

Peptid és nem peptid μ -opioid agonisták: perifériás és centrális opioid fájdalomcsillapítás

Doktori tézisek

Lackó Erzsébet

Semmelweis Egyetem
Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet



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

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 sok tekintetben megoldottnak tekinthető, ellentétben a krónikus fájdalommal, amelyekre eddig nem sikerült igazán hatékony és biztonságos gyógyszert találni, a világszerte folyó intenzív kutatások dacára. A fájdalom kutatásában nagy áttörést jelentett, amikor a kutatók az 1980-as évek végén, a centrálisan elhelyezkedő opioid receptorokon kívül, perifériás opioid receptorokat is azonosítottak szenzoros neuronokon. Így olyan új típusú opioidok kerültek az érdeklődés középpontjába, melyek fájdalomcsillapító hatásukat nem a központi idegrendszerben, hanem a periférián fejtik ki, így várhatóan centrális mellékhatásaik sem jelentkeznek.

Munkánk célja a vér-agy gáton rosszul penetráló vegyületek pl. egyes opioid peptidok illetve újonnan szintetizált *nem peptid* opioid vegyületek szisztémás adagolást követő támadáspontjának, esetleges perifériás fájdalomcsillapító hatásának elemzése volt.

Kísérleteink során a μ -opioid receptor szelektív agonista peptid DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol⁵] enkephalin) perifériás hatását vizsgáltuk patkányokban, egy új általunk módosított ecetsavval indukált vonaglászós tesztben (writhing teszt), az alkalmazott zsigeri fájdalom teszt a tartós fájdalom modelljének tekinthető. A kapott eredmények arra ösztönöztek bennünket, hogy egy hasonló kémiai tulajdonságokkal rendelkező, nem peptid vegyületet fejlesszünk ki. Ezt követően az új vegyület a 14-*O*-Metilmorfin-6-*O*-szulfát (14-*O*-MeM6SU) támadáspontjának és hatásspektrumának részletes vizsgálatát végeztük el *in vitro* (receptorkötéses vizsgálatok, izolált szervek) és *in vivo* (tail-flick teszt) teszteken.

CÉLKITÚZÉS

I. DAMGO és morfin farmakológiai hatásának vizsgálata új testrendszerünkben (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 testrendszer 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

MÓDSZEREK

I. In vivo kísérletek

1. Ecetsavas vonaglásos (zsigeri fájdalom) teszt patkányon

A kísérleteket 100-140 g-os hím Wistar patkányokon végeztük. A kísérleteket a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának szabályai szerint végeztük, mely szabályzat a Helsinki Egyezményen alapul (EC Directive 86/609/EEC, engedélyszám: 22.1/605/001/2010).

A kísérletsorozatban felhasznált vegyületek: morfin hidroklorid, naloxon hidroklorid (Alkaloida - ICN), DAMGO, NAL-M (Sigma-Aldrich). A vegyületeket 0,9 %-os fiziológias sóoldatban oldottuk.

A fiziológias sóoldatot, a morfint és a DAMGO-t i.p. vagy i.c.v. adagoltuk. I.p. injektálás esetén az állatok 5 ml/ttkg-os mennyiséget kaptak a fiziológias sóoldatból, illetve a vegyületek különböző koncentrációjú oldataiból. Az i.c.v. injektálás esetén a fiziológias sóoldatot illetve a vegyületeket 10 µl/állat térfogatban adagoltuk.

Nulla percnél az állatoknak 2%-os ecetsav oldatot adagoltunk i.p. 3 ml/ttkg mennyiségben. Az i.p. ecetsav injektálását követően a 120 perces megfigyelési időt 12 szakaszra bontottuk, minden szakasz 10 percig tartott. A vonaglások száma az 50. percre stabilizálódott és ez a stabilitás fennmaradt a 90. percig. A fiziológias só oldatot illetve a tesztvegyületeket az 55. percben injektáltuk i.p. vagy i.c.v., majd a fájdalomcsillapító hatást a vonaglások számából határoztuk meg a 60.-80. perc között. Az i.p./i.c.v. arányokat a dózishatásgörbékből kapott ED₅₀ értékek alapján számoltuk ki [ED₅₀ (nmol/kg) i.p. / ED₅₀ (nmol/patkány) i.c.v.].

2. Patkány tail-flick teszt (RTF)

100-140 g súlyú patkányokat használtunk. A patkányoknak a fiziológias sóoldatban oldott anyagokat s.c. vagy i.c.v. injektáltuk. A kísérlet kezdetén meghatároztuk a farokelrántás 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. A kapott értékeket százalékban fejeztük ki.

II. *In vitro* kísérletek

1. Receptorkötési vizsgálatok

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.

Kísérleteinket 250-300 g-os hím Wistar patkányokon és R9-es törzsből származó tengerimalacokon végeztük.

14-*O*-metilmorfin-6-*O*-szulfátot (14-*O*-MeM6SU) valamint morfin-6-*O*-szulfátot (M6SU) Budapesten, a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi

Kémiai Intézetében Dr. Hosztafi Sándor és Dr. Váradi András szintetizálta Professzor Dr. Noszál Béla vezetésével.

Felhasznált vegyületek: naloxon hidroklorid (NAL), naltrexon hidroklorid (NTX), morfin hidroklorid (Alkaloida-INC), etilketociklazocin - EKC (Sterling Winthrop), [d-Ala², d-Leu⁵] enkefalin – DADLE (Sigma-Aldrich), naltrindol – NTI (Sigma-Aldrich), 5- α ,7- α ,8- α -(-)-N-methyl-N-[7-(1-pyrrolidinyl)-1-oxaspiro-(4,5)-dec-8yl]-benzeneacetamide - U-69,593 (Upjohn Co), [D-Ala², NMePhe⁴, Gly⁵-ol]enkephalin (DAMGO), Ile^{5,6}deltorphin II (DIDII), [³H]DAMGO-t (41 Ci/mmol), [³H]DIDII (49 Ci/mmol) (Biológiai Központ Izotóp laboratórium Szeged), [³H] U-69,593 (44 Ci/mmol) (Amersham). Minden vegyületet 0,9%-os fiziológiás sóoldatban oldottunk.

a) Kompetíciós kötési kísérletek. A kompetíciós kötési kísérleteket homogenizált patkány és tengerimalac agyi membránpreparátumokon végeztük. Ezekből centrifugálással szacharóz mentes pelletet nyertünk. majd a kapott pelletet 50nM Tris-HCl pufferben szuszpendáltuk (pH 7.4). A membránhomogenátumokat a radioaktív ligandoknak megfelelően inkubáltuk, a [³H]DAMGO és a [³H]DIDII radioligandokat 35°C-on 45 percig, a [³H]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 ~ 1 nM-os [³H]DAMGO, [³H]DIDII, vagy ~ 3 nM-os [³H]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 μ M jelöletlen DAMGO, DIDII vagy U69,593 jelenlétében határoztuk meg. Az inkubációt követően a receptorhoz kötődött és nem kötődött radioligandokat gyors vákuumszűréssel választottuk szét, majd a kiszáritott filter korongok radioaktivitását detektáltuk.

b) Funkcionális [³⁵S]GTP γ S kötési kísérletek. A patkány és tengerimalac agyi membrán preparátumokat 50 mM-os Tris HCl pufferrel (pH 7.4) hígítottuk, hogy ~ 10 μ g fehérje/mintát nyerjünk. Ezt követően a minták 30°C-on 60 percig inkubálódtak Tris-EGTA pufferben (pH 7.4), 1 ml végtérfogatban. A puffer tartalmazott még 20 MBq/0,05 cm³ [³⁵S]GTP γ 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 μ M jelöletlen GTP γ S jelenlétében állapítottuk meg. A [³⁵S]GTP γ S specifikus

kötésének értékét a kettő különbsége (T-NS) adja meg. A jelöletlen ligandok jelenléte nélkül meghatározott [³⁵S]GTP γ S specifikus kötési értéke a receptor G-fehérje alapaktivitását jelöli, melyet 100 %-nak vettünk. A kötődött és nem kötődött [³⁵S]GTP γ S szétválasztását, valamint a minták detektálását a kompetíciós kötési tesztekhez hasonlóan végeztük el.

2. Izolált szervek

a) Egér vas deferens (MVD). MVD kísérletekben NMRI hím 35-45 g súlyú egereket használtunk. A preparátumot 31°C-os Mg²⁺-mentes Krebs oldatban (összetevői mmol/dm³ (mM) számolva: NaCl= 118; NaHCO₃= 25; KCl= 4,7; KH₂PO₄= 1,2; glukóz= 11; CaCl₂= 2,5) függesztettük fel. A kísérletben azt vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolják a különböző anyagok az elektromos téringerlés okozta kontrakciókat. 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.

b) Patkány vas deferens (RVD). RVD teszten 170-250 g súlyú patkányokat alkalmaztunk. A protokoll néhány módosítást leszámítva ugyanaz volt, mint az MVD esetében. Ebben az esetben Krebsz-oldatot használtunk (NaCl= 118; NaHCO₃= 25; KCl= 4,7; KH₂PO₄= 1,2; glukóz= 11; CaCl₂= 2,5; MgSO₄=1,2 mM/L). A kezdeti szervfeszesség 0,5 g volt, négyszögimpulzusokkal (1 ms széles, 9 V/cm intenzitású) ingereltük 0,1 Hz frekvenciával.

III. Statisztikai analízis

Az *ecetsavas vonaglászós teszten* kapott eredményeket átlag \pm S.E.M.-ben (standard error of mean), a fájdalomcsillapító hatást pedig százalékban fejeztük ki. A median fájdalomcsillapító hatás eléréséhez szükséges dózist (ED₅₀) a lineáris dózishatásgörbékből számoltuk ki. A 95%-os konfidencia intervallum meghatározása az irodalomban leírtak alapján történt. 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.

Tail-flick teszt esetén megvizsgáltuk a dózishatásgörbék közötti összefüggéseket, meghatároztuk az 50%-os fájdalomcsillapító hatáshoz (ED₅₀) szükséges dózisokat, majd Litchfield-Wilcoxon módszerével kiszámoltuk a 95%-os konfidencia intervallumokat. A csoportok közötti különbségeket egyszempontos ANOVA segítségével határoztuk meg, Tukey post hoc tesztjét alkalmazva. A $p < 0,05$ érték statisztikailag szignifikánsnak számított.

A **kompetíciós kötési kísérleteket** GraphPad Prism 5.0 segítségével értékeltük, meghatároztuk azt a vegyület koncentrációt mely lezorította a megfelelő radioaktív ligandok 50%-át (IC₅₀). A funkcionális [35S]GTP γ S kötési kísérleteknél a LogEC₅₀ és E_{max} értékek, valamint a szignifikancia szintek szintén GraphPad Prism 5.0-val számoltuk.

Az **MVD és RVD kísérletekben** az 50%-os effektív koncentrációt (EC₅₀) valamint a maximális hatást (E_{max}) nem-lineáris regresszióval számoltuk ki. MVD esetén a NAL disszociációs konstansát (K_e) single-dose módszerrel számoltuk ki. A K_e érték számítása: $K_e = [\text{antagonista koncentrációja}] / \text{dose ratio} - 1$.

EREDMÉNYEK

I. DAMGO és morfin farmakológiai hatásának vizsgálata

A morfin és a DAMGO fájdalomcsillapító hatása zsigeri fájdalom modellen. Megvizsgáltuk a morfin és a DAMGO fájdalomcsillapító hatását i.p. adagolt ecetsav által kiváltott vonaglósos 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 dóziszfüggő fájdalomcsillapító hatással rendelkezik. A morfin ED₅₀ értéke 238,57 nmol/kg, míg a DAMGO-é 289,52 nmol/kg-nak bizonyult. Ezen értékek azt mutatják, hogy a két vegyület fájdalomcsillapító hatása összemérhető i.p. adagolást követően. I.c.v. adagolásnál szintén mindkét vegyület dóziszfüggő fájdalomcsillapító hatást mutatott. A kiszámított ED₅₀ értékek alapján mind a morfin (2,02 nmol/állat) mind a DAMGO (0,006 nmol/állat) sokkal hatékonyabbnak bizonyult mint i.p. injektálás esetén. Az is megállapítható, hogy i.c.v. adagolást követően a DAMGO lényegesen hatékonyabb a morfinnál. A fentieknek megfelelően a DAMGO ED₅₀ értékeinek i.p./i.c.v aránya szintén magasabb, mint a morfiné.

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.

Az i.c.v. adagolt perifériásan ható opioid antagonistá NAL-M hatása az i.p. adagolt morfinra és DAMGO-ra. A NAL-M-et i.c.v., míg ezzel egyidejűleg a morfin 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, ugyanakkor nem volt hatása a szisztémásan adagolt DAMGO fájdalomcsillapító hatására.

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

Receptor kötési kísérletek. Megvizsgáltuk a 14-O-MeM6SU, kötési affinitását és szelektivitását MOR-ra és DOR-ra patkány agyi-, míg KOR-ra tengerimalac agyi membránpreparátumokon. Radioligandként [³H]DAMGO (μ), [³H]DIDII (δ) és [³H]U69,593 (κ) használtunk. A 14-O-MeM6SU gátolta a [³H]DAMGO, [³H]DIDII és a [³H]U69,593 specifikus kötődését. A kompetíciós kötési görbék alapján a következő K_i értékeket kaptuk: 1,12; 10,23 és 295,12 nM. Megállapítottuk, hogy összehasonlítva M6SU, morfin és homológ opioid ligandok adataival, a legjobb MOR affinitással a 14-O-MeM6SU rendelkezett, de jelentős a DOR-hoz való affinitása is, bár 9-szer alacsonyabb a MOR-hoz képest.

14-O-MeM6SU-tal stimulált [³⁵S]GTP γ S kötés. 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. 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 antagonistá NAL (10 μ M), a patkány agyi membránhomogenátumokhoz adva, a várakozásoknak megfelelően, jobbra tolt a 14-O-MeM6SU-tal stimulált [³⁵S]GTP γ S kötés görbét, megerősítve a hatás opioid specifikusságát. A 14-O-MeM6SU hatékonyan stimulálta a KOR mediált G-protein aktivációt, mindezt nagyobb hatékonysággal, mint az U-69,593 KOR szelektív ligand.

Az opioid agonisták aktivitása MVD és RVD teszteken.

MVD-n a 14-*O*-MeM6SU, M6SU, morfin és DAMGO EC₅₀ (nM) értékei a felsorolás sorrendjében a következők voltak: 4,38; 102,81; 346,63 és 238,47. 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} ± S.E.M értékek százalékban: 99,10 ± 0,90 a 14-*O*-MeM6SU, 96,99 ± 1,88 a DAMGO, 36,87 ± 3,36 a M6SU és 42,51 ± 6,43 a morfin esetében. A NAL K_e értékei 0,66 és 1,92 között változtak mind a négy vegyületnél.

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. 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 hatásereősséget (intrinsic efficacy) és a legmagasabb hatékonyságot, míg a morfinnak és a M6SU-nak nem volt hatása ezen a teszten.

Fájdalomcsillapító hatás vizsgálata tail-flick teszten, patkányon. 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. ED₅₀ értékek alapján a 14-*O*-MeM6SU 51-szer volt hatékonyabb, mint a M6SU és 34-szer hatékonyabb, mint a morfin. I.c.v. injektálás után a 14-*O*-MeM6SU 23-szor bizonyult hatékonyabbnak a M6SU-nál, ez az érték a morfinnal szemben 2456-volt. 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.

KÖVETKEZTETÉSEK

- Tesztrendszerünkben a DAMGO és morfin a vonaglásos teszten szisztémásan (i.p.) illetve centrálisan (i.c.v.) adagolva dózisfüggően gátolták a fájdalmat. A DAMGO és a morfin fájdalomcsillapító hatása a szisztémás adagolásnál összemérhető volt. Ezzel ellentétben centrális adagolást követően a DAMGO sokkal hatékonyabb fájdalomcsillapítónak bizonyult. Mivel a vér-agy gáton nehezen penetráló quaterner opioid antagonistá NAL-M i.p.

illetve i.c.v. adagolás mellett, gátolta a szisztémásan adott morfin fájdalomcsillapító hatását, ebből arra lehet következtetni, hogy analgetikus hatását mind perifériás, mind centrális támadásponttal fejtheti ki. Azonos kísérleti felépítés mellett a NAL-M i.c.v. adagolva gátolta az i.p. adott morfint, de nem gátolta az i.p. adott DAMGO-t, tehát a DAMGO esetében a perifériás fájdalomcsillapító hatás dominált. Kísérleteinkben, az általunk módosított zsigeri fájdalom tesztet a tartós fájdalom modelljének tekintjük. Kiemelendő, hogy az alkalmazott módszer egyedülálló abban, hogy gyakorlatában azonos a klinikai körülményekkel, mivel a vegyületek alkalmazása a *már kialakult fájdalom* idejében történik. Először igazoltuk, hogy a MOR agonisták gátolják a már tartósan fennálló zsigeri fájdalmat.

- Megállapítottuk, hogy egy kooperációban újonnan szintetizált morfin származék, a 14-*O*-MeM6SU receptorkötési tesztben alacsony (δ/μ) és magas (κ/μ) szelektivitást mutatott.
- Kimutattuk, hogy a 14-*O*-MeM6SU *in vitro* MVD és RVD teszteken opioid tulajdonságokat mutatott. MVD-n a 14-*O*-MeM6SU hatékonyabb volt a referencia vegyületeknél. A kapott naloxon K_e érték a 14-*O*-MeM6SU MOR mediálta hatásra utal, bár a szelektivitása a DOR mediált hatáshoz viszonyítva igen alacsony volt (10-szeres). RVD-n az E_{max} 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 14-*O*-MeM6SU *in vivo* termális RTF teszten szisztémás (s.c.) és centrális (i.c.v.) adagolás mellett dózisfüggő fájdalomcsillapító hatást mutatott. Megállapítottuk, hogy hő indukálta fájdalomban, a morfin és a M6SU mellett, a 14-*O*-MeM6SU bizonyult a legpotensebb analgetikumnak. Mivel a kalkulált i.c.v./s.c. arány, 14-*O*-MeM6SU és M6SU esetében jelentősen magasabb volt, mint morfin illetve DAMGO esetében, ez a tény előbbieket limitált központi idegrendszeri penetrációjára utalhat.
- A kapott eredmények alapján reménykeltőnek látszik, hogy a 14-*O*-MeM6SU ill. jelen tapasztalatok alapján továbbfejlesztett származékai valóban redukált centrális mellékhatásokkal rendelkeznek, melyeket munkáink következő szakaszában kívánunk részletesen elemezni, így a jövőben a klinikai gyakorlat számára is alkalmas, biztonságos, hatékony fájdalomcsillapítók előállítására nyílik lehetőség.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

AZ ÉRTEKEZÉS ANYAGÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

1. Lacko, E.¹, Varadi, A.¹, 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, M.¹, Lacko, E.¹, 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.

¹Ezen szerzők egyenlő mértékben működtek közre a munkában.

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.