

MORFINVÁZAS AFFINITÁSJELÖLŐK IRREVERZIBILIS KÖTŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA
PATKÁNY AGYI OPIOID RECEPTOROKON

Egyetemi doktori dolgozat

Készítette:

Krizsán Éva Dóra
1988.



Tartalomjegyzék

Irodalmi áttekintés.....	2
Endogén ligandok.....	4
Opioid receptor altípusok.....	6
Az opioid receptorok regulációja.....	10
Affinitásjelölők.....	13
Célkitűzések.....	18
Rövidítések.....	20
Anyagok és módszerek.....	21
A vizsgált vegyületek.....	21
Felhasznált anyagok.....	21
Membránpreparálás.....	23
A receptorkötési kísérletek elvi alapjai.....	24
Egyensúlyi receptorkötési kísérletek.....	28
Irreverzibilitás mérések.....	31
A mérési eredmények értékelése.....	31
Eredmények.....	32
Egyensúlyi receptorkötési kísérletek.....	32
Irreverzibilitás mérések.....	39
Megbeszélés.....	50
Köszönetnyilvánítás.....	56
Irodalomjegyzék.....	57



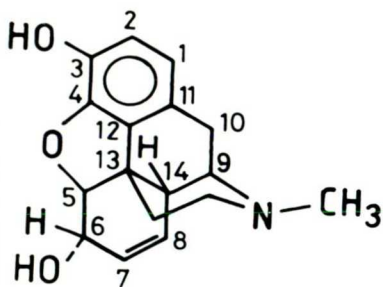
Irodalmi áttekintés

A központi idegrendszerre ható drogok nagy része specifikus receptorok közvetítésével fejti ki hatását.

Ez természetesen igaz az ópiát narkotikumokra is, amelyek olyan receptorokkal lépnek kölcsönhatásba, melyeknek endogén ligandjai pl. az enkefalinok és a β -endorfin.

A receptor a sejt felszínén, a membránba integrálódott olyan fehérje molekula vagy bonyolultabb szerkezetű komplex egység, amely specifikusan, nagy affinitással és szelektíven köt bizonyos molekulákat, a ligandjait, és ez a kötődés a sejten belül meghatározott biokémiai eseményeket indít el, amelyek specifikus élet-tani választ eredményeznek.

Az opioid receptorok jelenléte az agyban már azonosításuk előtt évtizedekkel bizonyosnak látszott, hiszen szinte ősidők óta ismert az ópiát alkaloidok farmakológiai hatása.



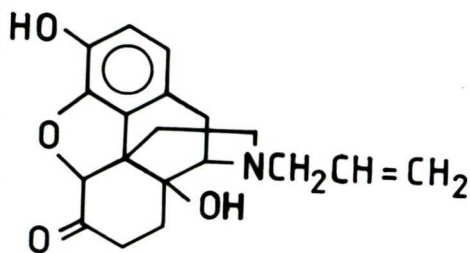
morfin

A morfint először 1803-ban izolálták az ópiumból, szerkezeti felépítése 1925 óta ismert.

A szerkezet felismerése után óriási lendülettel indult meg a kutatás, és kémiai módosítások sorozatával próbálták előállítani a morfin "kellemetlen" mellékha-

tásoktól (légzésdepresszió, függőség, stb.) mentes fájdalomcsillapítót. Ezen kutatások nagy eredménye a szerkezet-hatás vizsgálatok garmada, amelyek ahhoz a felismeréshez vezettek, hogy az ópiát hatás egy specifikus receptorral való kölcsönhatáson keresztül jön létre.

A szerkezeti módosításokkal nyert anyagok között vannak antagónisták is (pl. a naloxon), amelyeknek egyáltalán nincs fájdalomcsillapító hatásuk, de hatékonyan gátolják az ópiát agonisták hatását.



naloxon

Az antagonisták léte is megerősítette azt a feltételezést, hogy az agyban specifikus opioid receptoroknak kell lenniük. A receptorok mindkét csoportba tartozó ligandokat kötik, de élettani válasz csak

az agonistával való kötődés nyomán jön létre.

Számos ópiát sztereoizomerje nagyságrendekkel kisebb hatékonyságú.

A sztereospecifitás ténye szintén megerősíti egy specifikus receptor-ligand kölcsönhatás valószínűségét.

Az opioid receptorok agyban való kimutatása végül is radioaktív ligandokkal történő kísérletekkel sikerült.

Goldstein és mtsai (1) 1971-ben végeztek kötési kísérleteket ^3H -levorphanollal egér agy homogenizátumon. Azonban ekkor csak igen alacsony specifikus kötést sikerült mérniük. A nagyobb specifikus radioaktivitású ligandok kifejlesztése végül 1973-ban vezetett eredményre, amikor több laboratórium is sikeresen azonosította az opioid receptort (Pert, Snyder (2); Terenius(3); Simon (4)).

Az in vitro receptorkötési kísérletek sikeresen igazolták, hogy valóban egy, az élettani hatással összeegyeztethető receptort mutattak ki.

Az opioid receptor kötésre jellemző, hogy telíthető, az ópiát ligandok disszociációs konstansa (K_d) nanomoláris nagyságrendben van. Teljes agy homogenizátumon telítéskor a kötés kb. 0.25-0.3 pmól/mg fehérje (2-4).

Az ópiátok kötődése sztereospecifikus, a (-)izomerek több nagyságrenddel hatékonyabbak a receptoron. Ez egyébként a drogok farmakológiai hatásával is jól párhuzamba állítható.

A drogok élettani hatásossága arányos a receptorkötési kísérletekben mért triciált ligand leszorítási képességükkel. A tengerimalac ileumán végzett kísérletekből (5, 6) kiderült, hogy az ópiát agonisták gátolják az elektromos ingerlésre kiváltódó izom összehúzódásokat, míg az antagonisták ezt a hatást kivédik. A tengerimalac ileumon felállítható drog hatékonysági sorrend szoros egyezést mutat a ^3H -naloxon kötés leszorításával mért affinitásokkal (7).

Receptorkötési és autoradiográfiás kísérletek sorozatával kimutatták, hogy az opioid receptorok megoszlása is igen specifikus. Az agyban fordulnak elő a legnagyobb mennyiségben, ezen belül is a limbikus rendszerhez kapcsolt agyrégiókban. A periférián a gerincvelőben, valamint a simaizom beidegzéseknél (pl. tengerimalac ileum, egér vas deferens) találhatók meg.

Endogén ligandok

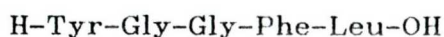
Már az opioid receptorok felfedezésének ténye is bizonyossá tette endogén ligandok létének szükségszerűségét az idegrendszerben. Endogén opioidok jelenlétére utaltak Reynolds (21), majd később Mayer és mtsai (22) kísérletei, amelyekben fájdalomcsillapítást értek el az agytörzs központi szürkeállományának elektromos ingerlésével. Feltételezték, hogy bizonyos neuronok elektromos ingerlésére endogén anyagok szabadulnak fel, amelyek közvetítik a fájdalomcsillapító hatást. A további megfigyelésekből kiderült, hogy

ez a hatás naloxonnal antagonizálható (23). Végül in vitro receptorkötési kísérletekben endogénen kötődött ligandok leszorítására utalt, hogy kötés növekedést tapasztaltak előzetes ópiát kezeléssel (24) ill. az agy homogenizátum 37 °C-on való inkubálásával (10).

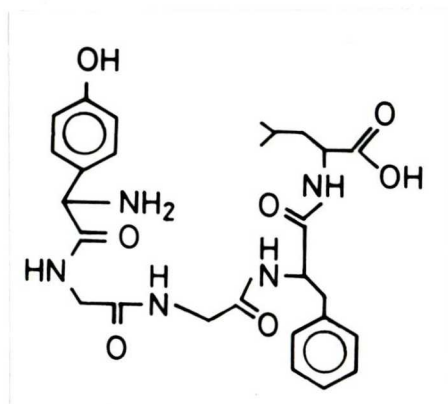
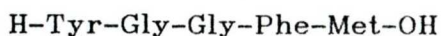
Hughes 1975-ben (25) agy extraktumokkal morfin-szerű hatást mért ki az elektromosan összehúzódnásra ingerelt tengerimalac ileumon ill. egér vas deferensen.

Végül még ugyanabban az évben (26) sikerült disznó agyból izolálnia az endogén anyagot, két pentapeptid - a met- és leu-enkefalin - keverékét. Majd ezt megerősítette Simantov és Snyder (27), akik borjú agyból nyerték a peptideket, és azokat ^3H -naloxon kötési kísérletekben tesztelték.

Leu-enkefalin:



Met-enkefalin:



Leu-enk. szerkezeti képlet

A morfin és az enkefalin szerkezeti analógiái (pl. a tirozin fenol-csoportja és az ópiát A gyűrűje, az enkefalin C-terminális karboxiljának OH-csoportja és a morfin C-6-os helyzetű OH-csoportja) is alátámasztják, hogy ezek a ligandok azonos felismerőhelyen kötődnek.

A megállapított peptid szekvenciából (26) kiderült, hogy az az agyalapi mirigyben található β -lipotropin (β -LPH) egy darabkája. Több laboratórium (28-30) egymástól függetlenül közölte, hogy a β -LPH C terminálisának 31 aminosavból álló szekvencia-részlete, amelyet β -endorfinnak neveztek el, szintén hatásos opioid peptid mind receptorkötési, mind tengerimalac ileumon végzett farmakológiai kísérletekben.

Opioid receptor altípusok

Az opioid receptorok sokféleségére vonatkozó elmélet először a Martin és mtsai (31) által spinális kutyán végzett farmakológiai kísérletek összegzése alapján vetődött fel. Számos ópiát drog farmakológiai hatásának különbözősége alapján három opioid receptor típus megkülönböztetését javasolták.

Az általuk μ -nek nevezett receptorok közvetítik a morfin-szerű ópiátok hatását és az eufória kialakulásában is szerepet játszanak.

A κ receptorokon ható anyagok fájdalomcsillapító és nyugtató hatásúak, eufóriát nem okoznak. Ezen vegyületek a ketociklazocinok.

Végül a σ receptorok, amelyeken keresztül a hallucinogén hatások közvetítődnek. Az SKF 10 047 jelű, kevert agonista-antagonista vegyülettel mutatták ki ezt a csoportot. Manapság a σ altípus opioid receptorokhoz való tartozását kétségbe vonják, mert a naloxon nem antagonizálja azt.

Az enkefalinokkal végzett farmakológiai és receptorkötési kísérletek azt bizonyították, hogy az endogén opioidoknak más hatásaik vannak egér vas deferensen, tengerimalac ileumon és patkány agyon (32). Ezek a kísérletek egy új receptor altípus (δ) létezését vetették fel. A δ receptor nagy affinitással köti az enkefalinokat, míg az ópiát alkaloidokhoz alacsonyabb az affinitása.

Opioid receptor altípusok

	μ	δ	κ
Agonista prototípus	Morfin	Leu-enkefalin	Etilketociklazocin
Szelektív agonista	DAGO	D-Pen ² -D-Pen ⁵ -enk.	U-50,488H
	Morficeptin (Tyr-Pro-Phe-ProNH ₂)	DADLE	
	Szufentanil	Deltakefalin (DSLET)	
Antagonista	Naloxon	Naloxon	Naloxon
Szelektív antagonistá	Naloxon-azin	ICI-154,129	MR-2266
		ICI-174,864	
Endogén ligand	Béta-endorfin	Leu-enkefalin	Dinorfin-(1-13)
Közvetített hatások	analgézia eufória katalepszia légzés gátlás prolaktin release táplálkozás fokozása	stressz-analgézia letalitás hipotenzió GH release leukocita kemotaxis	analgézia szedáció flexor reflex-gátlás ADH release pupillaszűkület
Jellemző előfordulás	nyúl kisagy tengerimalac ileum nyúl fülartéria	NG-108,15 sejtvonal egér vas deferens	nyúl nagyagy nyúl vas deferens kecskebéka agy tengerimalac kisagy

Agyszövetben végzett in vitro autoradiográfiás kísérletekkel szintén jelentős különbségeket mutattak ki a ^3H -D-ala-enkefalin, ^3H -dihidromorfin és a ^3H -diprenorfin kötés megoszlásában.

A két különböző - μ (morfin) és δ (enkefalin) - kötőhely létét megerősítő tények interpretálását az ezette nehezíti, hogy a receptorkötési kísérletekben többfázisú görbéket kaptak.

Ezt azzal magyarázták, hogy pl. az enkefalinok mindkét (μ és δ) kötőhelyhez kötődnek (34).

Pasternak és mtsai ^3H -D-alaD-leu-enkefalinnal (^3H -DADLE) vettek fel telítési görbéket morfin kis koncentrációban (1 nM) való jelenléte mellett és anélkül. A két telítési görbe összehasonlításából kiderült, hogy a rendszerben jelenlevő morfin az enkefalin nagy affinitású kötőhelyén jelent vetélytársat. A morfin jelenlétében felvett telítési görbéken eltűnik a nagy affinitású kötőhely. Ugyanezt a kísérletet fordított felállásban elvégezve szintén azt tapasztalták, hogy a ^3H -dihidromorfin nagy affinitású kötőhelye tűnt el enkefalin jelenlétében (35).

A N-etilmaleimiddel (NEM) végzett korai kísérletekből már ismert volt, hogy a ^3H -dihidromorfin nagy affinitású kötőhelye különös módon érzékeny a reagensre (36). Ezért megvizsgálták a ^3H -DADLE kötés érzékenységet is a reagensre. Szintén a nagy affinitású kötőhely elvesztését tapasztalták (35).

Ezen biokémiai tények alapján jutottak arra a feltételezésre, hogy a morfin ill. az enkefalinok három különböző receptor kötőhelyhez kapcsolódnak. A Pasternak és mtsai (35) által felvetett elképzelés szerint mind a morfin (és morfin-szerű ópiátok) mind az enkefalinok egy közös, nagy affinitású kötőhelyért versengenek. Ezt a

kötőhelyet μ_1 -nek nevezték el. A μ_2 -vel jelölt kötőhely megfelel a morfin alacsony affinitású kötőhelyének, és végül a δ kötőhely az enkefalinok alacsony affinitású kötőhelye.

A μ_1 szelektív irreverzibilis antagonisták (naloxazon, naloxon-azin) kifejlesztése igen jelentősen hozzájárult a receptor kötőhelyek és az általuk közvetített élettani hatás közötti összefüggések feltárására.

Pasternak és munkacsoportja számos tanulmányt (37-39) közöltek arról, hogy ezekkel az irreverzibilis antagonista ligandokkal *in vivo* kiváltott μ_1 kötőhely gátlás jelentős mértékben csökkenti az ópiátok és az endogén ligandok fájdalomcsillapító hatását. Például a morfin egéren mért fájdalomcsillapító hatásának ED_{50} -e (az esetek 50 %-ában hatásos dózis) 12-ed részére csökkent a μ_1 kötőhelyek gátlásakor.

Spinális transzsekcio után egéren végzett kísérletekből megállapították, hogy a μ_1 kötőhelyek a fájdalomcsillapítás szupraspinális közvetítésében játszanak szerepet, míg a spinális folyamatok valószínűleg a δ receptorokon keresztül mennek végbe (40).

A farmakológiai kutatásokban igen fontos kérdés, hogy vajon hogyan lehet elkülöníteni a morfin fájdalomcsillapító és légzésbénító hatását.

μ_1 irreverzibilis antagonistával kezelt patkányokon figyelték a morfin fájdalomcsillapító és légzésdepresszálo hatását (41). A kísérletekből kitűnt, hogy míg a fájdalomcsillapító hatás megszűnt a légzésdepresszió nem csökkent a μ_1 kötőhelyek irreverzibilis gátlása következtében.

Igy megállapítható, hogy a μ_1 kötőhelynek a fájdalomcsillapítás közvetítésében van szerepe, a légzésbénító hatásért más receptor altípus, valószínűleg a μ_2 felelős.

β -endorfinnal patkány vas deferensen végzett farmakológiai kísérletek (42), valamint nagy specifikus aktivitású ^3H - β -endorfinnal patkány agyhomogenizátumon végzett receptorkötési kísérletekben azt tapasztalták, hogy a β -endorfin egy olyan kötőhelyen kötődik, amelyhez az ópiátok, ill. az enkefalinok sokkal kisebb affinitással kapcsolódnak (43).

Ez alapján a kutatók feltételezik egy ϵ kötőhely létezését, amelyet az autoradiográfiás eljárással megállapított β -endorfin kötés területi eloszlása is alátámaszt (33), hiszen ez eltér más opioidok kötésének területi eloszlásától.

Az opioid receptorok regulációja

Az ópiát farmakológia egyik legnagyobb problémája azon a kellemetlen tényen alapult, hogy a különböző ópiátok folytonos átmenetet mutatnak az agonista és antagonistá jelleg között. Igen csekély kémiai módosítás máris antagonistává változtathatja az eredetileg agonista molekulát. Az opioid receptor kutatás egyik fontos célja volt ezért, hogy megtalálja a különbséget az agonisták és antagonisták kötés aktivitásában. Ennek a megfejtéséhez két, egymásnak látszólag ellentmondó tudományos közlemény vezetett. Pert és Snyder a Na^+ opioid kötésre gyakorolt kisebb, fokozó hatását közölték (2), míg Simon és mtsai a Na^+ jelenlétében a kötés gátlásáról számoltak be (4).

Az ellentmondást az oldotta fel, hogy míg az egyik csoport agonistát a másik antagonistát használt az opioid kötés mérésére.

A Na^+ tehát gátolja az agonista kötetést, az antagonistáét viszont elősegíti. Az kationok között ez a hatás specifikusan csak a Na^+ -ra érvényes, bár igen kis mértékben a Li^+ -nál is megfigyeltek hasonló hatást (8).

A " Na^+ -index" (a Na^+ jelenlétében és távollétében mért affinitások hányadosa) bevezetése hatékony tesztelési módszernek bizonyult. A tisztán antagonistá tulajdonságú vegyületek receptorhoz kötődése Na^+ hatására fokozódik, a kevert típusú agonista-antagonista karakterűek kötési affinitása Na^+ jelenlétében 2-3-ad részére csökken, a tisztán agonistáké pedig drámai mértékben, 12-60-adára.

A kétértékű kationok között a Mn^{++} és Mg^{++} módosítja az opioid receptorkötést (9), az agonistákét növelik, csökkentik az antagonistákét.

A Na^+ hatásának részletesebb biokémiai tanulmányozásakor a receptorkötési kísérletekből kiderült, hogy a Na^+ szelektíven a nagy affinitású kötőhelyet befolyásolja (10). Ez az eredmény arra utal, hogy Na^+ jelenlétében az opioid receptor valamilyen konformáció-változáson mehet keresztül.

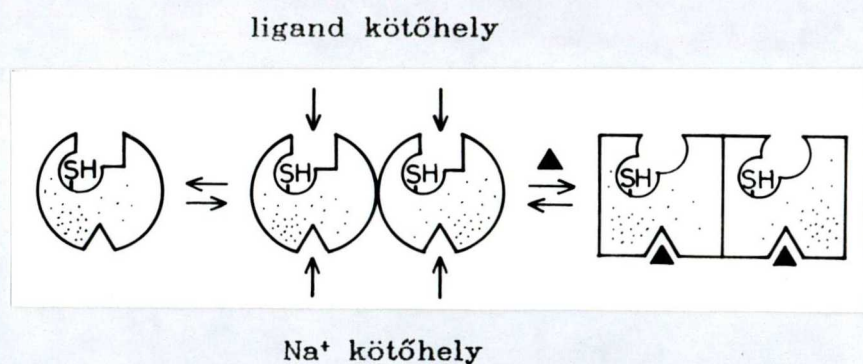
Ezt a feltevést a NEM-mel végzett kísérletek is alátámasztották (11). NEM előkezelésnek kitett membránon végzett kötési kísérletekben a kötés jelentős mértékben csökken. Ha NEM-el történő előinkubálás alatt kis mennyiségű ópiát is jelen van, akkor a NEM kötés csökkentő hatása kivédhető. Ez egyértelműen arra mutat, hogy a kötőhely közelében SH-csoport található, amely a NEM által hozzáférhetetlenné válik, ha a kötőhelyhez ligand kapcsolódik.

Ha az inkubáló elegyben 100 mM NaCl van jelen a NEM mellett, a membrán szintén védhető az alkilálódástól.

Miután a Na^+ -nak semmilyen hatása nincs az SH-csoportok alkilálására, ezért valószínűnek látszik az a következtetés, hogy a Na^+ jelenlétében a receptoron konformáció változás történik, melynek következtében az SH-csoport egy, a NEM által nem támadható térbeli helyzetbe kerül.

Simon és mtsai (12) NaCl jelenlétében végzett antagonisták kötési kísérletekben 1.5-2-es Hill-coefficiens értékeket találtak, amely pozitív kooperativitásra utal.

Mindezek alapján Simon (13) a Na^+ ionok alloszterikus hatását leírandó a következő modellt indítványozta:



Amikor a Na^+ kötődik az alloszterikus kötőhelyhez, megváltozik a receptor molekula konformációja. Ebben a pozícióban a receptor a NEM támadásával szemben ellenállóbb és az agonistákhoz való affinitása csökken.

Egy Na^+ -ot nem kötő vagy a Na^+ kötésével konformációváltozásra nem készíthető monomer meglétével magyarázható az, hogy 100 mM NaCl jelenlétében található a rendszerben " Na^+ -mentes" konformer (14).

Számos receptor-rendszerben bebizonyosodott, hogy a GTP, mint szabályozó anyag szerepet játszik a receptor adenilát ciklázhoz való kapcsoltságában.

A Blume által végzett kísérletek azt igazolják, hogy a guanin-nukleotidok az opioid rendszerben is élettani szabályozóként hatnak. Kísérleteikben a GTP csökkenti az ópiát agonista kötést mind agy membránon (15), mind neuroblastoma x glioma hibrid sejteken (16). A GTP és a NaCl hatása additív, együttesen teljesen eltüntetik az agonisták nagy affinitású kötőhelyét (17).

Agy homogenizátumban (18) és neuroblastoma x glioma hibrid sejtekben (19) az ópiát agonisták gátolják a prosztaglandin E_1 adenilát cikláz serkentő hatását. Enkefalinokkal pedig kimutatták az adenilát cikláz alapaktivitásának gátlását is (20).

A fenti eredmények és az a tény, hogy a GTP közvetlen hatást gyakorol az opioid receptor és agonistái kölcsönhatásában, azt valószínűsítik, hogy az opioid receptor adenilát ciklázhoz kapcsolt rendszer lehet.

Affinitásjelölők

Az egyszerű reverzibilis kompetitív gátlók használatával igen sokrétű és fontos információk kerültek napvilágra és számos munkahipotézis megalapozását tették lehetővé a receptor kutatásban. Hamar világossá vált azonban, hogy annak a meghatározására, hogy milyen aminosavak alkotják a kötőhelyet, stabil, kovalensen kötődő ligandok alkalmazása szükséges.

Mint már az előzőekben is láthattuk az irreverzibilis ligandoknak nagy szerepe volt az opioid receptorok sokféleségének bizonyításában.



A meglehetősen tág meghatározás szerint affinitásjelölő lehet mindazon molekula, amely bizonyos specifitással és affinitással kötődik egy enzim- vagy receptorfehérjéhez, egy olyan molekula-részlet segítségével, amely nem-egyensúlyi kötődést eredményez, és szerkezetében egy kémiai vagy fizikai módszerrel detektálható részletet (jelet) tartalmaz.

Az affinitásjelölő kötődése nem feltétlenül jelent kovalens kapcsolatot. Elképzelhető, hogy térbeli okok miatt jön létre egy nem egyensúlyi kötődés, vagy a ligand affinitása olyan nagy a kötőhelyhez ($K_d < 10^{-12}$ M), hogy a disszociáció sebessége igen csekély.

Az affinitásjelölőnek két nagy csoportját különböztetjük meg.

Az elektrofil affinitásjelölők olyan elektrofil részletet tartalmaznak, amely elégségesen reaktív ahhoz, hogy a receptor egy nukleofil részletéhez kapcsolódjanak.

A fotoaffinitás-jelölők esetében fény hatására keletkeznek reaktív intermedierek - leggyakrabban nitrén vagy karbén csoportok -, amelyek aztán kovalens kötést alakítanak ki a receptor molekulával.

Az elektrofil részt hordozó affinitásjelölőnek négy kritériumot kell teljesítenie ahhoz, hogy nagy szelektivitású receptor jelölő legyen.

1. A ligandnak nagy affinitással kell kötődnie a receptorhoz.
2. A ligandnak szelektívnek kell lennie.
3. A ligand elektrofil centrumának megfelelő térbeli helyzetben kell lennie.
4. Az elektrofil csoportnak reaktívnek és kémiaiilag szelektívnek kell lennie.

Az elektrofil affinitásjelölők két egymást követő folyamatban képeznek irreverzibilis kapcsolatot a receptorral.

Az első lépésben a ligand affinitásának és szelektivitásának van szerepe. Ekkor kialakul egy receptor-ligand reverzibilis egység, a második lépésben pedig az elektrofil centrum megfelelő helyzetéből és annak reaktivitásából adódóan kialakul a receptor és ligandja között a kovalens kötés.

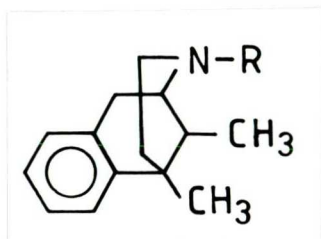
A nagy reaktivitású elektrofil csoportot tartalmazó molekula esetében a kovalens kötés szelektivitását elsődlegesen a receptor ligandhoz való affinitása határozza meg.

A fotoaffinitás-jelölők esetében meghatározott hullámhosszú (energiájú) fény hatására fotokémiai reakció során olyan reaktív csoport keletkezik, amely gyakorlatilag bármilyen aminosav oldallánchoz hozzákötődhet.

A fotoaffinitás-jelölők sötétben reverzibilis ligandok, így még a fotoreakció előtt a rendszerből eltávolíthatók a nem specifikusan kötődött molekulák.

Fotoaffinitás-jelölők megtervezése könnyebb feladat, hiszen az elektrofil affinitásjelölőknél az elektrofil csoport térbeli helyzete is fontos szempont. Mindemellett a fotoaffinitás-jelölők alkalmazása korlátozottabb, hiszen a szükséges fotolízis csak in vitro körülmények között lehetséges.

May és mtsa (44) állítottak elő elsőként opioid receptorok jelölésére alkalmas elektrofil funkciós csoportot tartalmazó ligandokat. Ezek az anyagok a benzomorfán bromalkil származékai voltak,



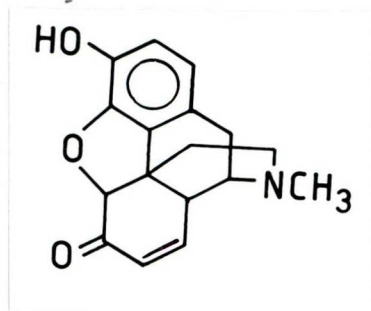
R: $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$

$\text{CH}_2\text{CHBrCH}_3$

$\text{CH}_2\text{CHBrC}_6\text{H}_5$

amelyeknek csak kis mértékű fájdalomcsillapító hatásuk volt egészen.

Több különféle próbálkozás után Nagamatsu és munkacsoportja írta

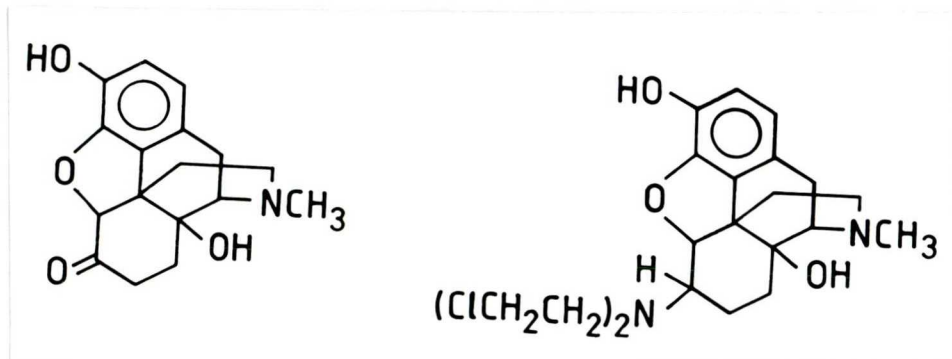


morfinon

le a morfinont, amely agyi membránon irreverzibilisen gátolta a ^3H -naloxon kötődését opioid receptorokhoz (45).

A későbbi tengerimalac ileumon, valamint egér vas deferensen végzett in vivo és in vitro kísérletekben (46) azonban reverzibilis agonistának mutatkozott.

Az oximorfon nitrogén mustár származéka a β -kloroximorfamin (β -COA)



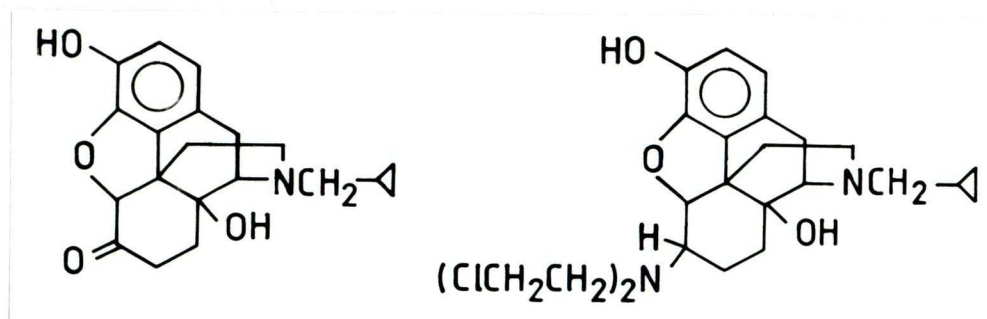
oximorfon

β -COA

mondható az első igazán sikeres irreverzibilis jelölőnek (47).

Tengerimalac ileumon és patkány agyon végzett kísérletekben jelentős agonista aktivitása van és a β -COA-val kezelt membránon 8 órás dializálás után is gátoltak az opioid kötőhelyek (48). A β -COA-val előidézett fájdalomcsillapítás időtartama egészen négyszer hosszabb volt, mint az oximorfon hatása.

A β -COA mintájára megszintetizálták a β -klornaltrexamint (β -CNA), amely hatékony irreverzibilis antagonistának bizonyult (50). Az agykamrába adott (i.c.v.) β -CNA a morfin kiváltotta fájdalomcsillapítás hosszú idejű (kb. 6 napig tartó) gátlását eredményezi (49). Többek között ^3H - β -CNA-t használtak opioid receptor komponensek izolálására agy membránból (51).

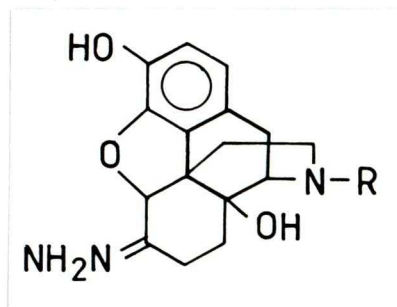


naltrexon

 β -CNA

Pelton és mtsai szintetizálták meg az első elktrofill affinitás-jelölő peptidet (52), a DALECK-et, amely a [D-Ala²-Leu⁵]enkefalin (DALE) klórmetilketon származéka.

A naloxon, a naltrexon és az oximorfon hidrazon származékai is hosszúidejű hatást fejtenek ki és az opioid receptorokhoz való



kötődésük nem egyensúlyi jellegű (53, 54).

R: CH ₂ CH=CH ₂	naloxazon
CH ₂ -	naltrexazon
CH ₃	oximorfazon

A további vizsgálatok (55) eredményei szerint a hidrazonokból keletkező azinok felelősek ezen származékok nem reverzibilis viselkedéséért. Az azinok 20-40-szer hatékonyabban gátolják az opioid kötést in vitro, mint a megfelelő hidrazonok.

A származékok specifikusan gátolják a μ_1 kötőhelyet. Ezeknek a szelektív μ_1 irreverzibilis ligandoknak nagy szerepe volt a közös nagy affinitású morfin és enkefalin kötőhely létezésének bizonyításában (37, 56). Azonban az opioid receptoron való hatásuk módja, a kötés mechanizmusa nem tisztázott.

Célkitűzések

A rohamosan fejlődő ópiát kutatás már számos kérdésre megfelelt, de az ópiát rendszer teljes megértésétől még távol vagyunk. A különböző típusú opioid receptorok tisztítása és szekvenálása, az endogén peptidek metabolizmusának és élettani szerepének teljes feltárása, a receptor-ligand kapcsolat kialakulásával kezdődő biokémiai folyamatok leírása, az egyéb neurotranszmitter rendszerekkel való kapcsolatok felderítése és az ópiát rendszer elhelyezése az idegrendszeri működés szerves egészébe mind nagy feladatai a jövő kutatásainak. Gyógyászati, farmakológiai szempontból pedig különlegesen aktuális az ópiát kutatás, hiszen pl. a hozzászokás és függőség kialakulásának okára és mechanizmusára adott magyarázat a világméreteket öltő narkómia elleni harcban is jelentős lépést jelentene.

Ezen feladatok egyrészének megoldásában az affinitásjelölők fontos szerepet játszhatnak. Az "ideális" affinitásjelölő megtervezéséhez feltétlenül szükséges az irreverzibilis kötődés mechanizmusának ismerete. Fontos továbbá azt is vizsgálni, hogy a molekula egyéb szubsztituensei a kötőhelyen való térbeli elhelyezkedés módosításával hogyan befolyásolják a kovalens kötés kialakulását.

Intézetünkben az opioid receptor tisztításához előállítottak egy izotóppal jelzett affinitásjelölőt, a ^3H -oximorfazont. A liganddal való receptor izolálás megkezdése előtt szükséges volt a lehetséges reakciómechanizmus vizsgálata.

Irodalmi adatok és elméleti megfontolások alapján az oximorfazon C-6-os helyzetben levő hidrazon csoportjának valamelyik szerkezeti eleme felelős az irreverzibilis kötődésért.

Ezt a szerkezeti elemet próbáltuk felderíteni olyan származékok segítségével, amelyek a hidrazon csoport kisebb nagyobb részét nem tartalmazzák. Kísérleteinkben négy vegyületcsaládot - oximorfon, dihidromorfinon, oxikodon, dihidrokodeinon - tanulmányoztunk.

Az affinitásjelölők esetében fontos tudni, hogy a kialakításukkor végzett szubsztitúció nem változtatja-e meg a ligand farmakológiai karakterét. Ezért azt is vizsgáltuk, hogy a szubsztitúció a C-6-os helyen mennyiben befolyásolja a ligand agonista-antagonista karakterét és affinitását a különböző opioid altípusokhoz.

Az ismeretes, hogy a C-3-as helyzetű fenolos OH-csoporthoz a receptoron egy felismerőhely tartozik, és ennek módosítása az affinitás nagymértékű csökkenéséhez vezet. Vizsgáltuk azt, hogy ez az affinitás csökkenés eredményez-e egyben irreverzibilitás csökkenést is.

Az oximorfon és oxikodon származékok a C-14-es helyen OH-csoportot tartalmaznak. Amennyiben a C-14-es OH-csoportnak a receptoron egy felismerőhely felel meg, ez a kötőhelyen való elhelyezkedés módosításával befolyásolhatja az irreverzibilis kötés kialakulását.

Ezért összevetettük C-14-es OH-csoportot tartalmazó és nem tartalmazó származékok irreverzibilitását.

Rövidítések

β -LPH	β -lipotropin
NEM	N-etil-maleimid
GTP	Guanil-trifoszfát
β -COA	β -kloroximorfamin
β -CNA	β -klornaltrexamin
i.c.v.	intra cerebroventricularis
DADLE	D-Ala ² -D-Leu ⁵ -enkefalin
DALE	D-(Ala ² -Leu ⁵)enkefalin
DALECK	D-(Ala ² -Leu ⁵)enkefalin-klórmetilketon
DAGO	[D-Ala ² ,N-Metil-Phe ⁴ ,Glyol]enkefalin
EKC	Etilketociklazocin
TRIS	Trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán
PPO	2,5-difenil-oxazol
POPOP	1,4-di[2-(5-fenil)-oxazoil]-benzol
PMR	proton magnetic resonance
MS	tömegspektrográfia

Anyagok és módszerekA vizsgált vegyületek

Az általunk tanulmányozott morfin analógokat a Tiszavasvári Alkaloidában Stein (57), valamint Sargent (58) közleményében leírt módszerekkel Hosztafi Sándor szintetizálta (59).

A vegyületek szerkezetét és sztereokémiáját a PMR és MS spektrumok elemzésével igazolták. Valamennyi anyag kristályos a dihidrimorfinon-fenilhidrazon kivételével. A minták tisztaságát vékonyréteg-kromatográfiával is ellenőrizték, MERCK 5554 szilikagél F₂₅₄ fóliákat használva. Az anyagok szerkezetét az 1. táblázat mutatja.

Felhasznált anyagok

A receptorkötési kísérletekben felhasznált izotópok közül ³H-naloxont (57 Ci/mmól) és a ³H-DALE-t (37 Ci/mmól) Varga Éva készítette a Szegedi Biológiai Központban. A ³H-EKC (27 Ci/mmól) és a ³H-DAGO (57,5 Ci/mmól) NEN (New England Nuclear), valamint Amersham készítmények. A jelzetlen ligandok közül a DADLE (Sigma), a naloxon (ENDO Labs.) és a morfin kereskedelmi termékek. A DAGO (Roemer, Sandoz Ltd.), az EKC (Sterling, Winthrop Institute) az oximorfon, dihidromorfinon, dihidrokodeinon és oxikodon (Hosztafi Sándor, Tiszavasvári Alkaloida) pedig ajándékba kapott vegyületek voltak.

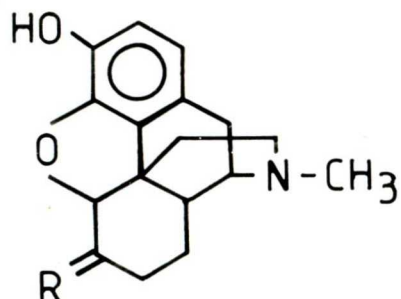
Ezekon kívül a kísérletekben felhasználtunk még TRIS-t (Sigma), NaCl-t (Sigma), PPO-t (Reanal) és POPOP-ot (Reanal).

A radioaktivitás méréséhez használt szcintillációs koktélok a következő összetétellel készítettük:

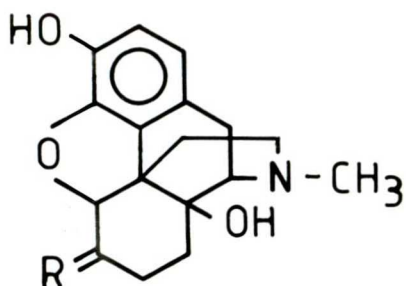
Dioxános koktél: 3 g PPO, 0.15 g POPOP, 120 g naftalin, 1000 ml dioxán

Toluolos koktél: 4 g PPO, 0.2 g POPOP, 1 l toluol

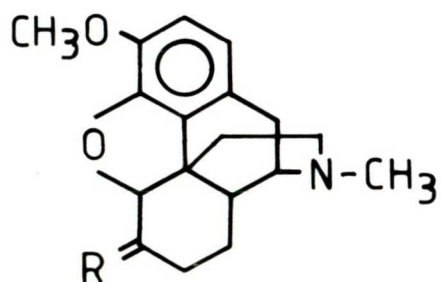
1. táblázat:



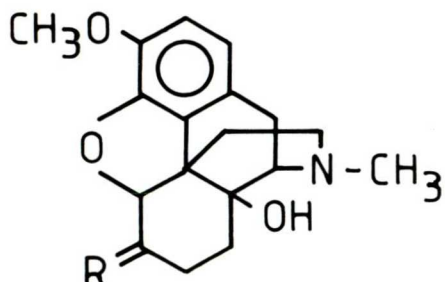
R = 0
Dihidromorfin



R = 0
Oximorfon



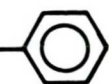
R = 0
Dihidrokodeinon



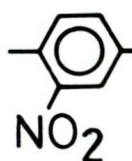
R = 0
Oxikodon

R = N - NH₂

Hidrazon

= N - NH - 

Fenilhidrazon

= N - NH -  - NO₂

Dinitrofenilhidrazon

= N - OH

Oxim

= N - NH -  - NH₂

Szemikarbazon

Membránpreparálás

A durva membrán preparátumot a Pasternak által kidolgozott módszer szerint készítettük (36).

Kísérleteinket PVG/C törzsű, 150–180 g súlyú, aszeptikus körülmények között, állatházban nevelt patkányokon végeztük.

Az állatok dekapitálása és a koponyacsont felvágása után kivett agyról eltávolítottuk a kisagyi féltekéket és rögtön jéghideg 50 mM-os Tris/HCl (pH:7.7) pufferbe helyeztük. Kísérletenként legalább két állat agyát használtuk fel. A nedves szövetsúly leérése után az agyakat teflonos homogenizálóval homogenizáltuk, ügyelve arra, hogy a szövet a homogenizálás közben ne melegedjen fel. A homogenizátumot négyrétegű gézen szűrtük keresztül, eltávolítva az esetleges homogenizálatlan darabkákat. A szuszpenziót ezután 20 percig 4 °C-on 49 ezer g-vel centrifugáltuk. A centrifugálás után a csapadékot friss pufferrel szuszpendáltuk fel és az eredeti szövetsúlyhoz képest kb. 40-szeres térfogatba vettük fel. Az endogén opioidok eltávolítása érdekében a szuszpenziót fél óráig 37 °C-on inkubáltuk, majd még egyszer megismételtük a centrifugálást. A csapadékot ismét felszuszpendáltuk és a kísérlettől függően vagy 5-szörös (mosási kísérletek) vagy 80-szoros (egyensúlyi receptor-kötési kísérletek) térfogatban vettük fel és frissen használtuk. A preparátum fehérjetartalmát Bradford módszere (60) szerint határoztuk meg.

A receptorkötési kísérletek elvi alapjai

A receptorkötési kísérletek (61) azon az elven alapulnak, hogy radioaktív, jelzett ligandot adnak a receptorban dús membrán vagy szinaptoszóma preparátumhoz. Az adott körülmények között a receptorhoz kötődött ligand mennyiségét a kötetlen ligand eltávolítása után folyadékszintillációs mérőberendezéssel mérjük.

A membrán természetéből adódóan a ligand nemcsak a specifikus receptorhoz kötődhet, hanem gyakorlatilag bármilyen fehérjéhez, membránrészelethez hozzátapadhat. Ez a nem specifikus kötés, amelyre jellemző - a specifikussal ellentétben -, hogy nem telithető.

Ha az inkubációs elegyben az izotóp mellett, annak 100-szoros koncentrációjában a jelzetlen ligand is jelen van, akkor az nagy valószínűséggel leszorítja a specifikus kötőhelyekről a jelzett ligandot. Az ilyen mintákban mért radioaktivitás a nem specifikus helyekre kötődött izotóp mennyiségét jelzi, tehát ebből a nem specifikus kötés kiszámítható.

A receptor-ligand kölcsönhatás a klasszikus enzim-szubsztrát kapcsolat kinetikájával közelíthető meg. A receptor (R) és a ligand (L) között kialakuló reverzibilis kötést a következő egyenlet írja le:



ahol (RL) a receptor-ligand komplex.

Egyensúlyi állapotban az oda- és visszaalakulás sebessége egyenlő:

$$k_1[R]^a[L]^b = k_{-1}[RL]^c \quad (2)$$

Az egyensúlyi kötési állandó mind asszociációs (K_a) mind disszociációs (K_d) állandóként definiálható.

$$K_d = \frac{1}{K_a} = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[R][L]}{[RL]} \quad (3)$$

Adott szövetben meghatározott számú specifikus receptor ($B_{\max}$) található - hisz a receptor egyik kritériuma a telíthetőség.

$$B_{\max} = [RL] + [R] \quad (4)$$

A két utóbbi egyenletből levezethető a következő összefüggés:

$$[RL] = \frac{B_{\max} [L]}{[L] + K_d} \quad (5)$$

Ha a receptor-ligand komplexet (RL) mint kötött ligandot (B) definiáljuk, és az egyensúlyi szabad ligandot F-el jelöljük ($[L]=[F]$), akkor az (5)-ös egyenlet a következőképpen írható le:

$$B = \frac{B_{\max} F}{F + K_d},$$

amely egyenletből átrendezéssel megkapjuk a Scatchard formulát:

$$\frac{B}{F} = \frac{B_{\max} - B}{K_d} \quad (6)$$

Ebből az összefüggésből látszik, hogy ha egyensúlyban ismert a szabad és kötött ligand koncentrációja, akkor meghatározható mind az egyensúlyi disszociációs állandó – tehát a receptor affinitása a ligandhoz –, mind a maximális kötőhelyek száma.

Igy tehát meghatározott szövetmennyiség mellett mérjük a kötött ligand mennyiségét a radioligand koncentrációjának függvényében.

A jelzett ligand koncentrációját kétféleképpen változtathatjuk:

1. Azonos specifikus aktivitás mellett változtatjuk a ligand tényleges koncentrációját – telítési kísérlet.
2. Azonos izotóp koncentráció mellett növeljük a jelzetlen ligand mennyiségét a reakcióelegyben, és ezzel mintegy meghigitjuk az izotópot, a specifikus aktivitás csökken – leszorítási kísérlet.

Megjegyzendő, hogy az egyensúlyi szabad ligand koncentrációját némi egyszerűsítéssel azonosnak vesszük a kiindulási ligand koncentrációval (T). Ezzel az elhanyagolással azonban csak akkor nem követünk el számottevő hibát, ha az összes ligand mennyiségének csak kevesebb mint 10 %-a kötődik a receptorhoz.

Ha tehát az egyensúlyi receptorkötési kísérletből számított B/F értékeket ábrázoljuk a B függvényében, akkor az így kapott Scatchard-görbe x tengely metszete meghatározza a $B_{\max}$ értékét, az egyenes iránytangensének reciproka pedig a K_d -t.

A nemlineáris Scatchard-görbe komplexebb modell felállítását sugallhatja. Utalhat több különböző affinitású kötőhely jelenlétére a rendszerben ill. arra, hogy a kötőhelyek kooperatív kölcsönhatásban vannak egymással. Hiperbolikus Scatchard-görbe esetén a görbe asszimptótáival becsülhetjük a két kötőhely kötési paramétereit.

Kinetikai kísérletekkel is meghatározható a ligand affinitása.

A (3) egyenlet alapján az egyensúlyi disszociációs állandó kiszámítható az asszociációs (K_1) ill. disszociációs (K_{-1}) sebességi állandó ismeretében.

A kinetikai kísérletekben konstans receptor és ligand koncentráció mellett a radioligand kötődését az idő függvényében követjük nyomon.

Ha az asszociációs sebességi állandó meghatározásánál eleget teszünk annak a követelménynek, hogy az össz. bevitt ligandnak csak kevesebb mint 10 %-a kötődik a jelenlevő receptorokhoz, akkor a szabad ligand koncentrációját konstansnak vehetjük.

$$\text{Igy a } \frac{d[RL]}{dt} = k_1 [R][L] \quad (7)$$

egyenletből

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_1' - t \quad (8)$$

kapunk, ahol $k_1' = k_1[R][L]$

Ha a specifikusan kötött ligand mennyiségét ábrázoljuk az idő függvényében, a görbe meredeksége a k_1' , amelyből kiszámítható a k_1 .

A disszociációs sebességi állandó meghatározásakor az egyensúlyig inkubált reakcióelegyet oly mértékben hígítjuk meg, hogy az asszociáció lehetőségét kizárhassuk, majd a specifikus kötést mérjük az idő függvényében.

Ilyen körülmények között $k_1 [R][L] = 0$, és:

$$\frac{d[RL]}{dt} = -k_{-1}[RL] \quad (9)$$

Ha az $\ln([RL]/[RL]_0)$ értékeket az idő függvényében ábrázoljuk - $[RL]_0$ a t_0 időpillanathoz tartozó kötés -, akkor a kapott egyenes meredeksége $-k_{-1}$.

Heterológ leszorítási kísérletben a receptor a jelzetlen ligand-hoz való affinitását határozhatjuk meg.

A hideg ligand hatékonysága legegyszerűbben azzal a koncentrációjával (IC_{50}) jellemezhető, amely a jelzett ligand 50 %-át képes leszorítani a receptorról.

A Cheng-Prusoff összefüggés alapján az IC_{50} értékből az alábbi módon számítható ki a jelzetlen ligand disszociációs állandója (K_i ; inhibíciós konstans):

$$k_i = \frac{IC_{50}}{1 + [L]/K_d} \quad (10)$$

Egyensúlyi receptorkötési kísérletek

A kötött és szabad ligand elválasztását kétféle módszer szerint végeztük.

Az egyik esetben Millipore szűrődobokon, a másikban Dynatech "cell-harvester"-en szűrtük le az inkubációs elegyeket. A két szűrési eljárás elméletileg nem különbözik egymástól. A reakció-elegyek mennyisége azonban nem egyforma a két kísérlet esetében.

A szűrődobos kísérletnél a reakcióelegy 1 ml végtérfogatú volt, míg a "cell-harvester" használatakor 96 lyukú tenyésztőtálcán végeztük a kísérleteket, 300 μ l végtérfogatban. A kétféleképpen végzett kísérletek között nem tapasztalható különbség, a "cell-harvester" használata megkönnyíti a receptorkötési kísérleteket. Egyszerre több minta szűrhető és a reakcióelegy térfogatának csökkentése miatt olcsóbb a módszer. Ezt a morfin származékok affinitásának meghatározásánál és a Na^+ -hatás vizsgálatánál használtuk.

300 μ l-es reakcióelegy:

30 μ l izotóp

30 μ l jelzetlen ligand*

40 μ l 50 mM TRIS/HCl puffer

200 μ l 25 mg nedves szövet/ml-es membránpreparátum

1 ml-es reakcióelegy:

100 μ l izotóp

100 μ l jelzetlen ligand*

800 μ l 12.5 mg nedves szövet/ml-es membránpreparátum

* a totál kötés mérésére szolgáló csövekben csak izotóp található, a jelzetlen ligand helyett puffert tettünk.

A telítési kísérletekben a ^3H -naloxonból 10^{-11} – 10^{-8} M koncentrációtartományban készítettünk higitási sort, a leszorítási kísérletekben 1 nM ^3H -naloxon volt a reakcióelegyben. A vizsgált anyagokból 10^{-12} – 10^{-5} M koncentrációtartományban készítettünk tizedes higitási sort. A nem specifikus kötést 10^{-5} M naloxon jelenlétében mértük.

A Na^+ -hatás vizsgálatánál a reakcióelegy 100 mM NaCl-t is tartalmazott.

A reakciót a membránpreparátum hozzáadásával indítottuk. Az elegyet 1 óráig 0 °C-on inkubáltuk. Inkubálás után a reakcióelegyet Whatman GF/B szűrőpapíron szűrtük. A Millipore szűrődobon való szűréskor 3x5 ml jéghideg pufferrel mostuk a szűrőkorongokat.

A szűrőkorongokat legalább 2 órán keresztül 37 °C-on szárítottuk, majd toluolos szcintillációs koktélba tettük, 1 óra állás után LKB Minibeta szcintillációs mérőberendezéssel mértük.

"Cell-harvester"-es szűrésnél program szerint mosási, majd szárítási fázis követi egymást (15 másodperces mosás 7 ml jéghideg vízzel, 45 másodperces szárítás). A szűrőkorongokat dioxános koktélba tettük majd egy-két órás állás után folyadékszscintillációs mérőberendezéssel mértük.

A dioxános ill. toluolos koktél elvileg nem különbözik egymástól, a gyakorlatban csak a mérési határfok fokozható a toluolos koktél használatával.

A különböző altípusok mérésénél ^3H -DAGO-t (3 nM), ^3H -DALE-t (3 nM) vagy ^3H -EKC-t (3 nM) használtunk. Mivel ezek a ligandok csak korlátozott mértékben szelektívek, ezért a többi receptor altípushoz való kötődésüket nagy mennyiségben adott szelektív jelzetlen liganddal gátoltuk. Így a δ receptor mérésénél a reakcióelegyben 10 nM DAGO, κ receptor mérésénél 100 nM DAGO és DADLE is jelen volt.

A ^3H -DAGO-val végzett kötési kísérletnél az inkubációt 37 °C-on 45 percig, a ^3H -DALE és ^3H -EKC esetében szobahőmérsékleten 45 percig végeztük.

Irreverzibilitás mérések (mosási kísérletek)

A vizsgált vegyületek irreverzibilitását indirekt úton határoztuk meg (62). Az anyaggal való előinkubálás után a membránt intenzíven mostuk, majd ezután mértük a ^3H -naloxon kötést. A kötés csökkenése jelzi, hogy a vizsgált anyag az előinkubálás során nem kimoshatóan kötődött a receptorhoz.

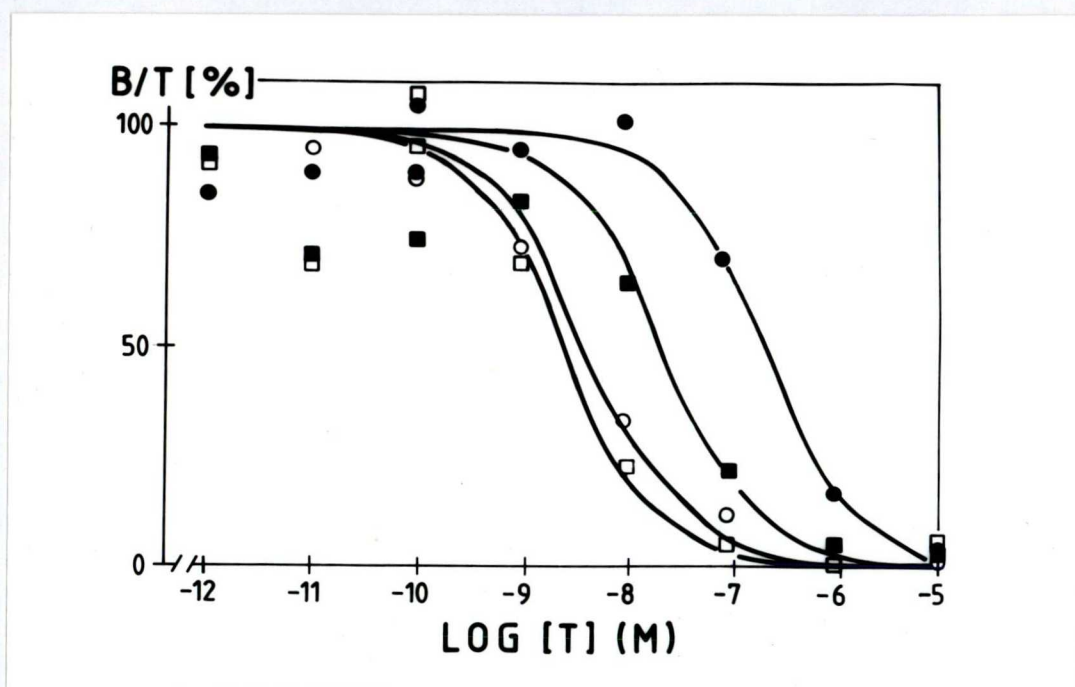
Az anyagokat három különböző koncentrációban 1, 10, 100 μM -ban vizsgáltuk. Az inkubációs elegy 1 ml volt. A 200 μl vizsgált anyagot az 500 μl 5-szörös térfogatban felvett membránt 300 μl pufferrel egészítettük ki. A kontroll csövek ligand helyett 200 μl puffert tartalmaztak. Az összekevert elegyet 1 órán keresztül jégen inkubáltuk, majd ezután szobahőmérsékletű pufferrel 30 ml-re töltöttük a csöveket és 10 percig 38 ezer g-vel 4 °C-on centrifugáltuk. A csapadékot újabb szobahőmérsékletű pufferrel szuszpendáltuk fel és a hígítási és centrifugálási lépéseket még négyszer ismételtük. Az utolsó centrifugálás után a csapadékot az eredeti szövet súlynak megfelelően 80-szoros térfogatban vettük fel (8 ml pufferben centrifugacsövenként) és az így előinkubált és mosott membránt azonnal felhasználtuk receptorkötési kísérletre.

A mérési eredmények értékelése

A kísérletek eredményeit a Munson és Rodbard (63) által kifejlesztett LIGAND programmal értékeltük ki Apple II típusú számítógépen. A program nemlineáris regresszió alapuló módszerrel több ligand több receptorral való egyidejű reakciója esetén a kötődési paraméterek optimális becslését adja. A receptor-ligand kölcsönhatás leírására egzakt matematikai modellt alkalmaz, és a legkisebb négyzetek módszerén alapuló algoritmus segítségével vizsgálja az illesztés pontosságát.

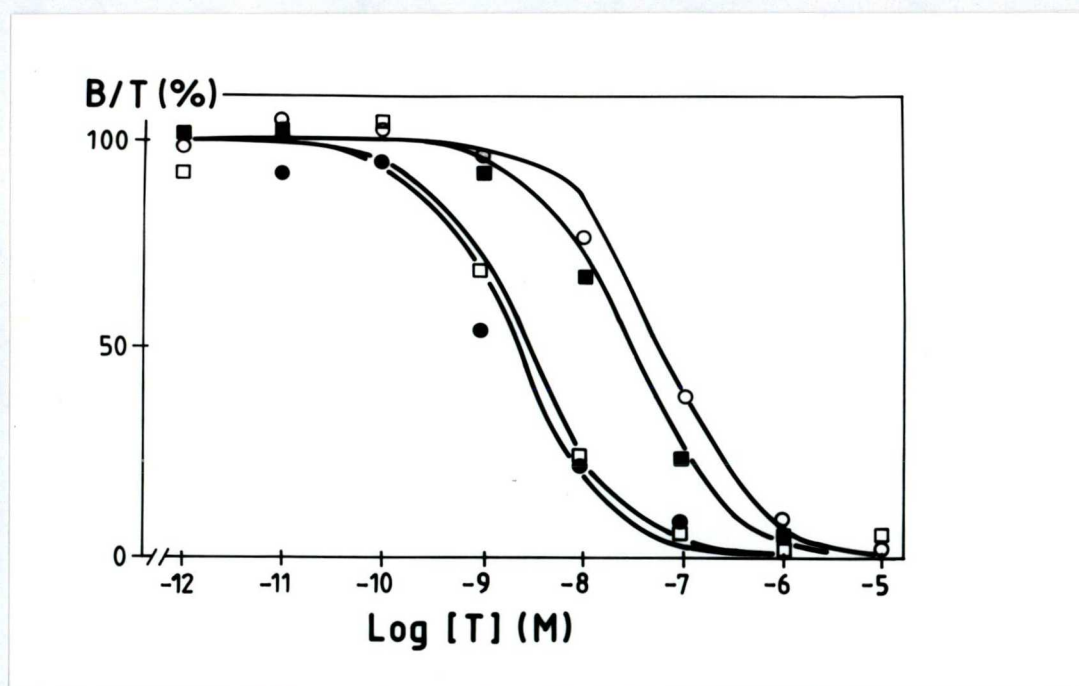
EredményekEgyensúlyi receptorkötési kísérletek

Először a vizsgált anyagok opioid receptorokhoz való affinitásának megállapítására egyensúlyi leszorítási kísérleteket végeztünk. ^3H -naloxon kötődését mértük különböző koncentrációjú -10^{-5} - 10^{-12} M tartományban - jelzetlen morfin analóg jelenlétében. Az adott anyag affinitásától függő koncentrációban képes a jelölt liganddal versengve azt leszorítani a receptorról. Az 1. ábrán az oximorfon-származékok leszorítási görbéi láthatók.



1. ábra: A membránt (20 mg nedves szövet/ml) 1 nM ^3H -naloxonnal inkubáltuk növekvő koncentrációjú oximorfon-oxim (□), oximorfon-szemikarbazon (○), oximorfon-fenilhidrazon (■) ill. oximorfon-dinitrofenilhidrazon (●) jelenlétében. A kötési százalékot (B/T %) ábrázoltuk a vizsgált ligand koncentrációjának (log T) függvényében.

Szembetűnő, hogy a C-6 helyen különböző csoportokkal történt helyettesítés megváltoztatja a molekula affinitását. Leginkább a legnagyobb méretű dinitrofenilhidrazon csoport jelenlétében tolódik jobbra a leszorítási görbe, tehát az anyag nagyobb koncentrációja szükséges a ^3H -naloxon opioid receptorról való leszorításához. A 2. ábra az oxim származékok leszorítási görbéit mutatja. Látható, hogy az azonos szubsztituenssel ellátott vegyületeknél az alapvegyületekre jellemző affinitásbeli különbségek jellemzőek. Az oximorfon és dihidromorfinon oxim származékai, ahogy az eredeti vegyületek is, viszonylag nagy affinitással rendelkeznek, míg az oxikodon- és a dihidrokodeinon-oxim görbéi ezekhez képest jobbra helyezkednek el, egy nagyságrenddel kisebb affinitást mutatva.



2. ábra: A membránt (20 mg nedves szövet/ml) 1 nM ^3H -naloxonnal inkubáltuk növekvő koncentrációjú dihidromorfinon- (●), oximorfon- (□), dihidrokodeinon- (○) ill. oxikodon-oxim (■) jelenlétében. A kötési százalékot (B/T %) ábrázoltuk a vizsgált ligand koncentrációjának (log T) függvényében.

A leszorítási kísérletek számítógépes értékeléséből kapott affinitási értékeket (K_i) a 2. táblázat tartalmazza. Megfigyelhető, hogy az oxim származékok affinitása a legmagasabb, míg a dinitrofenilhidrazon származékoké alacsony.

2. táblázat:

Vegyület	K_i (nM)		Na-index
	-Na ⁺	+Na ⁺	
Naloxon	13.0	1.5	0.1
Oximorfon	1.6	27.0	16.9
Oximorfon-oxim	2.3	17.9	7.8
-szemikarbazon	3.7	66.7	18.0
-fenilhidrazon	20.0	55.5	2.8
-dinitrofenilhidrazon	22.7	144.9	6.5
Dihidromorfinon	0.9	13.3	14.8
Dihidromorfinon-oxim	1.7	13.0	7.6
-szemikarbazon	3.0	58.8	19.6
-fenilhidrazon	5.0	14.9	3.0
-dinitrofenilhidrazon	28.6	90.9	3.2
Oxikodon	127.0	1100.0	8.7
Oxikodon-oxim	32.3	455.0	14.0
-szemikarbazon	588.0	769.0	1.3
-fenilhidrazon	1150.0	1000.0	0.86
-dinitrofenilhidrazon	610.0	1190.0	1.9
Dihidrokodeinon	476.0	204.0	4.3
Dihidrokodeinon-oxim	52.6	500.0	9.5
-fenilhidrazon	323.0	508.0	1.5
-dinitrofenilhidrazon	833.0	625.0	0.75

A membránt (20 mg nedves szövet/ml) 1 nM ³H-naloxonnal 100 mM NaCl jelenlétében vagy anélkül inkubáltuk a vizsgálandó anyag különböző koncentrációjával. K_i értékek a leszorítási görbékből számított affinitási értékek. A Na-index a Na⁺ jelenlétében és távollétében mért K_i értékek hányadosa.

Valószínűleg ez a szubsztitúciós csoport nagyságával áll összefüggésben. Az oxim csoporttal való helyettesítés a csoport méreteinél fogva gyakorlatilag nem változtatja meg az eredeti molekula méreteit. A dinitrofenilhidrazon csoport viszont erőteljesen megnöveli azt, és valószínűleg ennek következtében csökken az affinitás. Az oxikodon és dihidrokodeinon származékok affinitása akárcsak az alapvegyületeké alacsony. Bár érdekes, hogy az oximmal való helyettesítés mindkét esetben megnöveli az affinitást.

A következő kérdés, amelyet vizsgáltunk, hogy vajon megváltozik-e a helyettesítéssel az anyagok farmakológiai karaktere, agonista jellege.

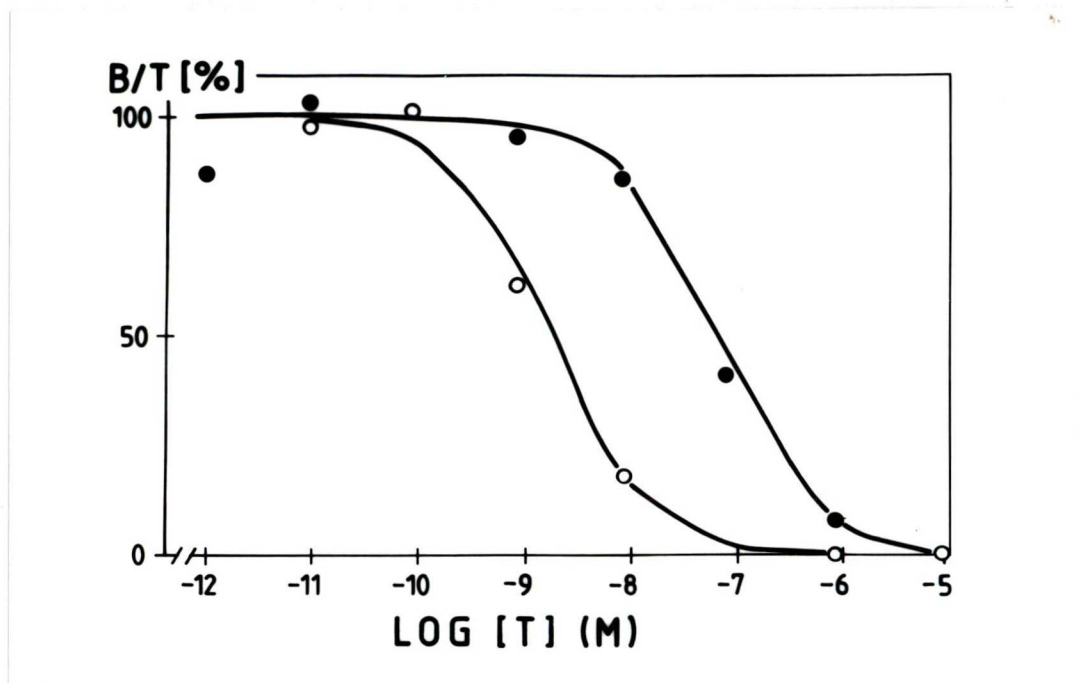
Fishman és munkatársai (64) feltételezik, hogy az eredetihez hasonló térbeli konfigurációjú csoporttal végzett helyettesítés nem változtatja meg a molekula agonista ill. antagonistákarakterét.

A 3. és 4. ábrákon először a Na^+ agonista ill. antagonistákopiát ligandok kötődésére gyakorolt hatását mutatjuk be.

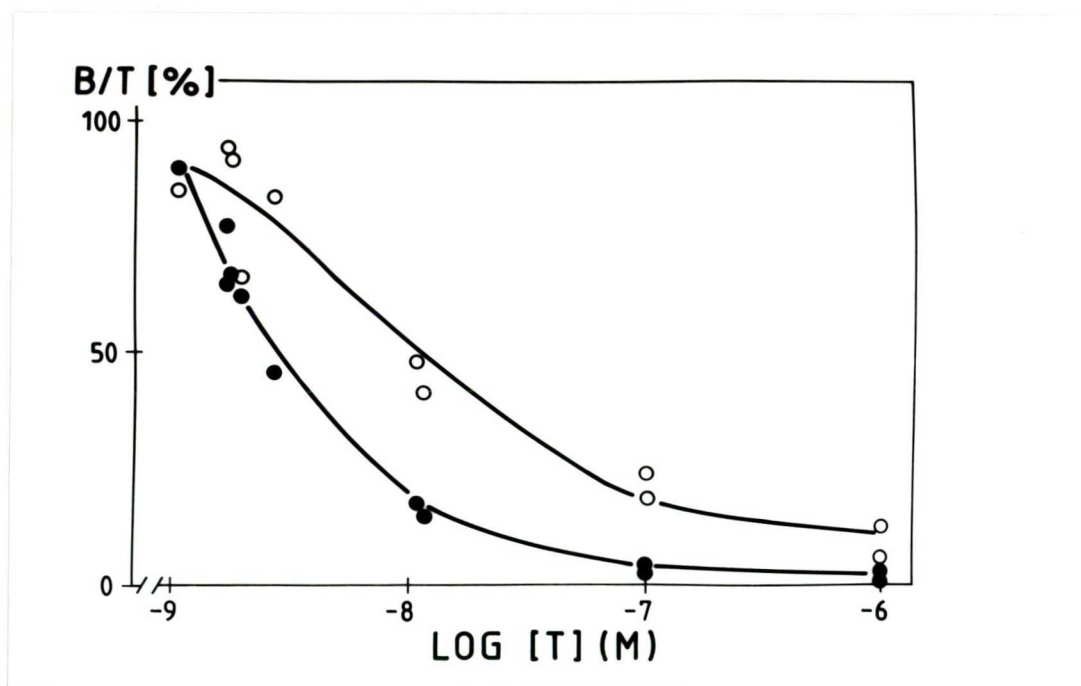
A 3. ábrán az oximorfon leszorítási görbéje látható Na^+ jelenlétében ill. anélkül. Ez jól szemlélteti a Na^+ hatását az agonistakarakterű ligand opioid receptorhoz való kötődésére. A Na^+ hatására a leszorítási görbe jobbra tolódik el, a ligand affinitása csökken.

A 4. ábra a naloxon homológ leszorítási görbáját mutatja Na^+ jelenlétében ill. anélkül. Itt az előző fordítottja tapasztalható.

Na^+ hatására az antagonistákötés növekszik, a görbe balra tolódik a kontrollhoz képest. A naloxon affinitása Na^+ hatására egy nagyságrenddel növekszik.



3. ábra: A membránt (20 mg nedves szövet/ml) 1 nM ^3H -naloxonnal és növekvő koncentrációjú oximorfonnal inkubáltuk 100 mM NaCl jelenlétében (●) ill. anélkül (○). A kötési százalékot (B/T %) ábrázoltuk a vizsgált ligand koncentrációjának (log T) függvényében.



4. ábra: A membránt (20 mg nedves szövet/ml) 1 nM ^3H -naloxonnal és növekvő koncentrációban adott jelzetlen naloxonnal inkubáltuk 100 mM NaCl jelenlétében (●) ill. anélkül (○). A kötési százalékot (B/T %) ábrázoltuk a vizsgált ligand koncentrációjának (log T) függvényében.

A vizsgált anyagok Na^+ jelenlétében mért affinitási értékeit (K_i) szintén a 2. táblázat foglalja össze, valamint ez tartalmazza a Na^+ -indexeket is, amely a Na^+ jelenlétében ill. Na^+ távollétében végzett leszorítási kísérletekből nyert K_i értékek hányadosa.

A Na^+ -index alapján könnyen osztályozhatók a ligandok. Az 1-es érték alattiak antagonisták karakterűek, 1-12 között kevert típusú, agonista-antagonista ligandok, 12 fölött pedig agonisták.

Méréseink alapján azt tapasztaltuk, hogy az agonista karakter csökken a helyettesítés hatására. Ez alól csak a szemikarbazon-származékok a kivételek, amelyeknél megmarad az oximorfon ill. dihidromorfinon agonista karaktere.

Érdekes, hogy a kevert jellegű agonista-antagonista oxikodon és dihidrokodeinon C-6 helyen oximmal történő helyettesítése a Na^+ -index alapján fokozni látszik az agonista karaktert.

A nagyméretű fenilhidrazon és dinitrofenilhidrazon csoportok jelenléte gyengíti leginkább az agonista jellegét, oxikodon és dihidrokodeinon származékaiként pedig egyenesen antagonisták jellegű ligandokat képeznek.

Az anya-vegyületek μ karakterű ligandok. A vizsgált analógok közül az oximorfon származékainak altípus specificitását vizsgáltuk.

A vegyületek affinitását a μ , δ és κ kötőhelyekhez altípus specifikus triciált ligandok segítségével mértük.

A μ receptor mérést ^3H -DAGO, a δ -t ^3H -DALE a κ -t pedig ^3H -EKC ligandokkal végeztük, a keresztreakciókat a megfelelő jelzetlen ligandok hozzáadásával gátoltuk (ld. Anyagok és módszerek). Az eredményeket a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat:

Ligandok	IC ₅₀ (nM)		
	μ ³ H-DAGO	δ ³ H-DALE	κ ³ H-EKC
Morfin	1	40	–
DADLE	20	4	–
DAGO	2	80	60
EKC	–	–	2
Oximorfon	5	100	20
Oximorfon-hidrazon	2	2000	2
-fenilhidrazon	25	75000	9000
-dinitrofenilhidrazon	10	5000	5000
-oxim	20	10000	8
-szemikarbazon	18	5000	10

A membrán preparátumot (12,5 mg nedves szövet/ml) növekvő koncentrációjú hideg ligand jelenlétében 3 nM ³H-DAGO-val (37 °C-on, 45 perc), 3 nM ³H-DALE-val (szobahőmérséklet, 45 perc) 10 nM DAGO jelenlétében vagy 3 nM ³H-EKC-vel (szobahőmérséklet, 45 perc) 100 nM DAGO és 100 nM DADLE jelenlétében inkubáltuk.

IC₅₀ azok a koncentrációk, amelyek a specifikus kötés 50 %-os gátlását okozzák.

–: nincs mérési adat

Látható, hogy az oximorfon származékok μ karaktere megmarad. Megfigyelhető, hogy a helyettesítés hatására szignifikánsan csökken az affinitásuk a δ kötőhelyekhez. A nagyméretű szubsztituensek esetén (fenilhidrazon, dinitrofenilhidrazon) a κ kötőhelyhez való affinitásuk is nagyságrenddel kisebb, mint az oximorfoné.

Irreverzibilitás mérések

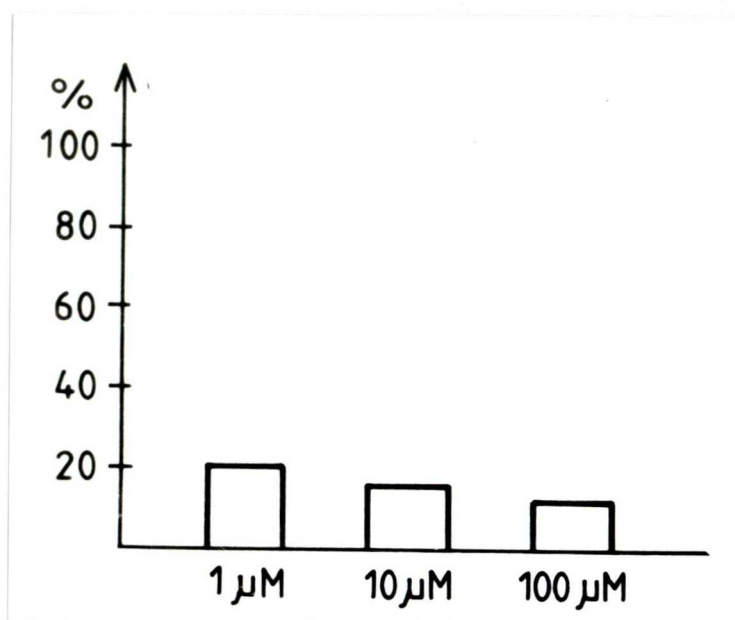
Az anyagok irreverzibilis kötődését indirekt úton vizsgáltuk, mivel a vegyületek triciált formája nem állt rendelkezésünkre. A viszonylag költséges és időigényes triciálás előtt feltétlenül indokolt a vegyületek irreverzibilitásának tesztelése az általánosan alkalmazott indirekt mosási kísérletekben. Ezeknél a méréseknél gyakorlatilag a ^3H -naloxon kötődésének változását mérjük olyan membránpreparátumon, amelyet a vizsgálati anyaggal előinkubáltunk, majd többszörös mosással a reverzibilisen membránhoz kötődött ligandot eltávolítottuk. Amennyiben az anyag az előinkubálás során irreverzibilisen kötődik a receptorhoz, ez nem távolítható el, és csökkent ^3H -naloxon kötést fogunk tapasztalni.

A pufferben ill. az anya-vegyülettel előinkubált membránokon a ^3H -naloxon kötés nem változott. Szintén nem változott a 6-amino-dihidromorfinnal előinkubált membrán ^3H -naloxon kötése.

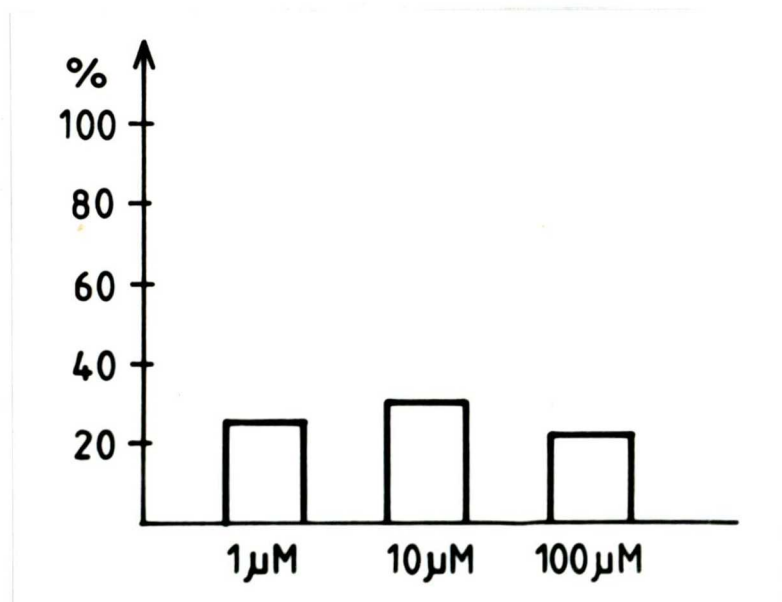
Az 5-14. ábrákon az oximorfon és dihidromorfinon származékokkal végzett mosási kísérletek diagramjai láthatók.

Az egyes anyagokat 3 különböző koncentrációban vizsgáltuk (1, 10, 100 μM). Az összes vizsgált származék dózis függően, kisebb vagy nagyobb mértékben irreverzibilitást mutatott.

A legerőteljesebb ^3H -naloxon kötés gátlás a oximorfon-hidrazon (5. ábra) és -dinitrofenilhidrazon (6. ábra) esetében volt tapasztalható. Ezek az anyagok már a legkisebb koncentrációban (1 μM) is 76-80 %-os kötés gátlást hoznak létre.



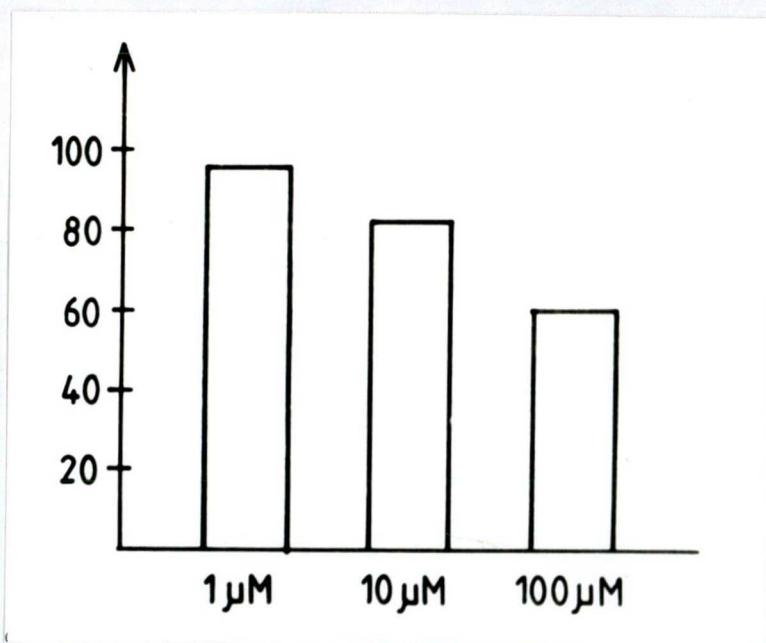
5. ábra: Oximorfon-hidrazon különböző koncentrációjával (1, 10, 100 μM) 1 órán át 0 °C-on előinkubáltuk a membránt (0,2 g nedves szövet/ml), majd a membránt többszöri centrifugálással és higitással átmostuk és 1 nM ^3H -naloxonnal inkubálva mértük a receptorkötést. A maradék ^3H -naloxon kötést a kontroll kötés %-ban fejeztük ki.



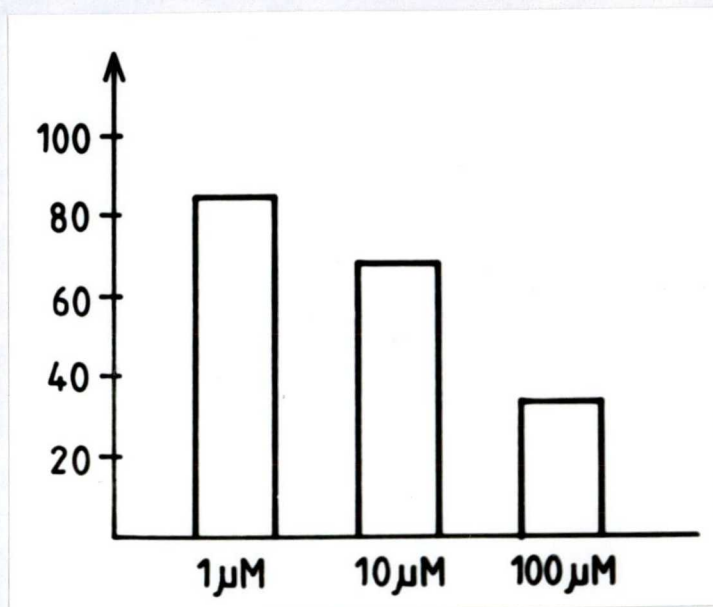
6. ábra: Az oximorfon-dinitrofenilhidrazonnal előinkubált membránon mért ^3H -naloxon kötés a kontroll kötés %-ban kifejezve.

Érdekes, hogy míg az oximorfon-dinitrofelhidrazon ilyen hatásos, addig a dihidromorfinon-dinitrofenilhidrazon (7. ábra) a legnagyobb koncentrációban is csak a kötés 40 %-át gátolta. A két szemikarbazon származék (8-9. ábra) esetén pedig épp ellenkezőleg, a dihidromorfinon származék mutat nagyobb irreverzibilitást. Ez 66 %-os kötésgátlást okoz, míg az oximorfon-szemikarbazon csak 26 %-ban gátol.

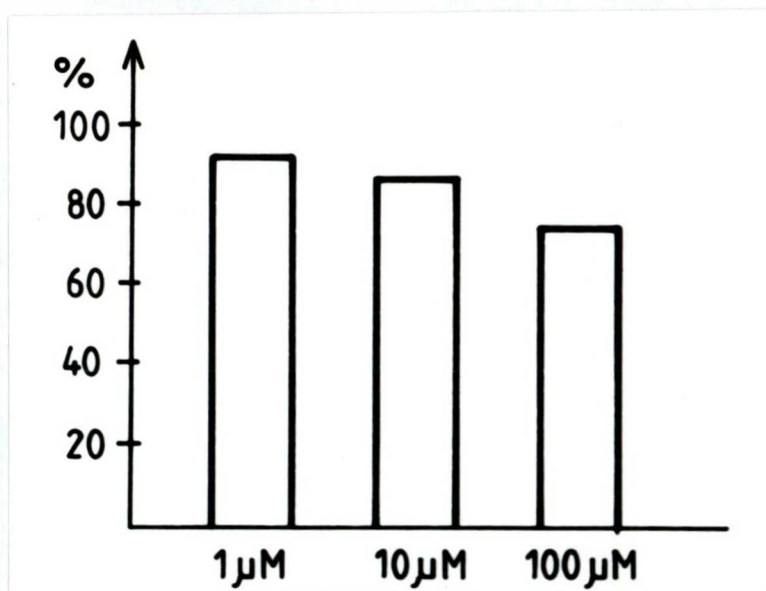
Ezek alapján az irreverzibilitási adatok alapján semmilyen összefüggés nem állapítható meg a 14-es OH-csoport megléte és a vegyület irreverzibilitása között.



7. ábra: A dihidromorfinon-dinitrofenilhidrazonnal előinkubált membránon mért ^3H -naloxon kötés a kontroll kötés %-ban kifejezve.

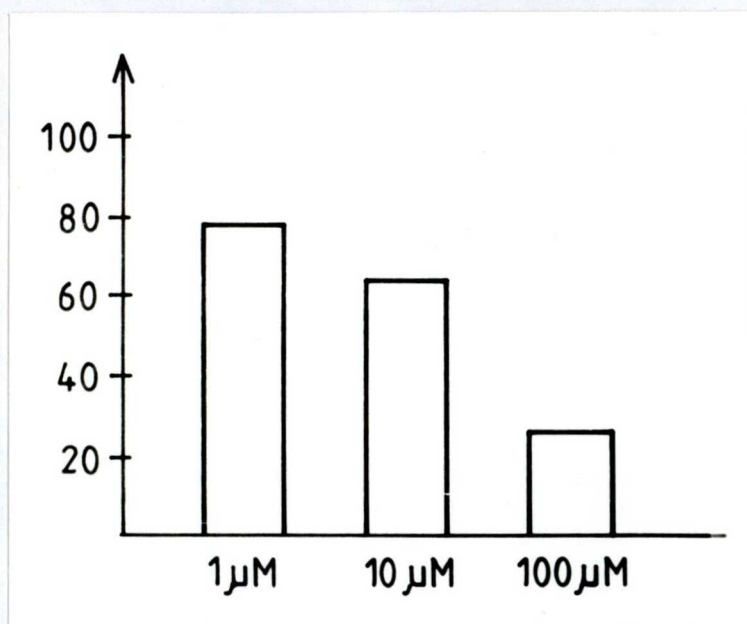


8. ábra: A dihidromorfinon-szemikarbazonnal előinkubált membránon mért ^3H -naloxon kötés a kontroll kötés %-ban kifejezve.

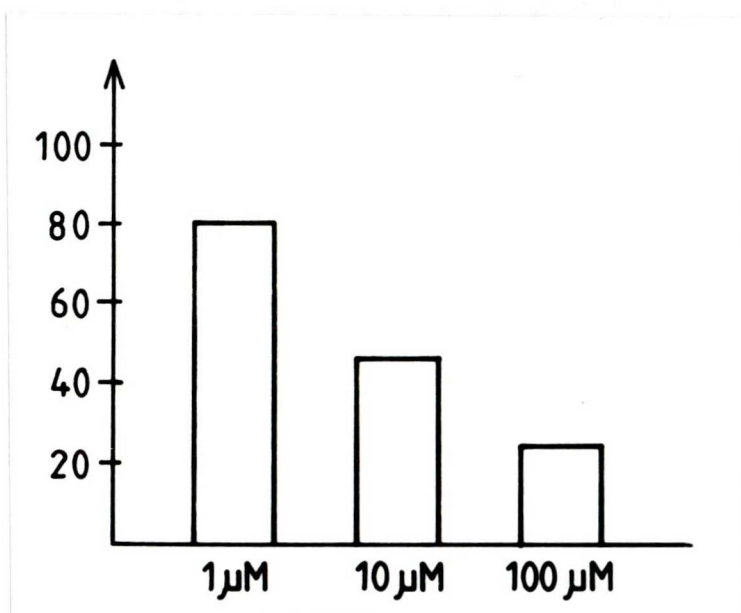


9. ábra: Az oximorfinon-szemikarbazonnal előinkubált membránon mért ^3H -naloxon kötés a kontroll kötés %-ban kifejezve.

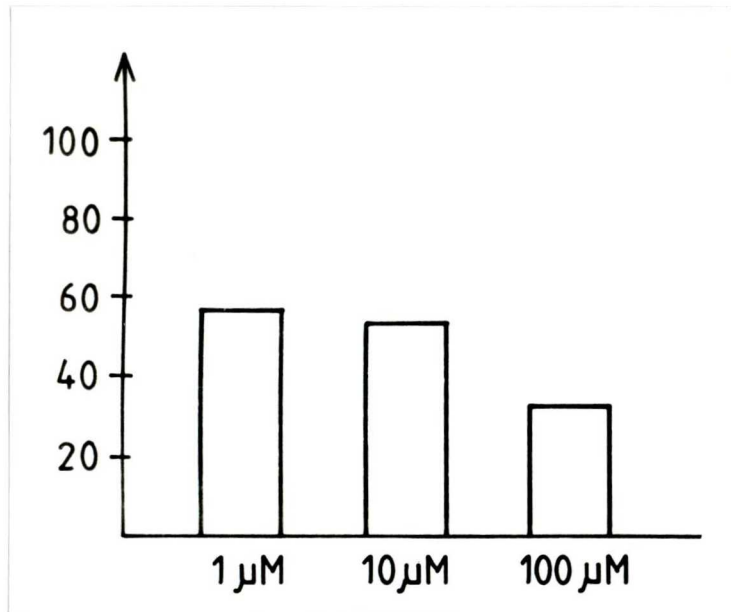
A dihidromorfinon származékok esetében az anyagok affinitása és irreverzibilitásuk párhuzamba állítható. Az oxim (10. ábra), fenilhidrazon (11. ábra) és szemikarbazon származékok affinitása (ld. 2. táblázat) közel megegyezik, az alkalmazott legnagyobb koncentrációban is közel azonos módon, 66-74 % között gátolták irreverzibilisen a ^3H -naloxon kötést. A dinitrofenilhidrazon származék pedig affinitásban és irreverzibilitásban is elmarad az előzőektől.



10. ábra: A dihidromorfinon-oximmal előinkubált membránon mért ^3H -naloxon kötés a kontroll kötés %-ban kifejezve.

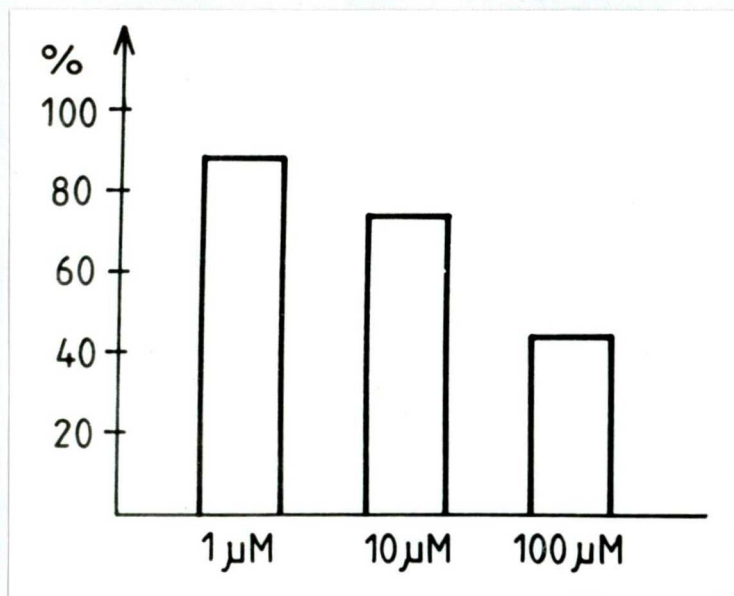
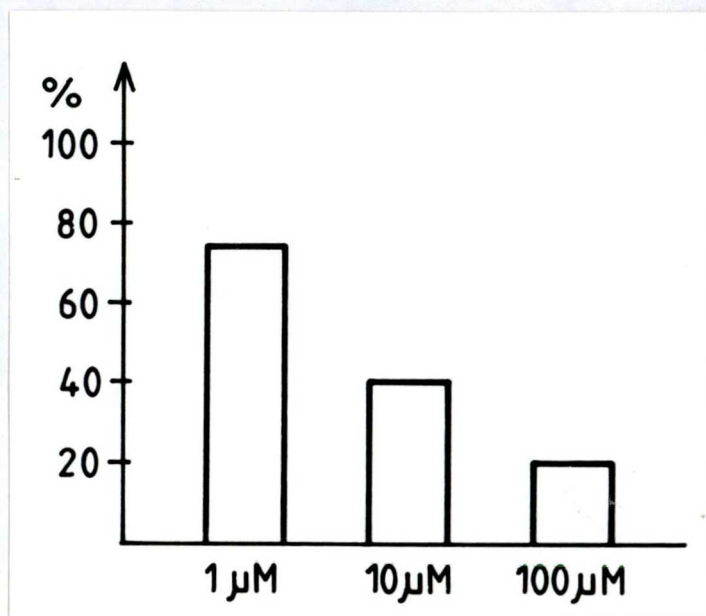


11. ábra: A dihidromorfinon-fenilhidrazonnal előinkubált membránon mért ³H-naloxon kötés a kontroll kötés %-ban kifejezve.



12. ábra: A dihidromorfinon-hidrazonnal előinkubált membránon mért ³H-naloxon kötés a kontroll kötés %-ban kifejezve.

Az oximorfon származékok esetében azonban az affinitás és irreverzibilitás ilyen párhuzamáról már nem lehet beszélni. Itt épp a viszonylag nagyméretű szubsztituenst tartalmazó vegyületek, amelyeknek az affinitása kisebb, mutatnak nagyobb irreverzibilitást.



13-14. ábra: Az oximorfon-oximmal (fent), oximorfon-fenilhidrazonnal (lent) előinkubált membránon mért ^3H -naloxon kötés a kontroll kötés %-ban kifejezve.

Az oxikodon és dihidrokodeinon származékok irreverzibilitását csak egy koncentrációban (100 μM) vizsgáltuk. Ennek eredményeit a 4. táblázat tartalmazza. Az oxikodon-dinitrofenilhidrazon nem mutatott irreverzibilitást, a többi vizsgált anyag is csak igen kis mértékben gátolta irreverzibilisen a ^3H -naloxon kötést, ahogyan affinitásuk is jóval kisebb, mint a morfinonoké.

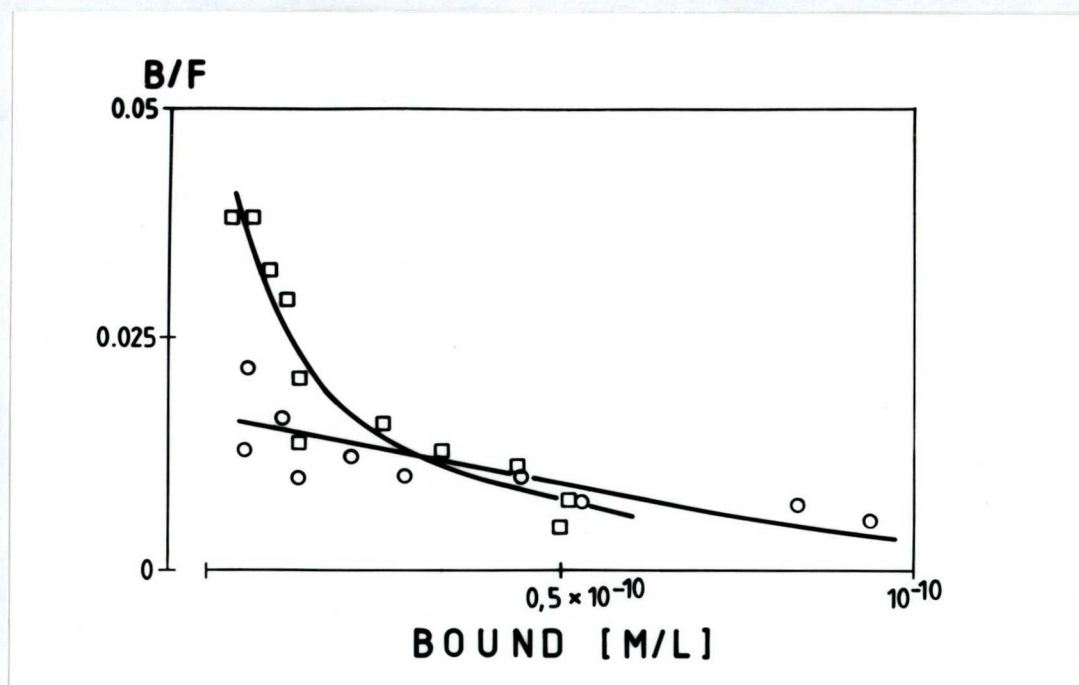
4. táblázat:

Vegyület	^3H -naloxon kötés gátlása (%)
Oxikodon-fenilhidrazon	8
-dinitrofenilhidrazon	0
Dihidrokodeinon-fenilhidrazon	20
-dinitrofenilhidrazon	37

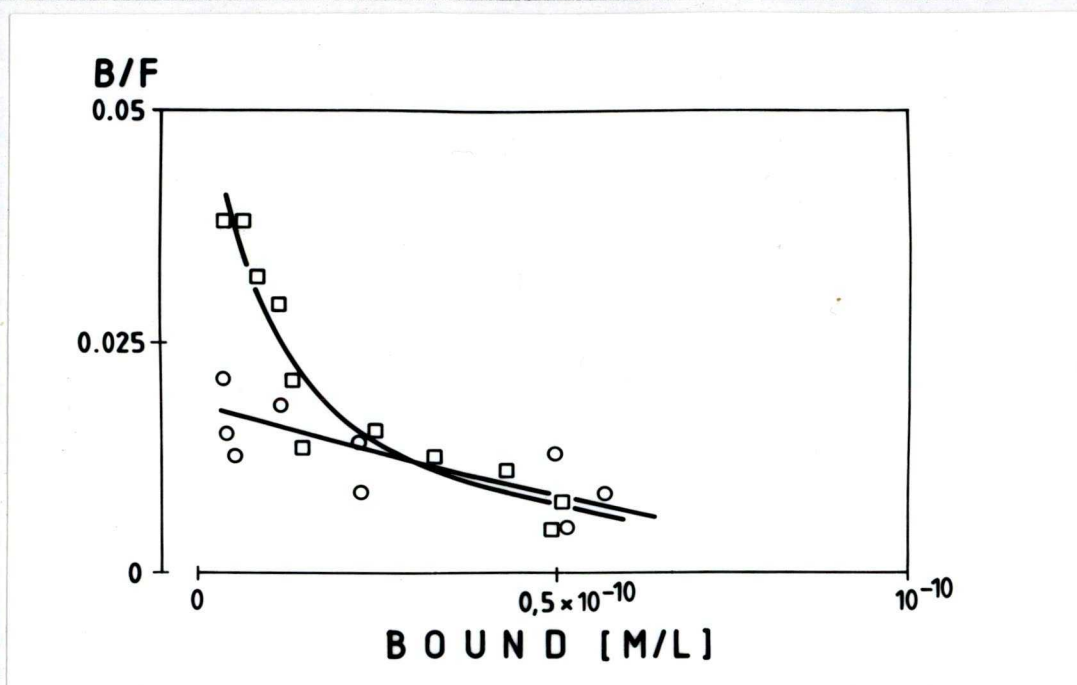
A membrán preparátumot (0,2 g nedves szövet/ml) a vizsgált anyag 100 μM -jával 1 óráig 0 °C-on előinkubáltuk, majd többszöri mosás után a membránt 1 nM ^3H -naloxonnal 1 óráig 0 °C-on inkubáltuk. A ^3H -naloxon kötés gátlását a kontroll %-ában adtuk meg.

Egyik anyaggal sem lehetett a ^3H -naloxon kötést 100 %-ban irreverzibilisen gátolni. Ez azonban azzal magyarázható, hogy ezek a vegyületek a naloxon kötőhelyek csak bizonyos populációjához kötődnek irreverzibilisen.

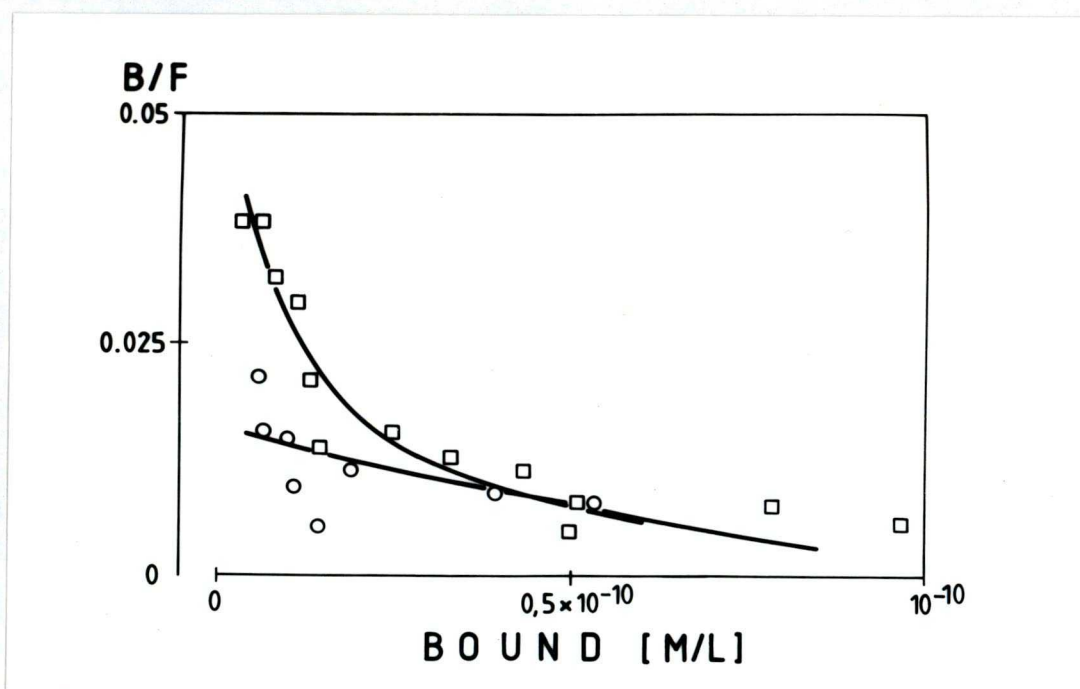
A hidrazon származékokkal (naloxazon, oximorfazon) végzett kísérletekben (54) azt bizonyították, hogy a membránt ezekkel az anyagokkal előinkubálva a ^3H -naloxon nagy affinitású kötőhelyét lehet irrverzibilisen gátolni, a kis affinitású kötőhely nem befolyásolható. Mi is vizsgáltuk, hogy az előinkubálás milyen hatással van a ^3H -naloxon kötődésére. E célból az előinkubálással és mosással előkészített membránon ^3H -naloxonnal telítési kísérletet végeztünk. A 15. 16. és 17. ábrák a dihidromorfinon különböző származékaival előinkubált membránon mért ^3H -naloxon Scatchard-görbéket mutatják.



15. ábra: 10 μM dihidromorfinon-oximmal (○) ill. pufferrel (□) előinkubált, majd mosott membránt (12,5 mg nedves szövet/ml) 0,3–20 nM ^3H -naloxonnal 1 órán át 0 °C-on inkubáltuk. A telítési görbe Scatchard transzformációját ábráztuk, ahol B a kötött ligandok száma és F a szabad ligandok száma.



16. ábra: 10 μ M dihidromorfinon-fenilhidrazonnal (○) ill. pufferrel (□) előinkubált, majd mosott membránt (12,5 mg nedves szövet/ml) 0,3–20 nM 3 H-naloxonnal 1 órán át 0 °C-on inkubáltuk. A telítési görbe Scatchard transzformációját ábrázoltuk, ahol B a kötött ligandok száma és F a szabad ligandok száma.



17. ábra: 10 μ M dihidromorfinon-szemikarbazonnal (○) ill. pufferrel (□) előinkubált, majd mosott membránt (12,5 mg nedves szövet/ml) 0,3–20 nM 3 H-naloxonnal 1 órán át 0 °C-on inkubáltuk. A telítési görbe Scatchard transzformációját ábrázoltuk, ahol B a kötött ligandok száma és F a szabad ligandok száma.

Látható, hogy a pufferrel előinkubált membránon végzett ^3H -naloxon telítés esetében a Scatchard görbe hiperbolikus, a ^3H -naloxonnak két kötőhelye - egy nagyobb és egy kisebb affinitású - van. Mindhárom esetben a vegyületekkel végzett előinkubálás után vizsgálva a ^3H -naloxon kötést, csak a naloxon alacsony affinitású kötőhelyét sikerült kimutatni. Mindez arra utal, hogy ezek az anyagok irreverzibilisen kötődnek a μ_1 -nek nevezett nagy affinitású kötőhelyhez.

5. táblázat:

Az előinkubáláshoz használt ligand	^3H -naloxon kötési paraméterei			
	K_d (nM)		$B_{\max}$ (fmol/mg fehérje)	
	1.	2.	1.	2.
Kontroll	0.269	7.69	69	497
Dihidromorfinon-oxim		6.5		432
-szemikarbazon		5.9		476
-fenilhidrazon		4.5		380

A $10\ \mu\text{M}$ anyaggal előinkubált és mosott membránt (12,5 mg nedves szövet/ml) $0,3\text{--}20\ \text{nM}$ ^3H -naloxonnal inkubáltuk. A telítési görbék analizisét számítógéppel végeztük.

Az 5. táblázat mutatja a különböző előinkubálásoknál mért affinitásokat (K_d), valamint a kötőhelyek számát ($B_{\max}$).

A számítógép által számított értékeket összevetve jól látszik, hogy az előinkubálás után a ^3H -naloxon csak ahhoz a receptor populációhoz kötődik, amely számában megegyezik a kontroll kísérlet kis affinitású receptoraival. Ezeket az affinitási értékek is megerősítik.

Megbeszélés

Kísérleteinkben dihidromorfinonok és dihidrokodeinonok C-6-os helyen helyettesített származékainak - fenilhidrazon, dinitrofenilhidrazon, oxim, szemikarbazon - opioid receptor kötési paramétereit vizsgáltuk patkány agyi membrán preparátumon.

Az alapvegyületek - dihidromorfinon, oximorfon, dihidrokodeinon, oxikodon - ópiát ligandok, melyek agonisták vagy a két utóbbi esetében kevert, agonista-antagonisták, nagyobb ill. kisebb affinitással reverzibilisen kötődnek az opioid receptorokhoz.

A naloxon és oximorfon C-6 helyen hidrazonnal helyettesített származékai (naloxazon, oximorfazon) (53) igen jelentős irreverzibilis ligandok. Ezek az anyagok az opioidok nagy affinitású kötőhelyeit gátolják (54). Az irreverzibilis gátlásnak - az in vivo farmakológiai kísérletek alapján - egy tartósan megmaradó fájdalomcsillapítás lesz a következménye ill. irreverzibilis antagonistán esetén ez a morfin fájdalomcsillapító hatását felfüggeszti, de a letális légzésdepressziót nem képes kivédeni (37, 65). Ezekből a kísérletekből úgy tűnik, hogy sikerült a fájdalomcsillapítást közvetítő receptor altípust - μ_1 - a többi opioid receptor altípustól megkülönböztetni az irreverzibilis hidrazon származékok segítségével.

Az irreverzibilis kötés kialakulásának mechanizmusáról azonban keveset tudni.

A gyógyszerfejlesztés szempontjából igen fontos ismerni azokat a folyamatokat, amelyek a receptor és irreverzibilis ligandja között létrejönnek.

Erre vonatkozóan három különböző elmélet vetődött fel az irreverzibilis ligandokkal folytatott kísérletek eredményeképp.

Elsőként azt a lehetőséget vetették fel, hogy a hidrazonok dimerizációjából származó azinok rendelkeznek olyan szerkezettel, amely lehetővé teszi az opioid receptorok hosszú idejű gátlását (55). A dimér két egymáshoz közeli opioid receptorhoz kötődik egyidejűleg - "kettős elfoglalás" -, ezzel magyarázták a komplex hosszú élettartamát, amely tehát nem kovalens kölcsönhatásnak, hanem az igen lassú disszociációnak tudható be.

Egy másik elképzelés szerint maga a hidrazon csoport rendelkezik olyan reaktivitással, amely szükséges a kovalens kötés kialakulásához (66). A hidrazon csoport szabad amino-csoportja képezhet Schiff-bázist a receptor egyik elektrofil helyével.

A legújabb feltételezés szerint egy erősen elektrofil csoporttal történő helyettesítés a 6-os számú C-atomot pozitív töltésűvé változtatja és mint ilyen, Michael-acceptorként reagálhat a receptor nukleofil részletével (67).

A C-6 helyen derivatizált dihidromorfinon és dihidrokodeinon származékokkal végzett kísérletekkel megpróbáltunk annak a kérdésnek a megválaszolásához közelebb kerülni, hogy milyen szerkezet szükséges az irreverzibilis kölcsönhatás kialakulásához.

A C-6 helyen történt szubsztitúció után is megmaradt a vegyületek affinitása az opioid receptorhoz. A kisméretű szubsztituensekkel végzett helyettesítés után a származék affinitása az eredeti molekula affinitásától csak kis mértékben tér el, a nagyobb méretű csoportok jelenléte a C-6 helyen csökkentette a vegyület affinitását.

Ebből arra lehet következtetni, hogy bár a C-6-os helyzetű szubsztituens megváltozása nem olyan kritikus az ópiát hatás szempontjából, mint a C-3-as helyzetű fenolos OH-csoport módosítása, de a rajta levő nagyobb szubsztituensek a molekula térszerkezetét az affinitás szempontjából hátrányosan befolyásolhatják.

A mért Na^+ -indexek alapján megállapítható, hogy a helyettesítés kivéve a szemikarbazonokat csökkentette a vegyületek agonista karakterét. Ebben az esetben is a nagyméretű csoportokkal történt helyettesítés változtatta meg jelentősebben a vegyületek jellegét. A dihidrokodeinonoknál antagonistá karakterű vegyületek alakultak ki dinitrofenilhidrazonnal és fenilhidrazonnal való helyettesítés után. Megjegyzendő, hogy a vegyületek farmakológiai karakterének vizsgálatánál a Na^+ -indexen kívül elengedhetetlenek az izolált szervi és egyéb farmakológiai vizsgálatok, ezek elvégzése azonban jelen munkában nem volt célunk.

Az alapvegyületek μ karakterű ligandok, mi az oximorfon származékok specifitását vizsgáltuk. Ezekből a kísérletekből megállapítható, hogy a helyettesítés nem változtatta meg a vegyületek μ specifikus karakterét, sőt affinitásuk a másik két altípushoz (δ és κ) csökken. Főképp a δ kötőhelyhez kötődnek szignifikánsan kisebb affinitással, a nagy szubsztituenseket tartalmazó vegyületeknél a κ receptorhoz való affinitásuk is szembetűnően csökken.

A vegyületek irreverzibilitását indirekt úton mértük.

A vizsgált dihidromorfinon és oximorfon származékok mind képesek voltak a ^3H -naloxon kötést irreverzibilisen gátolni. A gátlás dózis-függő, amely a receptor és ligand specifikus kölcsönhatására utal. A ligandok affinitása és irreverzibilitásuk mértéke nem mindig hozható párhuzamba. Az azonos csoporttal helyettesített

származékok affinitása közel egyforma akár dihidromorfinon akár oximorfon derivatívok. A ^3H -naloxon kötés irreverzibilis gátlásában azonban jelentősen eltérnek az azonos oximorfon és dihidromorfinon származékok.

Adataink alapján megállapítható, hogy a C-14-es helyen levő hidroxil csoportnak valószínűleg nincs a receptoron felismerő helye, hiszen a C-14-es hidroxil csoport megléte nem befolyásolta következetesen a származékok irreverzibilitását. Például a dinitrofenilhidrazon származékok esetében a C-14 OH-csoportot tartalmazó vegyület irreverzibilitása sokkal jelentősebb, más esetben (pl. szemikarbazon) épp az OH-csoportot nem tartalmazó dihidromorfinon származék gátol hatékonyabban.

A különböző szubsztituensek egymáshoz viszonyított affinitása és irreverzibilitása sem állítható párhuzamba az oximorfon származékok esetén.

A ^3H -naloxon kötetést legnagyobb mértékben (76–80 %) az oximorfondinitrofenilhidrazon gátolta, de teljes kötés gátlást ennél a vegyületnél sem tapasztaltunk. Ennek az lehet a magyarázata, hogy ezek a ligandok csak az egyik naloxon kötőhelyhez (μ_1) kötődnek, ugyanúgy ahogy ezt már a naloxazonnal és oximorfazonnal kapcsolatban megállapították (54).

Ez egybevág azzal a ténnyel, hogy a kodeinon származékok a naloxon nagy affinitású kötőhelyéhez (μ_1) csak kis mértékben kötődnek és kísérleteinkben a dihidrokodeinon és oxikodon származékok irreverzibilis kötése is igen csekély.

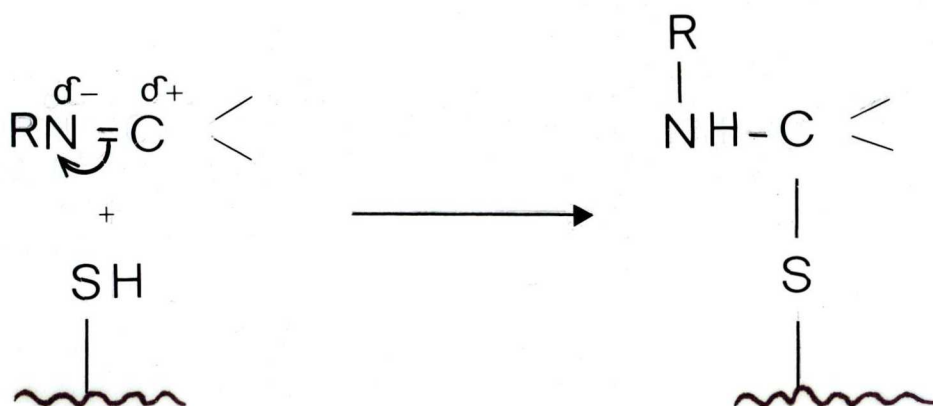
A vegyületekkel előinkubált, majd mosott membránon végzett ^3H -naloxon telítési kísérletekből is egyértelműen látszik, hogy mindhárom vizsgált esetben (dihidromorfinon-oxim, -szemikarbazon, -fenilhidrazon) az anyagok a naloxon nagy affinitású kötőhelyéhez (μ_1) kötődnek irreverzibilisen. A vegyületekkel előkezelt membránban a naloxon számára "megközelíthetetlené" válnak az eredetileg oly "vonzó" kötőhelyek.

A kísérletekben vizsgált származékok egyike sem alkalmas dime-rizációs reakcióra, hiszen a hidrazon csoportjuk a további helyettesítés miatt védett (fenilhidrazon, denitrofenilhidrazon). A szintén vizsgált oxim nem tartalmaz hidrazon csoportot. Mivel mindegyik származék képes volt a naloxon kötést irreverzibilisen gátolni, úgy látszik, a "kettős elfoglalás" elve - ha bizonyos esetekben igaz is lehet - semmiképpen sem fogadható el a receptor-ligand kölcsönhatás irreverzibilitásának magyarázatául.

A vizsgált szubsztituensek egyikében sem található szabad aminos-csoport, így egy esetleges Schiff-bázis kialakulása is valószínűtlen. Az összes általunk vizsgált vegyületben egy közös vonás volt, a C-6 helyen a $\text{C}=\text{N}$ kettős kötés, amelyet egy viszonylagosan elektrofil csoport követ. A tájékozódó kísérletben alkalmazott 6-amino-dihidromorfin nem tartalmaz $\text{C}=\text{N}$ kettőskötést a C-6-os helyen, viszont az aminos-csoport alkalmas lehetne Schiff-bázis létrehozására. Mivel ez az anyag nem gátolta irreverzibilisen a naloxon kötődését valószínű, hogy az irreverzibilis kötés nem Schiff-bázis képzés útján alakul ki.

Kísérleti adataink a Koman-féle (67) elméletet látszanak alátámasztani. A $\text{C}=\text{N}$ kettőskötés, mint Michael-acceptor reagálhat a receptor nukleofil részletével.

A merkaptánok iminekkel történő reakciójához (68) hasonló módon elképzelehtő, hogy a C=N kettőskötést tartalmazó molekularészlet a receptorfehérje egyik szulfhidril-csoportjával képez addíciós terméket.



Ez a feltételezés kiválóan egybeesik a NEM-mel végzett kísérletekből (11, 13) következő feltevással, hogy a receptor felismerőhelyén vagy annak közvetlen közelében SH-csoportnak kell lennie (ld. 12. old.).

Kísérleteink alapján is valószínűsíthető egy kovalens receptor-ligand kapcsolat kialakulása, amelynek gyakorlati jelentősége abban állna, hogy egy ilyen kovalensen kötődő irreverzibilis ligandot az opioid receptor altípusok szelektív elkülönítésére és tisztítására lehetne felhasználni a továbbiakban.

A dolgozat az MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetében a Nemzetközi Továbbképző Tanfolyam keretében készült.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani dr. Varga Évának nagy szakértelemmel végzett elméleti irányításáért.

Köszönöm a Nemzetközi Továbbképző Tanfolyam szervezőinek, dr. Wollemann Máriának és munkacsoportjának, dr. Venetianer Pálnak, a Biokémiai Intézet igazgatójának és főnökeimnek, dr. Fekete Mártonnak és Szentendrei Tibornak, hogy lehetővé tették doktori dolgozatom elkészítését és munkámban támogattak, valamint Kalicka Gabriellának és Borka Andrásnak az ábrák és fényképek szakszerű elkészítését, és Szántó Juditnak a kézirat nagy gondossággal végzett gépelését.

Irodalomjegyzék

1. A. GOLDSTEIN, L. I. LOWNEY and B. K. PAL, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68 1742-1747 (1971).
2. C. B. PERT and S. H. SNYDER, Science 179 1011-1014 (1973).
3. L. TERENIUS, Acta. Pharmac. Tox. 33 377-384 (1973).
4. E. J. SIMON, J. M. HILLER and I. EDELMAN, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70 1947-1949 (1973).
5. W. D. M. PATON, Br. J. Pharmacol. Ther. 12 119-127 (1957).
6. H. W. KOSTERLITZ and A. A. WATERFIELD, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 15 29-47 (1975).
7. I. CREESE and S. H. SNYDER, J. Pharm. Exp. Ther. 194 205-219 (1975).
8. C. B. PERT and S. H. SNYDER, Mol. Pharmacol. 10 868-879 (1974).
9. G. W. PASTERNAK, A. M. SNOWMAN and S. H. SNYDER, Mol. Pharmacol. 11 735-744 (1975).
10. G. W. PASTERNAK and S. H. SNYDER, Nature 253 563-565 (1975).
11. E. J. SIMON and J. GROTH, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72 2404-2407 (1975).
12. E. J. SIMON, J. M. HILLER, I. EDELMAN, J. GROTH and K. D. STAHL, Life Sci. 16 1795-1800 (1975).
13. E. J. SIMON, Neurosci. Res. Program. Bull. 13 43-50 (1975).
14. E. J. SIMON, J. M. HILLER, J. GROTH and I. EDELMAN, J. Pharmacol. Exp. Ther. 192 531-537 (1975).
15. A. J. BLUME, Life Sci. 23 759-762 (1978).
16. A. J. BLUME, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75 1713-1717 (1978).
17. S. R. CHILDERS and S. H. SNYDER, J. Neurochem. 34 583-593 (1980).
18. H. O. J. COLLIER and A. C. ROY, Nature 248 24-27 (1974).
19. S. K. SHARMA, M. NIRENBERG and W. A. KLEE, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72 590-594 (1975).
20. W. A. KLEE and M. NIRENBERG, Nature 263 609-611 (1976).

21. D. V. REYNOLDS, *Science* 164 444-445 (1969).
22. D. MAYER and J. C. LIEBERSKIND, *Brain Res.* 68 73-93 (1974).
23. H. AKIL, D. J. MAYER and J. C. LIEBERSKIND, *Science* 191 961-962 (1976).
24. C. B. PERT and S. H. SNYDER, *Biochem. Pharmacol.* 25 817-853 (1976).
25. J. T. HUGHES, *Brain Res.* 88 295-308 (1975).
26. J. T. HUGHES, T. W. SMITH, H. W. KOSTERLITZ, L. FORHERGILL, B. A. MORGAN and H. R. MORRIS, *Nature* 258 577-579 (1975).
27. R. SIMANTOV and S. H. SNYDER, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73 2515-2519 (1976).
28. B. M. COX, A. GOLDSTEIN and C. H. LI, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73 1821-1823 (1976).
29. A. F. BRADBURY, D. G. SMYTH and C. R. SNELL, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69 950-956 (1976).
30. M. CHRETIEN, S. BENJANNET, N. DRAGON, H. N. A. SEIDA and M. LIS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72 472-478 (1976).
31. W. R. MARTIN, C. G. EADES, J. A. THOMPSON, R. E. HUPPLER and P. E. GILBERT, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197 517-522 (1976).
32. J. A. H. LORD, A. A. WATERFIELD, J. HUGHES and W. KOSTERLITZ, *Nature* 267 495-499 (1977).
33. R. R. GOODMAN, S. H. SNYDER, M. J. KUCHAR and W. S. YOUNG, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77 6239-6243 (1980).
34. K. J. CHANG and J. CUATRECASAS, *J. Biol. Chem.* 254 2610-2618 (1979).
35. G. W. PASTERNAK, A. R. GINTZLER, R. A. HOUGHTEN, G. S. F. LING, R. R. GOODMAN, K. SPIEGEL, S. NISHIMURA, N. JOHNSON and L. D. RECHT, *Life Sci.* 33 167-173 (1983).
36. G. W. PASTERNAK, H. A. WILSON and S. H. SNYDER, *Molec. Pharmacol.* 11 340-351 (1975).
37. G. W. PASTERNAK, S. R. CHILDERS and S. H. SNYDER, *Science* 208 514-516 (1980).
38. A. Z. ZHANG and G. W. PASTERNAK, *Life Sci.* 29 843-851 (1981).
39. G. W. PASTERNAK, M. CAROLL-BUATTI and K. SPIEGEL, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219 192-198 (1981).

40. C. BURKHARDT, R. C. A. FREDERIKSON and G. W. PASTERNAK, *Peptides* 3 869-871 (1982).
41. G. S. F. LING, K. SPIEGEL, S. NISHIMURA and G. W. PASTERNAK, *Europ. J. Pharmacol.* 86 487-488 (1983).
42. R. SCHULZ, E. FAASE, M. WÜSTER and A. HERZ, *Life Sci.* 24 843-850 (1979).
43. N. JOHNSON, R. A. HOUGHTEN and G. W. PASTERNAK, *Life Sci.* 31 1381-1384 (1982).
44. M. MAY, L. CZONCHA, D. R. GARRISON and D. J. TRIGGLE, *J. Pharm. Sci.* 57 884-887 (1968).
45. K. NAGAMATSU, Y. KIDO, T. TERAOKA, T. ISHIDA and S. TOKI, *Life Sci.* 31 1451-1457 (1982).
46. S. FANG, A. E. TAKEMORI and P. S. PORTOGHESE, *J. Med. Chem.* 27 1361-1363 (1984).
47. T. P. CARUSO, A. E. TAKEMORI, D. L. LARSON and P. S. PORTOGHESE, *Science* 204 316-318 (1979).
48. T. P. CARUSO, D. L. LARSON, P. S. PORTOGHESE and A. E. TAKEMORI, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213 539-544 (1980).
49. A. A. LARSON and M. J. ARMSTRONG, *Eur. J. Pharmacol.* 68 25-31 (1980).
50. P. S. PORTOGHESE, D. L. LARSON, J. B. LIANG, A. E. TAKEMORI and T. P. CARUSO, *J. Med. Chem.* 21 598-599 (1978).
51. T. P. CARUSO, D. L. LARSON, P. S. PORTOGHESE and A. E. TAKEMORI, *Life Sci.* 27 2063-2069 (1980).
52. J. T. PETON, R. B. JOHNSON, J. L. BALK, C. J. SCHMIDT and E. B. ROCHE, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97 1391-1398 (1980).
53. A. W. PASTERNAK and E. F. HAHN, *J. Med. Chem.* 23 674-677 (1980).
54. G. W. PASTERNAK, S. R. CHILDERS and S. H. SNYDER, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214 455-462 (1980).
55. E. F. HAHN, M. CAROLL-BUATTI and G. W. PASTERNAK, *J. Neurosci.* 2 572-576 (1982).
56. S. L. NISHIMURA, L. D. RECHT and G. W. PASTERNAK, *Mol. Pharmacol.* 25 20-37 (1984).
57. A. STEIN, *Pharmazie* 3 180 (1955).

58. L. J. SARGENT, L. H. SCHWARTZMAN and L. F. SMALL, *J. Org. Chem.* 23 1247 (1958).
59. S. HOSZTAFI, L. SZILÁGYI, S. MAKLEIT and G. TÓTH, *Acta. Chim. Hung.* (in press)
60. M. M. BRADFORD, *Anal Biochem.* 72 248 (1976).
61. H. J. YAMAMURA, S. J. ENNA and M. J. KUCHAR, *Neurotransmitter Receptor Binding* Raven Press New York (1978).
62. M. SZÜCS, S. BENYHE, A. BORSODI, M. WOLLEMAN, G. JANCSÓ, J. SZECSI and K. I. MEDZIHRADSKY, *Life Sci.* 32 2777 (1982).
63. P. J. MUNSON and D. RODBARD, *Anal. Biochem.* 107 220-239 (1980).
64. A. Z. RÓNAI, F. F. FÖLDES, E. F. HAHN and J. FISHMAN, *J. Pharm. Exp. Ther.* 200 496 (1977).
65. S. GALETTA, G. S. F. LING, L. WOLFIN and G. W. PASTERNAK, *Life Sci.* 31 1389 (1982).
66. Alkaloidkémiai Munkabizottság ülése 1987. április, Balatonfüred.
67. A. KOMAN, V. M. KOLB and L. TERENIUS, *Pharm. Res.* 3 56 (1986).
68. Z. URBANCZKY-LIPKOWSKA, A. W. LIPKOWSKI, M. C. ETTER, E. F. HAHN, G. W. PASTERNAK and P. S. PORTHOGESE, *J. Med. Chem.* 30 1489 (1987).