Acta Pharmaceutica Hungarica 71. 25–39. 2000

Az endorphinok fájdalomcsillapító hatásának felfedezése: ahogy azt az elfogult farmakológus látja

SZÉKELY JÓZSEF IVÁN

Gyógyszerkutató Intézet Kft., 1045 Budapest, Berlini-út 47–49

Summary

Székely, J. I.: Discovery of the analgesic action of β-endorfin: a subjective account

The contribution of the research workers of the Institute for Drug Research to some early discoveries in the field of endorphins is reviewed. The author takes pride in the fact the analgesic action of β-endorphin was described in his laboratory concurrently with an American and a British group, respectively. The other main findings of his laboratory include demonstration of the cross-tolerance between β-endorphin and morphine, description of the elevation of the pain threshold upon inhibition of the breakdown endogenous opioids by intracerebroventricular administration of bacitracin, attenuation of morphine tolerance by α-MSH and Met-enkephalin, pharmacological development and clinical examination of a highly potent enkephalin analogue, (D-Met²,Pro⁵)-enkephalinamide, coded as GYKI 14238.

Összefoglalás

A szerző a Gyógyszerkutató Intézet munkatársainak főbb eredményeit tekinti át, mellyel hozzájárultak az endorphin kutatásokhoz, legalábbis azok korai fázisában. A szerző büszke arra, hogy a β-endorphin analgetikus hatását az ő laboratóriumában írták le, egyidejűleg egy amerikai és egy brit munkacsoporttal. Főbb nemzetközi visszhangot keltő eredményeik többek között a β-endorphin és morfin közötti kereszt-tolerancia leírása; a bacitracin nevű enzimgátló szer agykamrai adását követő fájdalomküszöb emelkedés bizonyítása, ami az endogén opioidok metabolizmusának gátlásával jön létre; a morfin iránti tolerancia gátlásának leírása α-MSH, vagy Met-enkephalin egyidejű adása esetében; és a jelenleg ismertek közül a második legerősebb enkephalin származék, a D-Met²,Pro⁵-enkephalinamid (GYKI 14238) farmakológiai és klinikai fejlesztése voltak.

Bevezetés

Ez alkalommal a szerző megkísérli visszaidézni azokat az izgalmas éveket, amikor a Gyógyszerkutató Intézet munkatársai egy rövid ideig az endorphin kutatások főszereplői voltak. Negyed évszázad múltán az érintett kutatók kissé vegyes érzelmekkel tekintenek vissza saját eredményeikre és tévedéseikre.

Az „endorphin" kifejezést *Dr. Eric Simon* konstruálta az endogén és morfin szavak összevonásával. Azóta kiderült, hogy az úgynevezett „endorphinok", azaz a klasszikus opiátok endogén rokonai kémiailag különböző csoportokra oszthatóak, s ezek eltérő, esetenként biológiailag ellentétes funkciókat látnak el. Fő közös sajátosságuk, hogy biológiai hatásaikat naloxonnal meg lehet fordítani. Ez annyit jelent, hogy bár erősen különböznek egymástól, különböző opioid receptorokhoz való kötéseikből ugyanazon antagonistákkal szoríthatóak ki. Az opiát receptorok létezését a morfin származékok agy-szövethez való (kémiai) kötődésével bizonyították. Időközben kiderült, hogy nem csak az opioidok, hanem azok kötőhelyei is sokfélék a szervezetben. S e kötőhelyeiknek csak az egyik fajtája köti a klasszikus morfin-származékokat. Azonban naloxonnal mind a természetes mind a szintetikus opioidokat mind ki lehet szorítani a (különböző) receptorokkal képzett kötéseikből. Ma már ugyanis tudjuk, hogy sem az opiát receptorok és természetes endogén ligandjaik mind heterogének. A morfint kötő úgynevezett μ (mü)-receptorok endogén ligandjai az endomorphinok, míg a β-endorphin és az enkephalinok kötődnek az opiát receptorok egy másik alcsoportjához is, melyeket δ (delta)-nak jelölnek [1–4]. Ezek a receptorok közvetítik az opiátok okozta analgéziát és euphoriát. Azonban a κ (kappa) receptorokhoz kötődő dynorphin és az ω (ómega) (orphanin) receptorokhoz illeszkedő nociceptin a fájdalomküszöböt csökkentik és dysphoriát okoznak [5, 6]. Ezek az oligopeptidek a biológiailag inaktív prekurzorokból hasadnak le mint a proenkephalin [7], a proopiomelanocortin [8], a prodynorphin és a

pronociceptin [9] Az opiát receptorok fent említett fajtáit pedig időközben sikerült megtisztítani, klónozni és kémiailag jellemezni [10–13]. Így tehát messze túljutottunk azon leegyszerűsített elképzeléstől, mely szerint az endogén opioidok mind a morfinhoz hasonlítanak, s egy egységes receptorpopulációhoz kötődnek A visszaemlékezés szerzője örül annak, hogy munkacsoportja szerény módon, de vitathatatlanul hozzájárult az endorphin „story" alakulásához, mely mára elvezetett a sokféle endogén opioid és azok összetett hatásmechanizmusának megismeréséhez.

1965-ben *Li és mtsai* [14] sertésagyból egy addig ismeretlen polipeptidet izoláltak, mely állításuk szerint 90 aminosavból állt. Az anyagot β-lipotropinnak keresztelték el, mivel 10^{-4} mólos koncentrációban lipolízist okoz. A neve után viszont mások feltételezték, hogy az anyag fiziológiásan is részt vesz a lipidek metabolizmusában, s a szérum koleszterin-tartalmának szabályozásában. Ezért a Gyógyszerkutató Intézet egykori vezetői, akik új hatásmechanizmusú lipid csökkentő szereket kerestek, hozzá küldték tanulmányútra egy fiatal munkatársukat, *dr. Gráf Lászlót*. Ő hamarosan leírta, hogy a polipeptid valójában 91 aminosavból áll (az eltérést az egyik fel nem ismert ismétlődése okozta) és később leírta a juh és emberi β-lipotropin helyes szekvenciáját is [15, 16]. Azonban a következő években a β-lipotropinnal a szakirodalom nem sokat foglalkozott. Csak egy brit munkacsoport, *Smyth és mtsai*, akik leírták, hogy a polipeptid karboxi-terminális fragmense tripszines emésztéssel könnyen lehasad [17] Így hát a β-lipotropin C-terminális fragmense 3 laboratóriumban is előállításra került, s nyugodtan várta a polcon, hogy mint β-endorphin-t újra felfedezzék.

Az események egy látszólag független láncolata volt az első valóban tiszta opiát antagonista hatású vegyület, a naloxon szintézise [18], majd annak felismerése, hogy az opiát receptorok nem lehetnek egységesek, mert bizonyos morfin analógok naloxonnal szembeni érzékenysége nem egyforma. Így posztulálták *Martin és mtsai* [19, 20] a morfin érzékeny μ, ketocyclazocin-érzékeny κ és a később nem opioid-nak bizonyult σ receptorok létezését.

Az események egy harmadik „független" láncolata volt az opiát, azaz morfin-kötőhelyek leírása, először hibásan a sejtmagban *Goldstein és mtsai* [21], majd korrekten a plazma membrán/szinaptoszoma frakcióban *Pert* és *Snyder* [22], *Simon és mtsai* [23], illetve *Terenius* által [24]. Mivel a morfin testidegen anyag, többek között a mák egyik terméke, nem kötődhet „véletlenül" az agyi opiát receptorokhoz Kell lenni tehát endogén morfin-szerű anyag(ok)nak is, melynek nevét (*endogén morfin*) *Eric Simon* gondolta ki. Talán nem meglepő módon az opiát receptorok leírása az endogén ligand(ok) intenzív kutatásához vezetett. *Snyder* munkacsoportja az endogén morfin izolálásához az opiát receptor kötési technikát alkalmazta, míg *Kosterlitz* munkacsoportja szelektív morfin-érzékeny izolált-szervi preparátumokat használt, melyek elektromos ingerléssel kiváltott kontrakcióit az opiátok igen alacsony dózisaival fel lehet függeszteni Ők írták le azt is, hogy morfinnal igen jól lehet gátolni nemcsak a tradicionálisan használt tengeri malac ileumot, ahol az ingerlés okozta kontrakciókat az acetilkolin közvetíti, hanem az egér vas deferens készítményt is, melyben a noradrenalin az inergületátvivő anyag [25] Majdnem egyidejűleg izolálták az agyból az első két endogén, morfin hatású pentapeptidet, melyek szekvenciája Tyr - Gly - Gly - Phe - Met, ill. Leu és a Met-enkephalin, ill Leu-enkephalin neveket kapták [1, 2]

Fájdalomcsillapító hatásra az enkephalinokat nem is tesztelték ezekben a laboratóriumokban. Talán, mert nagyon is evidensek tűnt, hogy endogén morfin-szerű peptideknek kell bírniuk ilyen hatással. Igaz, volt egy laboratórium, ahol a Met-enkephalint analgetikus hatásúnak találták, de ez irányú hatása gyenge volt, s csak igen rövid ideig tartott, még az egyébként biztosan nem fiziológiás, igen magas 200 mM-os agykamrai dózisban is [26].

A tudományos közvélemény azonnal felmérte e felismerések jelentőségét. Sőt még sok nem-szakmabéli is gyorsan levonta a következtetést: az endogén opioidok felfedezésével végre elértük az orvostudomány egyik legrégebbi célját: erős fájdalomcsillapítás gyógyszer-tolerancia és függőség nélkül. Az ugyanis nyilvánvalónak látszott, hogy a szervezet nem szokhat hozzá a saját maga által termelt ingerület-átvivő anyagaihoz A lelkesedés csak tovább nőtt, amikor észrevették, hogy a β-endorphin magatartási tünetek egy sajátos együttesét hozza létre, többek között teljes immobilitást, areflexiát és izomtónus-fokozódást. Mivel közismerten hasonló tüneteket lehet előidézni a neuroleptikumok, mint chlorpromazin és haloperidol magas dózisaival is, egyesek arra következtettek, hogy az endorphinok funkciója megvédeni a szervezetet a schizophréniától [27] Mások viszont e tünetegyüttest a cataton schizophréniával azono-

sították, s arra következtettek, hogy a pszichózisok oka az endogén opioidok túltermelése [28] Ez utóbbi feltételezést fogadta el számos klinikus és ezért próbálkoztak hosszú éveken keresztül naloxonnal, vagy más tiszta opiát antagonistával kezelni a schizophréniát E feltételezésekben csak az a közös, hogy felületes szemantikai hasonlóságokon, illetve analógiákon alapultak (akár a lipotropin kifejezés), s persze meg is buktak

Egy további felismerés abban a három laboratóriumben született, ahol már korábban foglalkoztak a β-lipotropinnal Nevezetesen észre kellett venni, hogy a Met-enkephalin szekvenciája azonos a β-lipotropin 61–65 fragmensével Azonban a Leu-enkephalin szekvenciája nincs jelen a β-lipotropinban Ennélfogva a kérdések egy egész sora merült fel Nevezetesen:

– Lehet, hogy a Met-enkephalin a β-lipotropinból keletkezik? Ha igen, honnan keletkezik a Leu-enkephalin? Ha az enkephalinok az aktív endorphinok, miért olyan gyenge a Met-enkephalin analgetikus hatása? Keletkeznek más endogén opioidok is a β-lipotropinból? Vajon az endogén opioidok kötődnek a dopamin receptorokhoz is, s ez magyarázza szerepüket a pszichózisokban? Az opiát receptorok egységesek?

Időközben kiderült, hogy egy sor tévedés már a kérdések megfogalmazásában is belefoglaltatott Ugyanis azt kezdetben mindenki magától értetődőnek tartotta, hogy az endorphinok egy közös prekurzorból képződnek, s hatásaikat egy egységes receptor-populáció közvetítésével fejtik ki E kérdések megválaszolására alakult a Gyógyszerkutató Intézet endorphin csoportja, amikor kiderült, hogy az egyik nemrég felfedezett enkephalin, a Met-enkephalin, a β-lipotropin szekvencia részét képezi Ugyanis a Gyógyszerkutató Intézet egyike volt azon kevés kutatóhelynek, ahol β-lipotropin, a laboratórium polcain „várta", hogy felfedezzék hatékony fragmenseit, köztük az „igazit", azaz a 61–91 fragmenst, azaz a β-endorphint

Anyag és módszer

A β-lipotropint és fragmenseit *dr Gráf László* és *mtsai* izolálták természetes forrásból, ill nyerték a teljes peptid enzimatikus emésztésével, ahogy azt korábban leírták [15, 16] Met-enkephalint, ill származékait *dr Bajusz Sándor* és *mtsai* szintetizálták, s a kémiai analitikai meghatározásokat *dr Patthy Miklós* végezte (hivatkozásokat lásd lejjebb)

In vitro az alábbi opiát érzékeny izolált-szervi preparátumokat használtuk: tengeri malac ileum hosszanti sima-izom preparátum [29], izolált egér és patkány vas deferens készítmények [25, 30] A vizsgált anyagok analgetikus hatását standard, az irodalomban leírt módszerekkel mértük [hivatkozások: 31] Elhárítási menekülési feltételes reflexet ún „shuttle box" berendezésben vizsgáltuk ahogy azt korábban leírtuk [32] Catalepsiát patkányon *Morpurgo* [33] szerint mértük A vizsgált anyagokat sc., ip., iv adagoltuk Egyszeri agykamrai anyag-adás *Haley* és *McCormick* [34] szerint történt, míg ismételt adagolás esetén krónikus kanült ültettünk a jobboldali agykamrába

ED_{50} számítások probit analízissel *Litchfield* és *Wilcoxon* szerint történtek [35] A pA_2 értékeket *Arunlakshana* és *Schild* szerint számítottuk [36]

Eredmények

Versenyfutás: a Met-enkephalin-tól a β-endorphin-ig

Visszatekintve a történtekre a Met-enkephalin szerkezetének és a β-lipotropinhoz való kémai rokonságának ismeretében a β-endorphin felfedezése egy logikus fejleménynek látszik Azonban azok a csoportok, amelyek az enkephalinokat leírták [1, 2] a β-lipotropin szerkezetét nem ismerték Másrészt a Met-enkephalin analgetikus hatásának gyenge voltát, a pentapeptid metabolikus instabilitásának lehetett tulajdonítani Továbbá az is hamar kiderült, hogy β-lipotropinból enkephalinok nem képződnek Ezért csoportunk talán méltán lehet büszke arra, hogy a szóban forgó amerikai *(Li, Loh* és *mtsai)* és brit *(Smyth, Bradbury* és *mtsai)* munkacsoportokkal egyidejűleg jutott el a β-endorphin fájdalom-csillapító hatásának felfedezéséhez

Az enkephalinokkal foglalkozó első publikációk [1, 2] szemmel láthatólag „megkerülték" a legtermészetesebb kérdést, nevezetesen, hogy analgéziát elő lehet-e velük idézni Tekintettel a peptidek metabolikus instabilitására, és a vér-agy gáton való áthaladás nehézségeire, már eleve agykamrai (intracerebroventricularis = i c v) adagolás mellett kellett őket vizsgálni Azonban legnagyobb meglepetésünkre saját vizsgálataink ban a Met-enkephalin, patkány farok-elrántási (tail-flick) tesztben még agykamrai adagolás mellett is hatástalan volt [37] *Feldberg és Smyth* [38] macskán a Met-enkephalint ugyancsak hatástalannak találták Azonban *Belluzzi* és *mtsai* [26], ill *Büscher és*

mtsai [39] rövid ideig tartó analgéziát észleltek patkányon, ill egéren. A látszólagos ellentmondás oka feltételezhetően az alkalmazott dózissal függ össze. A legnagyobb általunk alkalmazott dózis 670 nM azaz 1 μg volt, hiszen a morfin ED_{50} értéke is néhány nM körül van *(I. táblázat)* Ezzel szemben *Belluzzi* és *mtsai* [26] 200 μg-ot adtak, azaz nagyságrendekkel magasabb dózisokat alkalmaztak Ezek szerint a természetes enkephalinok legalább 3 nagyságrenddel gyengébbek lennének, mint a morfin. Azonban *in vitro* az egér vas deferens és tengeri malac ileum preparátumokon a Met-enkephalin/morfin potencia hányados kb. 20, ill 1 [1, 40]. Ebből számunkra az következett, hogy a természetes enkephalinok, bár morfin-szerűek, a fájdalomküszöb szabályozásában aligha vehetnek részt, hiszen jól ismert, hogy különböző peptidázok szinte másodperceken belül elbontják őket [41]. A fájdalomküszöböt talán egy másik endogén opioid szabályozhatja, talán a β-lipotropin valamelyik fragmense. S bár ma már tudjuk, hogy az enkephalin termelő neuronok modulálják a nagy felszálló fájdalomérző pályákat [42], fiziológiás szerepük mind a mai napig tisztázatlan Másrészt a természetes enkephalinok „quasi" hatástalansága figyelmünket még inkább a β-lipotropin felé fordította.

I. táblázat

A β-lipotropin néhány fragmensének hatása patkány farokelrántási tesztben

Vizsgált fragmens	ED_{50} (± 95% konfidencia intervallum) agykamrai adás mellett
Morfin	7,7 (5,5-11,0) nM
β-lipotropin	17,0 (10,0-25,0) nM
β-lipotropin$_{61-91}$ = β - endorphin	0,59 (0,35-1,12) nM
β-lipotropin$_{61-65}$ = Met-enkephalin	> 400 μg
β-lipotropin$_{61-69}$	> 400 μg
β-lipotropin$_{61-79}$	> 400 μg
β-lipotropin$_{1-69}$	> 400 μg

Első lépésként magát a β-lipotropint vizsgáltuk. Bár a kísérletet negatív kontrollnak szántuk, döbbenten regisztráltuk, hogy magának az „intakt" prekurzornak is van analgetikus hatékonysága, a mólsúllyal kalkulálva, csak kb. 3–5-ször gyengébb, mint a morfiné [43] Bár az *in vivo* mérést más laboratóriumban is megerősítették, az anyag *in vitro* hatástalansága arra utal, hogy csak egy hasítási terméke közvetítheti az analgetikus effektust. Kb. egy tucat β-lipotropin fragmenst teszteltünk. A leghosszabb fragmens az 1–69 volt, s az is hatástalannak bizonyult. Majd kiderült, hogy minden hasítási termék bír valamelyes hatékonysággal, ha a fragmens Tyr_{61}-t amino-terminális pozícióban tartalmazza [44]. Az utóbbiakat összehasonlítva igen gyenge hatást találtunk a 61–69 fragmens esetében, s valamelyest erősebb effektust a 61–79 fragmens esetében. Időközben *Guillemin* és *mtsai* izolálták a 61–76, ill. és 61–77 fragmenst, s észlelvén azok *in vitro* hatékonyságát, azokat α-, ill γ-endorphin-nak keresztelték [45] Mi pedig a 61–79 fragmensnek a δ-endorphin nevet adtuk. Mint kiderült elsiettük a dolgot. Ugyanis nincs olyan enzim az agyban, mely hasítaná a Lys - Ser kötést a 69–70 pozícióban. Azonban természetes körülmények között a β-lipotropinból nem képződik α- és γ-endorphin sem, nem hasítja a szervezet a Met_{65}-Thr_{66} kötést sem. Tehát egyik fragmens sem keletkezik elegendő mennyiségben a β-lipotropinból, hogy analgéziát idézzen elő, s ez a Met-enkephalinra is vonatkozik. Azonban a β-lipotropin szekvencián belül az Arg_{60} - Tyr_{61} kötés könnyen elhasad, s így keletkezik a β-lipotropin$_{61-69}$ untriakontapeptid, melyet a *Li* munkacsoportja [46] nevezett el. A fragmensek szűrővizsgálatát, β-endorphin fájdalomcsillapító hatásának kimutatását egyidejűleg és egymástól függetlenül végezték *Loh és mtsai* egéren [46], *Bradbury és mtsai* macskán [38], és saját munkacsoportunk [37, 47] patkányon

Amint azt az *I. táblázat* mutatja a β-endorphin, ellentétben a Met-enkephalinnal, egy igen aktív vegyület. I.c.v adás mellett, molárisan számolva körülbelül 20-szor erősebb, mint a morfin Ennek ellenére a β-endorphin és Met-enkephalin relative, szerepe a fájdalomérzés szabályozásában mind a mai napig tisztázatlan Ugyanis a β-endorphin, a β-lipotropin és közös prekurzoruk, a proopiomelanocortin igazán magas koncentrációban csak a hypothalamus medio-bazális régiójában található, míg az enkephalinok megtalálhatók véges-végig a klasszikus felszálló fájdalom-érző pályák mentén [42]. Továbbá mára kiderült, hogy az agyban az endogén opioid peptideknek legalább 4 különböző családja található. Met-enkephalin a proenkephalinból keletkezik, Leu-enkephalin a dynorphin amino-terminális fragmense, melynek előanyaga a prodynorphin és a β-endorphin a fent említett proopiomelancortin-ból hasad ki [7-9] Nemrég írták le a nociceptin, előanyagát a pronociceptin, mely a dynorphinhoz hasalóan, illetve ellentétben az enkephalinokkal és β-endorphinnal a fájdalomküszöböt nem emeli, hanem csökkenti Tehát a 4 endogén opioid peptid család közül ket-

tő a fájdalomérzékenységet csökkenti, míg a másik kettő fokozza [7–9 és további irodalom: 48]. Továbbá amint azt fent említettük, maguk az opiát receptorok is 4 alcsoportra oszthatóak és az endogén opioidok különböző affinitással kötődnek az opiát receptorok altípusaihoz, melyek jele μ, δ, κ és ω [6, 19, 20, 49, 50]. Az egyetlen közös bennük, hogy mindegyik biológiai hatása megfordítható naloxonnal, az univerzális opiát antagonistával.

Amíg az opioidokkal kapcsolatos kiterjedt ismeretanyag összegyűlt, számos érdekes probléma merült fel. Ezek közül csak néhányat említünk, melyek tisztázásához valamelyest saját munkacsoportunk is hozzájárult.

Hogy válhat a szervezet toleránssá, sőt dependenssé a saját maga által termelt opioidok irányában?

Definíció szerint a tolerancia kialakulása, vagyis a farmakológiai hatékonyság fokozatos elvesztése ismételt adagolás esetében a klasszikus opiátok egyik fő sajátossága. Ezért az endogén opiátok felfedezését követően az egyik első kérdés volt, vajon irányukban is kialakul-e a tolerancia. A β-endorphin ezirányú vizsgálatát akadályozta, hogy kellő mennyiségben az anyag nem állt rendelkezésre. Ezért egy másik megközelítést kellett választani, aminek lényege a tolerancia és keresztolerancia alapját képező élettani folyamatok hasonlósága. Ez irányban két kísérletet végeztünk [51]. Az elsőben először agykamrai adagolás mellett meghatároztuk a morfin ill. a β-endorphin analgetikus ED_{50} értékét majd magas ismételt morfin dózisokat alkalmaztunk szisztémás adás mellett (20 mg/kg ip. naponta kétszer 3 napon keresztül). A negyedik napon az utolsó perifériás injekció hatásának lejárta után ugyancsak agykamrai adás mellett újra meghatároztuk az opioidok ED_{50} értékét. Amint a *II. táblázat* mutatja 3 napos morfin kezelést követően mind a morfin mind β-endorphin analgetikus ED_{50} értéke kb. megduplázódott, azaz hatékonyságuk lényegesen csökkent. Egy másik kísérletben ugyancsak agykamrai adás mellett vizsgáltuk a morfin és a β-endorphin egy - egy dózisának (30, ill. 3 nanomol) analgetikus hatékonyságát három egymást követő napon végzett napi 150 nanmol morfin ic.v. adása előtt, ill. azt követően. Az ismételt morfin kezelést követően annak teszt-dózisa már teljesen hatástalan volt, azaz analgetikus hatást nem váltott ki, míg a β-endorphin hatása lényegesen gyengült, de nem szűnt meg teljesen *(II. táblázat)*. Ez a kísérlet viszont arra utalt, hogy a morfin és β-endorphin között kereszt-tolerancia nem volt teljes.

II. táblázat

Keresztolerancia morfin és β-endorphin között patkány farokelrántási tesztben

Vizsgált anyag	ED_{50} nM (±95% confidencia intervallum)		Analgetikus ED_{50} Potencia hányados
	Tolerancia indukció elött és után		Utána/elötte
Morfin	3,14 (2,47-3,99)	7,45 (5,51-10,6)	2,37 (2,01-2,80)
β-endorphin	0,59 (0,35-0,82)	1,05 (0,66-1,59)	1,78 (1,05-3,00)

Velünk egyidejűleg hasonló adatokat közöltek mások is [52, 53]. Tolerancia kialakulását észlelték a β-endorphin egyéb hatásainak irányában is, mint a hyperthermia és catalepsia [52, 53]. Az enkephalinokat persze *in vivo* közvetlenül tesztelni nem lehetett. Azonban *Waterfield és mtsai* már 1976-ban leírták, hogy izolált-szervi preparátumokban (tengeri malac ileum és egér vas deferens) mind a morfin, mind a Met-enkephalin hatékonysága lényegesen csökkent, ha az állatokat előzetesen még *in vivo* morfinnal kezelték [40]. Ugyanebben az évben közölték *Wei és mtsai* [54], hogy szisztémásan adott naloxonnal jellegzetes opiát megvonási tüneteket lehetett kiváltani, ha a patkányok középagyi szürke állományába (az aqueductus tájékán) 70 órán keresztül, folyamatosan morfint, vagy β-endorphint, vagy Met-enkephalint infundáltak. (Azaz egy olyan agyi régióba, mely különösen nagy mennyiségben tartalmaz opiát receptorokat) [55]. Azonban ezt a hallatlanul izgalmas kísérletet, az egyetlent, mely természetes enkephalinok adása mellet a függőség kialakulására utalt [54] azóta sem erősítették meg. Viszont saját kísérleteinkben [56], egy *in vivo* igen hatékony enkephalin származékot, a (D-Met^2,Pro^5)-enkephalinamidot (kódszáma: GYKI-14238) használtuk. Amint a *III. táblázat* mutatja, ismételt kezelés GYKI-14238 jelű enkephalin származékkal, a morfinhoz hasonlóan szenzitizálta az állatokat a naloxon iránt. Azaz akár egy 4 napig tartó emelkedő dózis regiment alkalmaztunk, akár egyszeri nagy dózist alkalmaztunk, mind a morfin, mind a peptid adását közvetlenül naloxonnal, megvonási tüneteket lehetett kiváltani, ami fizikai függőség kialakulására utal. Amint a *III. táblázat* mutatja azonos dózisokkal való előkezelés esetében is kb. 3-szor kisebb naloxon dózissal lehetett megvonási tüneteket előidézni GYKI-14238-at követően, mint

morfin adás után. Vagyis a GYKI-14238 esetében a nagyobb analgetikus hatékonyságot (lásd lejjebb) erősebb dependencia kapacitás kísérte [56].

III. táblázat
Morfin és (D-Met^2,Pro^5)-enkephalinamid (GYKI-14238) okozta dependencia egéren

Agonista	Naloxone ED_{50} (±95% confidencia intervallum) mg/kg s.c.	
	Előkezelés agonistával	
	Egyszer	15 növekvő dózis 4 nap alatt
Morphine	2,60 (1,53-4,42)	0,10 (0,05-0,22)
GYKI-14238	0,73 (0,46-1,16)	0,03 (0,02-0,05)

*Dependenciát vagy egyetlen 100 mg/kg dózissal indukálva *Smits* [58] szerint vagy 15 növekvő dózissal 4 nap alatt *Saelens et al* [59] szerint

Összességükben ezek az adatok arra utalnak, hogy a β-endorphin és az enkephalinok a morfinhoz (klasszikus opiátokhoz) hasonlóan toleranciát és dependenciát idéznek elő. Természetesen azonnal felmerül a kérdés, hogy hogyan szokhat hozzá a szervezet a saját maga által termelt idegi hormonokhoz? Van ennek biológiai értelme? Ma már tudjuk, hogy a kérdésfeltevésünk nem volt pontos. Ugyanis az endogén opioid peptidek sohasem önmagukban termelődnek (hasadnak le a prekurzoraikból), s többféle hasítási termék egymás hatását módosíthatja. Továbbá fájdalom-inger hatására többféle endogén opioid is felszabadul. S a végső hatás ezek egyensúlyának megbomlása. (Vagyis a szervezet nem ad önmagának tisztán β-endorphint tartalmazó injekciót.) E helyen csak két kérdést érintenénk. A morfin és a β-endorphin közötti kereszt-tolerancia miért csak részleges? A β-endorphin iránti tolerancia kialakulását milyen endogén anyag gátolhatja természetes körülmények között?

– Tulajdonképpen sem az említett szerzők [52, 53] sem saját magunk [51] nem észleltünk teljes kereszt-toleranciát a β-endorphin és a morfin között. S ma már tudjuk, hogy miért. Morfin csupán a róla elnevezett μ-típusú opiát receptorokhoz kötődik, míg a β-endorphin nagyjából azonos affinitással kötődik a μ-típusú és enkephalinokat kötő δ-receptorokhoz. *Tseng és mtsai* [59–61] adatai szerint morfin noradrenalint és szerotonint szabadít fel a gerincvelőben, míg a β-endorphin Met-enkephalint különböző leszálló pályák közvetítésével. Így hát a kereszt-tolerancia részleges volta a morfin és a β-endorphin között nem meglepő.

Amint a későbbiekben kiderült az opiát toleranciát és dependenciát sok neurotranszmitter befolyásolja. Tekintettel a vonatkozó adatok sokaságára, itt csak néhány példa említésére van hely. *Van Ree és mtsai* közölték már 1976-ban, hogy a morfin és β-endorphin okozta tolerancia folyamata felgyorsult, ha az opioidokkal egyidejűleg a Pro - Leu - Gly tripeptidet is adagolták, azaz az oxytocin C-terminális szakaszát [52]. Azóta az oxytocin és a vele szerkezetileg rokon vazopresszin számos szerkezeti analógját állították elő és vizsgálták ez irányban. Ezek közül számos fokozta, vagy éppenséggel gátolta az opiát tolerancia és dependencia kialakulását [52, 62, 63]. Felmerül tehát, hogy ezen ugyancsak hypothalamikus hormonok élettani körülményeik között is befolyásolják az onnan felszabaduló β-endorphin által kiváltott plasztikus idegrendszeri változásokat. Ez persze csak feltételezés.

Az oxytocin karboxi-terminális fragmensét MIF-nek is nevezik, ami α-MSH Release Inhibiting Factor-t jelent. Az α-MSH (α-Melanocyte Stimulating Hormone) viszont az ACTH 1–13 fragmensének felel meg, amely a hormon katabolizmusa során lehasad belőle. Az ACTH viszont a proopiomelanocortin hasadási terméke, akárcsak a β-lipotropin (s az egyelőre ismeretlen élettani funkciójú γ-MSH). Saját kérdésünk az volt, hogy a tolerancia folyamatának fent leírt fokozása Pro - Leu - Gly által magyarázható-e az α-MSH termelésének gátlásával. Ezért egy további kísérletben [63] megvizsgáltuk az α-MSH hatását a morfin tolerancia és dependencia kialakulására. Amint a *IV táblázat* mutatja, ha az ismételt adagolás során a morfinnal együtt α-MSH-t is kaptak az állatok, a tolerancia kialakulása lassult, gátlódott. Kontrollként megvizsgáltuk a CLIP (Corticotrophin-Like Intermediate Lobe Factor) hatását is, amely az α-MSH lehasítását követően visszamarad az ACTH-ból. A CLIP hatástalan volt. Végül maga a MIF összhangban az irodalmi adatokkal [52] gyorsította a morfin tolerancia kialakulását *(IV táblázat)* [64]. Megvizsgáltuk továbbá az α-MSH és a MIF hatását az opiát függőség kialakulására. Érdekes módon e peptidek a naloxonnal kiváltható jellegzetes tünetek közül csak az egyiket befolyásolták. Nem befolyásolták a naloxonnal kiváltott megvonási ugrások számát, hypothermiát, de befolyásolták az ilyenkor észlelhető hirtelen testsúly-csökkenést. E tünet tekintetében a MIF fokozta és az α-MSH gátolta a megvonási szindrómát [64]. Összességükben ezek az adatok arra utalnak, hogy természetes körülmények között α-MSH lehet egyike azon neurohormonoknak, melyek gátolják β-endorphin iránti tolerancia kialakulását, hiszen

jól ismert, hogy az ACTH, a β-endorphin és β-lipotropin egyidejűleg szabadulnak fel különböző, zömmel stressz-jellegű ingerek hatására [irodalom: 65].

IV. táblázat

α-MSH, MIF és CLIP hatása a morfin toleranciára patkányon[x]

Morfinnal együtt adott farmakon[xx]	Mérés a tolerancia indukció előtt	Reakció idő (sec) átlag ± SE Mérés 30 perccel a morfin adás előtt vagy 30 és 60 perccel utána		
Saline	Előtte	3,53±0,09	8,96±0,25	7,93± 0,31
	Utána	3,62±0,09	6,23±0,36	4,82± 0,32
α-MSH	Előtte	3,44±0,10	8,47±0,34	8,37± 0,35
	Utána	3,65± 0,11	7,94[xxx]± 0,34	6,25[xxx]± 0,43
CLIP	Előtte	3,80±0,10	9,24±0,21	8,97±0,32
	Utána	3,53±0,08	6,36±0,33	4,32±0,27
MIF	Előtte	3,71±0,18	9,55±0,46	9,42±0,45
	Utána	3,67±0,17	5,48[xxx]± 0,27	3,44[xxx]± 0,17

[x] A morfin teszt dózisa 4,35 mg/kg, ami az analgetikus ED_{50} kb. 3-szorosa. Tolerancia indukció naponta 2x14,5 mg/kg s.c dózissal, ami az analgetikus ED_{50} kb. 10-szerese. Ismételt tesztelés az ötödik napon.

[xx] α-MSH azaz α-melanocyte stimulating hormone morfinnal együtt adva, 0,1 mg/kg dózisban, kivéve a teszteléskor. CLIP (corticotropin-like intermediate lobe peptide) az ACTH inaktív fragmense, ami az α-MSH adása után visszamarad. Dózisa 1,0 mg/kg a morfinnal együtt adva, kivéve teszteléskor. MIF (MSH release inhibiting factor) dózisa ugyancsak 1,0 mg/kg 1 órával a morfin előtt adva, hiszen feltételezett hatása a plazma α-MSH szintjének csökkentése.

[xxx] Szignifikánsan különbözik a fiz. sóval + morfinnal kezelt csoporttól

Azonban, ha ez a feltételezés egyáltalán igaz, akkor α-MSH csak az egyike lehet az endogén opioidok iránti toleranciát és dependenciát gátló neurohormonoknak, hiszen a preproenkephalin nem tartalmazza az ACTH szekvenciát, abból ACTH nem képződik. Másrészt egyre több adat van arra nézve, hogy különböző idegi hormonok ezeket az adaptív folyamatokat módosítják, vagy legalábbis módosíthatják. Pl. NO, a guanyl cyclase modulátor, ugyancsak részt vesz e folyamatok szabályozásában. Ugyanis N-ω-nitro-L-arginin, az NO szintetáze gátlója, állatkísérletekben, ugyancsak gátolja a morfin tolerancia kialakulását [66]. Vagyis azon neurohormonok listája, melyekről már tudjuk, hogy legalábbis kísérletes körülmények között az opiát tolerancia és dependencia folyamatát befolyásolják, egyre bővül.

További adatok pedig arra utalnak, hogy az endogén opioidok egymás ez irányú hatásait ugyancsak módosít(hat)ják. A nagyszámú erre vonatkozó kísérletes közlemény között a sajátunk az első között volt. Amint az *V. táblázat* mutatja, a morfin ismételt agykamrai adásával kiváltott analgetikus tolerancia gátlódott, ha azt Met-enkephalinnal kombinálva adagoltuk [67]. Vagyis az opiát tolerancia kialakulását módosíthatja, ha a μ-receptorokkal egyidejűleg a δ-típusúakat is izgatják. A dolog különösen bonyolulttá válik, ha figyelembe vesszük, hogy az endogén opioidok egy része nem analgéziát és euphoriát okoz, hanem dysphoriát. Pl. a vonatkozó kísérleti közlemények gondos átnulmányozása alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a dynorphin, a κ-receptorok endogén ligandja, csak a mechanikus ingerekkel létrehozott nociceptív reakciókat gátolja, azonban a hőingerek iránti érzékenységet nem befolyásolja és dysphoriát okoz [68]. Ennek ellenére egy-egy vizsgálat szerint a dynorphin mérsékli a morfin megvonás tüneteit [69] és opiát-depenedens majmokon a morfint dynorphinnal helyettesíteni lehet [70].

V. táblázat

Met-enkephalin hatása a morfin toleranciára patkányon[x]

Morfinnal együtt adott farmakon[xx]	Mérés a tolerancia indukció előtt	Reakció idő (sec) átlag ± SE Mérés 30 perccel a morfin adás előtt vagy 30 és 60 perccel utána		
Saline	Előtte	3,6±0,1	10,4±0,8	12,4±0,7
	Utána	3,5± 0,1	7,1±0,7	7,1±0,7
Met-enkephalin[xx]	Előtte	3,6±0,1	10,5±0,7	11,9±0,7
	Utána	3,6±0,1	8,8[xxx]±0,6	9,3[xxx]±0,8

[x] A morfin teszt-dózisa 30 nMol volt az oldalkamrába beépített kanülön keresztül adva. Tesztelés az 1. és 5. napon. Morfin tolerancia indukciója naponta egyszeri morfin kezeléssel (100 nM) a 2., 3. és 4. napon;

[xx] Az egyik csoport fiz. sót a másik 100 nM Met-enkephalint kapott a morfinnal egyidejűleg az oldalkamrába a 2., 3. és 4. napon;

[xxx] Szignifikánsan különbözik a fiz. só + morfinnal kezelt csoporttól

Vagyis az opiát tolerancia és függőség kialakulását nem lehet egyetlen receptor-populáció működésének változásaira visszavezetni. Természetes körülmények között az endogén opioidok egymás közötti és az endorphinok, ill. egyéb neurohormonok közötti funkcionális egyensúlyának eltolódása képezi e jelenségek alapját. Azonban a specifikus részletek tisztázása még éppen, hogy csak elkezdődött.

Valóban van kapcsolat az endorphinok és a schizophrenia között?

Az irodalom jelenlegi állása szerint maga a kérdésfeltevés is abszurd. Azonban vitathatatlan tu-

domány-történeti tény, hogy az endorphinokkal kapcsolatos legvakmerőbb és leglátványosabban megbukott elméletek e hormonok a schizophrenia keletkezésében játszott szerepére utalnak. A szenzációsnak tűnő „felismerések" alapját valójában két durva szemantikus félreértés képezte.

Az egyik alapja aránylag egyszerű. Gyakorló kísérletező farmakológusok jól tudják, hogy a klasszikus opiátok kísérleti állatokon, mindenek előtt patkányon, nagy dózisban az izomtónust fokozzák. Ezt a jelenséget a pszichofarmakológusok „catalepsia"-nak nevezik. Ezt a félig-meddig szakmai jargon-szerű kifejezést azonosították a „cataton" schizophreniával. (*Sine ira*: olyan kutatók, akiknek nem volt sok közük sem a psychiátriához, sem az állatkísérletes viselkedés-farmakológiához.) A szemantikus hasonlóság arra a következtetésre vezetett, hogy a schizophrenia az endogén opioidok, pontosabban az endorphinok túltermelésének következtében lép fel [28]. Ez a feltételezés vezetett ahhoz több mint egy évtizedig tartó klinikai próbálkozásokhoz, melyek során naloxonnal, vagy naltrexonnal próbálták kezelni a pszichotikus betegeket. S persze volt olyan klinikus, aki bizonyos tünetek átmeneti javulását vélte felismerni betegein a naloxon injekciót követően. Mások viszont az opiátok magatartási tüneteit, a klasszikus dopamin receptor gátló neuroleptikumok hatásaival keverték össze, patkányon [27]. Ugyanis az utóbbiak (mint pl. a chlorpromazin, vagy haloperidol) ugyancsak fokozzák az izomtónust, s ugyancsak szedációt okoznak azaz a spontán motilitás megszűnését. Azonban a klasszikus opiátok és a neuroleptikumok által előidézhető tünetek még „fenomenológiailag" sem egyformák. (Pl. az opiátok nagy dózisban minden-fajta reflexet gátolnak, míg a neuroleptikumok aktiválják a testtartási reflexeket.) S persze naloxonnal csak az opiátok okozta rigiditást lehet gátolni, a neuroleptikumok felületes szemlélő számára hasonlónak látszó hatásait nem.

A neuroleptikumok talán legspecifikusabb állatkísérletes hatása a feltételes reakciók gátlása. Ezért saját vizsgálatainkban a haloperidol, a morfin és GYKI-14238 ez irányú effektusait mértük össze [71]. Azt tapasztaltuk, hogy a morfin és GYKI-14238 csak olyan magas dózisban gátoltak egy előzetesen kiépített elhárítási-menekülési feltételes reflexet patkányon, mely már egyidejűleg súlyos ataxiát, catalepsiát, rigiditást és motoros debilitációt okozott. Ezzel szemben a haloperidol olyan alacsony adagban is gátolta a tanult motoros reakciókat, mely még semmiféle látható tünetet nem idézett elő. Vagyis opiátok esetében a feltételes reflexek gátlása csak a motoros koordináció másodlagos zavarként lép fel, míg ez a haloperidol esetében ez szelektív főhatás [71]. Ezzel magunk részéről a fenti hipotéziseket elvetettük.

Hatékony enkephalin analógok kutatása

A természetes enkephalinok *in vivo* hatástalansága csak egy rövid ideig volt érthetetlen. Látszólagos hatástalanságuk okait hamar kiderítették, s a nyert adatok utat mutattak a peptid-kémikusok számára, hogy milyen kémiai szerkezeti módosítások esetében lehet a természetes enkephalinoknál hatékonyabb analógokat remélni. E kutatásokat persze az a tévhit is motiválta, hogy az enkephalin-analógok nem hozzák majd létre a tolerancia és a függőség kialakulását. Ennél fogva az enkephalin analógok szintézise az amúgy is hirtelen népszerűvé vált endorphin kutatásokon belül is az egyik legintenzívebb művelt „téma"!!! volt. (Jellemző, hogy közel egy tucat szabadalmi kérelmet nyújtottak be a hatóságoknak az enkephalin származékokkal kapcsolatban, mielőtt *Hughes és mtsai* [1] történelmi közleménye megjelent volna.) S bár a β-endorphin aminosav szekvenciája is hamar ismertté vált, szerkezeti analógokat nagy számban az előbbiből állítottak elő. Saját csoportunk nagy szerencséje volt, hogy csatlakozott hozzánk a világhírű peptid-kémikus, *dr Bajusz Sándor*, aki mintegy 3–4 tucat enkephalin analógot szintetizált. Közülük (szisztémás adagolás esetén) a GYKI-14238 jelű, azaz (D-Met^2, Pro5)-enkephalinamid bizonyult a leghatékonyabbnak. Azonban a többi sem volt hatástalan, s a *Bajusz dr* által szintetizált peptidek, általában sokat segítettek a szerkezet-hatás összefüggések tisztázásához. Az alábbiakban tehát az általa előállított peptidek szerkezet-hatás összefüggéseit foglaljuk össze, persze a vonatkozó szakirodalom tükrében. Amint az alábbiakból is kiderült a természetes enkephalinok *in vivo* hatástalanságának 3 különböző oka van, s ezek figyelembe vételével lehetett hatékonyabb származékokat előállítani.

Metabolikus instabilitás

Ahogy ezt elsőnek *Hambrook és mtsai* [41] demonstrálták a természetes enkephalinok rendkívül instabil peptidek. Az amino-terminális Tyr (ami a biológiai hatás *sine qua non* feltétele) percek,

de inkább másodpercek alatt lehasad, ha a pentapeptidet plazmában, vagy agyi homogenátumban inkubálják. A további hasítást karboxi- és endopeptidázok végzik, de az elsőnek lehasadt termék az amino-terminális tirozin [41, 72]. A β-endorphin sokkal stabilisabb, s ez egyik oka lehet fokozottabb analgetikus hatékonyságának. Azonban a β-endorphin is lebomlik az agyszövetben. Ugyanis, agyszövetben inkubálva és bacitracint adva rendszerhez, lebomlása lényegesen lassult [73]. (Bacitracin egy nem-szelektív peptidáz gátló.) Továbbá, ha bacitracinnal együtt adagoltuk a β-endorphint az agykamrába, annak analgetikus hatása tovább tartott. Sőt bacitracint önmagában adva az agykamrába, a fájdalomküszöb mérsékelt, de statisztikailag szignifikáns meghosszabbodását észleltük [73]. Sajnos akkor, az endorphin-kutatások kezdeti évében nem volt időnk a kérdéssel tovább foglalkozni. Mindenesetre örülünk, hogy a peptid gátlók analgetikus hatását legjobb tudomásunk szerint elsőnek írtuk le. A hatásmechanizmus nyilvánvalóan az endogén opioidok elbomlásának a gátlása. Azóta már több szelektív enkephalinase gátlót is kifejlesztettek, s az egyik mint gyógyszer forgalomban is van (a székrekedés kezelésére, mivel egy a bélből fel nem szívódó preparátumról van szó).

Mivel a hasítás kritikus lépése az amino-terminális aminosav lehasítása, a peptid stabilizálásának elkerülhetetlen része a második helyen elhelyezkedő Gly helyettesítése egy d-aminsoavval (mivel a peptidázok sztereospecifikusak). Az első enzimatikusan stabilizált enkephalin-analógok előállítása kapcsán merült fel a kérdés, hogy a fájdalomcsillapító hatékonyság kizárólag az enzimatikus stabilitástól függ? Ezért egy további kísérletünkben párhuzamosan meghatároztuk az eredeti szintetikus enkephalin származékok analgetikus hatékonyságát és plazmában, ill. agyi homogenizátumban való lebomlásának sebességét [74]. Amint a *VI. táblázat* mutatja, a szintetikus enkephalinok mind lassabban bomlanak le mint a Met-enkephalin. Azonban nem volt korreláció a szintetikus peptidek lebontásának sebessége (stabilitása) és fájdalomcsillapító hatékonysága között [74]. A következtetés egyszerű: *in vivo* csak a metabolikusan stabilizált analógok hatékonyak, de az enzimatikus bontással szembeni rezisztencia önmagában még nem elég a farmakológiai hatékonyság biztosításához.

Átjárhatóság a vér-agy gáton

Tankönyvi adat, hogy a vér-agy gáton az aminosavak átjutása aktív transzporttal történik, de ez a peptidek nagy részére nem áll. Az első vonatkozó kísérletben *Rapaport és mtsai* [75] azt találták, hogy a radioaktív endorphinok csak kis mértékben képesek áthaladni a vér-agy gáton. Ami az enkephalinokat illeti, egyik laboratóriumban a vér-agy gáton való könnyű áthaladást észleltek [76], azonban egy másik szerint [77] erre alig képesek. Egyéb vizsgálatokból ismert, hogy az agyszöveben az enkephalinok a hatás helye közelében képződnek, s természetes körülmények között nem kell a perifériás oldal felöl áthaladniuk a vér-agy gáton, hogy hatást fejtsenek ki. A farmakológusok többsége ezt a problémát egyszerűen „oldotta meg", az enkephalinokat az agykamrába

VI. táblázat

A metabolikus stabilitás és analgetikus hatékonyság viszonya enkephalin (H-Tyr - Gly - Gly - Phe - Met/Leu-OH) analógok esetében

Aminosav a 2. pozícióban	Aminosav az 5. pozícióban	Retenció %: intakt az agyszövetben 0.5/2 óra múlva		Retenció %: intakt a plazmában 4 óra múlva	Analgetikus* ED_{50} i.c.v. nM	Analgetikus* ED_{50} i.v. mM/kg
Gly	Pro	10	0	0	< 1	64
Gly	Met	40	26	9	~ 1.5	0
D-Ala	Pro	78	54	NV	250	83
D-Ala	Pro-amid	85	62	89	1538	89
D-Etionin	Pro-amid	88	63	NV	5714	235
D-Met	Pro-amid	92	78	100	24242	3125
D-Nle	Pro-amid	93	74	100	7404	222
D-Phe	Pro-amid	100	85	100	250	204

* Analgézia vizsgálat: patkány farok-elrántási teszt

NV : nem vizsgáltuk

VII táblázat

Néhány opioid analgetikus hatékonysága agykamrai és intravénás adás mellett (saját és irodalmi adatok összefoglalása)

Vizsgálati anyag	ED_{50} i.c.v. µg/állat	ED_{50} i.v. mg/kg	Relatív hatékonyság: i.c.v vs. i.v. azaz nM/állat vs mg/kg X 100	Az adatok forrása citatum száma
Met-enkephalin	nem mérhető	inaktív	-	26, 37, 38, 39, 79
β-endorphin	1-5	inaktiv	-	37, 38, 46, 47, 53
(D-Nle^2, Pro^5)-enkephalinamid	~ 7	~ 222	32	74
(D-Ala^2, NleS^5)-enkephalin	~ 15	~ 35000	0,43	88
GYKI 14238[1]	0,03	230	0,13	81
FK 33-824[2]	0,002	700	0,03	84
Morfin	0,8	700	1,14	81

[1] [D-Met^2,Pro^5]-enkephalinamid

[2] [D-Ala^2,pNOPhe^{4}Met(0)^5-ol]-enkephalin

adagolta, s persze mi is így szűrtük az új vegyületeket. Azonban majdnem mindegyiket megvizsgáltuk vénás (iv.) adás mellett is. Az iv. és ic.v. adás mellett mért ED_{50} értékek összevetésével pedig felvilágosítást kapunk a vér-agy gáton való áthaladás mértékére vonatkozóan. (Mennél nagyobb az iv. és ic.v. adás mellett mért ED_{50} értékek hányadosa, annál gyengébb a vér-agy gáton való áthaladás képessége.)

Amint a *VII. táblázat* mutatja a morfinhoz viszonyítva az opioid peptidek penetráló képessége általában gyenge. Talán a β-endorphin lenne a kivétel, azonban az annak iv. hatékonyságára vonatkozó közleményt [78] nem erősítették meg. Magunk úgy gondoltuk, hogy ha iv. adás mellett van analgetikus hatás, azaz elegendő számú molekula eljut az agyi fájdalomcsillapítást közvetítő területekre, akkor az agyszöveten kívül-rekedt frakcióról „el lehet felejtkezni". Sajnos a klinikai kipróbálás során kiderült, hogy nagyot tévedtünk.

Azt is már korán leírták [79], hogy a karboxi-terminális Met^5 amidálása fokozta a hatékonyságot. Összességében ezek a korai adatok arra intettek, hogy strukturális módosításokat csak 2. és 5. pozícióban érdemes végezni, s hogy az amino-terminális bázikussá tétele fokozhatja a biológiai aktivitást. Saját, a szerkezet-hatás összefüggésekkel kapcsolatos korai adataink, a *VIII táblázatban* vannak összefoglalva [81-83]. Saját anyagaink közül a (D-Met^2,Pro^5)-enkephalinamid bizonyul a leghatékonyabbnak. Tudomásunk szerint, intravénás adagolás mellett állatkísérletben és emberen mind a mai napig ez második leghatékonyabb ismert enkephalin származék. SFK-33 824 a „riválís" molekula, ami kémiailag (D-Al^2, MePhe^4, Met-(O)^5-ol)-enkephalin, s *Römer* és *mtsai* fejlesztettek ki [84]. Azóta enkephalin származékot sok ezret állítottak elő. Ezek között néhány i.c.v. adás mellett hatékonyabb, mint a GYKI-14238, illetve az FK 33-824. Azonban szisztémás (iv., sc.) adás mellet ezek

Az opiát receptorok multiplicitása és hatás-szerkezet kapcsolatok az enkephalinok között

Chang és mtsai [79] írták le, hogy a szubsztituálatlan tirozin jelenléte amino-terminális pozícióban nélkülözhetetlen az opiát receptorokhoz való kötődéshez. A tirozin cseréje triptofánnal, vagy a fenolos OH-csoport eltávolítása, vagy egy másik hozzáadása a gyűrűhöz a receptor kötés teljes elvesztését eredményezte. Ma már általánosan elfogadott, hogy az enkephalin Tyr csoportja analóg a morfin A gyűrűjével. További vizsgálatok hamar kiderítették, hogy a második Gly komponens (azaz az Gly_3 a szekvenciában) mint „spacer" nélkülözhetetlen a kötődéshez, s a Phe_4 pedig feltételezhetően egy kiegészítő kötőhelyhez kapcsolódik [80].

VIII táblázat

Néhány enkephalin analog biológiai potenciáljának összehasonlítása patkány farok-elrántási tesztben (moláris mennyiség alapján)

Helyettesítés a 2. pozícióban	Helyettesítés az 5. pozícióban	Relatív analgetikus hatékonyság i.c.v. 1= morfin	Relatív analgetikus hatékonyság i.v. 1 = morfin
D-Ala	Pro-NH-Amil	0,08	0,10
D-Ala	Pro-NH-Etil	16,9	0,19
D-Ala	Pro-NH_2	3,9	0,22
D-Met	Pro-NH-Etil	16,9	0.55
D-Met	Pro-NH_2	49,8	5.5
Met-enkephalin		>0.001	nem mérhető
β-endorphin		5,32	0,04**

Adatok a 81–83, ill. a 78 citátumokból

a leghatékonyabbak. Azonban egyikből sem lett „csodaszer", ami a klasszikus morfin-származékokat helyettesíthette volna. A sikertelenség oka a klinikai kipróbálás során észlelet váratlan mellékhatásokra vezethetők vissza, azok viszont az opiát receptorok multiplicitásával függenek össze.

Kosterlitz és *Hughes* csoportja már 1976-ban felhívta a figyelmet, hogy a természetes enkephalinok hatékonysága nagyjából hasonló volt a morfinéhoz tengeri malac ileum készítményben, míg egér vas deferens preparátumban az enkephalinok kb. 20-szor erősebbek [40, 49]. Ezért az enkephalinok izolálása során az utóbbi készítményt használták a szerzők sorozat-vizsgálatok céljából. Egyébként az opiátok a tengeri malac ileumban az acetilkolin felszabadulást gátolják (preszinaptikusan) [29], míg egér vas deferens készítményben az opiátok a noradrenalin (elektromos ingerléssel kiváltott) felszabadulását gátolják [25]. Egyébként az említett brit munkacsoport [49, 85] és a sajátunk [86, 87] egyidejűleg figyelte meg, hogy

– Az opioidok (peptidek és klasszikus morfin származékok) analgetikus hatékonysága jobban korrelál a vizsgált anyagok tengeri malac ileumban mért IC_{50} értékével, mint az egér vas deferensben mért hatékonyságukkal,

– Több naloxon szükséges a természetes enkephalinok *in vitro* hatásának gátlásához, mint a (nor)morfin, β-endorphin és az *in vivo* hatékony enkephalin analógok esetében. Így pl. azt figyeltük meg [88], hogy a *Bajusz és mtsai* által [89] szintetizált, NleS és NleP-t (az 5. pozícióban) tartalmazó enkephalin analógok esetében a jobbra forgató sztereoizomérek egér vas deferens készítményen kevésbé aktívak, mint a balra forgató párjuk, de hatékonyabbak *in vivo*.

Ezek a megfigyelések késztették a *Kosterlitz csoportot* az ún. δ-opiát receptorok létezésének posztulálására, melyek nagy koncentrációban találhatók az egér vas deferens készítményben [49] és saját csoportunk tapasztalatai szerint nem kedveznek az analgetikus hatás létrejöttének [86, 87]. A természetes enkephalinok, lévén karboxi-terminálissal bíró peptidek, savanyú karakterűek. S amint azt már *Chang és mtsai* is megfigyelték [79], a met-enkephalin karboxi-terminálisának amidálása, azaz savanyú karakterének bázikusra váltása, fokozta a hatékonyságot. Saját analógjaink körében pedig azt észleltük, hogy bár a (D-Met^2,Pro^5)-enkephalin is hatékony volt, annak amidálása eredményezett egy igazán iv. is aktív analgetikumot (lásd a *VI. táblázatot*). Egyébként a C-terminális aminosavat el lehet hagyni, ha karboxi-terminális amidálva van, s az N-terminális egy guanidino-csoportot is tartalmaz [89]. Így például ciklikus imino-savval helyettesítve a C-terminális alifatikus aminosavat amidálva vagy guanidino-csoporttal kiegészítve az N-terminálist fokozta a peptidek hatékonyságát a tengeri malac ileumban, csökkentette potenciájukat egér vas deferens preparátumban és megnövelte fájdalomcsillapító effektusukat *(IX. táblázat)*.

IX. táblázat

Néhány amidált tetra- és pentapeptid analóg aktivitása N-terminális guanidino-csoporttal, ill. anélkül (aktivitások in vitro normorfinhoz (= 1) és in vivo morfinhoz (= 1) viszonyítva) általános szerkezet: X-Tyr-Y-Gly-Phe-O

Szerkezet	Relatív aktivitás in			
X - Y - O	Tengeri malac ileum hosszanti sima-izom preparátum	Egér vas deferens preparátum	Patkány farok-elrántási teszt, adagolás i.c.v.	Patkány farok-elrántási teszt, adagolás i.v.
H-Tyr-D-Met-Pro-NH_2	7,9	7,9	64,6	4,2
H_2N-CH-NH-D-Met-Pro-NH_2	173,0	25,0	10,5	0,65
H-Tyr-D-Met-NH_2	17,0	4,1	12,1	2,2
H_2N-CH-NH-D-Met-NH_2	79,0	21,0	210,0	4,4

Egy további kísérletben a morfin, β-endorphin és a GYKI-14238 analgetikus hatásának naloxonnal való antagonizálhatóságát hasonlítottuk össze egéren és patkányon *(X. táblázat)* [90]. Egéren nem volt különbség a pA_2 értékek között, azaz közel azonos mennyiségű naloxon kellett mindhárom peptid analgetikus hatékonyságának megfelezéséhez azaz az ED_{50} értékek megduplázásához. Patkányokban a naloxon pA_2 értéke a morfinnal szemben hasonló volt az egérben nyert értékhez. Azonban patkányon a naloxon pA_2 értéke a β-endorphinnal és a GYKI-14238-cal szemben szignifikánsan magasabb volt, mint egéren, ill. patkányon a morfin ellenében *(X. táblázat)*. Ezek az adatok [90] arra vallanak, hogy az analgézia mechanizmusát illetően nem lehet könnyű általánosításokat tenni. Hiszen egéren egyetlen közös, azaz legalábbis a naloxon iránt egységesen érzékeny receptor populáció közvetítheti a fájdalomcsillapító hatást, míg patkányon más-más receptor típusok

mediálhatják a morfin, ill. e hatékony peptidek analgetikus effektusát

X. táblázat

*Néhány opioid antagonizálhatósága naloxonnal: a pA_2 értékek meghatározása in vivo**

Agonista	Mért („látszólagos") pA_2 értékek átlag ± SE	
	Egér "forró lemez" teszt	Patkány farok-elrántási teszt
GYKI 14238	6,73±0,11	7,51±0,06
β-endorphin	6,79±0,09	7,55±0,10
Morfin	7,17±0,09	7,17±0,09

*Agonisták adása i.c.v., a naloxon injekciója s.c. történt

Negatív klinikai tapasztalatok az enkephalin származékokkal

A nemzetközi erőfeszítések lényegében két vegyületet eredményeztek, melyek elérték a klinikai kipróbálás fázisát mivel állatkísérletekben hatékonyak voltak iv. és sc. adagolás mellett is. Ezek a következők: FK 33-824 és az GYKI-14238. Klinikai kipróbálásra került továbbá a BW942C jelű vegyület, mely a GYKI 14238 származéka, s csak abban különbözik a kiinduló vegyülettől, hogy a Phe^4 csoportra egy para-NO_2 csoportot vittek. Kipróbálták továbbá a D-Ala^2, Met-enkephalint és magát a β-endorphint is [91]. Lényegében igen hasonló adatokat nyertek mindegyikkel, ezért a kapott klinikai adatokat közösen tekintjük át. A fő terápiás célkitűzés természetesen a fájdalomcsillapítás volt, de tekintettel a röviden áttekintett állatkísérletes adatokra a vegyületeket bizonyos elmebetegségek kezelésében is kipróbálták. Természetesen a klinikusok elsősorban a hozzászokás kialakulásától tartottak, továbbá a morfin származékok jól ismert egyéb mellékhatásaitól, mint a légzésdepresszió, vizelet-retenció stb.

A klinikai tapasztalatok alapvetően negatívak voltak a vegyületek nem váltották be a hozzájuk fűzött nagy reményeket. Ezért a vizsgálatokat a klinikai kipróbálás korai fázisaiban mindegyik enkephalin-származékkal megszakították. Meglepő módon a vegyületek nem idézték elő a morfinszármazékok ismert mellékhatásait sem, mint hozzászokás, légzésdepresszió stb. Euphoriát sem észleltek. Igaz e vegyületek valamelyest emelték a fájdalom-küszöböt egészséges önkénteseken [97, 101] és betegeken is [97]. Azonban az észlelt analgetikus hatás gyenge volt. Persze lehet, hogy az alkalmazott dózis emelésével az analgetikus hatás is fokozódott volna. Azonban a dózis emelésével egy sor mellékhatás lépett fel, melyek miatt azokat tovább növelni nem lehetett (lásd lejjebb). A pszichózisok kezelésére csak az FK 33-824 jelű enkephalin származékot próbálták ki, de hatástalan volt, sőt a betegek konfúzióját csak fokozták.

A mellékhatások mindenek előtt igen szokatlan, a klasszikus opiátok által előidézettekhez egyáltalában nem hasonló tünetek voltak, többek között: az arc sápadtsága, a kötőhártya belövelltsége, borborygmus, polyuria. Továbbá az orr eldugulása, polyuria, s a szájszárazság. A legjellemzőbb a végtagok zsibbadása volt. A dózis-növelést limitáló mellékhatás ortosztatikus kollapszus volt. Ami a centrális tüneteket illeti az önkéntesek (köztük e tanulmány a szerzője) az alábbiakat észlelte magán: bágyadtság, fáradtság-érzés, valamelyes szorongás-csökkenés és az euphoria, ill. dysphoria egy furcsa nehezen leírható keveréke. Az önkéntesek egy része a tüneteket annyira szokatlannak észlelte, hogy komolyan megijedt.

Ami a meglepő klinikai tapasztalatok értelmezését illeti, talán az észlelt diuretikus hatás nyújthat útmutatást. Az ugyanis jól ismert, hogy a κ-opiát receptorok agonistái diurézist idéznek elő [106]. Másrészt, amint azt említettük, a κ-receptorok agonistái dysphoriát okoznak [91]. Az autonóm idegrendszer bőven tartalmaz κ-receptorokat [55]. Ezért feltételezzük, hogy az enkephalain analógok az említett autonóm tüneteket azért hozzák létre, mert a molekulák jó része a vér-agy gáton kívül reked, e receptorokat izgatja. S a létrejövő dysphoria elfedi a centrális μ- és δ-receptorok által előidézett euphoriát. A „dysphoriának köszönhetően" az enkephalin analógok irányában hozzászokás nem alakul ki, hiszen ennek alapfeltétele, hogy a betegekben a szer euphoriát idézzen elő. Másrészt a kellemetlen mellékhatások és a fájdalomcsillapító hatás gyenge volta a klinikai alkalmazást is kizárja.

IRODALOM

1 *Hughes, J., Fothergill, L. A., Kosterlitz, H. W., Morgan, B. A., Morris, H. R.*: Identification of two related pentapetides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature *258*, 577-579 (1975).

2 *Simantov, R., Snyder, S. H.*: Isolation and structure identification of a morphine-like peptide „enkephalin"in the bovine brain. Life Sci. *18*, 781-788 (1976).

3 *Li, C. H., Chung, D.*: Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from the pituitary. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1145-1148 (1976).

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

5 *Goldstein, A , Tachibana, S., Lowney, L , Hunkapiller, M , Hood, L* : Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. Proc. Natl. Acad. Sci USA *76*, 6666-6670 (1979).
6 *Meunier, J -C , Mollereau, C , Toll, L , Suaudeau, C, Moisand, C , Alvinerie, P., Butour, J -L , Guillemot, J -C , Ferrar, P., Monsarrat, B , Mazarguil, H , Vassart , G , Parmentier, M., Costentin, J.*: Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL_1 receptor. Nature 377, 532-535 (1995).
7 *Noda, M , Furutani, Y, Takahashi , H , Toyosato, M , Hirose, T., Inayama, S., Nakanishi, S , Numa, S* : Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. Nature *295*, 202-206 (1982).
8 *Nakanishi, S, Inoue, A, Kita, T., Nakamura, M , Chang, A. C Y, Cohen, S. N , Numa, S*: Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-β-lipotropin precursor. Nature, *278*, 423-427 (1979)
9 *Kakidani, H., Furutani, Y, Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y, Hirose, T., Asai, M , Inayama, S., Nakanishi, S , Numa, S* : Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine β-neoendorphin/dynorphin precursor. Nature *298*, 245-249 (1982).
10 *Wang, J -B , Johnson, P. S , Perisco, A M , Hawkins, A L , Griffin, C. A , Uhl , G.*: Characterisation and chromosomal assignement. FEBS Lett. *338*, 217-222 (1994)
11 *Evans, C. J., Keith, D. E ,Jr., Morrison H , Magendzo, K , Edwards, R H* : Cloning of delta opioid receptor by functional expression. Science *258*, 1952-1955 (1992)
12 *Xie G.-X , Meng, F., Mansour, A , Thompson, R C., Hoversten, M T., Goldstein, A , Watson, S. J , Akil, H.* Primary structure and functional expression of a guinea pig κ opioid (dynorphin) receptor. Proc. Natl. Acad. Sci USA *91*, 3779-3783 (1994).
13 *Mollereau, C., Parmentier, M , Mailleux, P., Butour, J -L ; Moisand, C , Chalon, P, Caput, D , Vassart, G , Meunier, J.-C* : ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localisation. FEBS Lett. *341*, 33-38 (1994).
14 *Li, C H , Barnafi, L , Chretien, M., Chung, D* : Isolation and amino acid sequence of b-liptropin sequence from sheep pituitary gland. Nature *208*, 1093-1094 (1965).
15 *Gráf, L , Li, C H* : Action of plasmin on ovine β-lipotropin: revision of the carboxyl terminal sequence. Biochim. Biophys. Res. Commun. *53*, 1304-1309 (1973).
16 *Gráf, L., Barát, E., Cseh, G , Sajgó, M* : Amino acid sequence of porcine β-lipotropic hormone. Biochim. Biophys. Acta (Amsterdam) 229, 276-278 (1971)
17 *Bradbury, A. F, Smyth, D. G , Snell, C R.; Birdsall, N. J. M; Hulme, E C.*: Structural and conformational relationships between enkephalins and the opiates. Nature *260*, 793-795 (1976).
18 *Földes, F. F, Lunn. J N , Moore, J , Brown, J. M* : N-allynoroxymorphon a new potent narcotic antagonist. J. Amer. Med. Sci. *245*, 23-30 (1963).
19 *Martin, W. R., Eades, C G , Thompson, J A , Huppler, R E., Gilbert E.*: The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. *197*, 517-532 (1976).
20 *Gilbert, P. E., Martin, W. R* :The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent, morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. *198*, 66 -82 (1976)
21 *Goldstein, A , Lowney, L I., Pál, B K* : Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in the subcellular fractions of the mouse brain. Proc. Natl. Acad. Sci USA *68*, 1742-1747 (1971)
22. *Pert, C. B , Snyder, S. H* : Opiate receptor. Demonstration in nervous tissue. Science 179, 1011-1014 (1973).
23 *Simon, E. J , Hiller, J M , Edelman, I.*: Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H)-etorphine to rat brain homogenate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *70*, 1947-1949 (1973)
24. *Terenius, L* : Characteristics of the „receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. Acta Pharmacol. Toxicol. *33*, 377-384 (1973)
25. *Hughes, J., Kosterlitz, H W, Leslie, F. M* : Effect of morphine on adrenergic transmission in the mouse vas deferens. Assessment of agonist and antagonist potencies of narcotic analgesics. Brit. J. Pharmacol. 53, 371-181 (1975).
26. *Belluzzi, J D , Grant, N., Garsky, V., Sarantakis, Wise, C. D., Stein, L* : Analgesia induced *in vivo* by central administration of enkephalin in rat. Nature *260*, 625-626 (1976)
27. *Jacquet, Y. F., Marks, N.*: C-fragment of β-lipotropin: an endogenous neuroleptic or antipsychotogen ? Science *194*, 630-632 (1976)
28. *Bloom, F., Segal, D , Ling, N., Guillemin, R* : Endorphins: profound behavioural effects in rats suggest new etiological factor in mental illness. Science *194*, 631-632 (1976).
29. *Paton, W D M Vizi, E S* : The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig ileum longitudinal muscle strip. Brit. J. Pharmacol. 35, 10-28 (1969.
30 *Schulz, R , Faase, E , Wüster, M , Herz, A.*: Selective receptors for β-endorphin on the rat vas deferens. Life Sci. *24*, 843-849 (1979)
31. *Székely, J. I., Dunai-Kovács, Z , Miglécz, E , Rónai, A Z , Bajusz, S.*: In vivo antagonism by naloxone of morphine, β-endorphin and a synthetic enkephalin analog. J. Pharmacol. Exp. Ther. *207*, 878-883 (1978).
32. *Sineger, E., Horváth, K , Miglécz, E , Tarnawa, I , Andrási, F , Székely, J I* : Morphine and [D-Met^2,Pro^5] enkephalinamide do not show specific neuroleptic activit. Eur. J. Pharmacol. *80*, 359-368 (1982).
33 *Morpurgo, C* : Effects of antiparkinson drugs on a phenothiazine-induced catatonic reaction. Arch. Int. Pharmacodyn. *137*, 84-90 (1962) .
34. *Haley, T. J , McCormick, W.G.*: Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. Brit. J. Pharmacol. *12*, 12-15 (1957)
35 *Litchfield, J T., Jr., Wilcoxon, F* : A simplified method of evaluating the dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther. *96*, 99-113 (1949).
36 *Arunlakshana, O , Schild, H O* : Some quantitative uses of drug antagonists. Brit. J. Pharmacol. 14, 48-58 (1959)
37. *Gráf, L., Székely, J I., Rónai, A Z , Dunai-Kovács, Z , Bajusz, S.*: Comparative study on analgesic effect of Met^5-enkephalin and related lipotropin frgaments. Nature *263*, 240-241 (1976).
38. *Feldberg, W., Smyth, D G* : The C-fragment of lipotropin-A potent analgesic. J. Physiol. (London) *260*, 31P (1976).
39 *Büscher, H. H , Hill, R C., Römer, D., Cardinaux, F., Closse, A., Hauser, D , Pless, J.*: Evidence for analgesic activity of enkephalin in the mouse. Nature *261*, 423-425 (1976).

40 *Waterfield, A A, Hughes, J, Kosterlitz, H W.*: Cross tolerance between morphine and methionine- enkephalin Nature *260*, 625 -626 (1976)

41 *Hambrook, J M, Morgan B.A, Rance, M J, Smith, C.F.C*: Mode of deactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain homogenates. Nature *262*, 782-783 (1976).

42 *Székely, J. I.*: „Regional distribution of enkephalins and endorphins in the brain and in the peripheral tissues", in: *Székely, J I, Rónai A.Z*, Opioid Peptides, Volume III, Opiate Receptors and their Ligands, CRC PRESS, Boca Raton, Florida, 1983 107 - 137. p.

43 *Rónai, A. Z., Székely, J I, Gráf, L, Dunai-Kovács, Z, Bajusz, S*: Morphine-like analgesic effect of a pituitary hormone, β-lipotropin. Life Sci *19*, 733-738 (1976)

44 *Gráf, L, Rónai, A Z, Bajusz, S., Cseh, G, Székely, J. I*: Opioid agonist activity of β-lipotropin fragments: a possible source of morphine-like substances in the pituitary. FEBS Lett. *64*, 181-184 (1976).

45 *Guillemin, R, Ling, N, Burgus, R*: Endorphins, peptides d'origine hypothalamique et neurohypophysaire á activité morphinomimetique Isolement et structure moléculaire de l'α-endoprhine. C.R Acad Sci Paris *282*, 783-785 (1976).

46 *Loh, H H, Tseng, L F., Wei, E, Li, C J.*: β-Endorphin is a potent analgesic agent Proc. Natl. Acad Sci. USA *73*, 2895-2895 (1976).

47 *Székely, J I,Rónai, A. Z, Dunai-Kovács, Z, Gráf, L., Bajusz, S*: C-terminal fragment of β-lipotropin: is it the natural opiate-like neurohormone of the brain? Experientia *33*, 54-55 (1977).

48 *Székely, J. I*: „Aspecific character of the analgesia induced by k agonists", in: *Székely, J. I* Opiopid Peptides in Substance Abuse. CRC PRESS, Boca Raton, Florida, 1994. 15-34. p

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

50 *Goldstein A, Naidu, A*: Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding signatures Mol Pharmacol. *36*, 265-272 (1989).

51 *Székely, J. I., Rónai, A. Z, Dunai-Kovács, Z, Miglécz, E, Bajusz, S., Gráf, L.*: Cross tolerance between morphine and β-endorphin in vivo. Life Sci. *20*, 1259-1264 (1977)

52 *Van Ree, J M., de Wied, D, Bradbury, A. F., Hulme, E. C, Smyth, D G., Snell, C R*: Induction of tolerance to the analgesic action of lipotropin C-fragment Nature *264*, 792-294 (1976).

53 *Tseng L.-F, Loh, H H, Li, C H.*: Human β-endorphin: development of tolerance and behavioral activity in rats, Biochem. Biophys Res Com *74*, 390-396 (1977).

54 *Wei, E., Loh, H H*: Physical dependence on opiate-like peptides Science *193*, 1262-1263 (1976)

55 *Rónai, A. Z*: „Regional distribution of opiate receptors in the brain", in: *Székely, J I, Rónai A Z.* Opioid Peptides, Vol. III, Opiate Receptors and their Ligands CRC PRESS, Boca Raton, Florida, 1983 12-21 p.

56 *Miglécz, E., Székely, J. I, Dunai-Kovács, Z.*: Comparison of tolerance development and dependence capacities of morphine, β-endorphin, and [D-Met^2,Pro^5]-enkephalinamide. Psychopharmacology *62*, 29-34 (1979)

57 *Smits, S. E.*: Quantitation of physical dependence in mice by naloxone-precipitated jumping after a single dose of morphine. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. *10*, 651-661 (1975).

58 *Saelens, J K, Granat, R F., Sawyer, W. K.*: The mouse jumping test: a simple screening method to estimate the physical dependence capacity of analgesics. Arch Int Pharmacodyn. *190*, 213-218 (1971).

59 *Tseng, L F., Tang, R, Stackman, R, Camara, A, Fujimoto, J M*: Brainstem sites differentially sensitive to β-endorphin and morphine for analgesia and release of Met-enkephalin in anaesthetised rats. J. Pharmacol Exp Ther *253*, 930-937 (1990)

60 *Tseng, L F.; Lin, J J; Collins, K A.*: Partial antinociceptive cross-tolerance to intracerebroventricular β-endorphin in mice tolerant to systemic morphine. Eur. J Pharmacol. *241*, 63-70 (1993)

61 *Suh, H H, Tseng, L F.*: Lack of antinociceptive cross-tolerance between intracerebroventricularly administered β-endorphin and morphine or DPDPE in mice. Life Sci *46*, 759-765 (1990)

62 *Bhargava, H N*: Cyclo (leucylglycine) inhibits the development of morphine tolerance and dopamine receptor supersensitivity in rats. Life Sci. *27*, 117-123 (1980)

63 *De Wied, D, Gispen, W H*: Impaired development of tolerance to morphine analgesia in rats with hereditary diabetes insipidus. Psychopharmacology *46*, 27-29 (1976)

64 *Székely, J I., Miglécz, E., Dunai-Kovács, Z, Tarnawa, I, Rónai, A Z., Gráf, L., Bajusz, S.*: Attenuation of morphine tolerance and dependence by α-melanocyte stimulating hormone Life Sci *24*, 1931-1938 (1979).

65 *Székely, J I*: Opioid peptides and stress Neurobiology *6*, 1-12 1990

66 *Kolesnikov, Y. A, Pick, C G, Ciszewska, G, Pasternak, G*: Blockade of tolerance to morphine but not to κ opioid by a nitric oxide synthase inhibitor. Proc Natl Acad Sci USA *90*, 5162-5166 (1993)

67 *Gráf, L., Miglécz, E, Bajusz, S, Székely, J I*: Met-enkephalin attenuates morphine tolerance in rats Eur J. Pharmacol *58*, 345-346 (1979)

68 *Székely, J. I.*: „μ-Agonist induced euphoria as opposed to dysphoria elicited by κ-agonists in humans and experimental animals", in: Opioid Peptides in Substance Abuse, CRC PRESS, Boca Raton, Florida, 1994 55-80. p

69 *Aceto, M D, Dewey, W L., Chang J-K, Lee, N. M*: Dynorphin-(1-13): Effects in nontolerant and morphine-dependent rhesus monkeys. Eur J. Pharmacol *83*, 139-142 (1982)

70 *Green, P. G., Lee, N M*: Dynorphin A-(1-13) attenuates withdrawal in morphine-dependent rats: effect of route of administration Eur J. Pharmacol. 145, 267-272 (1988)

71 *Sineger, E., Horváth, K., Miglécz, E., Tarnawa, I, Andrási, F., Székely, J I*: Morphine and [D-Met^2,Pro^5]-enkephalinamide do not show specific neuroleptic activity Eur J. Pharmacol. *80*, 359-368 (1982).

72 *Grynbaum, A, Kastin, A. J, Coy, D H, Marks, N*: Breakdown of enkephalin and endorphin analogs by brain extracts. Brain Res. Bul *2*, 479-484 (1977).

73 *Patthy, A, Gráf, L, Kenessey Á., Székely, J I, Bajusz, S*: Effect of bacitracin on the biodegradation of β-endorphin Biochem. Biophys. Res. Comm *79*, 254-259 (1977).

74 *Bajusz, S., Patthy, A, Kenessey, Á, Gráf, Á, Székely, J. I, Rónai, A. Z.*: Is there correlation between analgesic potency and biodegradation of enkephalin analogs? Biochem Biophys. Res Comm. *84*, 1045-1053 (1978).

75 *Rapaport, S I, Klee, W A, Pettigrew, K D, Ohno, K*: Entry of opioid peptides into the central nervous system. Science *207*, 84-86 (1980)

76. *Kastin, A J, Nissen, C, Schally A V, Coy, D. H*: Blood-brain barrier, half-life disappearance, and brain distribution for labeled enkephalin and a potent analog. Brain Res. Bull. *1*, 583-589 (1976)

77. *Cornford, E. M, Braun, D. L, Crane, P. D, Oldendorf, W J*: Blood-brain barrier restriction of peptides and the low uptake of enkephalins. Endocrinology *103*, 1297-1303 (1978).

78 *Tseng L.-F., Loh, H H., Li, C. H*: β-endorphin is a potent analgesic by intravenous injection. Nature *263*, 239-240 (1976)

79 *Chang J.-K., Fong, T V, Pert, A., Pert, C B*: Opiate receptor affinities and behavioral effects of enkephalin: structure-activity relationships of ten synthetic peptide analogues. Life Sci *18*, 1473-1482 (1976).

80. *Rónai, A Z*: „Structure-activity relationships", in: *Székely, J I Rónai A Z (Eds.)*: Opioid Peptides, Vol III., Opiate Receptors and their Ligands, CRC PRESS, Boca-Raton, Florida, USA 1983. 141-176 p.

81 *Székely, J. I., Rónai, A.Z., Dunai-Kovács, Z., Miglécz, E., Berzétei, I, Bajusz, S.*: (D-Met^2,Pro^5)-enkephalinamide: a potent morphine-like analgesic. Eur. J. Pharmacol. *43*, 293-294 (1977).

82 *Bajusz, S, Rónai, A. Z, Székely, J I, Gráf, L., Dunai-Kovács, Z, Berzétei, I*: A superactive pentapeptide, (D-Met^2, Pro^5)-enkephalinamide. FEBS Lett *76*, 91-92 (1977)

83. *Rónai, A Z, Berzétei, I., Bajusz, S, Székely, J I.*: The in vitro pharmacology of D-Met^2,Pro^5-enkephalinamide. J. Pharm. Pharmacol. *33*, 534-535 (1981)

84 *Römer, D, Büscher, H. H., Hill, R. C., Pless, J, Bauer, W, Cardinaux, F., Closse, A., Hauser, D., Huguenin, R*: A synthetic enkephalin analog with prolonged parenteral and oral analgesic activity. Nature *268*, 547-549 (1977).

85. *Kosterlitz, H. W, Lord, J. A. H, Paterson, S J, Waterfield, A. A.*: Effects of changes in the structure of enkephalins and of narcotic analgesic drugs on their interactions with μ- and δ-receptors. Brit. J. Pharmacol *68*, 333-342 (1980)

86 *Rónai, A Z, Berzétei, I, Székely, J I, Gráf, L., Bajusz, S*: Kinetic studies in isolated organs: tools to design analgesic peptides and to analyse their receptor effects. Pharmacology *18*, 18-24 (1979)

87. *Rónai, A. Z., Berzétei I, Székely, J I, Miglécz, E, Kurgyis, J., Bajusz, S.*: Enkephalin-like character and analgesia. Eur J Pharmacol. *69*, 263-271 (1981).

88 *Bajusz, S, Rónai, A Z., Székely, J. I., Turán, A, Juhász, A, Patthy, A, Miglécz, E, Berzétei, I.*:Enkephalin analogs containing amino sulfonic and amino phosphonic residues at position 5. FEBS Lett. *117*, 308-310 (1980).

89. *Bajusz, S., Rónai, A. Z., Székely, J. I., Miglécz, E, Berzétei, I.*: Further enhancement of analgesic activity: enkephalin analogs with terminal guanidino group. FEBS Lett *110*, 85-87 (1980).

90. *Székely, J I, Dunai-Kovács, Z., Miglécz, E., Rónai, A. Z., Bajusz, S*: *In vivo* antagonism by naloxone of morphine, β-endorphin and a synthetic enkephalin analog. J. Pharmacol. Exp. Ther. *207*, 878-883 (1978).

91. *Székely, J I.*: „μ-Agonists induce euphoria, whereas κ-agonists dysphoria in humans". In: *Székely, J I.*: Opioid Peptides in Substance Abuse, CRC PRESS, Boca-Raton, Florida, USA 1994. 55-60. p.

92 *Catlin, D H., Hui, K K., Loh, H. H*: Pharmacologic activity of β-endorphin in man. Commun. Psychopharmacol. *1*, 439-442 (1977)

93. *Stubbs, W A, Delitala, G, Jones, A., Jeffcoate, W J, Edwards, C., Ratter, S J, Besser, G M., Bloom, S R., Alberti, K. G. M M*: Hormonal and metabolic responses to an enkephalin analog in normal man. Lancet *2*, 1225-1227 (1978).

94 *Krebs, E, Roubicek, J*: EEG and clinical profile of a synthetic analogue of methionine-enkephalin - FK 33-824. Pharmakopsychiatr. Neuro-Psychopharmakol., *12*, 86-93 (1979).

95. *Nedopil, N, Rüther, E*: Effect of the synthetic analogue of methionine enkephalin FK 33-824 on psychotic symptoms. Pharmakopsychiatr. Neuro-Psychopharmakol., *12*, 277-280 (1979).

96 *Jorgensen, A, Fog, R, Veilis, B*: Synthetic enkephalin analogue in the treatment of schizophrenia. Lancet 1, 955-956 (1979)

97. *Stacher, G, Bauer, P., Steinringer, H, Schreiber, E, Schmierer, G.*: Effects of the synthetic enkephalin analogue FK 33-824 on pain threshold and pain tolerance in man. Pain *7*, 159-172 (1979).

98 *Calimlim, J F., Wardell, W M, Sriwatanakul, K, Lasagna, L, Cox, C*: Analgesic efficacy of parenteral metkephamide acetate in the treatment of postoperative pain. Lancet *1*, 1374-1375 (1980)

99 *Bloomfield, S S, Barden, T P., Mitchell, J*: Metkephamide and meperidine analgesia after episiotomy. Clin. Pharmacol. Ther. *34*, 240-247 (1983).

100. *Földes, J, Török, K., Székely, J I., Borvendég, J., Karczag, J., Tolna, J., Marosfi, S, Váradi, A, Gara, A, Rónai, A Z, Szilágyi, J.*: Human tolerability studies with D-Met^2,Pro^5-enkephalinamide. Life Sci. 33 (Suppl.), 769-772 (1983).

101 *Földes, J., Váradi, J, Gara, Á, Bános, C, Vargha, P., Török, K, Székely, J I.*: Effects of methysergide, bromocriptine and naloxone on prolactin, growth hormone and TSH release induced by D-Met^2,Pro^5-enkephalinamide in man. Psychopharmacology *88*, 331-335 (1986).

102 *Székely, J. I., Török, K., Karczag, I., Tolna, J., Till, M.*: Effects of [D-Met^2,Pro^5]-enkephalinamide on pain tolerance and some cognitive functions in man. Psychopharmacology *89*, 409-413 (1986)

103. *Johnson, R E, Jasinski, D. R*: Opioid profile of BWC942C in man. NIDA Res. Monogr. 76, 81-86 (1987)

104. *Boucher, B A, Foster, T. S., Phillips, B A, Fleck, R J, Kirksey, D S., Cato, A. E*: The acute effects of the enkephalin analogue BW 942C in humans. J. Clin. Pharmacol. *27*, 151-154 (1987)

105 *Vaupel, D B., Cone, E J., Johnson, R. E, Su, T.-P*: Kappa opioid partial agonist activity of the enkephalin-like pentapeptide BW942C based on urination and *in vitro* studies. J. Pharmacol. Exp. Ther. *224*, 225-234 (1990)

106. *Leander, J. D, Zerbe, R L., Hart, J. C*: Diuresis and suppression of vasopressin by kappa opioids: comparison with mu and delta opioids and clonidine. J. Pharmacol. Exp. Ther. *234*, 463-469 (1985).

[Érkezett: 2001. február 9.]