

EMB zsúri: OTKA T 46434 sz. pályázat zárójelentése.

Antinociceptív neurotranszmitterek/modulátorok hatásmechanizmusa ENDOMORFINOK ÉS RECEPTORAIK VIZSGÁLATA

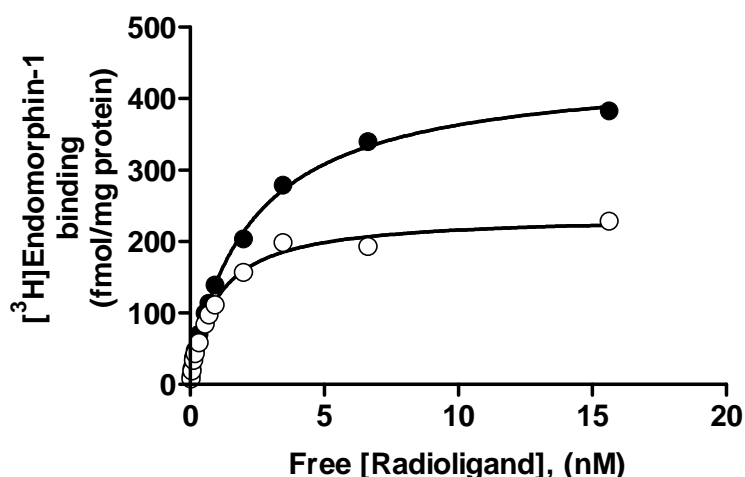
Biokémiai vizsgálatok

Az endogén opioid peptidcsaládok (endorfin, enkefalinok, dinorfin) felfedezése már több mint harminc éve megtörtént. Mind farmakológiai, mind biokémiai bizonyítékok születtek az opioid receptorok heterogenitására (mu vagy MOR, delta vagy DOR, kappa vagy KOR receptorok), viszont a morfint felismerő mu receptorok endogén liganduma ismeretlen maradt egészen 1997-ig. Akkor került sor az endomorfín-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) és endomorfín-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) peptidok izolálására, amelyeket a mu receptor endogén ligandumának feltételeznek. Korán bekapcsolódtunk tanulmányozásukba (Kocsis és mts.i, Szatmári és mts.i, Lengyel és mts.i) és direkt bizonyítékot szolgáltatunk radioligand kötődés alapján kizárólagos mu szelektivitásukra (Monory és mts.i). Felfigyeltünk arra, hogy valószínűleg heterogén receptorpopulációt képes jelölni az endomorfín-1. Vizsgálatainkkal ezeknek a kötőhelyeknek a természetére vonatkozóan kívántunk adatokat szolgáltatni, tekintettel a kérdéses receptorok szerteágazó fiziológiai jelentőségére (...)

Az általunk trícíált endomorfín-1-gyel végzett telítési kísérletek váratlan eredményeket szolgáltatottak. Hagyományosan az opioid antagonistá naloxonnal állapítjuk meg a nem specifikus kötődés hányadát. Ezt összehasonlítva a jelöletlen endomorfínnal kapott értékekkel, megállapítottuk, hogy jelentős eltérés mutatkozik (1. ábra).

1. ábra

Trícíált endomorfín-1 (specifikus rádioaktivitás: 2,35 TBq/mmol, 41Ci/mmol) specifikus kötődése patkány agyi membránon.



A nem-specifikus kötést 10⁻⁵M-os naloxon jelenlétében (üres kör), illetve 10⁻⁵ M-os jelöletlen endomorfín-1-el (telt kör) határoztuk meg.

A naloxonnal végzett méréseknél a kötőhelyek száma 188.0 ± 21.7 fmol/mg fehérjének mutatkozott 1.0 ± 0.1 nM disszociációs állandó mellett. Az endomorfín-1-gyel kapott értékek ettől lényegesen eltértek, két receptorpopuláció volt elkülöníthető Scatchard transzformációval ill. nonlinearis regressziós analízissel, amelyekhez a következő értékek rendelkezhetők: $K_{d1}=0.4 \pm 0.1$ nM és $K_{d2}=8.2 \pm 1.4$ nM, valamint a kötőhelyek maximális száma B_{max} : 119.6 ± 18.5 és 432.5 ± 83.7 fmol/mg. A két kötőhely létét homológ és heterológ leszorítási kísérletekkel is igazoltuk (I. táblázat), ahol részben kétfázisú görbéket kaptunk, a korábbiakhoz hasonló disszociációs állandókkal.

I. táblázat

Különböző szelektivitású opioid ligandok affinitása triciált endomorfín-1 kötésének gátlásában patkány agyi membránon.

Szelektivitás	Ligand	K_i(nM) \pm SEM
Általános antagonist	Naloxon	0.62 ± 0.07
MOR - szelektív	Endomorfín-1	1.00 ± 0.1
	Endomorfín-2	2.23 ± 0.08
	DAMGO	0.84 ± 0.06
DOR - szelektív	TIPP (Tyr-Tic-Phe-Phe)	739.33 ± 51.67
	Ile ^{5,6} - Deltorfín-II	1110.67 ± 85.76
KOR - szelektív	Dynorfín	15.05 ± 3.73
	MERF	20.06 ± 6.35
Aktív sztereomer	Levorfanol	0.31 ± 0.13
Inaktív sztereomer	Dextrorfan	481.67 ± 81.53

A patkány agyi membránokat 45 percig inkubáltuk 24 °C-on 0.4 nM általunk triciált endomorfín-1-el (specifikus rádioaktivitás: 2,35 TBq/mmol, 41Ci/mmol) különböző koncentrációjú opioid ligandok jelenlétében. A K_i értékeket a GraphPad Prism 3.0 programmal számoltuk. Az értékek az átlagot jelentik a szórással, melyeket legalább három megismételt kísérletből számoltunk.

Az endomorfín-1 kötődése sztereospecifikus volt. A nagyaffinitású kötőhelyért jól versengtek a μ -szelektivitású vegyületek, az affinitási sorrend $\mu > \delta > \kappa$ volt. (I. táblázat). A kompetíciós kísérleteket a továbbiakban folytattuk különböző specificitású ligandumokkal, és eltérő értékek születtek a kis- (10^{-5} M naloxonnal már blokkolva) és a nagyaffinitású kötőhelyen végzett kísérletek alapján (II. táblázat). Meglepő módon a második kötőhely nem volt felismerhető heterociklusos opioid ligandumokkal, ellenben számos nem opioid peptid mérhető affinitást mutatott .

II. táblázat

Tríciált endomorfín-1 (8nM) kötés leszorítása különböző szelektivitású opioid-és nem opioid ligandokkal patkány agyi membránon.

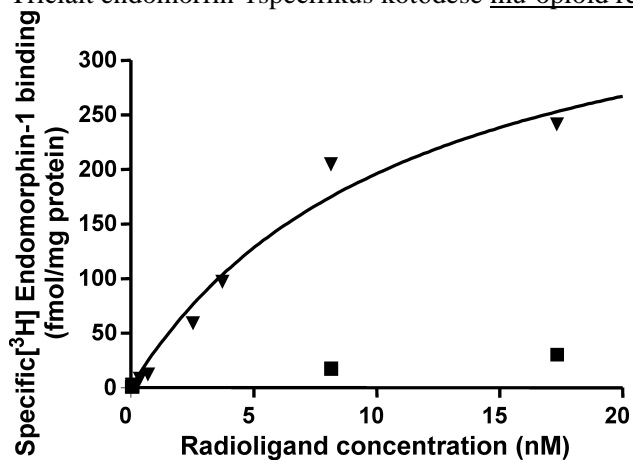
Ligand	Szelektivitás	Maradék kötés %	Ligand	Szelektivitás	Maradék kötés %
Naloxone	Általános antagonist	35.5 ± 3.4	Hemorfin	?	0 ± 1.8
Endomorfín-1	μ-opioid receptor	0	Angiotenzin IV	Angiotenzin-receptor	0 ± 3.3
Endomorfín-2	μ-opioid receptor	3 ± 1.6	NPFF	NPFF-receptor	0 ± 2.1
DAMGO	μ-opioid receptor	33.4 ±	FMRF	NPFF-receptor	0.3 ± 3.2
Morfín	μ-opioid receptor	32.5 ± 2.7	Nociceptin	ORL-receptor	0 ± 2.8
TIPP (Tyr-Tic-Phe-Phe)	δ-opioid receptor	3.3 ± 2.4	AMPA	AMPA-receptor	32 ± 0.3
Naltrindol	δ-opioid receptor	26.7 ± 3.3	GABA	GABA-receptor	32.9 ± 1.2
Ile ^{5,6} - Deltorfín II	δ-opioid receptor	22.8 ± 5.2	Glutamát	Glutamát-receptor	32.3 ± 1.9
Met-enkefalin	δ-opioid receptor	7.5 ± 2.1	SKF(+)	Szigma-receptor	32.4 ± 5.0
Leu-enkefalin	δ-opioid receptor	13 ± 7.6	(-)MK801	NMDA-receptor	33.9 ± 5.8
MERF (Met-enkefalin-Arg-Phe)	κ-opioid receptor	0 ± 4.5	(+)MK801	NMDA-receptor	34.7 ± 6.0
SKF(-)	κ-opioid receptor	31.7 ± 4.1	Szubstansz P(1-7)	?	13.6 ± 13.4
Dynorfín (1-11)	κ-opioid receptor	16 ± 4.8			

A patkány agyi membránokat 45percig inkubáltuk 24 °C-on 8 nM tríciált endomorfín-1-el különböző koncentrációjú opioid- és nem opioid ligandokkal 10⁻⁵ M –os naloxon jelenlétében. A *K_i* értékeket GraphPad Prism programmal számoltuk. A feltüntetett értékek az átlagot jelentik a szórással, melyeket legalább három megismételt kísérletből számoltunk.

Ezt követően megvizsgáltuk az endomorfín-1 kötődését azokon az agyi területeken, ahol ismertén alacsony a mu-receptor denzitás vagy nemis azonosítható. Ilyen terület a kisagy, újszülött agy, ill. a genetikailag módosított mu-receptor, vagy mu-, delta- és kapa- receptor hiányos (tripladeficiens) egerekből származó agyi preparátumok és mindezeket a vizsgálat tárgyává tettük. Az ezeken a mintákon végzett kísérletek azonban azt mutatták, hogy tapasztalható tríciált endomorfín-1 kötődése (2. és 3. ábra).

2. ábra

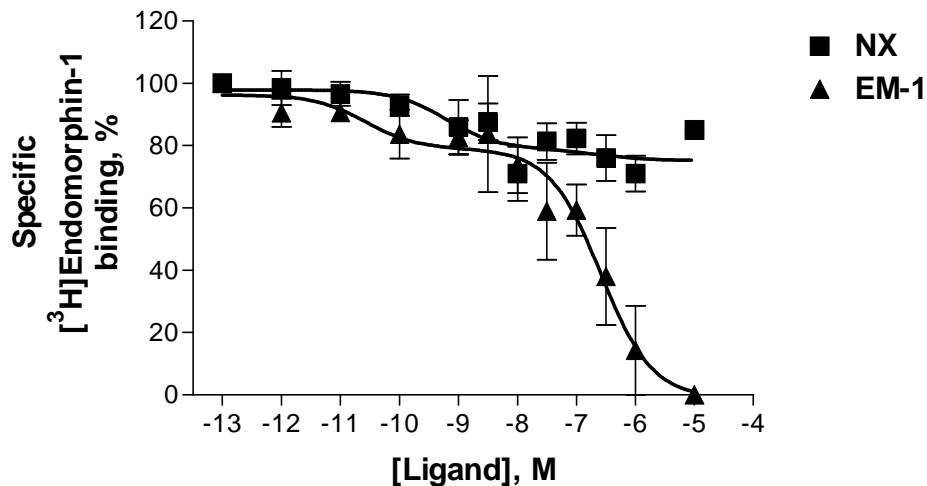
Triciált endomorfín-1 specifikus kötődése mu-opioid receptor hiányos egér agyi membránon.



A nonspecific binding was determined in the presence of 10^{-5} M naloxone (filled square), and in the presence of 10^{-5} M unlabeled endomorphin-1 (filled triangle).

3. ábra

Triciált endomorfín-1 kötődés leszorítása hideg endomorfín-1-el és naloxonnal mü-, delta- és kappa receptor hiányos egér agyi membránon.

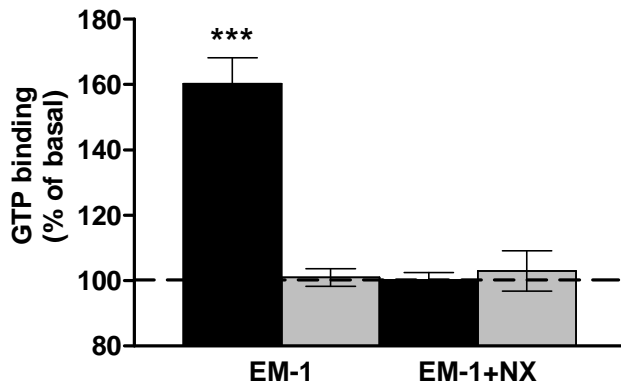


Tripla opioid receptor hiányos egér agyi membránokon 0.8 nM triciált endomorfín-1-et növekvő koncentrációjú (10^{-12} – 10^{-5} M) endomorfín-1-el, vagy naloxonnal inkubáltunk 45 percig 24 °C-on.

Ezen túlmenően funkcionális vizsgálatokat végeztünk adenilil cikláz aktivitás és G-fehérje aktiváció (4. ábra) mérése alapján. A klasszikus opioid receptorok jól vizsgálhatóak ezekkel a módszerekkel. Az újonnan felismert endomorfín-1-gyel jelzett, naloxonra inszenzitív receptorok azonban nem befolyásolják sem az adenilil cikláz aktivitását, sem pedig a G-fehérje aktivitást. Ezek a megfigyelések egy új receptorféleség jelenlétére utalnak.

4. ábra

Endomorfín-1 által indukált G-fehérje aktivációja patkány előagyban és kisagyban.



10^{-5} M endomorfín-1-et inkubáltunk 60 percig 30°C -on patkány előagyi (fekete oszlop) és kisagyi (szürke oszlop) membrán preparátumon naloxon (10^{-5} M) jelenlétében illetve hiányában. Eredményeinket legalább három egymástól független kísérletből kaptuk.

ENDOMORFINOK LOKALIZÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA AUTORADIOGRÁFIÁVAL

Bár az endomorfínok felfedezése 1997-ben megtörtént, autoradiográfias vizsgálatokról ezideig az irodalomból nem tudunk. Célunk volt ezek elvégzése, amit spanyol partnerekkel terveztünk. Mivel ezt TÉT pályázat keretében kívántuk megvalósítani, ez a munka a késői pályázati jóváhagyás miatt csak a 2007. év második felében indult el.

Az általunk triciált és karakterizált [³H]endomorfín-1-el és [³H]endomorfín-2-vel az autoradiográfiás kísérletek jelenleg is folyamatban vannak az UNED Pszichobiológiai Tanszékén (Prof. Emilio Ambrosio, Madrid, Spanyolország) Lewis és Fischer 344 (F344) patkány törzseken, valamint vad típusú és CB1 receptor hiányos egereken. Ezen patkány törzsek kiválasztására azért került sor, mert a F344 törzseknek szignifikánsan magasabb a proenkefalin (PENK) mRNS tartalma és [³H]DAMGO-val (mű specifikus peptid agonista) lényegesen több MOR kötőhelyet mutatnak agyban, mint a Lewis törzsek (Higuera-Matas, Sanchez-Cardoso; 2007), valamint eltérések mutatkoznak az endogén opioid rendszerben morfin önadagolást követően.

Az eddigi vizsgálatok alapján látható, hogy

1. az endomorfínok a várakozásnak megfelelően kolokalizációt mutatnak a DAMGO kötődésével
2. különbség mutatkozik az endomorfín 1 és 2 jelölés között a leszoríthatás tekintetében, amennyiben a triciált endomorfín 1-nek csak egy hányada mutat reverzibilis kötést jelöletlen ligandumával tesztelve adott koncentrációtartományon belül. Ez két receptor populáció jelenlétére enged következtetni.

A kísérletek és a kvantitatív kiértékelések jelenleg is folyamatban vannak. Az eddigi eredmények igen jó összhangban állnak a biokémiai vizsgálatokban találtakkal. **Az eredmények együttes publikációjára törekszünk.**

A naloxonra inszenzitív kötőhely teljeskörű karakterizálását meghaladóan azonban nem volt módunk a receptor izolálására ill. klónozására a támogatási összeg többrendbeli jelentős csökkentése miatt.

Terven kívül azonban tanulmányoztuk az opioid és nociceptin rendszer összefüggéseit, illetve szerkezet-hatás vizsgálatokat végeztünk újonnan kifejlesztett ligandumokkal az alábbiak szerint.

SZERKEZET-HATÁS VIZSGÁLATOK

A nociceptív neurotranszmitterek, neuromodulátorok hatásmechanizmusának tanulmányozásához elengedhetetlen eszközök a különleges sajátságokkal rendelkező ligandumok. Ezen a területen új kutatási irányok indultak el és jelentős előrelépés is történt az elmúlt években. Korábbi nemzetközi kapcsolataink eredményeképpen sikerült bekapcsolódnunk ezekbe a kutatásokba.. Ez abból a szempontból is indokolt volt, hogy lehetőség kínálkozott az endomorfínokkal szerkezeti hasonlóságot mutató vegyületek vizsgálatára és továbbfejlesztésére, amelyek segítségével az opioid rendszer heterogenitása újabb oldalról vált vizsgálhatóvá. Így került sor eredetileg delta specifitású szintetikus peptidok módosítására is a mű szelektivitás felé történő átalakítás céljából. Ez az

irány tekintetben is lényeges, hogy új terápiás támadáspontja lehet (immunterápia). Az első 'prototipikus' ligand ebből a sorozatból a TIPP (H-Tyr-Tic-Phe-Phe) volt, amelyet széleskörű szerkezet-hatás kölcsönhatás vizsgálatok követték. Új kifejlesztésű tetrapeptidok biokémiai és funkcionális analízisét tűztük ki célul. Az új analógok különböző szerkezeti és konformációs modifikációkat tartalmaznak az eredeti TIPP peptidhez képest, pl. ilyenek az első helyzetben lévő Tyr helyettesítése 2',6'-dimetiltirozinnal (Dmt), egy nem természetes aminosav a 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-3-karboxilsav (Tic²) jelenléte a hármask helyzetben, valamint a C-terminális amidálása. A Dmt¹ és β -Me-aminosav³ szubsztitúciók együttes hatását receptorkötési és G-fehérje aktivációs mintázatának a vizsgálatát írtuk le.

A főbb eredmények a következők voltak:

1. A fenilalanin oldalláncának metilálása β -metil-fenilalaninná diasztereomer párt eredményezett melyek közül a Dmt-Tic-(2*S*,3*R*) β MePhe-Phe analog potens δ -szelektív antagonistának bizonyult míg a Dmt-Tic-(2*R*,3*S*) β MePhe-Phe **nagyobb μ -receptor affinitást mutatott.**
2. A [³H]Dmt-Tic-(2*S*,3*R*) β MePhe-Phe radioligand δ -opioid kötőhelyekhez nagy affinitással, sztereószelektíven és jól telíthetően kötődött mind agyi frakciókban mind δ -opioid receptorokat stabilan expresszáló kínai hörcsög ovárium sejtekben.
3. Heterológ kompetíciós kísérletekben a radiojelzett [³H]Dmt-Tic-(2*S*,3*R*) β MePhe-Phe leszorítása jelöletlen ligandokkal $\delta > \mu > \kappa$ kompetíciós hatáserőségi mintázatot mutatott.
4. A β MeCha³ szubsztitúció a hármask helyzetben négy diasztereomer vegyületet eredményezett, melyek jó δ -receptor affinitással rendelkeztek míg szelektivitásuk nagyban függ a konfigurációjuktól.
5. A C-terminális amidálása a β MeCha³ szubsztituált analógoknál **μ -receptor affinitás és szelektivitás növekedést okozott.**
6. A Dmt¹ és β MePhe³ szubsztitúciók kombinációja sokkal potensebb és komplexebb analógokat eredményezett, melyek egyidejűleg δ -antagonista/agonista valamint kevert μ -agonista/ δ -antagonista „in vitro” tulajdonságokkal rendelkeznek sejt membrán preparátumokban.

Az újonnan szintetizált tetrapeptid analógok komplex tulajdonságaiknál fogva az opioid kutatás fontos elemei lehetnek. Ugyanakkor megnövekedett hidrofóbicitásuk, lipofil karakterük révén transzportálódhatnak az agy-vér gáton keresztül így a klinikai kutatás új vegyületeit képezhetik. Az endomorfínokkal (Endomorphin 1: Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂ és endomorphin 2: Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) való hasonlóságuk révén a farmakofór elemek egy újabb és érdekes sorozatát képezhetik azáltal, hogy egészen kis szerkezeti eltérések nagyban megváltoztatják a ligandumok tulajdonságait.

Ebből a témakörből a következő publikációk születtek : Tömböly és mts.i, Ioja és mts.i 2006 és 2007, Toth és mts.i. 2004 és 2007

AZ OPIOID ÁS KANNABINOID RENDSZER KÖLCSÖNHATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

A kutatás másik célja az opioid és kannabinoid rendszer vizsgálata volt opioid receptor génexpresszió és G-fehérje aktiválás szintjén. Quantitative Real-Time PCR-t alkalmaztunk az opioid receptorok mRNS szintjének meghatározására. A szignál transzdukciós események és a receptor-G-fehérje kapcsoltság nyomon követése céljából [³⁵S]GTPgammaS funkcionális biokémiai tetszet használtunk. Munkánkat receptor kötési tesztekkel egészítettük ki. Kísérleteinkhez vad típusú és CB1 kannabisz receptor hiányos egereket használtunk (forrás: Dr. K. Ledent, Brussels, Belgium). Az állatokat a Humán Morfológiai és Fejlődésbiológiai Intézetben (SOTE, Budapest) egyszeri alkalommal, intraperitoneálisan (i.p.) endogén kannabisz agonistával (noladin ether) (1mg/kg) kezeltük. A kombinált kezelések esetében CB1 (Rimonabant) vagy CB2 (SR144528) kannabisz receptor antagonistákat (0.1mg/kg) injektáltunk 30 perccel a noladin ether kezelés előtt. A kezeléseket követően az egerek agyát kipreparáluk és három részre osztottuk (előagy, kisagy és agytörzs). A pályázat első két évében a *kisagyi* és *előagyi* területekre koncentráltunk. **A legmarkánsabb változásokat a mü-(MOR) opioid receptorok esetében tapasztaltunk.**

Kisagyban, noladin ether (NE) kezelést követően a MOR génexpressziója nő, ezzel ellentétben a DAMGO (MOR peptid agonista) által indukált G-protein aktiváció szignifikánsan csökken CB1 vad típusú egerekben. CB1 receptor hiányos állatokban sem a MOR génexpressziója sem pedig a MOR G-protein aktivációja nem változik. A NE által kiváltott hatások Rimonabant (CB1 receptor antagonist) és SR144528 (CB2 receptor antagonist) előkezelésekkel voltak módosíthatók (Páldyová és mts.i, 2007), és valószínűsítettük, hogy az észlelt hatások indirekt módon mennek végbe.

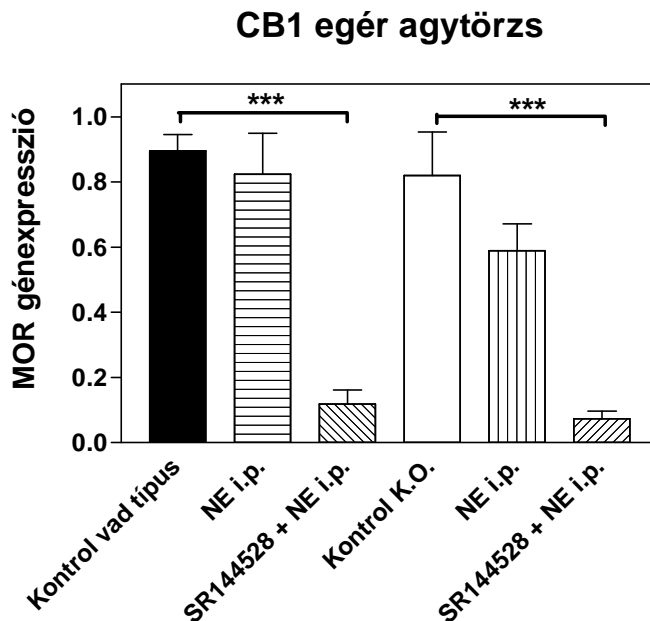
Előagyban mind a vad típusú, mind pedig a CB1 receptor hiányos egerekben szignifikáns gátlást tapasztaltunk a MOR génexpresszió szintjén NE kezelést követően. Ez a hatás a DAMGO által kiváltott [³⁵S]GTPgammaS kísérletekben is megfigyelhető volt. SR144528 (CB2 antagonist) előkezelést követően a NE által okozott gátlás mind a vad típusú mind pedig a CB1 receptor hiányos állatokban felfüggeszthető volt. Kísérleteinket *in vitro* [³⁵S]GTPgammaS mérésekkel is elvégeztük és hasonló eredményeket kaptunk. Ezekből megállapíthatjuk, hogy vad típusú és CB1 receptor hiányos egér **előagyban az endogén kannabinoid NE gátolja a MOR génexpressziót valamint a MOR G-fehérje aktivációt.** Ezt a hatást (*in vivo* és *in vitro* is) az SR144528 CB2 receptor antagonist felfüggeszti.

Ezek alapján, valamint a radioligand kötési tesztek eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy **a mü-opioid receptor mRNS expresszió és G-fehérje aktiváció megfigyelt NE gátlás valószínűleg CB2 receptorhoz kötött (Páldyová és mts.i, 2008)**. Ezek az eredmények nem csupán újabb bizonyítékai annak, hogy létezik interakció e két rendszer között, hanem alátámasztják a közelmúltban megjelent néhány publikáció idevonatkozó eredményeit is. Ezek szerint az immunsejtekre jellemző, úgynevezett „perifériás” CB2 receptorok az agy különböző területein is expresszálódnak és valószínűleg posztzinaptikusan helyezkednek el az agyi neuronokon (Van Sickle et al. 2005, Gong et al. 2006, Onaivi et al. 2008). Ezen tudományos tények ismeretében, valamint az eddigi eredményeink alapján kísérleteinket a CB2 receptorokban gazdag *agytrzs* területekre is kiterjesztettük.

Agytrzsben in vivo NE kezelést követően semmilyen változást nem tapasztaltunk a MOR génexpressziójában valamint a DAMGO által kiváltott G-protein aktivációban sem a vad típusú, sem pedig a CB1 receptor hiányos egereken. Kombinált (SR144528 0.1mg/kg + NE 1mg/kg) kezelést követően azonban szignifikáns gátlást tapasztaltunk mind a MOR génexpresszióban (5. ábra), mind pedig a G-protein aktivációban (III. táblázat).

5. ábra

Vad típusú és CB1 receptor hiányos egér agytrzséből izolált MOR mRNS szintjének ábrázolása. A kombinált (SR144528 + NE) kezelések szignifikánsan különböznek a kontroltól (hatóanyag nélküli DMSO oldattal kezelt) mind a vad típusú (**P<0.001) mind a CB1 receptor hiányos egérben (**P<0.001). Az ábra oszlopai 4-6 számú kísérlet átlagértékeit jelentik szórással.



III. táblázat

DAMGO által indukált G-fehérje aktiváció vad típusú és CB1 receptor hiányos egér agytörzsben NE és kombinált (SR144528 + NE) kezelést követően. A [³⁵S]GTPγS funkcionális tesztekben szignifikáns csökkenést látunk az E_{max} értékekben a kombinált kezelést követően mind a vad típusú (*P<0.05) mind pedig a CB1 receptor hiányos (*P<0.05) állatokban. A táblázat értékeit minimum 3 kísérlet átlagából számoltuk szórással.

$E_{max} \pm S.E.M.$ (DAMGO)	In vivo kezelt $CBI^{+/+}$ egér agytörzs			In vivo kezelt $CBI^{-/-}$ egér agytörzs		
	Kontroll	NE	SR144528+NE	Kontroll	NE	SR144528+NE
	170±5	165±7 ^{ns}	138±2 [*]	172±6	163±10 ^{ns}	135±2 [*]

Kísérleteinket *in vitro*, [³⁵S]GTPγS funkcionális teszttel is elvégeztük. Amíg a NE kezelés itt sem mutatott semmilyen változást, addig a kombinált (SR144528 1μM + NE 1μM) *in vitro* kezeléssel hasonló gátlást kaptunk, mint *in vivo* (IV. táblázat).

IV. táblázat

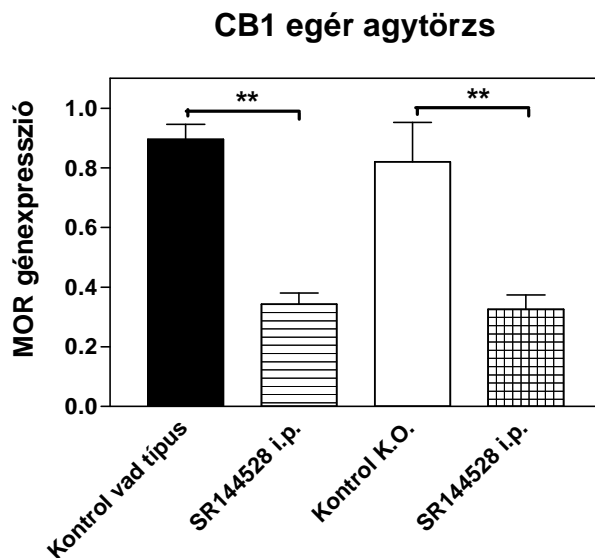
Vad típusú és CB1 receptor hiányos egér agytörzsben mért MOR G-fehérje aktiváció NE és kombinált (SR144528 + NE) kezelést követően *in vitro*. A [³⁵S]GTPgammaS funkcionális tesztekben szignifikáns csökkenést látunk az E_{max} értékekben a kombinált kezelést követően mind a vad típusú (**P<0.001) mind pedig a CB1 receptor hiányos (**P<0.01) állatokban. A táblázat értékeit minimum 3 kísérlet átlagából számoltuk szórással.

$E_{max} \pm S.E.M.$ (DAMGO)	In vitro kezelt $CBI^{+/+}$ egér agytörzs			In vitro kezelt $CBI^{-/-}$ egér agytörzs		
	Kontroll	NE (1μM)	+ SR144528+NE	Kontroll	NE(1μM)	SR144528+NE
	165±3	161±3 ^{ns}	139±3 ^{***}	166±3	173±5 ^{ns}	142±3 ^{**}

Ellentétben az előagyban látottakkal megállapíthatjuk, hogy **az agytörzsben a NE kezelés semmilyen változást nem okoz** a MOR génexpressziójában és G-protein aktivációjában. Mivel a kombinált kezeléssel minden esetben gátlást kaptunk, újabb intraperitoneális kezeléseket végeztünk a CB2 kannabisz antagonistá SR144528-al. Egyszeri SR144528 (0.1mg/kg) kezelés szignifikáns gátlást okozott mind a MOR mRNA expressziójában (6. ábra), mind pedig a DAMGO által aktivált [³⁵S]GTPgammaS funkcionális tesztekben (7. ábra) a vad típusú és a CB1 receptor hiányos egerekben is, megerősítve ezzel előző feltételezéseinket miszerint a **CB2 antagonistá SR144528 gátló hatással van a MOR aktivitására.**

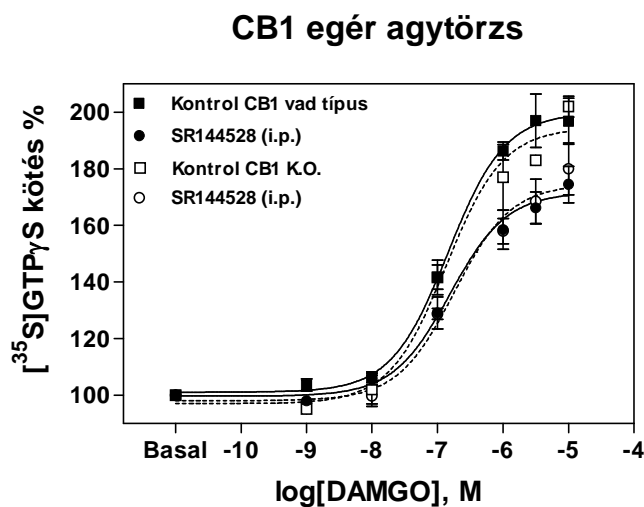
6. ábra

Vad típusú és CB1 receptor hiányos egér agytörzséből izolált MOR mRNS szintjének ábrázolása. SR144528 kezelések szignifikánsan különböznek a kontroltól (hatóanyag nélküli DMSO oldattal kezelt) mind a vad típusú (**P<0.01) mind a CB1 receptor hiányos egérben (**P<0.01). Az ábra oszlopai 3-6 számú kísérlet átlagértékeit jelentik szórással.



7. ábra

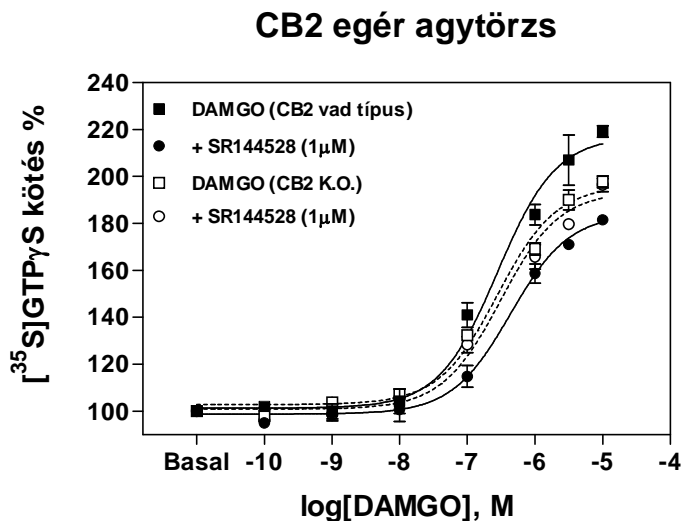
MOR G-fehérje aktiváció vad típusú és CB1 receptor hiányos agytörzsben *in vitro* SR144528 kezelést követően. Jelentős gátlást tapasztalunk a maximális stimulációban mind a vad típusú (***P<0.001) mind pedig a CB1 receptor hiányos (**P<0.01) állatokon SR144528 kezelést követően. Az ábrák pontjai (töltött jelek = vad típusú, üres jelek = CB1 receptor hiányos) 4-6 számú kísérlet átlagértékeit jelentik szórással.



Ennek további bizonyítására CB2 receptor hiányos egereken (forrás: Dr. A. Zimmer, Bonn, Németország) *in vitro* kezeléseket végeztünk SR144528-al (1 μ M). Jelentős gátlást kaptunk a vad típusú egér agytörzsben a [³⁵S]GTPgammaS funkcionális tesztben. A CB2 receptor hiányos egerben nem tapasztaltunk különbséget a kezelés hatására a kontrolhoz képest (8. ábra).

8. ábra

MOR G-fehérje aktiváció vad típusú és CB2 receptor hiányos agytörzsben *in vitro* SR144528 kezelést követően. Jelentős a gátlás a maximális stimulációban a vad típusú (***) állatokon SR144528 kezelést követően. A CB1 receptor hiányos állatokon nem tapasztaltunk szignifikáns változást a kezelés hatására. Az ábrák pontjai (töltött jelek = vad típusú, üres jelek = CB1 receptor hiányos) 4-6 számú kísérlet átlagértékeit jelentik szórással.

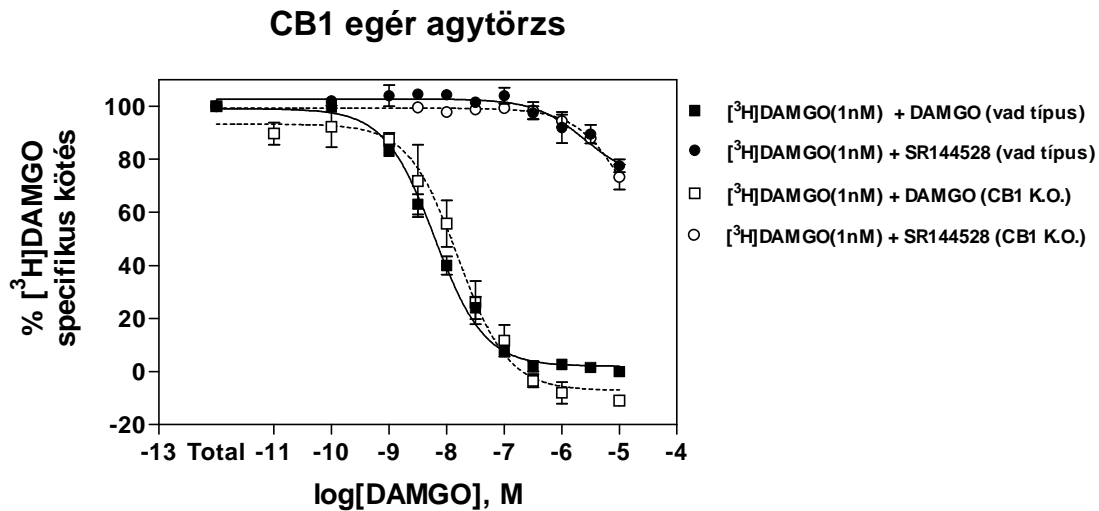


Összességében valószínűsíthetjük, hogy a mért hatások CB2 receptoron keresztül közvetítődnek. Ezt a feltételezést a radioligand kötési tesztek eredményei is alátámasztják (9. ábra).

Bebizonyítottuk, hogy **az agyban előforduló CB2 receptorok befolyásolják a mü-opioid receptorokat**. Az agyi CB2 receptorok funkciója ma még alig ismert. Jelentek meg publikációk arról, hogy szerepük lehet az akut fájdalomcsillapítás folyamatában, valamint a drogfüggés és a depresszió kialakulásában is (Malan et al. 2003, Ibrahim et al. 2006, Onaivi et al. 2008).

9. ábra

A DAMGO és az SR144528 kompetíciója [^3H]DAMGO kötési tesztben vad típusú (töltött jelek) és CB1 receptor hiányos (üres jelek) egerekből preparált agytörzsi membránokban. Az ábrák pontjai 3 számú kísérlet átlagértékeit jelentik szórással.



Irodalomjegyzék.

Gong, J-P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q-R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A., Uhl, G.R.: Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* 1071, 10-23, 2006.

Gündüz, Ö., Rizzi, A., Baldisserotto, A., Guerrini, R., Spagnolo, B., Gavioli, E.C., Kocsis, L., Magyar, A., Benyhe, S., BORSODI, A. and Caló, G. In vitro and in vivo pharmacological characterization of the nociceptin/orphanin FQ receptor ligand Ac-RYYRIK-ol. *Eur. J. Pharmacol.* 539, 39-48, 2006.

Gündüz, Ö., Sipos, F., Spagnolo, B., Kocsis, L., Magyar, A., Orosz, Gy., BORSODI, A., Caló, G. and Benyhe, S. In vitro binding and functional studies of Nociceptin / Orphanin receptor hexapeptides. *NeuroSignals* 15, 91-101, 2006.

Ibrahim, M.M., Rude, M.L., Stagg, N.J., Mata, H.P., Lai, J., Vanderah, T.W., Porreca, F., Buckley, N.E., Makriyannis, A., Malan, T.P.Jr. CB2 cannabinoid receptor mediation of antinociception. *Pain* 122, 36-42, 2006.

- Ioja, E., Benyhe, S., Tourwe, D., Tömböly, Cs., Tóth, G. and BORSODI, A.:
Opioid Receptor Binding Characteristics And Structure-Activity Studies Of Novel
Diastereomeric tetrapeptides in the TIPP (Tyr-Tic-Phe-Phe) Series.
Neurosignals 14, 317-329-8, 2006.
- Ioja, E., Tourwé, D., Kertész, I., Tóth, G., BORSODI, A. and Benyhe, S.:
Novel diastereomeric opioid tetrapeptides exhibit differing pharmacological activity
profiles. *Brain Res. Bull.* 74, 119-129, 2007.
- Kocsis, L., Benyhe, S., BORSODI, A., Rónai, A.Z., Al-Kharasani, M., Magyar, A. and
Orosz, G. Endomorphin related peptide alcohols: structure-activity studies. In: *Peptides
2000, Proceedings of the 26th European Peptide Symposium*. Eds: Jean Martinez, Jean-
Alain Fehrentz. ISBN:2-8425-048-4, Éditions EDK Paris, pp. 823-824, 2001.
- Lengyel, I., Orosz, Gy., Biyashev, D., Kocsis, L., Al-Khrasani, M., Rónai, A.Z.,
Tömböly, Cs., Fürst, Z., Tóth, G. and BORSODI, A
Side chain modifications change the binding and agonist properties of endomorphin 2.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 290, 153-61, 2002.
- Ligeti, M., Bősze, S., Csámpai, A., Gündüz, Ö., Rónai, A.Z., Medzihradzsky-Schweiger,
H., Benyhe, S., BORSODI, A., Hudecz, F. and Magyar, A. Synthesis of enzymatically
resistant nociceptin-related peptides containing a carbamic acid residue.
J. Peptide Sci. 12, 481-490, 2006.
- Ligeti, M., Gündüz, Ö., Magyar, A., Kató, E., Rónai, A.Z., Vita, C., Varga, I., Hudecz,
F., Tóth, G., BORSODI, A. and Benyhe, S. Synthesis and biological studies of nociceptin
derivatives containing the dtpa chelating group for further labeling with therapeutic
radionuclides. *Peptides* 26, 1159-1165, 2005.
- Malan, T.P.Jr., Ibrahim, M.M., Lai, P., Vanderah, T.W., Makriyannis, A., Porreca, F.:
CB2 cannabinoid receptor agonists: pain relief without psychoactive effects?
Curr. Op. Pharmacol. 3, 62-67, 2003.
- Monory, K., Bourin, M-C., Spetea, M., Tömböly, Cs., Tóth, G., Matthes, H., Kieffer,
B.L., Hanoune, J. and BORSODI, A. Specific activation of the μ -opioid receptor (MOR)
by endomorphin-1 and -2. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1-8, 2000.
- Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.-P., Patel, S., Meozzi, P.A., Myers, L., Perchuk, A.,
Mora, Z., Tagliaferro, P.A., Gardner, E., Macharia, D., Teasenfitz, L., Arinami, T., Uhl,
G.R. Brain neuronal CB2 cannabinoid receptor sin drug abuse and depression: from mice
to human subjects. *PloS ONE* 3, e1640, 2008.
- Páldyová, E., Bereczki, E., Sántha, M., Wenger, T., BORSODI, A. and Benyhe, S.:
Altered gene expression and functional activity of opioid receptors in the cerebellum of
CB1 cannabis receptor knockout mice after acute treatments with cannabinoids.
Acta Biol. Hung. 58, 113-130, 2007.

Páldyová, E., Bereczki, E., Sántha, M., Wenger, T., BORSODI, A. and Benyhe, S.:
Noladin ether, a putative endocannabinoid, inhibits μ -opioid receptor activation via CB2
cannabinoid receptors. *Neurochem. Int.* 52, 321-328, 2008.

Szatmári, I., Biyashev, D., Tömböly, C., Tóth, G., Mácsai, M., Szabó, Gy., BORSODI,
A. and Lengyel, I.
Influence of degradation on binding properties and biological activity of endomorphin 1.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 284, 771-776, 2001.

Tóth, G., Ioja, E., Tömböly, Cs., Péter, A., Chung, N.N., Schiller, P.W., Benyhe, S.,
BORSODI, A. and Tourwé, D.:
Beta-methyl substitution on Cha residue in Dmt-Tic-Cha-Phe peptides provides highly
potent delta agonists.
J. Med. Chem. 50, 328-333, 2007.

Tóth, G., Keresztes, A., Tömböly, C., Péter, A., Fülöp, F., Tourwe, D., Navratilova, E.,
Varga, É., Roeske, W.R., Yamamura, H.I., Szűcs, M. and BORSODI, A.:
New endomorphin analogs with mu-agonist and delta-antagonist properties.
Pure Appl. Chem. 76, 951-957, 2004.

Tömböly, Cs., Kövér, K., Péter, A., Tourwè, D., Biyashev, D., Benyhe, S., BORSODI,
A., Al-Khrasani, M., Rónai, A.Z. and Tóth, G.
Structure-activity study on the Phe side-chain arrangement of endomorphins using
conformationally constrained analogues.
J. Med. Chem. 47, 735-743, 2004.

Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N.,
Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., Marnett, L.J., Di Marzo, V., Pittman, Q.J.,
Patel, K.D., Sharkey, K.A.:
Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors.
Science 310, 329-332, 2005.