsillapító hatása, hőszugár által kiváltott fájdalomra, patkány tail-flick teszten 20, 30, 60 és 120 perccel a vegyületek i.c.v. beadását követően.

A zárójelben lévő adatok a 95%-os konfidencia intervallumok. Dózisonként minimum 5 állat volt egy csoportban és 3-4 dózist használtunk, hogy meghatározzuk az ED<sub>50</sub> értékét.

<sup>a</sup> a hatás maximuma.

Vegyület	ED <sub>50</sub> (nmol/állat, i.c.v.)			
	20'	30'	60'	120'
<b>Morfin</b>	<b>55,365</b> (32,037–94,868)	<b>38,569<sup>a</sup></b> (22,084–67,496)	<b>49,145</b> (28,927–83,670)	-
<b>M6SU</b>	<b>0,573</b> (0,348–0,944)	<b>0,356<sup>a</sup></b> (0,179–0709)	<b>0,730</b> (0,462–1,155)	<b>0,966</b> (0,407–2,294)
<b>14-O-MeM6SU</b>	<b>0,0157<sup>a</sup></b> (0,0101–0,0240)	<b>0,0175</b> (0,0119–0,0253)	<b>0,0172</b> (0,0119–0,0248)	<b>0,0233</b> (0,0164–0,0331)

## 5. MEGBESZÉLÉS

### 5.1. DAMGO

Az elmúlt két évtizedben nagy figyelmet kapott a perifériás opioid receptorok vizsgálata, hiszen ha a perifériás opioid receptor agonistákkal erős fájdalomcsillapító hatás érhető el, akkor ezek a szerek alkalmasak lehetnek lokálisan, a sérülés, gyulladás helyén a fájdalom csillapítására súlyos centrális opioid mellékhatások nélkül.

Kísérleteinkben zsigeri gyulladásos fájdalom modellt alkalmaztunk. A zsigeri fájdalom kialakulásában részt vevő neurotranszmitterek, receptorok és ioncsatornák mennyiségileg és minőségileg is különböznek a szomatikus és a neuropátiás fájdalométól (Brumovsky és Gebhart, 2010; Robinson és Gebhart, 2008).

Állatmodelleken a zsigeri fájdalom az elülső hasfal izomzatán megfigyelhető visceromotoros választ vált ki a konvergencia miatt, s a fájdalom objektív mérésére alkalmas. Ilyen fájdalom váltható ki pl. experimentális colitis, ecetsav indukálta peritonitis és colorectalis distensio esetén is. A zsigeri konvergencia a szervek kereszt szenzitizációjához vezet, aminek eredményeként az egyik visceralis szerv fokozza a másik szervben kialakuló fájdalmat, ha azonos spinális szegmentumból idegződnek be (Brumovsky és Gebhart, 2010; Robinson és Gebhart, 2008). A konvergencia miatt a visceralis fájdalom rosszul lokalizált, diffúz és gyakran a szomatikus kisugárzás alapján azonosítható (Blackshaw és mtsai, 2007).

Számos receptor és ioncsatorna aktiválása vesz részt a visceralis fájdalom kialakulásában. Ilyen például a TRPV-1 (transient receptor potential vanilloid-1), Ca-csatornák, GABA-B csatorna, a  $\mu$ ,  $\delta$  és  $\kappa$  opioid receptorok és szomatosztatin receptorok (Ahlbeck, 2011).

Az opioid agonisták fájdalomcsillapító hatását korábban már kiterjedten tanulmányozták egéren, ecetsav által kiváltott zsigeri fájdalom modellen. Néhány tanulmány foglalkozik ugyan a MOR agonisták fájdalomcsillapító hatásával patkány zsigeri fájdalom modellen is (Harada és mtsai, 2000; Kharkevich és Churukanov, 1999), de ezekben az esetekben a vegyületeket rendszerint preventív, azaz a várható fájdalom előtt, alkalmazták.



A jelen vizsgálatban, ellentétben a korábbiakhoz, ahol a vegyületeket preventív azaz még a zsigeri fájdalom kiváltása előtt adták (Harada és mtsai, 2000; Hayashida és mtsai, 2003; Narayana Raju és mtsai, 2005), akkor adtuk a vegyületeket amikor már kialakult a zsigeri fájdalom, így sokkal jobban modellez egy klinikai állapotot.

Kísérleteinkben a DAMGO és a morfin mind perifériás, mind centrális alkalmazást követően, dóziszfüggően csökkentette a késői permanens zsigeri fájdalmat patkányoknál. I.c.v. injektált NAL-M-el végzett kísérleteinkben az egyidejűleg i.p. adagolt DAMGO fájdalomcsillapító hatását a perifériás opioid receptorokon keresztül fejtette ki, ezzel szemben az i.p. adagolt morfin ugyanezt a hatást a centrális MOR-on keresztül érte el, habár némi perifériás hatás itt is megfigyelhető volt. A DAMGO nagyon nagy affinitással kötődik a  $\mu$ -opioid receptorokhoz, ezerszer szelektívebben mint a  $\delta$ -opioid receptorokhoz (Handa és mtsai, 1981; Schiller és mtsai, 1989), fájdalomcsillapító hatása NAL-al antagonizálható, ezek alapján elmondható, hogy a megfigyelt hatást a  $\mu$ -opioid receptorok közvetítik.

A DAMGO és a morfin i.p. adagolva hasonló fájdalomcsillapító hatással rendelkezik, ezzel szemben i.c.v. adagolásnál a DAMGO 336-szor bizonyult hatékonyabbnak a morfinnál. Következésképpen az így kapott i.p./i.c.v. ED<sub>50</sub> dózis arány lényegesen magasabb a DAMGO esetében. A különbség a vegyületek vér-agy-gáton való penetrációjával magyarázható. A DAMGO fehérje szerkezetének köszönhetően nehezen jut át a vér-agy-gáton, ez azt sugallja, hogy i.p. beadást követően, a fájdalomcsillapító hatásért a perifériás opioid receptorok felelősek.

A kapott eredmények összhangban vannak a korábbi vizsgálatokkal, miszerint a MOR agonisták csökkentik a kémiai anyagok által kiváltott zsigeri fájdalmat perifériás és centrális adagolás mellett is (Al-Khrasani és mtsai, 2007; Porreca és mtsai, 1987; Takasuna és mtsai, 1994). A  $\mu$ -opioid szelektív dermorfin esetében is azt írták le, hogy intracerebroventrikularisan vagy intratekálisan (i.t.) adagolva sokkal hatékonyabb mint a morfin, ugyanakkor perifériás alkalmazás során hasonló hatékonysággal rendelkezik (Negri és Improta, 1984). Ezen kívül más fájdalom modellt, pl. tail-flick tesztet (hő által kiváltott fájdalom), használva az opioid agonisták hatásának vizsgálatára, i.t. (Riba és mtsai, 2002) és i.c.v. (He és Lee, 1997) adagolva a DAMGO ugyancsak erősebb hatást mutatott a morfinhoz képest patkányokon és egereken is. A vegyületek közötti ezen

eltéréseknek több oka is lehet, mint például a hatékonyság, a hatáserősség vagy a fizikai-kémiai tulajdonságaik.

Annak, hogy a DAMGO fájdalomcsillapító hatása különbözik centrálisan és perifériásan, a fent említett farmakokinetikai okok mellett farmakodinámiás okai is lehetnek. Farmakodinámiás ok lehet, hogy perifériásan kicsi a MOR készlet, emiatt ahhoz hogy a DAMGO i.p. kifejthesse fájdalomcsillapító hatását nagyobb dózisokra van szükség.

A MOR agonisták nagyobb hatással rendelkeznek az olyan szerveken, ahol magas a MOR készlet (Miller és mtsai, 1986). Korábbi vizsgálatokból ismert, hogy a DAMGO fájdalomcsillapító hatása intravénás (i.v.) adagolást követően gyorsan megszűnik, eliminációs fél-életideje mindössze 15 perc volt (Szeto és mtsai, 2001). Összehasonlításképpen, a morfin eliminációs fél-életideje 47,2 perc intravénás (iv.) adagolást követően (Hasegawa és mtsai, 2010). A DAMGO, hasonlóan a másik szelektív  $\mu$ -opioid agonista DADLA-hoz (H-Tyr-d-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>), csak korlátozottan tud bejutni a központi idegrendszerbe (Schiller 1990, Szeto 2001).

A DAMGO-val és morfinnal i.p. együtt adagolt naloxon mindkét vegyület fájdalomcsillapító hatását teljes mértékben kivédte így a perifériás és a centrális hatáskomponensek elkülönítésére nem alkalmas.

A kvaterner opioid antagonistákat viszont gyakran használják a centrális és perifériás opioid agonista hatás megkülönböztetésére. A legfőbb oka ennek az, hogy kisebb dózisban (esetünkben a használt NAL-M dózis 2130,83 nmol/kg volt) nem jutnak át a vér-agy gáton (Furst és mtsai, 2005; Khalefa és mtsai, 2013; Lewanowitsch és Irvine, 2002; Stein és mtsai, 1995). Ebből kiindulva, ha az i.p. adott kvaterner opioid antagonista, esetünkben NAL-M, nem gátolja a szintén i.p. adott agonista hatását, vagy ha az i.c.v. injektált NAL-M antagonozálja az i.p. adott agonista hatását, bizonyos, hogy a hatás a központi idegrendszer opioid receptorain jön létre.

Kísérleteink egyik legfontosabb eredménye az volt, hogy a kvaterner antagonista vegyület, a NAL-M, i.p. együtt adva a MOR agonistákkal (morfin vagy DAMGO), szignifikánsan csökkentette az agonista vegyületek fájdalomcsillapító hatását.

Az i.c.v. adott NAL-M részlegesen, de szignifikánsan gátolta az i.p. adott morfin hatását, ugyanakkor az i.p. adott DAMGO fájdalomcsillapító hatására nem volt befolyása. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az i.p. adott DAMGO

fájdalomcsillapító hatásában főleg perifériás és kevésbé centrális hatáskomponensek vesznek részt.

Ezzel ellentétben az i.p. adott morfin fájdalomcsillapító hatásában mind a perifériás mind a centrális opioid receptorok szerepet játszanak. Azokban az esetekben, (Al-Khrasani és mtsai, 2007; Fields, 2007; Takasuna és mtsai, 1994) amikor a morfint a kémiai stimulus (ecetsav) előtt adták, fájdalomcsillapító hatását a centrális opioid receptorokon keresztül váltotta ki. Ismert, hogy a fájdalomcsillapításban a központi idegrendszer mellett a perifériás opioid rendszer is részt vesz (Goicoechea és mtsai, 2008; Ji és mtsai, 2006; Nozaki-Taguchi és Yaksh, 1999; Stein és Lang, 2009). He és mtsai a metadonnal kapcsolatban kimutatták, hogy egereken és patkányokon végzett tail-flick teszten, mind szisztémásan, mind centrálisan adagolva fájdalomcsillapító hatását szignifikáns mértékben a perifériás opioid receptorokon fejt ki. A centrális és perifériás hatás elkülönítéséhez NAL-M-et használtak (He és mtsai, 2009). Eredményeink összhangban vannak olyan korábbi vizsgálatokkal ahol szintén kimutatták a morfin hatásának perifériás komponensét (He és mtsai, 2009; Labuz és mtsai, 2007). Klinikai kutatásokban a morfin intraartikuláris alkalmazását sokszor vizsgálták, sőt ma már alkalmazzák is terápiásan. Térd műtétek után helyileg adva, csökkenti a betegek fájdalmát, illetve mérsékli az egyéb fájdalomcsillapítók iránti igényt (Mousa és mtsai, 2007). A morfin lokális analgetikus hatását bizonyítja az a kísérlet is, amelyben lokálisan adott opioid antagonisták fokozta a posztoperatív fájdalmat (Stein és Lang, 2009). Fontos megfigyelés, hogy a lokálisan alkalmazott morfin fájdalomcsillapító hatását a perifériás opioid receptorokon keresztül fejt ki, így a centrális mellékhatásoktól nem kell tartani (Stein és mtsai, 2001).

Csoportunk korábbi vizsgálatban megállapította, hogy egy új morfin származék, a 14-*O*-metiloximorfon-6 $\beta$ -glicin (HS-731), korlátozottan tud csak bejutni a központi idegrendszerbe, patkány tail-flick teszten és egér zsigeri fájdalom modellen fájdalomcsillapító hatását a perifériás opioid receptorokon fejt ki (Al-Khrasani és mtsai, 2007; Furst és mtsai, 2005). Csoportunk azt is leírta, hogy a DAMGO preemtív szisztémás adagolást követően perifériás fájdalomcsillapító hatással rendelkezik egér zsigeri fájdalom modellen (Al-Khrasani és mtsai, 2007). Takasuna és mtsai (Takasuna és mtsai, 1994) leírták, hogy a loperamid, szemben a morfinnal, nem jut át könnyen a vér-agy gáton, így fájdalomcsillapító hatását perifériásan fejt ki (kísérleteiket egereken

végezték és vonaglásos tesztet használtak). Elektrofiziológiai bizonyítékok szintén alátámasztják, az opioidok fájdalomcsillapító hatásának perifériás oldalát. A patkányok szőrös bőrére lokálisan adott morfin gátolta a glutamát által a finomrostokban kiváltott fájdalmat (Tian és mtsai, 2005). Goicoechea és mtsai hot-plate teszt alkalmazásával kimutatták (Goicoechea és mtsai, 2008), hogy a fentanil analóg N-[1-fenilpirazol-3-yl]-N-[1-(2-fenetil)-4-piperidil] propenamid (IQMF-4) nagy affinitással és szelektivitással kötődik a MOR-hoz (Giron és mtsai, 2002) és fájdalomcsillapító hatását részben perifériás úton fejt ki. Az endomorfín analógok szintén rendelkeznek perifériás fájdalomcsillapító hatással egér zsigeri fájdalom modellen (Bedini és mtsai, 2010; Spampinato és mtsai, 2003).

A perifériás MOR funkcionális up-regulációja következik be viszonylag rövid ideig tartó, gyulladást kiváltó mediátor expozíció hatására (Berg és mtsai, 2007; Patwardhan és mtsai, 2006; Rowan és mtsai, 2009). Az opioid receptorok, mRNS-eik illetve fehérjéik jelenléte jól dokumentált a zsigeri szövetekben (Bagnol és mtsai, 1997; Fickel és mtsai, 1997; Pol és mtsai, 2001). Labuz és mtsai kimutatták, hogy az egér peritoneum perifériás idegvégződéseiben is expresszálnak  $\mu$ -,  $\kappa$ - és  $\delta$ -opioid receptorok (Labuz és mtsai, 2007). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az opioidok megfigyelt perifériás hatása a perifériás idegek végkészülékein jön létre.

Egyes kutatók úgy vélik, hogy a NAL-M kis mennyiségű NAL-al való szennyeződése az oka a NAL-M megfigyelt antagonistá hatásának (Bianchi és mtsai, 1982). Ebben az esetben az i.p. adott NAL-M teljesen gátolná az i.p. morfin hatását. Hogy elkerüljük ennek még a lehetőségét is, alacsony dózisu (2130,83 nmol/kg) NAL-M-et használtunk. Mindezek miatt valószínűtlennek tartjuk, hogy a NAL-M antagonistá hatása az i.p. morfinra vagy DAMGO-ra NAL szennyeződés következménye lenne. A fentiek tükrében érdemes lenne tudni, hogy mennyi idő alatt metabolizálódik a NAL-M, de erről nincsenek irodalmi adatok. Ezért, hogy teljesen kizárjunk a NAL-al való szennyeződés lehetőségét, megvizsgáltuk az i.c.v. injektált NAL-M hatását is az i.p. morfinra és DAMGO-ra. NAL-al való szennyeződés esetén az i.c.v. adott NAL-M teljesen gátolná az i.p. injektált morfin és DAMGO hatását.

A célkitűzésekben felállított kérdésekre az alábbi válaszokat kaptuk késői permanens zsigeri fájdalomnál, patkányokkal végzett kísérletekben:

1. A szisztémásan és centrálisan injektált DAMGO és morfin dózisfüggően csökkentette a fájdalmat.
2. A NAL-M szisztémásan együtt adva a DAMGO-val vagy a morfinnal szignifikánsan csökkentette azok fájdalomcsillapító hatását. A centrálisan injektált NAL-M szignifikánsan csökkentette a szisztémásan adagolt morfin hatását, ugyanakkor nem volt hatása a szisztémásan adagolt DAMGO fájdalomcsillapító hatására
3. Következtetés: a DAMGO fájdalomcsillapító hatását a perifériás opioid receptorokon keresztül fejt ki, míg a morfin ugyanezt a hatást a elsősorban a centrális MOR-on keresztül éri el.

A kapott eredmények újdonságértéke:

- Patkány vonaglásos kísérletek során először alkalmaztunk opioid fájdalomcsillapítást a fájdalom kialakulását követően, mely jobban modellezi a klinikai gyakorlatot.
- Ezen a teszten az alkalmazott dózisokban a szisztémásan adott DAMGO fájdalomcsillapító hatását a periférián fejt ki.

## **5.2. 14-O-Metilmorfin-6-O-szulfát**

A munkám másik része bemutatja egy új opioid agonista, a 14-O-MeM6SU farmakológiai tulajdonságait, összehasonlítva a M6SU-al, a morfinnal és a DAMGO-val *in vitro* és *in vivo* kísérletekben.

A vegyület megtervezése során fő szempontunk egy olyan kémiai szerkezet létrehozása volt, mely nagy affinitással, hatékonysággal és fájdalomcsillapító hatással rendelkezik és nem, vagy nehezen jut át a vér-agy gáton. A 14-O-MeM6SU esetében, a morfinhoz képest, a 14-es C-atom metoxi csoportja segíti a receptorális kötődést és biztosítja a magas hatékonyságot és hatáserősséget, a 6-os pozícióban jelen lévő szulfát csoport negatív töltése pedig a vér-agy gáton át történő penetrációt nehezíti meg.

A 14-O-MeM6SU patkány agyi membránpreparátumokon (kompetíciós kötés) magasabb affinitást mutat a MOR-ra mint a M6SU, morfin vagy a DAMGO. Emellett sokkal nagyobb a hatáserőssége és a hatékonysága a referencia vegyületeknél

izomkontrakció gátlását modellező kísérletekben (MVD, RVD), csakúgy, mint a [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési kísérletekben. A vegyület ezenkívül erős, és naloxonnal visszafordítható fájdalomcsillapító hatást mutatott patkány tail-flick teszten. I.c.v./s.c. effektív dózis arányok, ellentétben a morfinnal mind a 14-*O*-MeM6SU, mind a M6SU esetében magasak voltak.

**Kompetíciós kötési kísérletek.** Ezek során lehetőségünk volt biokémiai módszerekkel lemérni az interakciót vegyület és receptora között. A 14-*O*-MeM6SU gátolja a [<sup>3</sup>H]DAMGO, [<sup>3</sup>H]DIDII és a [<sup>3</sup>H]U69,593 specifikus kötődését a  $\mu$ ,  $\delta$  és  $\kappa$ -opioid receptorokhoz. Emellett 269-szer magasabb affinitást mutat a MOR-hoz mint a KOR-hoz, míg a DOR-hoz viszonyítva ez az affinitás 9-szer magasabb. A 14-*O*-MeM6SU a M6SU-hoz képest 10-szer nagyobb affinitással rendelkezik a MOR-ra, míg ez az érték DOR esetén 51-szeres patkány agyi membránpreparátumon. Érdekes még megjegyezni, hogy a morfinhoz képest a M6SU 2,6-szor kisebb affinitással rendelkezik a MOR-ra, míg 5,6-szor nagyobb az affinitással a DOR-ra. A morfinhoz képest ez az érték a 14-*O*-MeM6SU esetén 4-szer nagyobb affinitás a MOR-ra és 288-szor nagyobb affinitás a DOR-ra.

Eredményeink hasonlóak Oguri és mts-i (Oguri és mtsai, 1987) által kapott eredményekhez, akik leírták, hogy a M6SU-nak, a morfinhoz képest, 2-szer kisebb affinitása van a MOR-hoz és 30-szor nagyobb affinitása a DOR-hoz patkány agyi membránokon. A MOR/DOR szelektivitás közötti kis különbség ellenére a 14-*O*-MeM6SU képes megváltoztatni a [<sup>3</sup>H]DAMGO kötését a patkány agyi membránokhoz, mutatva ezzel, hogy ennek a morfin analógnak van a legnagyobb affinitása a MOR-hoz. Ezzel ellentétben a M6SU a [<sup>3</sup>H]DAMGO kötését kis affinitással szorítja le, sugallva ezzel, hogy a C-14-es pozícióban lévő metoxi csoport alapvető fontosságú a kötési folyamatban a morfin analógoknál.

**Funkcionális [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési kísérletek.** A 14-*O*-MeM6SU agonista, parciális agonista vagy antagonisták karakterének meghatározására mindhárom opioid receptoron funkcionális [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési kísérleteket végeztünk.

A receptorra kifejtett hatásuk alapján megkülönböztetünk teljes- (full) és parciális agonistákat, kevert agonista/antagonistákat és tiszta antagonistákat. A teljes agonisták a maximális farmakológiai hatás kiváltására képesek (pl. fentanil). A parciális agonisták az összes receptor elfoglalása után sem képesek a maximális hatás elérésére

(pl. buprenorfin). A kevert agonista/antagonista vegyületek jellemzője, hogy az egyik receptortípuson agonistaként, míg a másikon antagonistaként viselkednek (pl. nalbuphin). A tiszta antagonisták minden opioid receptoron gátló hatást fejtenek ki (pl. a naloxon).

Az opioid agonisták farmakológiai hatásukat a sejtmembránban lévő G fehérje kapcsolt receptorokon keresztül fejtik ki. Ezen receptorok agonisták általi aktivációját nem hasítható radioaktív izotóppal jelölt GTP analóg [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési kísérletekkel mérhetjük (Lorenzen és mtsai, 1993; Tian és mtsai, 1994). Ez a módszer lehetőséget ad a receptor-mediált G fehérjék opioidok általi aktivációjának direkt mérésére (Asano és Ross, 1984; Hilf és mtsai, 1989; Kurose és mtsai, 1986). A MOR agonisták hatékonysága megbecsülhető az agonista által stimulált [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötéssel (Emmerson és mtsai, 1996; Selley és mtsai, 1997; Traynor és Nahorski, 1995). Az így kapott E<sub>max</sub> értékeket számos farmakológus használja a hatékonyság mérésére (Emmerson és mtsai, 1996; Selley és mtsai, 1997; Strange, 2010; Traynor és Nahorski, 1995). Olyan körülmények között, ahol nincs receptor tartalék, a [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötés maximális stimulációja az agonista által elfoglalt receptoron egyenes összefüggésben áll az intrinsic hatékonyságával (Selley és mtsai, 1998).

Az E<sub>max</sub> értékek alapján a 14-*O*-MeM6S a DAMGO-éval azonos hatékonysági értékeket mutatott a [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötések aktivációjánál patkány agyi membránpreparátumokon, ugyanezen körülmények között a M6SU és a morfin gyengébb volt. Az így kapott hatékonyság tendenciájában mind a négy vegyületnél azonos volt az MVD és RVD kísérleteknél kapottakkal. A magas hatékonysággal rendelkező agonista 14-*O*-MeM6S és DAMGO minden kísérletnél magas aktivitást mutatott, míg a részleges MOR agonista morfin és M6SU hatástalan volt RVD-n, az MVD és [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési kísérletekben pedig nem tudott maximális hatást kifejteni.

Munkánk során biokémiai és biológiai módszereket alkalmaztunk, hogy meghatározzuk a teszt vegyületek receptor konstansát. Az effektív MOR tartalékok mindhárom vizsgálati módszernél (MVD, RVD és agyi membrán) különbözőek voltak, ennek ellenére összehasonlíthatóak a kapott hatékonysági értékek. Megerősítettük a 14-*O*-MeM6S és a DAMGO teljes agonista-, míg a M6SU és a morfin részleges agonista jellegét. A kapott eredmények összhangban állnak azzal a korábbi megfigyeléssel, miszerint a metoxi csoport jelenléte C-14-es pozícióban hatással van az új vegyületek

hatékonyságára és hatáserősségére (Al-Khrasani és mtsai, 2007; Riba és mtsai, 2010; Spetea és Schmidhammer, 2012).

Az elmúlt évtized során kutatócsoportunk együttműködve Helmut Schmidhammer kutatócsoportjával, számos 14-*O*-methoxyloxymorfon farmakológiai tulajdonságait vizsgálta meg. Schmidhammer és munkatársai számos 14-alkoxy származékot vizsgált meg és azt találták, hogy magas kötési affinitással rendelkeznek mindhárom típusú opioid receptorhoz, valamint magas az agonista aktivitásuk *in vitro* és *in vivo* körülmények között is. A vizsgált vegyületek között a 14-*O*-methyloxymorfon-6 $\beta$ -glicin (HS-731) és a 14-ethoxymetopon magas kötési affinitással rendelkezik a MOR és a DOR esetén, viszont a KOR-hoz való affinitása gyenge (Furst és mtsai, 2005; Lattanzi és mtsai, 2005). A 14-*O*-methyloxymorfon teljes vagy majdnem teljes agonistaként viselkedik a MOR-on [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési kísérletekben (patkány és tengerimalac agy homogenizátumot használva) csakúgy, mint RVD-n (Riba és mtsai, 2010). Összehasonlítva a 14-*O*-methyloxymorfon agonista hatékonyságát és hatáserősségét a kiindulási vegyülettel, az oximorfonnal, jelentősebb MOR aktivitást láthatunk.

A jelen kísérletekben kapott eredmények a 14-*O*-MeM6SU-al, M6SU-al és morfínnal egybecsengenek azokkal, amit korábban csoportunk a HS-731 esetén megfigyelt (Al-Khrasani és mtsai, 2007; Furst és mtsai, 2005; Spetea és mtsai, 2004).

**Izolált szervekkel végzett kísérletek.** A *vas deferens* preparátumok noradrenerg neuronokat tartalmaznak, elektromos impulzussal kontrakció váltható ki rajtuk. Ez a hatás preszinaptikus elhelyezkedésű opioid receptorokon keresztül gátolható. Ezért alkalmas ez a modell az opioid agonista hatás vizsgálatára. Kísérleteink során 2 féle szervpreparátumot használtunk, melyek opioid receptor készlete eltérő. Az egér *vas deferens* (MVD) mindhárom típusú opioid-receptorral rendelkezik, bár eltérő mennyiségben (DOR>MOR>KOR) (Hutchinson és mtsai, 1975; Leslie, 1987; Lord és mtsai, 1977), míg a patkány *vas deferens* (RVD) csak kis mennyiségben tartalmaz  $\mu$ -opioid receptorokat (Smith és Rance, 1983), ezért ezen csak olyan vegyületek hatnak, melyeknek nagy az intrinsic aktivitásuk.

**MVD.** Az MVD-vel való kísérletek során a 14-*O*-MeM6SU bizonyult a leghatékonyabb opioid agonistának,  $K_e$  értéke a NAL-al szemben 0,66-1,92 nM között mozgott, hasonlóan a DAMGO-hoz, mutatva ezzel, hogy hatását ebben a koncentráció tartományban MOR-okon keresztül fejt ki. Ugyanilyen körülmények között a DOR



antagonista NTI  $K_e$  értéke a 14-*O*-MeM6SU-al szemben 92-szer volt magasabb, mint a DOR agonista DADLE-val szemben. Továbbá a KOR antagonista nor-BNI  $K_e$  értéke 14-*O*-MeM6SU-al szemben 67-szer volt magasabb, mint a KOR agonista EKC-val szemben. Ha NAL 14-*O*-MeM6SU-al szembeni  $K_e$  értékeit összehasonlítjuk a MOR-ra nagyon szelektív kontroll vegyület, DAMGO értékeivel megállapíthatjuk, hogy ezen kísérleti körülmények között a két vegyület azonos receptoron hat. Eredményeink megegyeznek Miller és mts-i által kapott eredményekkel, melyekben a NAL  $K_e$  értékei a DAMGO-val és a morfinnal szemben hasonló értéktartományban vannak (Miller és mtsai, 1986). Eredményeink megerősítésképpen megállapítottuk az NTX  $K_e$  értékeit mindkét vizsgált vegyülettel szemben. A 14-*O*-MeM6SU esetében 0,63 nM-t, míg a DAMGO esetében 0,27 nM-t kaptunk (nem szerepel az eredmények között) mely összhangban van az NTX korábban MOR-ra megállapított affinitásával (Al-Khrasani és mtsai, 2007; Gyires és mtsai, 1997). MVD-n a 14-*O*-MeM6SU és a DAMGO magasabb maximális gátlást mutat, mint a M6SU vagy a morfin. A 14-*O*-MeM6SU superior intrinsic hatékonysága 99% volt, míg a DAMGO-é 97%, ehhez képest a M6SU és a morfin submaximális gátló hatása nem érte el az 50%-ot. Habár a 14-*O*-MeM6SU a használt koncentrációban gátló hatását a MOR-on fejt ki, nem zárható ki, hogy magasabb koncentrációban a DOR-ra és KOR-ra is hatással van.

Az, hogy egy szövet hogyan reagál egy opioidra az több tényezőtől függ: a vegyület affinitásától, intrinsic aktivitásától és a biológiai rendszer tartalék (spare) receptorainak számától. Például a  $\mu$ -receptor agonista DAMGO ugyanúgy viselkedik a tengerimalac ileum, RVD és MVD preparátumokon, hatáserőssége viszont különbözik a preparátumonként. Ez a különbség a receptorkészlet és a tesztelt vegyület intrinsic aktivitásából adódik.

**RVD.** Az RVD-vel végzett kísérletek során szintén megvizsgáltuk a 14-*O*-MeM6SU, M6SU és a referencia vegyületek (DAMGO, morfin) agonista aktivitását. Mind a 14-*O*-MeM6SU mind a DAMGO gátló hatást produkált 80% feletti értékekkel, míg a M6SU-nak és a morfinnak nem volt hatása (a M6SU és morfin által kiváltott receptor aktiváció nem elegendő ahhoz, hogy agonista választ kapjunk). Mindez, illetve az MVD-vel való kísérletek eredményei arra utalnak, hogy a 14-*O*-MeM6SU, hasonlóan a DAMGO-hoz magasabb hatékonyságot mutat a másik két vegyületnél. A patkány *vas deferensen* nagyon kevés opioid receptor található és tulajdonságaik megegyeznek a

perifériás szövetekben található  $\mu$ -opioid receptorokéval (Miller és mtsai, 1986; Smith és Rance, 1983). Ezen tulajdonságai alapján kiválóan alkalmas a vizsgálni kívánt vegyületek hatáserősségének és hatékonyságának meghatározására. DAMGO-val és morfinnal kapott eredményeink összhangban vannak csoportunk és más kutatócsoportok korábbi eredményeivel, miszerint a DAMGO sokkal hatásosabb és sokkal nagyobb  $E_{\max}$  értékkel rendelkezik a morfinnál (Al-Khrasani és mtsai, 2007; Riba és mtsai, 2010). Más módszerek alkalmazása is ehhez az eredményhez vezetett. A MOR részleges, irreverzibilis inaktivációja váltható ki  $\beta$ -funaltrexamin-al ( $\beta$ -FNA) MVD-n. A DAMGO ezt követően is teljes agonistaként működött, míg a morfin részleges agonistaként (Al-Khrasani és mtsai, 2001; Ronai és mtsai, 2006). A  $\beta$ -FNA képes a MOR készlet csökkentésére *in vitro* és *in vivo* körülmények között, csökkentve ezzel a morfin maximális hatását mindkét típusú kísérletnél (Adams és mtsai, 1990; Al-Khrasani és mtsai, 2001; Ronai és mtsai, 2006).

MVD-vel és RVD-vel végzett kísérleteinkben demonstráltuk a vizsgált vegyületek közötti  $E_{\max}$  érték különbségeket. A morfin és M6SU kis mértékű gátló hatása RVD-n, szemben a 14-*O*-MeM6S és a DAMGO hatásával, alacsony intrinsíc hatékonyságával magyarázható.

**Patkány tail-flick teszt.** A 14-*O*-MeM6SU fájdalomcsillapító hatását patkány tail-flick teszten is megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a M6SU-al és a morfinnal, a vegyületeket s.c. és i.c.v. adagoltuk, majd a kezelést követően történtek a mérések. S.c. injekció után a 14-*O*-MeM6SU jelentős, dózis függő fájdalomcsillapító hatást mutatott, a hatás már 48,05 nmol/kg-os mennyiségben jelentkezett és a dózis növelésével együtt növekedett. Ugyanez a hatás a M6SU esetében 5145,05 nmol/kg-nál, míg a morfin esetében 3888,02 nmol/kg-nál kezdődött. I.c.v. adagolás után a 14-*O*-MeM6SU 2457-szer, míg a M6SU 108-szor volt hatékonyabb a morfinnál. A M6SU-al kapott eredményeink összhangban vannak más csoportok korábbi eredményeivel patkány és egér kísérletekben i.c.v. adagolást követően (Brown és mtsai, 1985; Holtman és mtsai, 2010; Mori és mtsai, 1972; Zuckerman és mtsai, 1999). Jelen kísérletsorozat elsődlegesen vizsgált vegyülete a 14-*O*-MeM6SU sokkal erősebb fájdalomcsillapító hatást produkált s.c. és i.c.v. adagolást követően, mint a referenciavegyületek (M6SU és morfin).

Összehasonlítottuk a vizsgált vegyületek s.c./i.c.v. arányait is. A 14-*O*-MeM6SU, csakúgy mint a M6SU magasabb arányt mutatott a morfinnál. A M6SU és a morfin esetén voltak már hasonló megfigyelések. Borow és mts-i (Brown és mtsai, 1985) szerint a M6SU esetén kapott gyenge s.c. hatás a KIR-be való részleges bejutásával magyarázható. Valószínűleg hasonló a magyarázat a 14-*O*-MeM6SU esetében is.

A 14-*O*-MeM6SU előnyei a M6SU-al szemben *in vitro* mutatott magasabb hatékonysága és affinitása, illetve *in vivo* mutatott fájdalomcsillapító hatása is sokkal jelentősebb mind szisztémás, mind centrális adagolást követően. A 14-*O*-MeM6SU kötési affinitási profilja az  $\mu$  és  $\delta$  opioid receptorokra jelentősebb, mint a M6SU-é vagy a morfiné, a MOR/DOR affinitás aránya viszont csak 9. Holtman és mts-i (Holtman és mtsai, 2010) úgy gondolják, hogy a M6SU fokozott hatása neuropátiás és gyulladásos fájdalomnál pont a a morfinálól különböző (DOR/MOR) kötési profiljában rejlik. Ebből kiindulva érdemes lenne megvizsgálni a 14-*O*-MeM6SU fájdalomcsillapító hatását neuropátiás és gyulladásos patkány modellen. A vegyületek különböző modelleken való tesztelése, nagyon fontos azok opioid tulajdonságainak meghatározásában, ez teszi lehetővé azt, hogy valós képet kapjunk a róluk. A berlini egyetemmel együttműködve megvizsgáltuk a 14-*O*-MeM6SU hatását intraplantárisan Freund's adjuvánszal előidézett gyulladásos modellen. Ezen a modellen a 14-*O*-MeM6SU, a fentanil, met-enkefalin és  $\beta$ -endorfin dózisfüggően csillapították a gyulladásos fájdalmat. Mindközül a legjelentősebb fájdalomcsillapító hatással a 14-*O*-MeM6SU rendelkezett. A kapott fájdalomcsillapító hatást a lokálisan adott NAL-M felfüggesztette (Khalefa és mtsai, 2013). Ez az eredmény arra utal, hogy a 14-*O*-MeM6SU lokális fájdalomcsillapító hatással is rendelkezik.

Összességében elmondható, hogy eredményeink megerősítik korábbi vizsgálatainkat, miszerint a 14-*O*-metoxi csoport a morfinon és oxymorfonon nagy affinitást, hatékonyságot és fájdalomcsillapító hatást eredményez anélkül, hogy szignifikánsan megváltoztatná a receptorkötési tulajdonságokat. Érdemes megjegyezni, hogy a 14-*O*-MeM6SU, ellentétben a M6SU-al és a morfinnal nagy hatékonyságot mutat G-fehérje aktivációnál és izolált szerveknél is (MVD, RVD).

Elképzelhető, hogy a MOR agonista DAMGO és a 14-*O*-MeM6SU nagy hatékonyságának az oka, hogy hatásukat egy alternatív splice variáns MOR-on keresztül

fejtik ki, mely nagyobb affinitással köti őket, mint a morfint vagy a M6SU-ot (Rossi és mtsai, 1997). Az is lehetséges, hogy a tesztelt vegyületek különböző módon okoznak receptor deszenzitizációt (pl. receptor internalizáció, endocitózis, foszforiláció, receptor szétkapcsolás) (Kelly és mtsai, 2008; Patierno és mtsai, 2011). Magyarázat lehet még, hogy a 14-*O*-MeM6SU és a DAMGO, ellentétben a morfinnal és M6SU-al, az alkalmazott koncentrációkban  $\beta$ -arrestin mediálta jelátviteli utat aktivál a Gs-mediált jelátvitel helyett (DeWire és mtsai, 2007; Frolich és mtsai, 2011; Rodriguez-Munoz és mtsai, 2007; Shukla és mtsai, 2008).

A célkitűzésekben felállított kérdésekre az alábbi válaszokat kaptuk.

1. Az izolált szervekkel történő kísérletek (MVD, RVD) illetve a receptorkötéses és G-protein aktivációs kísérletek alapján elmondható, hogy a 14-*O*-MeM6SU nagyobb hatáserősséggel, affinitással és hatékonysággal rendelkezik, mint a referencia vegyületek. A 14-*O*-MeM6SU DOR/MOR aránya 10-szeres.
2. Patkány tail-flick teszten, szisztémás adagolást követően, a 14-*O*-MeM6SU a morfinnál 34-szer, a M6SU-nál 51-szer nagyobb hatékonysággal rendelkezik, centrális adagolást követően a morfintól 2456-szor, míg a M6SU-tól 23-szor hatékonyabb fájdalomcsillapító hatással rendelkezik. Magas s.c./i.c.v. arány limitált KIR penetrációra utal.

A kapott eredmények újdonságértéke:

- Az általunk szintetizált 14-*O*-MeM6SU erőteljes fájdalomcsillapító hatással rendelkezik, tulajdonságai alapján a klinikai gyakorlatban is hasznos lehet.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

Sokáig a központi idegrendszernek kizárólagos szerepet tulajdonítottak az opioidok fájdalomcsillapító hatásában. Ezen opioidok a felszálló fájdalmat közvetítő pályák átkapcsolási helyein csökkentik az ingerület átvitelt, illetve a leszálló analgetikus pályák aktivitását fokozzák. A hatás kifejtéséhez az opioidoknak be kell jutniuk a központi idegrendszerbe, így súlyos centrális mellékhatásokat okoznak.

A centrális mellékhatások elkerülése a periférián ható opioidok kifejlesztésével érhető el. A nemrégiben felismert perifériás opioid receptorok és ezek szerepe a gyulladásos fájdalomcsillapításban, izgalmas lehetőségeket nyitott meg a fájdalom kutatásában és terápiájában. Az elmúlt évek intenzív kutatási eredményei közé tartozik, hogy a perifériás szöveti sérülés, illetve gyulladás meghatározó szerepét felismerték az opioidok perifériás fájdalomcsillapításában.

Kísérletekkel sikerült bizonyítani, hogy ilyen körülmények között fokozódik a primer szenzoros afferensen található opioid receptorok száma, illetve a leukocitákkal infiltrált gyulladt szövetekből endogén opioidok szabadulnak fel. Habár a korai vizsgálatok nem tudták a perifériás opioid fájdalomcsillapítás lehetőségét bizonyítani fiziológiás szöveti körülmények között, több eredmény született a patológiás fájdalom csillapításában. Így a perifériásan ható opioidok a gyulladásos, daganatos, viscerális és csontfájdalmakban egyaránt hatékonyak bizonyultak, míg a neuropátiás fájdalomban hatásuk további vizsgálat tárgyát képezi. A fájdalomcsillapításon és gyulladáscsökkentésen kívül szerepet játszanak a sebgyógyulásban is.

A kutatások új irányjai ezen perifériásan ható opioidokkal kapcsolatosak, a kívánt vegyületek akkor lennének ideálisak, ha az opioid receptorokat a központi idegrendszeren kívül aktiválnák, így a centrális nem kívánt mellékhatások nem korlátoznák terápiás használatukat. A klinikai gyakorlatban a morfin lokális alkalmazása – bizonyos fájdalmak csillapítására - már széles körben elfogadott, míg szisztémásan adható, szelektíven a periférián ható gyógyszerek még hiányoznak a klinikusok tárházából.

Klinikai gyakorlatban már használnak lokálisan opioid agonistákat, de szükség lenne szisztémásan beadható perifériásan ható új gyógyszerekre is.

Kísérleteink a DAMGO-val, illetve az új vegyület, a 14-*O*-MeM6SU megtervezése és az ezzel való kutatómunka a fenti céllal születtek.

A kapott eredmények azt mutatják, hogy a MOR agonisták gátolják az ecetsav által kiváltott, már kialakult zsigeri fájdalmat. A morfinnak ez a fájdalomcsillapító hatása a centrális és perifériás MOR aktivációján keresztül valósul meg, míg a DAMGO esetében ez főként a perifériás MOR-on keresztül történik. A morfin és a DAMGO i.p. injekció esetén hasonló hatásereőséggel rendelkezik, ugyanakkor az i.c.v. injekciónál a morfin 200-szor a DAMGO 1000-szer bizonyult hatékonyabbnak az i.p. eredményeknél. Fontos új eredmény, hogy kísérleteinkben a MOR agonisták a már tartósan fennálló zsigeri fájdalom esetében mutattak fájdalomcsillapító hatást. Ez a fent említettek miatt lényeges nagyon, mert klinikai körülmények között a már kialakult fájdalom csillapítására van szükség.

A vizsgált új vegyület a 14-*O*-MeM6SU magasabb kötési affinitást mutat a MOR, DOR és KOR esetén mint a morfin vagy a M6SU. Szelektivitása a MOR és a DOR esetében nem mutat nagy különbséget. A 14-*O*-MeM6SU a DAMGO-hoz hasonlóan nagy hatékonysággal rendelkezik izolált szervekkel végzett kísérletekben (MVD és RVD) illetve a [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési kísérletekben. A 14-*O*-MeM6SU a morfinnál és a M6SU-nál sokkal hatékonyabb fájdalomcsillapító hatással rendelkezik, ezenkívül magas a s.c./i.c.v. aránya, hasonlóan a M6SU-hoz patkány tail-flick teszten. Ezen tulajdonságai alapján, hasznos opioid fájdalomcsillapító lehet a klinikai gyakorlatban is.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Egyre több irodalmi adat támasztja alá a perifériás opioid rendszer szerepét a fájdalomcsillapításban. Munkám fő célja a MOR agonisták perifériás antinociceptív hatásának további bizonyítása. Kísérleteinkben patkányokban ecetsavval indukált vonaglászós tesztben (writhing test), ill. termális nociceptív tesztben (rat-tail flick, RTF) vizsgáltuk a fájdalomcsillapító hatásokat centrális és perifériás adagolási módok mellett. Egy általunk tervezett és szintetizált új vegyület a 14-*O*-Metilmorfin-6-*O*-szulfát támadáspontjának és hatásspektrumának vizsgálatát folytattuk in vitro és in vivo modellekben. E kísérletsorozatunk célja a vér-agy gáton át nem jutó, perifériásan ható opioid vegyületek hatás-szerkezetének elemzése volt. Patkányokban a vonaglászós teszten DAMGO és morfin szisztémásan (i.p.) vagy centrálisan (i.c.v.) injektálva dózisfüggően gátolták a fájdalmi reakciót. A DAMGO és a morfin ED<sub>50</sub> értéke szisztémás adagolásnál összemérhető volt, ugyanakkor centrálisan alkalmazva a DAMGO sokkal hatékonyabbnak bizonyult. A quaterner opioid antagonistá N-Metilnaloxon (NAL-M) i.p. illetve i.c.v. adva arra utal, hogy a szisztémásan adagolt morfin fájdalomcsillapító hatásában mind perifériás mind centrális, míg a DAMGO-nál a perifériás jelleg dominál. A 14-*O*-MeM6SU opioid tulajdonságait (hatékonyság, hatáserősség, affinitás) izolált szerveken (egér *vas deferens*, MVD és patkány *vas deferens*, RVD), receptor kötési kísérletekben elemeztük illetve szisztémás (s.c.) és centrális (i.c.v.) fájdalomcsillapító hatását vizsgáltuk RTF-en. Referens kísérletekben a morfin-6-*O*-szulfát-ot (M6SU), a morfint és a MOR szelektív DAMGO-t használtuk. MVD-n a 14-*O*-MeM6SU hatékonyabb volt, mint a M6SU, morfin vagy DAMGO. A kapott naloxon K<sub>e</sub> érték MOR mediált hatásra utal. RVD-n az E<sub>max</sub> értékek alapján a 14-*O*-MeM6SU és a DAMGO teljes agonisták, míg M6SU és morfin részleges agonisták. Ezt a megfigyelést G-protein aktivációs kísérleteink is alátámasztották. A kötési kísérletekben 14-*O*-MeM6SU alacsony ( $\delta/\mu$ ) és magas ( $\kappa/\mu$ ) szelektivitást mutatott. 14-*O*-MeM6SU, M6SU és morfin s.c. és i.c.v. fájdalomcsillapító hatását vizsgáltuk RTF-en. Ezen a teszten a 14-*O*-MeM6SU volt a legpotensebb analgetikum. A 14-*O*-MeM6SU- és M6SU magasabb i.c.v./s.c. aránya limiltált KIR penetrációjára utal. A kapott eredmények alapján reménykeltőnek látszik, hogy a 14-*O*-MeM6SU ill. a tapasztalatok alapján továbbfejlesztett származékai a klinikai gyakorlat számára is alkalmas, biztonságos fájdalomcsillapítók előállítására lehetnek alkalmasak.

## 8. SUMMARY

Growing data support the role of peripheral opioid system in relieving pain. The main objective of my work was to provide further proof for the peripheral antinociceptive effect of MOR agonists. In our experiments, we applied writhing test induced by acetic acid in rats or thermal nociceptive tests (rat tail-flick, RTF) to demonstrate the antinociceptive effects of test compounds following peripheral or central administrations. We studied the pharmacological effect of a new compound, 14-*O*-Methylmorphine-6-*O*-sulfate, designed and synthesised by us, in *in vitro* and *in vivo* models. The main goal of these experiments was to analyse the structure activity relationship of opioid compounds unable to penetrate through the blood brain barrier. In writhing tests in rats, DAMGO and morphine, injected systemically (i.p.) or centrally (i.c.v.), dose-dependently inhibited pain responses. After systemic administration, the analgesic ED<sub>50</sub> values of DAMGO and morphine were comparable, however, after central injections DAMGO proved to be more effective than morphine. The quaterner opioid antagonist N-Methylnaloxone (NAL-M) injected i.p. or i.c.v. reveal that systemically administered morphine has both peripheral and central antinociceptive effects, in case of DAMGO the peripheral effect was dominated. The opioid properties of 14-*O*-MeM6SU (potency, efficacy, receptor preference) were analysed in isolated organs (mouse *vas deferens*, MVD and rat *vas deferens*, RVD) and receptor-binding experiments; its systemic (s.c.) and central (i.c.v.) analgesic effects were studied in vivo (RTF). Morphine-6-*O*-sulphate (M6SU), morphine and MOR-selective DAMGO as reference ligands were used. In MVD, 14-*O*-MeM6SU was more potent than M6SU, morphine or DAMGO. The obtained naloxone K<sub>e</sub> value refers to MOR-mediated effect. In RVD, based on E<sub>max</sub> values, 14-*O*-MeM6SU and DAMGO are full agonists, whereas M6SU and morphine are partial agonists. This observation was also supported by our G-protein activation experiments. In binding experiments, 14-*O*-MeM6SU showed low ( $\delta/\mu$ ) and high ( $\kappa/\mu$ ) selectivity. In RTF test, 14-*O*-MeM6SU was the most potent analgesic. The higher i.c.v./s.c. ratio of 14-*O*-MeM6SU and M6SU referred to limited central nervous system penetration. Based on the obtained results, it seems promising that approach used to develop 14-*O*-MeM6SU and its derivatives, may be suitable to generate safe analgesics for clinical practice.



## 9. IRODALOMJEGYZÉK

Adams, J.U., Paronis, C.A., Holtzman, S.G., 1990. Assessment of relative intrinsic activity of mu-opioid analgesics in vivo by using beta-funaltrexamine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 255, 1027-1032.

Ahlbeck, K., 2011. Opioids: a two-faced Janus. *Current medical research and opinion* 27, 439-448.

Akins, P.T., McCleskey, E.W., 1993. Characterization of potassium currents in adult rat sensory neurons and modulation by opioids and cyclic AMP. *Neuroscience* 56, 759-769.

Al-Khrasani, M., Orosz, G., Kocsis, L., Farkas, V., Magyar, A., Lengyel, I., Benyhe, S., Borsodi, A., Ronai, A.Z., 2001. Receptor constants for endomorphin-1 and endomorphin-1-ol indicate differences in efficacy and receptor occupancy. *European journal of pharmacology* 421, 61-67.

Al-Khrasani, M., Spetea, M., Friedmann, T., Riba, P., Kiraly, K., Schmidhammer, H., Furst, S., 2007. DAMGO and 6beta-glycine substituted 14-O-methyloxymorphone but not morphine show peripheral, preemptive antinociception after systemic administration in a mouse visceral pain model and high intrinsic efficacy in the isolated rat vas deferens. *Brain research bulletin* 74, 369-375.

Almeida, T.F., Roizenblatt, S., Tufik, S., 2004. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain research* 1000, 40-56.

Asano, T., Ross, E.M., 1984. Catecholamine-stimulated guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) binding to the stimulatory GTP-binding protein of adenylate cyclase: kinetic analysis in reconstituted phospholipid vesicles. *Biochemistry* 23, 5467-5471.

Bagnol, D., Mansour, A., Akil, H., Watson, S.J., 1997. Cellular localization and distribution of the cloned mu and kappa opioid receptors in rat gastrointestinal tract. *Neuroscience* 81, 579-591.

Bedini, A., Baiula, M., Gentilucci, L., Tolomelli, A., De Marco, R., Spampinato, S., 2010. Peripheral antinociceptive effects of the cyclic endomorphin-1 analog c[YpwFG] in a mouse visceral pain model. *Peptides* 31, 2135-2140.

Bentley, G.A., Newton, S.H., Starr, J., 1981. Evidence for an action of morphine and the enkephalins on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. *British journal of pharmacology* 73, 325-332.

Benyhe, S., Farkas, J., Toth, G., Wollemann, M., 1997. Met5-enkephalin-Arg6-Phe7, an endogenous neuropeptide, binds to multiple opioid and nonopioid sites in rat brain. *Journal of neuroscience research* 48, 249-258.

Berg, K.A., Patwardhan, A.M., Sanchez, T.A., Silva, Y.M., Hargreaves, K.M., Clarke, W.P., 2007. Rapid modulation of micro-opioid receptor signaling in primary sensory neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 321, 839-847.

Bianchi, G., Fiocchi, R., Tavani, A., Manara, L., 1982. Quaternary narcotic antagonists' relative ability to prevent antinociception and gastrointestinal transit inhibition in morphine-treated rats as an index of peripheral selectivity. *Life sciences* 30, 1875-1883.

Blackshaw, L.A., Brookes, S.J., Grundy, D., Schemann, M., 2007. Sensory transmission in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 19, 1-19.

Borgland, S.L., Connor, M., Christie, M.J., 2001. Nociceptin inhibits calcium channel currents in a subpopulation of small nociceptive trigeminal ganglion neurons in mouse. *The Journal of physiology* 536, 35-47.

Braz, J., Beaufour, C., Coutaux, A., Epstein, A.L., Cesselin, F., Hamon, M., Pohl, M., 2001. Therapeutic efficacy in experimental polyarthritis of viral-driven enkephalin overproduction in sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 7881-7888.

Brown, C.E., Roerig, S.C., Burger, V.T., Cody, R.B., Jr., Fujimoto, J.M., 1985. Analgesic potencies of morphine 3- and 6-sulfates after intracerebroventricular administration in mice: relationship to structural characteristics defined by mass

spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Journal of pharmaceutical sciences* 74, 821-824.

Brumovsky, P.R., Gebhart, G.F., 2010. Visceral organ cross-sensitization - an integrated perspective. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 153, 106-115.

Chavkin, C., James, I.F., Goldstein, A., 1982. Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. *Science* 215, 413-415.

Coggeshall, R.E., Tate, S., Carlton, S.M., 2004. Differential expression of tetrodotoxin-resistant sodium channels Nav1.8 and Nav1.9 in normal and inflamed rats. *Neuroscience letters* 355, 45-48.

Coggeshall, R.E., Zhou, S., Carlton, S.M., 1997. Opioid receptors on peripheral sensory axons. *Brain research* 764, 126-132.

DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J., Shenoy, S.K., 2007. Beta-arrestins and cell signaling. *Annual review of physiology* 69, 483-510.

Donnerer, J., Cardinale, G., Coffey, J., Lisek, C.A., Jardine, I., Spector, S., 1987. Chemical characterization and regulation of endogenous morphine and codeine in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 242, 583-587.

Dores, R.M., Khachaturian, H., Watson, S.J., Akil, H., 1984. Localization of neurons containing pro-opiomelanocortin-related peptides in the hypothalamus and midbrain of the lizard, *Anolis carolinensis*: evidence for region-specific processing of beta-endorphin. *Brain research* 324, 384-389.

Eisenberg, E., Suzan, E., 2014. Drug combinations in the treatment of neuropathic pain. *Current pain and headache reports* 18, 463.

Emmerson, P.J., Clark, M.J., Mansour, A., Akil, H., Woods, J.H., Medzihradsky, F., 1996. Characterization of opioid agonist efficacy in a C6 glioma cell line expressing the mu opioid receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 278, 1121-1127.

Fickel, J., Bagnol, D., Watson, S.J., Akil, H., 1997. Opioid receptor expression in the rat gastrointestinal tract: a quantitative study with comparison to the brain. *Brain research. Molecular brain research* 46, 1-8.

Fields, H.L., 2007. Understanding how opioids contribute to reward and analgesia. *Regional anesthesia and pain medicine* 32, 242-246.

Fowler, C.J., Fraser, G.L., 1994. Mu-, delta-, kappa-opioid receptors and their subtypes. A critical review with emphasis on radioligand binding experiments. *Neurochemistry international* 24, 401-426.

Frolich, N., Dees, C., Paetz, C., Ren, X., Lohse, M.J., Nikolaev, V.O., Zenk, M.H., 2011. Distinct pharmacological properties of morphine metabolites at G(i)-protein and beta-arrestin signaling pathways activated by the human mu-opioid receptor. *Biochemical pharmacology* 81, 1248-1254.

Furst, S., 2007. Opioid agonisták és opioid antagonisták. *Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest.*

Furst, S., 2008. Centrális és perifériás mechanizmusok szerepe a fájdalomcsillapításban. *Neuropsychopharmacologica Hungarica*, 127-130.

Furst, S., Riba, P., Friedmann, T., Timar, J., Al-Khrasani, M., Obara, I., Makuch, W., Spetea, M., Schutz, J., Przewlocki, R., Przewlocka, B., Schmidhammer, H., 2005. Peripheral versus central antinociceptive actions of 6-amino acid-substituted derivatives of 14-O-methyloxymorphone in acute and inflammatory pain in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 312, 609-618.

Furst, Z., Buzas, B., Friedmann, T., Schmidhammer, H., Borsodi, A., 1993. Highly potent novel opioid receptor agonist in the 14-alkoxymetopon series. *European journal of pharmacology* 236, 209-215.

Giron, R., Abalo, R., Goicoechea, C., Martin, M.I., Callado, L.F., Cano, C., Goya, P., Jagerovic, N., 2002. Synthesis and opioid activity of new fentanyl analogs. *Life sciences* 71, 1023-1034.

Goicoechea, C., Sanchez, E., Cano, C., Jagerovic, N., Martin, M.I., 2008. Analgesic activity and pharmacological characterization of N-[1-phenylpyrazol-3-yl]-N-[1-(2-phenethyl)-4-piperidyl] propenamide, a new opioid agonist acting peripherally. *European journal of pharmacology* 595, 22-29.

Gold, M.S., Levine, J.D., 1996. DAMGO inhibits prostaglandin E2-induced potentiation of a TTX-resistant Na<sup>+</sup> current in rat sensory neurons in vitro. *Neuroscience letters* 212, 83-86.

Greenberg, S.A., 2003. The history of dermatome mapping. *Archives of neurology* 60, 126-131.

Guan, Y., Johaneck, L.M., Hartke, T.V., Shim, B., Tao, Y.X., Ringkamp, M., Meyer, R.A., Raja, S.N., 2008. Peripherally acting mu-opioid receptor agonist attenuates neuropathic pain in rats after L5 spinal nerve injury. *Pain* 138, 318-329.

Gyires, K., Ronai, A.Z., Toth, G., Darula, Z., Furst, S., 1997. Analysis of the role of delta opioid receptors in gastroprotection in the rat. *Life sciences* 60, 1337-1347.

Handa, B.K., Land, A.C., Lord, J.A., Morgan, B.A., Rance, M.J., Smith, C.F., 1981. Analogues of beta-LPH61-64 possessing selective agonist activity at mu-opiate receptors. *European journal of pharmacology* 70, 531-540.

Harada, H., Hosonuma, K., Fujii, T., Kawashima, K., 2000. Enhancement of cerebral cortical acetylcholine release by intraperitoneal acetic acid and its suppression by analgesics in freely moving rats. *Neuroscience letters* 284, 163-166.

Hasegawa, Y., Kishimoto, S., Shibatani, N., Nomura, H., Ishii, Y., Onishi, M., Inotsume, N., Takeuchi, Y., Fukushima, S., 2010. The pharmacokinetics of morphine and its glucuronide conjugate in a rat model of streptozotocin-induced diabetes and the expression of MRP2, MRP3 and UGT2B1 in the liver. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 62, 310-314.

Hassan, A.H., Ableitner, A., Stein, C., Herz, A., 1993. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience* 55, 185-195.

Hayashida, K., Takeuchi, T., Shimizu, H., Ando, K., Harada, E., 2003. Novel function of bovine milk-derived lactoferrin on antinociception mediated by mu-opioid receptor in the rat spinal cord. *Brain research* 965, 239-245.

He, L., Kim, J., Ou, C., McFadden, W., van Rijn, R.M., Whistler, J.L., 2009. Methadone antinociception is dependent on peripheral opioid receptors. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 10, 369-379.

He, L., Lee, N.M., 1997. DynorphinA-(2-17) restores spinal/supraspinal morphine synergy in morphine-tolerant mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 280, 1210-1214.

Heinke, B., Gingl, E., Sandkuhler, J., 2011. Multiple targets of mu-opioid receptor-mediated presynaptic inhibition at primary afferent Adelta- and C-fibers. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 1313-1322.

Heurich, M., Mousa, S.A., Lenzner, M., Morciniec, P., Kopf, A., Welte, M., Stein, C., 2007. Influence of pain treatment by epidural fentanyl and bupivacaine on homing of opioid-containing leukocytes to surgical wounds. *Brain, behavior, and immunity* 21, 544-552.

Hilf, G., Gierschik, P., Jakobs, K.H., 1989. Muscarinic acetylcholine receptor-stimulated binding of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) to guanine-nucleotide-binding proteins in cardiac membranes. *European journal of biochemistry / FEBS* 186, 725-731.

Holtman, J.R., Jr., Crooks, P.A., Johnson-Hardy, J., Wala, E.P., 2010. Antinociceptive effects and toxicity of morphine-6-O-sulfate sodium salt in rat models of pain. *European journal of pharmacology* 648, 87-94.

Hutchinson, M., Kosterlitz, H.W., Leslie, F.M., Waterfield, A.A., 1975. Assessment in the guinea-pig ileum and mouse vas deferens of benzomorphans which have strong antinociceptive activity but do not substitute for morphine in the dependent monkey. *British journal of pharmacology* 55, 541-546.

Ibrahim, M.M., Porreca, F., Lai, J., Albrecht, P.J., Rice, F.L., Khodorova, A., Davar, G., Makriyannis, A., Vanderah, T.W., Mata, H.P., Malan, T.P., Jr., 2005. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3093-3098.

Iwaszkiewicz, K.S., Schneider, J.J., Hua, S., 2013. Targeting peripheral opioid receptors to promote analgesic and anti-inflammatory actions. *Frontiers in pharmacology* 4, 132.

Ji, Y., Murphy, A.Z., Traub, R.J., 2006. Sex differences in morphine-induced analgesia of visceral pain are supraspinally and peripherally mediated. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 291, R307-314.

Kelly, E., Bailey, C.P., Henderson, G., 2008. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *British journal of pharmacology* 153 Suppl 1, S379-388.

Khalefa, B.I., Mousa, S.A., Shaqura, M., Lacko, E., Hosztafi, S., Riba, P., Schafer, M., Ferdinandy, P., Furst, S., Al-Khrasani, M., 2013. Peripheral antinociceptive efficacy and potency of a novel opioid compound 14-O-MeM6SU in comparison to known peptide and non-peptide opioid agonists in a rat model of inflammatory pain. *European journal of pharmacology* 713, 54-57.

Kharkevich, D.A., Churukanov, V.V., 1999. Pharmacological regulation of descending cortical control of the nociceptive processing. *European journal of pharmacology* 375, 121-131.

Kiraly, K., Szalay, B., Szalai, J., Barna, I., Gyires, K., Verbeken, M., Ronai, A.Z., 2009. Intrathecally injected Ile-Pro-Ile, an inhibitor of membrane ectoenzyme dipeptidyl peptidase IV, is antihyperalgesic in rats by switching the enzyme from hydrolase to synthase functional mode to generate endomorphin 2. *European journal of pharmacology* 620, 21-26.

Komoly, S., 2010. Fájdalom. Mecidina Könyvkiadó Zrt., Budapest.

Kosterlitz, H.W., Paterson, S.J., Robson, L.E., 1981. Characterization of the kappa-subtype of the opiate receptor in the guinea-pig brain. *British journal of pharmacology* 73, 939-949.

Kosterlitz, H.W., Watt, A.J., 1968. Kinetic parameters of narcotic agonists and antagonists, with particular reference to N-allylnoroxymorphone (naloxone). *British journal of pharmacology and chemotherapy* 33, 266-276.

Kraus, J., Borner, C., Giannini, E., Hickfang, K., Braun, H., Mayer, P., Hoehe, M.R., Ambrosch, A., Konig, W., Holtt, V., 2001. Regulation of mu-opioid receptor gene transcription by interleukin-4 and influence of an allelic variation within a STAT6 transcription factor binding site. *The Journal of biological chemistry* 276, 43901-43908.

Kurose, H., Katada, T., Haga, T., Haga, K., Ichiyama, A., Ui, M., 1986. Functional interaction of purified muscarinic receptors with purified inhibitory guanine nucleotide regulatory proteins reconstituted in phospholipid vesicles. *The Journal of biological chemistry* 261, 6423-6428.

Labuz, D., Mousa, S.A., Schafer, M., Stein, C., Machelska, H., 2007. Relative contribution of peripheral versus central opioid receptors to antinociception. *Brain research* 1160, 30-38.

Lattanzi, R., Spetea, M., Schullner, F., Rief, S.B., Krassnig, R., Negri, L., Schmidhammer, H., 2005. Synthesis and biological evaluation of 14-alkoxymorphinans. 22.(1) Influence of the 14-alkoxy group and the substitution in position 5 in 14-alkoxymorphinan-6-ones on in vitro and in vivo activities. *Journal of medicinal chemistry* 48, 3372-3378.

Leslie, F.M., 1987. Methods used for the study of opioid receptors. *Pharmacological reviews* 39, 197-249.

Lewanowitsch, T., Irvine, R.J., 2002. Naloxone methiodide reverses opioid-induced respiratory depression and analgesia without withdrawal. *European journal of pharmacology* 445, 61-67.



Litchfield, J.T., Jr., Wilcoxon, F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 96, 99-113.

Lord, J.A., Waterfield, A.A., Hughes, J., Kosterlitz, H.W., 1977. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267, 495-499.

Lorenzen, A., Fuss, M., Vogt, H., Schwabe, U., 1993. Measurement of guanine nucleotide-binding protein activation by A1 adenosine receptor agonists in bovine brain membranes: stimulation of guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)triphosphate binding. *Molecular pharmacology* 44, 115-123.

Machelska, H., Pfluger, M., Weber, W., Piranvisseh-Volk, M., Daubert, J.D., Dehaven, R., Stein, C., 1999. Peripheral effects of the kappa-opioid agonist EMD 61753 on pain and inflammation in rats and humans. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 290, 354-361.

Machelska, H., Stein, C., 2002. Immune mechanisms in pain control. *Anesthesia and analgesia* 95, 1002-1008, table of contents.

Mansour, A., Fox, C.A., Akil, H., Watson, S.J., 1995. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends in neurosciences* 18, 22-29.

Miller, L., Shaw, J.S., Whiting, E.M., 1986. The contribution of intrinsic activity to the action of opioids in vitro. *British journal of pharmacology* 87, 595-601.

Mori, M., Oguri, K., Yoshimura, H., Shimomura, K., Kamata, O., 1972. Chemical synthesis and analgesic effect of morphine ethereal sulfates. *Life sciences. Pt. 1: Physiology and pharmacology* 11, 525-533.

Mousa, S.A., Shakibaei, M., Sitte, N., Schafer, M., Stein, C., 2004. Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain. *Endocrinology* 145, 1331-1341.

Mousa, S.A., Shaqura, M., Brendl, U., Al-Khrasani, M., Furst, S., Schafer, M., 2010. Involvement of the peripheral sensory and sympathetic nervous system in the vascular

endothelial expression of ICAM-1 and the recruitment of opioid-containing immune cells to inhibit inflammatory pain. *Brain, behavior, and immunity* 24, 1310-1323.

Mousa, S.A., Straub, R.H., Schafer, M., Stein, C., 2007. Beta-endorphin, Met-enkephalin and corresponding opioid receptors within synovium of patients with joint trauma, osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 66, 871-879.

Mousa, S.A., Zhang, Q., Sitte, N., Ji, R., Stein, C., 2001. beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *Journal of neuroimmunology* 115, 71-78.

Mu, X., Wu, A., Wu, J., Liu, Y., Zhang, Y., Yue, Y., Fang, L., Wang, Y., 2010. Effects of anesthetic propofol on release of amino acids from the spinal cord during visceral pain. *Neuroscience letters* 484, 206-209.

Nagano, E., Yamada, H., Oguri, K., 2000. Characteristic glucuronidation pattern of physiologic concentration of morphine in rat brain. *Life sciences* 67, 2453-2464.

Narayana Raju, K.V., Ashok Kumar, D., Arutselvan, N., Thejomoorthy, P., Puvanakrishnan, R., 2005. Antinociceptive and antipyretic effects of a derivatized tetrapeptide from lactoferrin in rats. *Peptides* 26, 615-619.

Negri, L., Improta, G., 1984. Distribution and metabolism of dermorphin in rats. *Pharmacological research communications* 16, 1183-1191.

Nozaki-Taguchi, N., Yaksh, T.L., 1999. Characterization of the antihyperalgesic action of a novel peripheral mu-opioid receptor agonist--loperamide. *Anesthesiology* 90, 225-234.

Obara, I., Makuch, W., Spetea, M., Schutz, J., Schmidhammer, H., Przewlocki, R., Przewlocka, B., 2007. Local peripheral antinociceptive effects of 14-O-methyloxymorphone derivatives in inflammatory and neuropathic pain in the rat. *European journal of pharmacology* 558, 60-67.

Oguri, K., Yamada-Mori, I., Shigezane, J., Hirano, T., Yoshimura, H., 1987. Enhanced binding of morphine and nalorphine to opioid delta receptor by glucuronate and sulfate conjugations at the 6-position. *Life sciences* 41, 1457-1464.

Ossipov, M.H., Lai, J., King, T., Vanderah, T.W., Malan, T.P., Jr., Hruby, V.J., Porreca, F., 2004. Antinociceptive and nociceptive actions of opioids. *Journal of neurobiology* 61, 126-148.

Pasternak, G.W., Pan, Y.X., 2013. Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacological reviews* 65, 1257-1317.

Patierno, S., Anselmi, L., Jaramillo, I., Scott, D., Garcia, R., Sternini, C., 2011. Morphine induces mu opioid receptor endocytosis in guinea pig enteric neurons following prolonged receptor activation. *Gastroenterology* 140, 618-626.

Patwardhan, A.M., Diogenes, A., Berg, K.A., Fehrenbacher, J.C., Clarke, W.P., Akopian, A.N., Hargreaves, K.M., 2006. PAR-2 agonists activate trigeminal nociceptors and induce functional competence in the delta opioid receptor. *Pain* 125, 114-124.

Pol, O., Alameda, F., Puig, M.M., 2001. Inflammation enhances mu-opioid receptor transcription and expression in mice intestine. *Molecular pharmacology* 60, 894-899.

Porreca, F., Mosberg, H.I., Omnaas, J.R., Burks, T.F., Cowan, A., 1987. Supraspinal and spinal potency of selective opioid agonists in the mouse writhing test. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 240, 890-894.

Riba, P., Ben, Y., Smith, A.P., Furst, S., Lee, N.M., 2002. Morphine tolerance in spinal cord is due to interaction between mu- and delta-receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 300, 265-272.

Riba, P., Friedmann, T., Kiraly, K.P., Al-Khrasani, M., Sobor, M., Asim, M.F., Spetea, M., Schmidhammer, H., Furst, S., 2010. Novel approach to demonstrate high efficacy of mu opioids in the rat vas deferens: a simple model of predictive value. *Brain research bulletin* 81, 178-184.

Rittner, H.L., Labuz, D., Richter, J.F., Brack, A., Schafer, M., Stein, C., Mousa, S.A., 2007. CXCR1/2 ligands induce p38 MAPK-dependent translocation and release of opioid peptides from primary granules in vitro and in vivo. *Brain, behavior, and immunity* 21, 1021-1032.

Robinson, D.R., Gebhart, G.F., 2008. Inside information: the unique features of visceral sensation. *Molecular interventions* 8, 242-253.

Rodriguez-Munoz, M., de la Torre-Madrid, E., Sanchez-Blazquez, P., Garzon, J., 2007. Morphine induces endocytosis of neuronal mu-opioid receptors through the sustained transfer of Galpha subunits to RGS2 proteins. *Molecular pain* 3, 19.

Ronai, A., Graf, L., Szekely, I., Dunai-Kovacs, Z., Bajusz, S., 1977. Differential behaviour of LPH-(61-91)-peptide in different model systems: comparison of the opioid activities of LPH-(61-91)-peptide and its fragments. *FEBS letters* 74, 182-184.

Ronai, A.Z., Al-Khrasani, M., Benyhe, S., Lengyel, I., Kocsis, L., Orosz, G., Toth, G., Kato, E., Tothfalusi, L., 2006. Partial and full agonism in endomorphin derivatives: comparison by null and operational model. *Peptides* 27, 1507-1513.

Ronai, A.Z., Timar, J., Mako, E., Erdo, F., Gyarmati, Z., Toth, G., Orosz, G., Furst, S., Szekely, J.I., 1999. Diprotin A, an inhibitor of dipeptidyl aminopeptidase IV(EC 3.4.14.5) produces naloxone-reversible analgesia in rats. *Life sciences* 64, 145-152.

Rossi, G.C., Leventhal, L., Pan, Y.X., Cole, J., Su, W., Bodnar, R.J., Pasternak, G.W., 1997. Antisense mapping of MOR-1 in rats: distinguishing between morphine and morphine-6beta-glucuronide antinociception. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 281, 109-114.

Rowan, M.P., Ruparel, N.B., Patwardhan, A.M., Berg, K.A., Clarke, W.P., Hargreaves, K.M., 2009. Peripheral delta opioid receptors require priming for functional competence in vivo. *European journal of pharmacology* 602, 283-287.

Schafer, M., Imai, Y., Uhl, G.R., Stein, C., 1995. Inflammation enhances peripheral mu-opioid receptor-mediated analgesia, but not mu-opioid receptor transcription in dorsal root ganglia. *European journal of pharmacology* 279, 165-169.

Schiller, P.W., Nguyen, T.M., Chung, N.N., Lemieux, C., 1989. Dermorphin analogues carrying an increased positive net charge in their "message" domain display extremely high mu opioid receptor selectivity. *Journal of medicinal chemistry* 32, 698-703.

Schmidhammer, H., Aeppli, L., Atwell, L., Fritsch, F., Jacobson, A.E., Nebuchla, M., Sperk, G., 1984. Synthesis and biological evaluation of 14-alkoxymorphinans. 1. Highly potent opioid agonists in the series of (-)-14-methoxy-N-methylmorphinan-6-ones. *Journal of medicinal chemistry* 27, 1575-1579.

Schmitt, T.K., Mousa, S.A., Brack, A., Schmidt, D.K., Rittner, H.L., Welte, M., Schafer, M., Stein, C., 2003. Modulation of peripheral endogenous opioid analgesia by central afferent blockade. *Anesthesiology* 98, 195-202.

Schneider, S.P., Eckert, W.A., 3rd, Light, A.R., 1998. Opioid-activated postsynaptic, inward rectifying potassium currents in whole cell recordings in substantia gelatinosa neurons. *Journal of neurophysiology* 80, 2954-2962.

Selley, D.E., Liu, Q., Childers, S.R., 1998. Signal transduction correlates of mu opioid agonist intrinsic efficacy: receptor-stimulated [35S]GTP gamma S binding in mMOR-CHO cells and rat thalamus. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 285, 496-505.

Selley, D.E., Sim, L.J., Xiao, R., Liu, Q., Childers, S.R., 1997. mu-Opioid receptor-stimulated guanosine-5'-O-(gamma-thio)-triphosphate binding in rat thalamus and cultured cell lines: signal transduction mechanisms underlying agonist efficacy. *Molecular pharmacology* 51, 87-96.

Shimomura, K., Kamata, O., Ueki, S., Ida, S., Oguri, K., 1971. Analgesic effect of morphine glucuronides. *The Tohoku journal of experimental medicine* 105, 45-52.

Shukla, A.K., Violin, J.D., Whalen, E.J., Gesty-Palmer, D., Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J., 2008. Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9988-9993.

Sim, L.J., Selley, D.E., Childers, S.R., 1995. In vitro autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[gamma-[35S]thio]-triphosphate binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7242-7246.

Smith, C.F., Rance, M.J., 1983. Opiate receptors in the rat vas deferens. *Life sciences* 33 Suppl 1, 327-330.

Spampinato, S., Qasem, A.R., Calienni, M., Murari, G., Gentilucci, L., Tolomelli, A., Cardillo, G., 2003. Antinociception by a peripherally administered novel endomorphin-1 analogue containing beta-proline. *European journal of pharmacology* 469, 89-95.

Spetea, M., Friedmann, T., Riba, P., Schutz, J., Wunder, G., Langer, T., Schmidhammer, H., Furst, S., 2004. In vitro opioid activity profiles of 6-amino acid substituted derivatives of 14-O-methyloxymorphone. *European journal of pharmacology* 483, 301-308.

Spetea, M., Schmidhammer, H., 2012. Recent advances in the development of 14-alkoxy substituted morphinans as potent and safer opioid analgesics. *Current medicinal chemistry* 19, 2442-2457.

Steeds, 2009. The anatomy and physiology of pain. *Surgery* 27, 507-511.

Stein, C., 2013. Opioids, sensory systems and chronic pain. *European journal of pharmacology* 716, 179-187.

Stein, C., Hassan, A.H., Przewlocki, R., Gramsch, C., Peter, K., Herz, A., 1990. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 5935-5939.

Stein, C., Lang, L.J., 2009. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Current opinion in pharmacology* 9, 3-8.

Stein, C., Machelska, H., Binder, W., Schafer, M., 2001. Peripheral opioid analgesia. *Current opinion in pharmacology* 1, 62-65.

Stein, C., Schafer, M., Hassan, A.H., 1995. Peripheral opioid receptors. *Annals of medicine* 27, 219-221.

Stein, C., Schafer, M., Machelska, H., 2003. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nature medicine* 9, 1003-1008.

Stein, C., Yassouridis, A., 1997. Peripheral morphine analgesia. *Pain* 71, 119-121.

Strange, P.G., 2010. Use of the GTPgammaS ([<sup>35</sup>S]GTPgammaS and Eu-GTPgammaS) binding assay for analysis of ligand potency and efficacy at G protein-coupled receptors. *British journal of pharmacology* 161, 1238-1249.

Szeto, H.H., Lovelace, J.L., Fridland, G., Soong, Y., Fasolo, J., Wu, D., Desiderio, D.M., Schiller, P.W., 2001. In vivo pharmacokinetics of selective mu-opioid peptide agonists. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 298, 57-61.

Takasuna, M., Negus, S.S., DeCosta, B.R., Woods, J.H., 1994. Opioid pharmacology of the antinociceptive effects of loperamide in mice. *Behavioural pharmacology* 5, 189-195.

Tegeder, I., Meier, S., Burian, M., Schmidt, H., Geisslinger, G., Lotsch, J., 2003. Peripheral opioid analgesia in experimental human pain models. *Brain : a journal of neurology* 126, 1092-1102.

Tian, W.N., Duzic, E., Lanier, S.M., Deth, R.C., 1994. Determinants of alpha 2-adrenergic receptor activation of G proteins: evidence for a precoupled receptor/G protein state. *Molecular pharmacology* 45, 524-531.

Tian, Y.L., Guo, Y., Cao, D.Y., Zhang, Q., Wang, H.S., Zhao, Y., 2005. Local application of morphine suppresses glutamate-evoked activities of C and Adelta afferent fibers in rat hairy skin. *Brain research* 1059, 28-34.

Traynor, J.R., 1994. Opioid receptors and their subtypes: focus on peripheral isolated tissue preparations. *Neurochemistry international* 24, 427-432.

Traynor, J.R., Nahorski, S.R., 1995. Modulation by mu-opioid agonists of guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)triphosphate binding to membranes from human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Molecular pharmacology* 47, 848-854.

Varadi, A., Gergely, A., Beni, S., Jankovics, P., Noszal, B., Hosztafi, S., 2011. Sulfate esters of morphine derivatives: synthesis and characterization. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 42, 65-72.

Verma-Gandhu, M., Bercik, P., Motomura, Y., Verdu, E.F., Khan, W.I., Blennerhassett, P.A., Wang, L., El-Sharkawy, R.T., Collins, S.M., 2006. CD4+ T-cell modulation of visceral nociception in mice. *Gastroenterology* 130, 1721-1728.

Womack, M.D., McCleskey, E.W., 1995. Interaction of opioids and membrane potential to modulate Ca<sup>2+</sup> channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of neurophysiology* 73, 1793-1798.

Woods, L.A., 1954. Distribution and fate of morphine in non-tolerant and tolerant dogs and rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 112, 158-175.

Zadina, J.E., Hackler, L., Ge, L.J., Kastin, A.J., 1997. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386, 499-502.

Zuckerman, A., Bolan, E., de Paulis, T., Schmidt, D., Spector, S., Pasternak, G.W., 1999. Pharmacological characterization of morphine-6-sulfate and codeine-6-sulfate. *Brain research* 842, 1-5.



## 10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 10.1. Az értekezés anyagát képező közlemények

1. Lacko, E.<sup>1</sup>, Varadi, A.<sup>1</sup>, Rapavi, R., Zador, F., Riba, P., Benyhe, S., Borsodi, A., Hosztafi, S., Timar, J., Noszal, B., Furst, S., Al-Khrasani, M., 2012. A novel micro-opioid receptor ligand with high in vitro and in vivo agonist efficacy. *Current medicinal chemistry* 19, 4699-4707.
2. Al-Khrasani<sup>1</sup>, M., Lacko, E.<sup>1</sup>, Riba, P., Kiraly, K., Sobor, M., Timar, J., Mousa, S., Schafer, M., Furst, S., 2012. The central versus peripheral antinociceptive effects of mu-opioid receptor agonists in the new model of rat visceral pain. *Brain research bulletin* 87, 238-243.

<sup>1</sup> Ezen szerzők egyenlő mértékben működtek közre a munkában.

### 10.3. Egyéb közlemények

1. Lackó, E., Riba, P., Giricz, Z., Váradi, A., Cornic, L., Balogh, M., Király, K., Cseko, K., Mousa, S.A., Hosztafi, S., Schäfer, M., Zádori, Z.S., Helyes, Zs., Ferdinandy, P., Füst, S., and Mahmoud Al-Khrasani., 2016. New Morphine Analogs Produce Peripheral Antinociception within a Certain Dose Range of Their Systemic Administration. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*.
2. Szentirmay, A.K., Kiraly, K.P., Lenkey, N., Lacko, E., Al-Khrasani, M., Friedmann, T., Timar, J., Gyarmati, S., Toth, G., Furst, S., Riba, P., 2013. Spinal interaction between the highly selective mu agonist DAMGO and several delta opioid receptor ligands in naive and morphine-tolerant mice. *Brain research bulletin* 90, 66-71.

3. Khalefa, B.I., Mousa, S.A., Shaqura, M., Lacko, E., Hosztafi, S., Riba, P., Schafer, M., Ferdinandy, P., Furst, S., Al-Khrasani, M., 2013. Peripheral antinociceptive efficacy and potency of a novel opioid compound 14-O-MeM6SU in comparison to known peptide and non-peptide opioid agonists in a rat model of inflammatory pain. *European journal of pharmacology* 713, 54-57.
4. Zadori, Z.S., Feher, A., Al-Khrasani, M., Lacko, E., Toth, V.E., Brancati, S.B., Hein, L., Matyus, P., Gyires, K., 2013. Imidazoline versus alpha(2)-adrenoceptors in the control of gastric motility in mice. *European journal of pharmacology* 705, 61-67.
5. Alberti, A., Beni, S., Lacko, E., Riba, P., Al-Khrasani, M., Kery, A., 2012. Characterization of phenolic compounds and antinociceptive activity of *Sempervivum tectorum* L. leaf juice. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 70, 143-150
6. Igyarto, B.Z., Lacko, E., Olah, I., Magyar, A., 2006. Characterization of chicken epidermal dendritic cells. *Immunology* 119, 278-288.
7. Felfoldi, B., Imre, G., Igyarto, B., Ivan, J., Mihalik, R., Lacko, E., Olah, I., Magyar, A., 2005. In ovo vitelline duct ligation results in transient changes of bursal microenvironments. *Immunology* 116, 267-275.

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Prof. Dr. Fürst Zsuzsanna professzor asszonynak és Dr. Al-Khrasani Mahmoudnak, akik értékes szakmai tanácsaikkal segítettek kutatómunkámat és hozzájárultak a bemutatott eredmények eléréséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Tímár Júliának, aki gondos munkájával hozzájárult, hogy a dolgozat végleges formáját elnyerhesse.

Köszönöm Prof. Dr. Gyires Klárának és Prof. Dr. Ferdinandy Péternek a Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet volt, illetve jelenlegi vezetőjének, hogy tudományos pályafutásomat figyelemmel kísérték és tanácsaikkal segítették.

Köszönöm programvezetőmnek Prof. Dr. Szőke Évának és Dr. Noszál Béla professzor úrnak a Gyógyszertudományok Doktori Iskola volt, illetve jelenlegi vezetőjének, hogy támogatták munkámat.

Hálával tartozom az Opioid munkacsoport tagjainak, elsősorban Dr. Riba Pálnak és Molnárné Péntes Máriának, továbbá a Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet dolgozóinak, barátaimnak és családomnak, akik segítettek és ösztönöztek, a tudományos kutatásban elért eredményeim így nekik is köszönhetem.

Végül de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a Semmelweis Egyetem Doktori Iskolájának anyagi támogatását.