

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Készült

Szegedi Orvostudományi Egyetem

Kórélettani Intézetében

Igazgató

Dr. Telegdy Gyula

tanszékvezető egyetemi tanár

NORFIN-FÜGGŐSÉGET BEFOLYÁSOLÓ PEPTIDEK HATÁSA A
DOPAMIN ANYAGCSERÉRE EGÉRAGYBAN

Írta:

Faludi Mária

okl. kémia-fizika tanár

Szeged

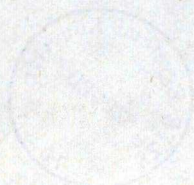
1985



B 5122



E 2.683



TARTALOMJEGYZÉK

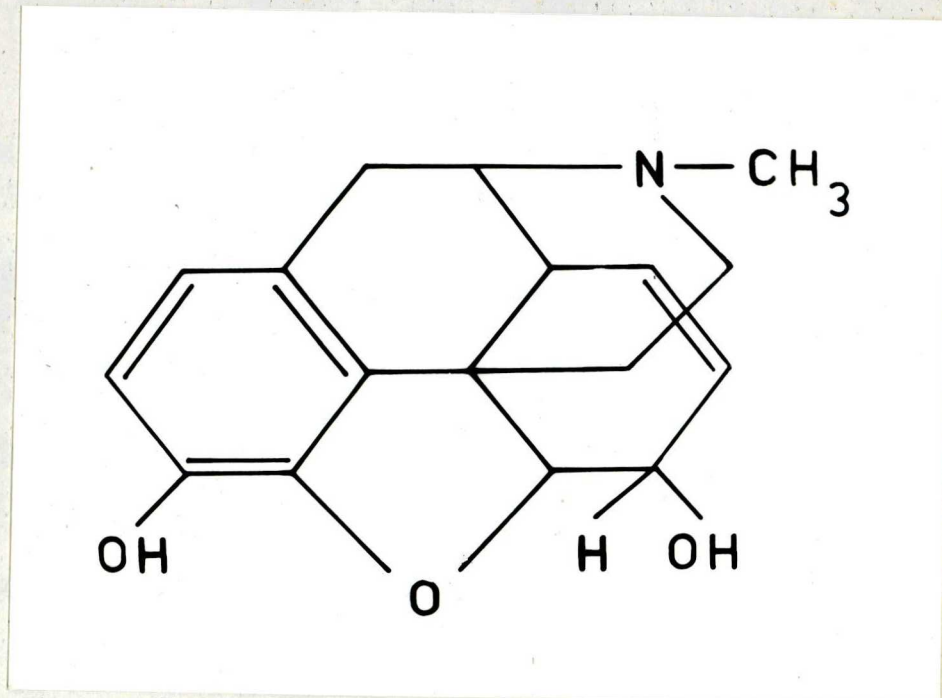
	oldal
1. BEVEZETÉS	3
1.1 A morfin hatása	3
1.2 A dopamin szerepe a morfin toleranciában és dependenciában	5
1.3 Dopamin pályák	6
1.4 Dopamin szintézis	8
1.5 Dopamin metabolizmus	11
1.6 A peptidek szerepe	12
1.7 Célkitűzések	15
2. MÓDSZEREK	17
2.1 Kísérleti állatok	17
2.2 Biológiai módszerek /Morfin megvonás vizsgálata/	17
2.3 Állatok leölése, mintavétel	19
2.4 Kémiai módszerek	19
2.4.1 A dopamin tartalom spektrofлуorimetrikus mérése /makromódszer/	19
2.4.2 Dopamin felhasználás radioenzimatikus mérése egér agymagvakban /mikromódszer/	20
2.4.3 Homovanillinsav /HVA/ meghatározás	21
2.4.4 Radioaktív transzmitter felvétel agyszövet szeleteken	23

	oldal
2.4.5 Radioaktív transzmitter felszabadulás agyszövet szelleteken	25
2.5 Kezelések	27
2.5.1 Akut oxitocin kezelés	27
2.5.2 Krónikus oxitocin kezelés	28
2.5.3 Dipeptid kezelés	28
2.5.4 Morfin tolerancia/függőség, megvonás és dipeptid kölcsönhatás	28
2.5.5 Dopamin felhasználás vizsgálata / α -metil-p-tirozin kezelés/	29
2.6 Statisztikai módszerek	30
3. EREDMÉNYEK	31
4. KÖVETKEZTETÉSEK	55
5. ÖSSZEFOGLALÁS	70
6. IRODALOMJEGYZÉK	74
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	84

1. BEVEZETÉS

1.1 A MORFIN HATÁSA

A morfin a legerősebb fájdalomcsillapítók egyike. Egyidejűleg jó közérzetet, gondolatcsapongást, indokolatlan jókedélyt okoz és végül altató hatást fejt ki. A morfin a központi idegrendszert bénító hatása miatt nagyobb dózisban halálos mérge. Főleg sebészeti beavatkozások előtt a beteg megnyugtatóására, továbbá ismételt adagolással fájdalmas, gyógyíthatatlan betegségek végső stádiumában alkalmazzák. A morfinra éppúgy, mint a morfin-típusú természetes, félszintetikus és szintetikus származékokra jellemző a tolerancia kialakulása, vagyis tartós adagolás után mind nagyobb dózisok bevitele válik szükségessé a hatás eléréséhez. Hajlamos egyének a morfint euforizáló hatása miatt élvezeti szerként fogyasztják és a kialakuló tolerancia miatt mind nagyobb mennyiségek bevitelére szorulnak. Ennek során krónikus morfinmérgezés és hozzászokás alakul ki /morfinizmus/. Az állandó morfinhatás alatt álló szervezet súlyosan károsodik. Morfinista egyéneken a morfin elvonása kiváltja az elvonási tüneteket. Rendkívül heves izgatottság, félelemérzés, remegés lép fel. Gyakoriak a dührohamok, hallucinációk. A pszichés tüneteket jellemző szomatikus elvonási tünetek kísérik /hasmenés, izzadás,



1. ábra

A morfin /C₁₇H₁₉NO₃/ szerkezeti képlete

nyálzás/. Az elvonási szindróma egyre gyengülő jelleggel eltarthat 1-2 hétig, majd fokozatosan megszűnik. Ezt követően a beteg állapota gyorsan javul. A visszaesés azonban - ha a mód megmarad a morfin megszerzésére /bűnözés/ - rendkívül gyakori, amely végülis a beteg halálát okozza.

A világ számos laboratóriumában folytatnak kísérleteket a morfin pontos hatásmódjának, a tolerancia és hozzászokás kialakulás mechanizmusának felderítésére. A pontos hatásmechanizmus azonban az intenzív kutatások ellenére sem tisztázott.

1.2 A DOPAMIN SZEREPE A MORFIN TOLERÁNCIÁBAN ÉS DEPENDENCIÁBAN

A kutatások szerint a kábító fájdalomcsillapítók akut hatása, az opiát tolerancia és dependencia kialakulása kapcsolatban van az agyi neurotranszmitterek metabolizmusában beálló változásokkal /SHUSTER 1961, SHARPLESS és mtsai 1969, COLLIER 1968, MARTIN 1970./ Az akut analgetikus hatás közvetítésében receptorszintű változásokat /opiát-receptor/, míg a tolerancia/dependencia kialakulásában adaptív idegrendszeri változásokat feltételeznek. Egyes kutatók szerint a transzmitter-receptorok, elsősorban a posztzinaptikus dopamin-receptor superszenzitivitása alakul ki az agyban

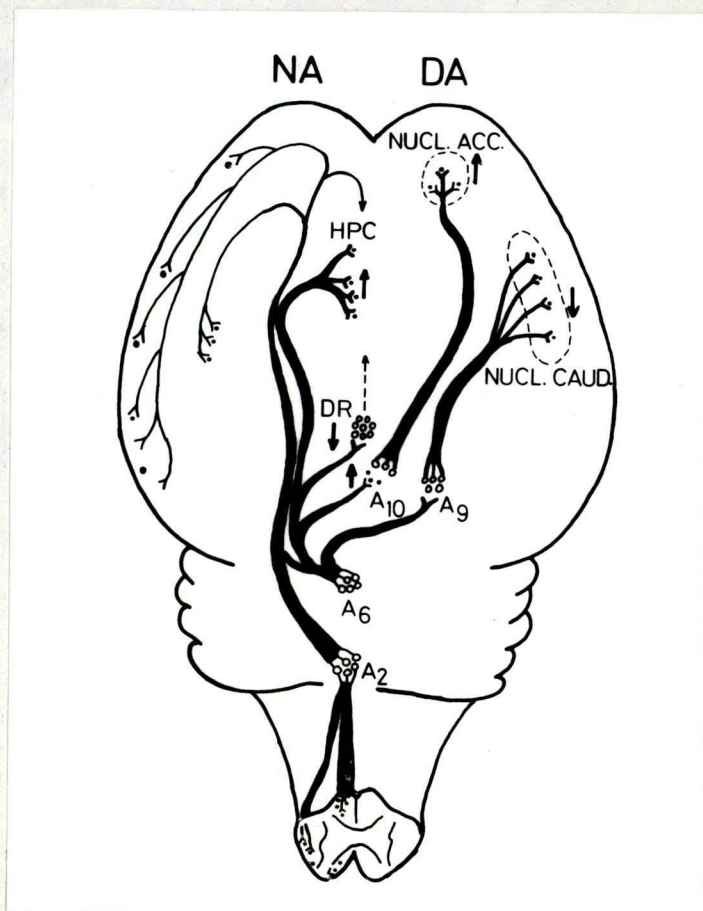
a krónikus opiát kezelés folyamán /COLLIER 1968, JAFFE és mtsai 1968/.

A dopamin /DA/ szerepére utal, hogy a striatális DA-szint lecsökkent a kontrollhoz viszonyítva akut morfin kezelés során patkányban /JOHNSON és mtsai 1974/. A morfin krónikus adására az egerben az agy DA-szint változatlan maradt /WAY és mtsai 1969/. Az agyi DA-szint szignifikánsan megnövekedett a morfin dependens egerben és patkányban a naloxonnal kiváltott megvonás alatt /IWAMOTO és mtsai 1973, 1976, KOVÁCS és mtsai 1983b/.

FUKUI és TAKAGI /1972/ szerint a morfin analgetikus dózisa /10 mg/kg szubkután/ megnövelte a dopamin metabolitok 3,4-dihidroxi-fenil-ecetsav/DOPAC/ és homovanillinsav /HVA/ koncentrációját az egerek agyában. A HVA akkumulációja előzetes probenecid kezelés után megnövekedett opiát adását követően az egész agyban /PAPESCHI és mtsai 1975/, a striátumban /KUSCHINSKY és HORNYKIEWICZ 1972/, valamint a nucleus accumbensben és tuberculum olfactoriumban /WESTERINK és KORF 1975a,b/.

1.3 DOPAMIN PÁLYÁK

Hisztofluoreszcenciás és biokémiai vizsgálatokkal kimutatták, hogy az agyban a következő négy fő dopaminerg pályarendszer található - a./ nigrostriatális,



2. ábra

A dopamin pályák sematikus rajza

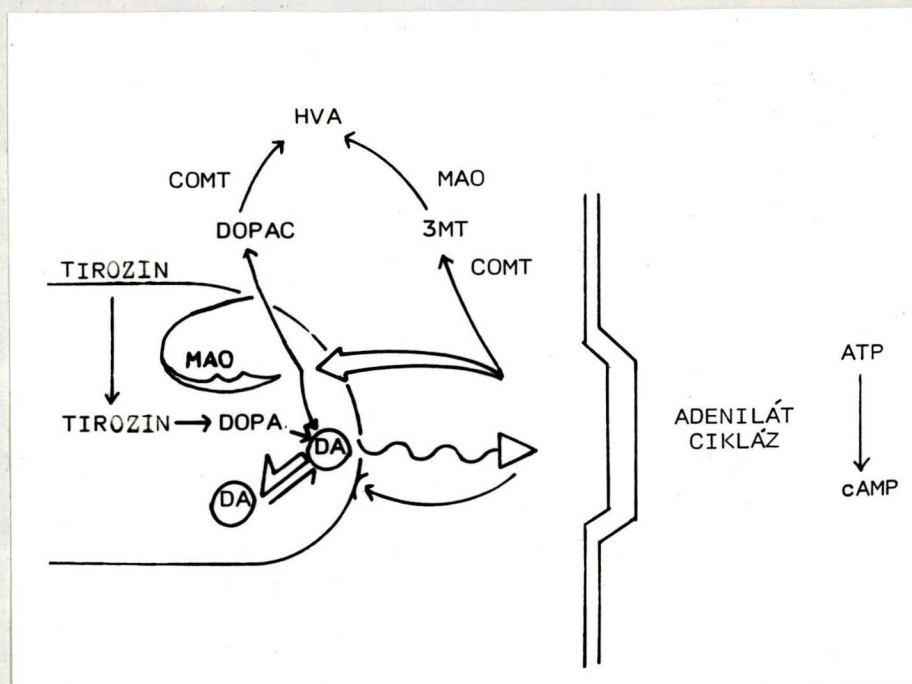
b./ tuberoinfundibuláris, c./ mesolimbikus d./ mesocorticalis. /MOORE és KELLY 1978/. A dopamin a striátumban a substantia nigra-ból eredő neuronok terminálisain belül lokalizálódik. Ez a nigrostriatális pálya a legkorábban megismert dopaminerg neuronális rendszer az agyban. Az ezt követő vizsgálatok felfedték más dopaminerg neuronok létét is /FUXE és mtsai 1978/. Ezek némelyike a hypothalamuson /tuberoinfundibuláris pálya/ belül található. A tuberoinfundibuláris rendszernek a sejttestjei a nucleus arcuatusban és a nucleus periventricularisban, és terminálisai az eminentia mediana külső rétegében valamint a hypophysisben vannak /LINDVALL és BJÖRKLUND 1978/. A mesolimbikus és mesocorticalis rendszernek a sejttestjei a ventralis tegmentumban /area tegmentalis ventralis/ kisebb részben a substantia nigrában vannak, terminálisai a limbikus előagy régiókban /nucleus accumbens, tuberculum olfactorium, septum, amygdala/ és az agykéregben található. A dopaminerg idegvégződések a cortex mélyebb régióira korlátozódnak /LINDVALL és BJÖRKLUND 1978/.

1.4 DOPAMIN SZINTÉZIS

A dopamin a terminálisokban és a sejttestekben szintetizálódik tirozinból. Ez az aminosav átalakul 3,4-dihidroxi-fenilalaninná /DOPA/ tirozin-hidroxiláz enzim

által. A DOPA viszont dekarboxilálódhat dopaminná. Az újonnan szintetizált dopamin vagy raktározódik a szinaptikus vezikulákban vagy pedig akciós potenciál /vagy gyógyszer/ hatására felszabadul. A dopamin koncentrációja a szövetben a raktározott dopamint tükrözi vissza elsősorban. A dopamin ha kiszabadul a neuronból, átdiffundál a szinaptikus résen a posztzinaptikus membránon lévő dopamin receptorokhoz. A posztzinaptikus dopamin receptort jellemezhetjük in vitro a ^3H -DA membránhoz kötődés meghatározással. Ezen ligand specifikus kötésének relatív mennyisége párhuzamos a dopamin koncentrációval az agy különböző régióiban /CREESE és mtsai 1975/. A kiszabadult dopamin aktiválja a preszinaptikus receptorokat is a terminálisokon, de elsősorban a dendriteken. Ezen receptorok aktiválása gátolja a dopamin szintézist és csökkenti a dopamin felszabadulást. Ily módon a szinaptikus résben levő dopamin koncentráció modulálja saját felszabadulását. Ez a "short feedback loop" /rövid visszacsatolási kör/ kimutatható a mesolimbikus és nigrostriatális neuronok végződéseinél egyaránt /MOORE és KELLY 1978/.





3. ábra

A dopamin szinapszis sematikus rajza

- ATP adenzin-5-trifoszfát
 COMT katekol-O-metiltranszferáz
 DA dopamin
 DOPAC dihidroxi-fenil-ecetsav
 HVA homovanillinsav
 MAO monoamin-oxidáz
 3MT 3-metoxitiramin
 cAMP ciklusos adenzin-3', 5'-monofoszfát

1.5 DOPAMIN METABOLIZMUS

A DA a szinaptikus részből, így a preszinaptikus és posztzinaptikus receptorok régióiból aktiv ujrafelvétel mechanizmussal eltávozik, tehát a DA egy része visszajut a preszinaptikus idegvégződésekre. Ha a DA belép a szinaptikus vezikulákba, ezt követően vagy felszabadul vagy átalakul mitokondriális monoamin-oxidázzal /MAO/ dihidroxi-fenil-ecetsavvá /DOPAC/. A DA és/vagy a DOPAC o-metilálódik katekol-o-metiltranszferázzal /COMT/ úgy, hogy a DA végső metabolikus terméke az o-metilált deaminált származék, a homovanillinsav /HVA/.

A különféle drogok megváltoztatják a DA leadás folyamatát a transzmitter állandó koncentrációjának megváltoztatása nélkül. A DA tartalmú neuronok aktivitása nyomon követhető a DA anyagcsere sebesség mértékének meghatározásával.

Ez történhet /MOORE és KELLY 1978/:

- a./ DA koncentráció csökkenése mértékének meghatározásával α -metil-tirozin-nal / α -MT/ blokkolt szintézis után.
- b./ A DOPAC vagy HVA mennyiségének meghatározásával.
- c./ A radioaktív tirozin radioaktív DA-ná történő átalakulás mértékének meghatározásával.
- d./ A DOPA akkumuláció mérésével DOPA-dekarboxiláz gátlás után.

1.6 A PEPTIDEK SZEREPE

A legújabb vizsgálatok nagy jelentőséget tulajdonítanak az idegrendszerben a peptideknek a klasszikus transzmitterek mellett a kábitószer tolerancia és függőség folyamatában. Ilyen jellegzetes peptidek a neurohipofízis hormonok és azok származékai. Elsősorban azért, mert ezek befolyásolják a tanulást, a memóriát - és a tanulási folyamatnak egyesek nagy jelentőséget tulajdonítanak a kábitószerhozzászokásban /SIEGEL 1975, 1978/. Azonban, míg a természetesen előforduló vazopresszin, és oxitocin befolyásolják a tanulást és a memóriát /DE WIED és mtsai 1976, SCHULZ és mtsai 1976, KOVÁCS és mtsai 1978, KOVÁCS és TELEGDY 1982, TELEGDY és mtsai 1979a,b/, addig az oxitocin C-terminális fragmensének analógja a Z-Pro-D-Leu nincs hatással a tanulási funkcióra /WALTER és mtsai 1978/. Korábbi tanulmányok jelzik, hogy a neurohipofízis hormonok /oxitocin és vazopresszin/ befolyásolják a morfin toleranciát és dependenciát /KRIVOY és mtsai 1974, VAN REE és mtsa 1976, KOVÁCS és mtsai 1981, 1985b/. Az oxitocin aktív része ilyen tekintetben a molekula C-terminális részében van, a nonapeptid 7.-8. aminosava /Pro-Leu/. A Pro-Leu bár hatásos /KOVÁCS és mtsai 1985b/, de instabil. A szintetikus dipeptid Z-Pro-D-Leu, amely N-terminális részén



4. ábra

Az oxitocin /C₄₃H₆₆N₁₂O₁₂S₂/ szerkezeti képlete

védett Z-csoportot /N-benziloxikarbonil/ és az enzimatikusan stabilabb D-leucint tartalmaz, sokkal aktívabb vegyület a morfin dependencia mérséklésében /KOVÁCS és mtsai 1981, 1983a, 1984, 1985b, RITZMAN és mtsai 1980, WALTER és mtsai 1978/. A hatás további erősítése érdekében az oxitocin C-terminális részének analógjait és származékait állították elő és analizálták a morfin megvonásra azon nyilvánvaló teoretikus és klinikai fontossága miatt, hogy ezen származékok csökkentik a szomatikus függőséget /RITZMANN és mtsai 1980, WALTER és mtsai 1978/. A fő hangsúly egyrészt a leucin résznek a helyettesítésén volt más aminosavakkal, másrészt a leucin L-enantiomerjét megőrizték a molekulában és az L-prolint cserélték ki L-glutamáttal vagy L-piroglutamáttal. Az L-Gly-L-Pro és L-Leu-L-Gly hatását a morfin megvonásra szintén tanulmányozták. A dipeptideket N-benziloxikarbonil-csoporttal védték. Az utóbbi peptidek nemvédett formái olyan aminosav szekvenciákat tartalmaznak, amelyek normál körülmények között előfordulnak az endogén peptidekben /L-Glu-L-Leu; sertés intesztinális peptid, inzulin, paratiroid hormon, L-pGlu-L-Leu; neurotenzin, L-Gly-L-Leu; pankreász polipeptid, β -MSH/

1.7 CÉLKITÜZÉSEK

A fenti irodalmi bevezetés alapján érdemesnek látszott megvizsgálni az oxitocin és C-terminális fragmenteinek átalakításával nyert szintetikus analógok: Z-Pro-D-Leu, Z-L-pGlu-L-Leu, L-pGlu-L-Leu, Z-L-Gly-L-Pro hatását a morfin megvonásra, és elemezni a hatás közvetítéséért felelős idegi mechanizmusokat. Ezen belül is elsősorban a fenti neuropeptidek és az agyi dopaminerg neurotranszmisszió kölcsönhatásait tanulmányoztuk.

Megvizsgáltuk az oxitocin és a Z-Pro-D-Leu hatását az α -MPT-indukált DA eltűnésre, hogy teszteljük - a peptidek hatnak-e a dopaminerg rendszerre az agyban. Mértük a DA nyugalmi szintet és felhasználást akut és krónikus oxitocin kezelés után a nigrostriatális és mesolimbikus dopaminerg rendszerben. Valamint megnéztük mikromódszerrel a DA felhasználást Z-Pro-D-Leu kezelést követően azon egér agymagvakban amelyek tartalmazzák a fő dopaminerg /substantia nigra, area tegmentalis ventralis/ pályák sejttestjeit és axon terminálisait /pl. nucleus caudatus, nucleus accumbens/.

Megvizsgáltuk az oxitocin és a Z-Pro-D-Leu hatását a ^3H -DA felvételre és felszabadulásra in vitro. A szövetmintákat a mesolimbikus dopaminerg rendszer terminálisait tartalmazó nucleus accumbens, valamint a nigro-

striatális dopaminerg rendszer terminálisait tartalmazó nucleus caudatus kimetszésével nyertük.

Mivel számos irodalmi adat utal arra, hogy a morfin akut és krónikus alkalmazása, valamint a dependens állatnál a morfin naloxonnal történő megvonása megváltoztatja a neurotranszmitterek és azok metabolitjainak szintjét az agéragyban, így laboratóriumunkban HVA-szint méréssel próbáltunk következtetést levonni a morfinnak a neurotransmisszióra gyakorolt hatására vonatkozólag. Megvizsgáltuk az akut morfin kezelés, morfin tolerancia és megvonás hatását a DA egyik fő metabolitja, a HVA szintjére egér különböző agyterületeiben: nucleus caudatusban, hypothalamusban és agytörzsben /pons + medulla/. Továbbá elemeztük a fenti négy dipeptid hatását a HVA-szintre morfin-naiv egerek illetve tabletta implantálásal toleránssá tett egerek nucleus caudatusában, hypothalamusában és agytörzsében /pons + medulla/ a megvonás során. Kísérleteinkben mértük a sztereotip ugrások latenciáját is a különböző dipeptiddel kezelt dependens egereknél. Vizsgáltuk hogyan befolyásolja a morfin a HVA-szintet az agéragy különböző agyterületeiben, valamint a morfin-megvonás mérséklésében fontos szerepet játszó Z-Pro-D-Leu illetve ennek származékai önmagukban hatással vannak-e a HVA-szintre.

2. MÓDSZEREK

2.1 KISÉRLETI ÁLLATOK

CPLP törzsből származó him egereket /25-35g/ használtunk. Az egereket standard körülmények között /12 óra sötét, 12 óra világos/ tartottuk, vízzel és táppal tetszés szerint elláttuk. Az állatokat tizesével helyeztük el.

2.2 BIOLÓGIAI MÓDSZEREK /MORFIN MEGVONÁS VIZSGÁLATA/

A morfin toleranciát/függőséget morfint tartalmazó tabletta /morfin-hidroklorid 37,5 mg, polivinil-klorid 75 mg, kalcium-sztearát 1,5 mg/ bőr alá ültetésével váltottuk ki, /a tabletta átmérője 6mm volt és a keménysége 14 ± 1 Strong-Cobb egység/. Az állatokat étergőzzel elaltattuk, majd az egerek háti oldalán a nyak tájékán a bőrt átvágtuk és csipesz segítségével a tablettát a bőr alá csúszattuk. Ezt követően a bőrt összevarrtuk. A megvonási tüneteket a tabletta implantálását követő 3. napon idéztük elő naloxon kezeléssel /1,0 mg naloxon/kg testsúly szubkután/. Az egereket 35cm átmérőjű, 70cm magas kör alakú állványra helyeztük és mértük a sztereotip ugrási latenciát. Maximum 900 másodpercig vizsgáltuk az állatokat. Az egereket a megvonási tünetek kiváltását



5. ábra

Morfin-megvonást követő sztereotip ugrás

Morfin toleráns/dependens állatokban naloxon kezelés megvonási tüneteket vált ki. Egerekben a legjellemzőbb tünetek egyike a sztereotip ugrások megjelenése. A kísérleti állat 70 cm magas állványról extenziós tartásban messze elugrik.

követő 30. percben dekapitáltuk a biokémiai vizsgálathoz. A morfin-függő egerek másik csoportja a 3. napon 0,1 ml/10 g testsúly mennyiségű fiziológiás sóoldatot kapott szubkután /toleráns/függő csoport megvonás előtt/. A kontroll állatok bőre alá placebo tablettát /polivinil-klorid/ ültettünk és a 3. napon ezek is fiziológiás sóoldatot kaptak szubkután /0,1 ml fiz. só/10 g testsúly/. Az injekció beadása után 30 perccel dekapitáltuk a kontroll egereket.

2.3 ÁLLATOK LEÖLÉSE, MINTAVÉTEL

A biokémiai vizsgálatokhoz a kísérleti állatokat dekapitáltuk, agyukat azonnal eltávolítottuk és mélyfagyasztottuk. Az egyes agyterületeket a szövethatárok betartásával a korábban közölt módszerek szerint metsettük ki /BAUMGARTEN és mtsai 1971/.

2.4 KÉMIAI MÓDSZEREK

2.4.1 A dopamin tartalom spektrofлуorimetrikus mérése /makromódszer/

A nucleus accumbens, a nucleus caudatus és az agytörzset /pons+medulla/ kimetszettük és a DA szintet spektrofлуorimetrián JACOBOWITZ és RICHARDSON /1978/

szerint SZABÓ és mtsai /1983/ módosítása alapján határoztuk meg. A transzmitter szintet nmol transzmitter/g nedves szövet fejeztük ki.

2.4.2 Dopamin felhasználás radioenzimatikus mérése egér agymagvakban /mikromódszer/

Az agyakat kriosztátban -10°C -on $300\text{ }\mu\text{m}$ részekre szellettük fel. Az agymagvakat sztereomikroszkóp alatt metszettük ki tüvel PALKOVITS /1973/ módszere szerint, amit eredetileg patkány agymagvakra írt le. Az egér agytörzs és a mesencephalikus magvak lokalizációjára, KOVÁCS és DENK /1968/ sztereotaxikus térképét használtuk. A magok kivételének részleteit illetően utalunk eredeti közleményünkre /KOVÁCS és mtsai 1983a/.

A szövetmintákat $50\text{ }\mu\text{l}$ $0,1\text{ N HClO}_4$ -ben homogenizáltuk. A homogenátum $20\text{ }\mu\text{l}$ -es mintáját kivettük a protein tartalom meghatározására, amely LOWRY és mtsai /1951/ módszere alapján történt. A maradék homogenátumot homogenizációs csövekben centrifugáltuk /15 perc, 6000 g , $+4^{\circ}\text{C}$ /. A NA-t és a DA-t a felüluszó $20\text{ }\mu\text{l}$ -es mintáiból határoztuk meg VAN DER GUGTEN és mtsai /1976/ radioenzimatikus mikromódszerének megfelelően. A meghatározáshoz patkánymáj katekol-O-metiltranszferázt saját magunk készítettünk CUELLO és mtsai /1973/ módszere szerint. Metil-donorként S-adenozil-metil/ ^3H -metionint fajl. aktivitás: 555 GBq/mmol , /AMERSHAM Anglia/ használtunk. A két katekolamint vékony-

réteg-kromatográfiával választottuk szét egymástól MARTIN és mtsai /1978/ módszere alapján.

Az adatokat fmol katekolamin/ μ g protein $\pm$ S.E. egységekben számoltuk ki.

2.4.3 Homovanillinsav /HVA/ meghatározás

A HVA meghatározást WESTERINK és KORF /1975b/ módszere alapján végeztük el, a módosításokat az 1. táblázat tartalmazza.

A szövetmintákat $+4^{\circ}\text{C}$ -on homogenizáltuk 2 ml 10 mM HCl-val savanyított butanolban. Ezután harminc másodpercig vortexeltük, majd húsz percig centrifugáltuk 4000 RPM-es fordulatonál. A centrifugálást követően 1,6 ml felüluszót adtunk 1 ml 0,01 N HCl-hoz és 3 ml desztillált heptánhoz. A belső standard-sorhoz 0,5 μ g valamint 1 μ g HVA-t adtunk 100 μ l illetve 200 μ l 0,01 N HCl-ban oldva. Az aminosavat harminc másodpercig tartó rázással nyertük ki, majd a csöveket tíz percig 3000 RPM-es fordulattal centrifugáltuk. A szerves fázis 3 ml mintáját, amely tartalmazza a savas metabolitokat /5-HIAA, HVA/, 4 ml 10 mM TRIS-HCl pH:7-es pufferhez adtuk, és a HVA-t extraháltuk a TRIS-HCl pufferbe harminc másodperces vortex-szel. A csövek centrifugálása után, amely húsz percig tartott 3000 RPM-es fordulatonál, a HVA-t tartalmazó vizes fázis 2,6 ml-ét óvatosan a szerves fázison keresztül leszívtuk.

HVA MEGHATÁROZÁS

szövetminta

homogenizálás hidegen

2 ml savanyú butanolban

1 perc vortex

Cf. 4000 ford./20 perc

1,6 ml felülúszó

+ 1 ml 0,01 N HCl

/belső standard bevitele/

+ 3 ml n-heptán

1 perc vortex

Cf. 3000 ford./10 perc

3 ml aliquot

+ 4 ml 10 mM TRIS-HCl puffer pH:7

1 perc vortex

Cf. 3000 ford./20 perc

2,6 ml vizes fázis /HVA/

+ 0,3 ml 7 N NH_4OH

vortex

+ 30 μl 1 % $\text{K}_3/\text{Fe}/\text{CN}/6/$

vortex

+ 60 μl 1 % cisztein

vortex

1 óra múlva mérés 310/420 nm-en

1. táblázat

A HVA fluorimetrikus analizise ANDEN és mtsai /1963/ eljárásával történt. A minták pH-ját először növeltük 0,3 ml 7 N NH_4OH hozzáadásával, majd a vortexelés után 30 μl 1 %-os $\text{K}_3/\text{Fe}/\text{CN}/_6/-$ -ot adtunk hozzá, hogy oxidáljuk a HVA-t. Vortexelés után 60 μl 1 %-os ciszteint adtunk hozzá, hogy az oxidációt leállítsuk. A reagens-sort 0,5 μg illetve 1,0 μg HVA bemérésével készítettük. A vak-sorozat a $\text{K}_3/\text{Fe}/\text{CN}/_6/$ és a cisztein fordított sorrendben történő adásával készült. A fluoreszcenciát 310 gerjesztő/420 nm analizáló hullámhossznál olvastuk le HITACHI-204 spektrofluorimeteren.

2.4.4 Radioaktív transzmitter felvétel agyszövet szeleteken

A ^3H -DA felvétel vizsgálatát BITAN és HERSHKOWITZ /1977/ módszere alapján végeztük el egér agyszövet szeleteken. Dekapitálás után az agyakat azonnal eltávolítottuk és az agyterületeket kimetszettük /nucleus accumbens, nucleus caudatus/. A szövetdarabokat lemértük, majd egyenletesen felszeleteltük. Ezeket az előre elkészített, jégen tartott inkubáló edényekbe helyeztük. Az inkubáló edény tartalma:

- 2 ml Krebs-Henseleit oldat /4,2 mM K^+ / pH:7,2

/Összetétele: 500 ml 0,9 % NaCl

20 ml 1,15 % KCl

15 ml 0,81 % CaCl_2

5 ml 3,8 % $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

5 ml 2,11 % KH_2PO_4

+ 1,365 g NaHCO_3 / 105 ml desztillált víz

1,3 g glükóz

0,325 g Na_2EDTA

0,13 g aszkorbinsav /

- 5 μl iproniazid / 8 mg/ml /

- A tesztelendő anyagból a megfelelő mennyiség / 5-10 μl /

A szövetet 36°C -on tíz percig előinkubáltuk. A "hideg" kontroll csöveket jégen tartottuk. A felvételt 5×10^{-8} M ^3H -DA fajlagos aktivitás: 358,9 GBq mmol / AMERSHAM, Anglia / hozzáadásával indítottuk. Az inkubáló elegyet ötperces inkubálás után lehűtött homogenizáló csövekbe öntöttük, s az edényt 5 ml 0°C -os Krebs-Henseleit oldattal / KRBG-oldat / utánaöblítettük és azonnal vortexeltük. Ezután $+4^\circ\text{C}$ -on 3000 RPM fordulatszámmal három percig centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük, s 5 ml 0°C -os KRBG oldattal utánaöblítettük majd öt másodpercig vortexeltük. Ujra centrifugáltuk $+4^\circ\text{C}$ -on, 3000 RPM fordulatszámmal három percig majd egy újabb mosás - vortexelés következett tíz másodpercig, utána tíz percig centrifugáltuk $+4^\circ\text{C}$ -on, 3000 RPM-es fordulatszámmal. Így nyertük a végső üledéket.

A felülúszó leöntése és leitatása után 0,5 ml abszolút alkoholban homogenizáltuk a szövetet. Ezt követően centrifugáltuk tíz percig $+4^\circ\text{C}$ -on 3000 RPM-es fordulat-

számmal. A felülúszóból 200 μ l-t izotóp mérőedénybe mértünk, majd 5 ml szcintillációs oldatot adtunk hozzá /PPO:5,0 g, POPOP:0,25 g ad 1000 ml toluol/ és tíz másodpercig vortexeltük. Ezután $+4^{\circ}\text{C}$ -ra lehűtöttük, majd a minta radioaktivitását lemértük. Az eredményeket DPM/100 mg agyszövet mértékegységben adtuk meg.

2.4.5 Radioaktív transzmitter felszabadulás agyszövet szeleteken

A ^3H -DA felszabadulást EITAN és HERSHKOWITZ /1977/ módszere alapján vizsgáltuk. Dekapitálás után az agyat azonnal eltávolítottuk és az agyterületeket kimetszettük. A szövetet előre elkészített, jégen tartott előzőleg szilikonozott centrifugacsövekbe helyeztük.

A centrifugacső tartalma:

- 2 ml EDTA-mentes Krebs-Henseleit oldat
/4,2 mM K^+ / pH:7,2

Összetétele: 750 ml 0,9 % NaCl

30 ml 1,15 % KCl

22,5 ml 0,81 % CaCl_2

7,5 ml 3,8 % $\text{MgSO}_4 \cdot \text{xH}_2\text{O}$

7,5 ml 2,11 % KH_2PO_4

+ 2,04 g NaHCO_3 /157,5 ml desztillált víz

+ 1,95 g glükóz

0,195 g aszkorbinsav /

- 5 μ l iproniazid /8 mg/ml/

A szövetet 36°C -on tíz percig előinkubáltuk. A szövet telítését $5 \times 10^{-8} \text{ M } ^3\text{H-DA}$ fajlagos aktivitás $358,9 \text{ GBq mmol}$, /AMERSHAM, Anglia/ hozzáadásával végeztük. Ezt követően tíz percig inkubáltuk, majd a csövekbe $5 \text{ ml } 0^{\circ}\text{C}$ -os EDTA-mentes KRBG oldatot mértünk, s az elegyet három percig $+4^{\circ}\text{C}$ -on 3000 RPM -es fordulatszámmal centrifugáltuk. Ezután a felülúszót leöntöttük, majd a szövetet háromszor $5\text{-}5 \text{ ml } +4^{\circ}\text{C}$ -os EDTA-mentes KRBG oldattal mostuk. A vortexelés öt másodpercig történt, a centrifugálás pedig az előzőekben leírtak szerint. A felülúszót ismét leöntöttük, a csövekbe $5 \text{ ml } 4^{\circ}\text{C}$ -os EDTA-mentes KRBG oldatot mértünk, s a szövetet 36°C -on húsz percig inkubáltuk a be nem épült izotóp eltávolítására. A centrifugálás tíz percig tartott $+4^{\circ}\text{C}$ -on 3000 RPM -es fordulatszámmal, majd a felülúszót leöntöttük, s a szövetet leitatattuk. Ezután 3 ml EDTA-mentes KRBG oldatot adtunk hozzá, amely tartalmazta a vizsgálandó anyagot, majd harminc percig inkubáltuk 36°C -on. Ezt követően tíz percig centrifugáltuk $+4^{\circ}\text{C}$ -on 3000 RPM -es fordulatszámmal. A felülúszót leöntöttük, s a közeg radioaktivitásának meghatározására félretettük /tárolás $+4^{\circ}\text{C}$ -on/. Az így nyert üledéket $3 \times 5 \text{ ml}$ EDTA-mentes KRBG oldattal vékonyabb centrifugacsőbe átmostuk, öt másodpercig vortexeltük és centrifugáltuk /tíz perc, 3000 RPM -es fordulatszám/. Ezután a felül-

úszót leöntöttük, a szövetet leitatattuk, majd 0,5 ml abszolút alkoholban homogenizáltuk. A tízperces centrifugálás után a felülúszóból illetve a homogenizált szövetmintából 150 µl-t izotopmérőedénybe mértünk, majd 5 ml szcintillációs oldatot adtunk hozzá.

/ Összetétele: naftalin 60,0 g

2,5-difenil-oxazol /PPO/ 5,0 g

1,4-di-/2-/5-fenil/-oxazoil/-benzol /POPOP/ 0,25 g

abszolút metanol 100 ml

etilénglikol 20 ml

ad 1000 ml dioxán /

Ezután tíz másodpercig vortexeltük, majd +4°C-on történt lehűtés után a radioaktivitást lemértük. Az eredményeket DPM felülúszó/DPM szövet hányadossal fejeztük ki.

2.5 KEZELÉSEK

2.5.1 Akut oxitocin kezelés

A kísérleti állatok oxitocint /0,002 mg/kg; 0,2 mg/kg/ kaptak szubkután 0,2 ml 6 % alkoholt tartalmazó élettani konyhasó-oldatban oldva. A kontroll állatokat az oldószerrel kezeltük. Az egereket az injekció beadása után 60 perccel dekapitáltuk a DA tartalom meghatározás és a ³H-DA felvétel vizsgálatánál, illetve három órával az α-MPT kezelés esetén.

2.5.2 Krónikus oxitocin kezelés

A kísérleti egerek az oxitocint az előzőekben leírt dózisban 8 napon keresztül kapták szubkután. A kontroll állatok az oldószert kapták. Az egereket a 8. napon az utolsó injekciót követő 60. percben dekapitáltuk.

2.5.3 Dipeptid kezelés

A kísérleti állatokat a következő dipeptidekkel kezeltük:

Z-Pro-D-Leu

Z-L-Gly-L-Pro

Z-L-pGlu-L-Leu

L-pGlu-L-Leu

Az egerek a 0. percben 0,2 ml dipeptidet kaptak 2 mg/kg koncentrációban szubkután. A kontroll állatok az oldószert kapták szubkután. Az egereket a kezelés után két órával dekapitáltuk.

2.5.4 Morfin tolerancia/függőség, megvonás és dipeptid kölcsönhatás

A morfint tartalmazó tabletták implantálása előtt két órával és a vizsgálat 2. és 3. napján a kísérleti állatok 2 mg/kg peptidet kaptak szubkután. A morfin tabletták beültetése az előzőekben leírt módon történt. A 3. napon a kezelés után két órával 1 mg/kg naloxont kaptak szub-

kután, majd a sztereotip ugrási latencia mérése következett. Az egereket a naloxon befecskendezését követő 30. percben dekapitáltuk.

A Z-L-pGlu-L-Leu és Z-L-Gly-L-Pro dipeptidokkal a fenti kísérletet elvégeztük 4 mg/kg illetve a Z-L-pGlu-L-Leu dipeptiddel 8 mg/kg mennyiséggel is.

A dekapitált állatok agyából kimetszettük a nucleus caudatus, a hypothalamust és az agytörzset /pons+medulla/. Három állat agyából származó agyterületeket összegyűjtöttünk és súlyát lemértük. A kémiai feldolgozásig fagyasztva tároltuk.

2.5.5 Dopamin felhasználás vizsgálata α -metil-p-tirozin kezelés/

α -metil-p-tirozin-metil-észter HCl / α -MPT, Sigma, 250 mg/kg/ intraperitoneális injekcióját követte harminc perccel később 2 mg/kg Z-Pro-D-Leu vagy 0,002 mg/kg és 0,2 mg/kg oxitocin. A szubkután peptid-kezelés után 3 órával, azaz 3,5 órával az α -MPT /tirozin-hidroxiláz gátló/ beadása után az egereket dekapitáltuk. A agyakat gyorsan kivettük a koponyából és a feldolgozásig mélyhűtőben illetve száraz jégen lefagyasztottuk.

2.6 STATISZTIKAI MÓDSZEREK

Eredményeink statisztikai értékelésére a Student-féle kétmintás t-próbát valamint variancia analízist használtunk. Szignifikánsnak az 5 %-nál kisebb valószínűségi értéket fogadtuk el / $P < 0,05$ /.

3. EREDMÉNYEK

Az akut és krónikus oxitocin kezelés hatását a DA nyugalmi szintre és felhasználásra egéragyban a 2. táblázatban összegeztük. Az oxitocin /0,002 mg/kg és 0,2 mg/kg/ akut in vivo alkalmazása nem változtatta meg a DA nyugalmi szintjét a nucleus accumbensben. α -MPT /250 mg/kg/ szignifikánsan csökkentette a nucleus accumbens DA-tartalmát / $P < 0,001$ /. Az α -MPT kezelt állatokban az oxitocin /0,002 mg/kg illetve 0,2 mg/kg/ akut adása nem befolyásolta a nucleus accumbensben a DA felhasználást.

Az oxitocin krónikus adása a vizsgált koncentrációkban nem befolyásolta a nucleus accumbens DA nyugalmi szintjét a kontrollhoz viszonyítva. A krónikusan adott oxitocin /0,2 mg/kg/ szignifikánsan / $P < 0,001$ / gátolta az α -MPT indukált DA csökkenést a nucleus accumbensben, míg a kisebb /0,002 mg/kg/ oxitocin dózis hatástalan volt. Az oxitocin /0,002 mg/kg/ akut in vivo injekciója jelentősen emelte / $P < 0,05$ / a nucleus caudatus DA nyugalmi szintjét, míg 0,2 mg/kg oxitocin változatlanul hagyta a DA tartalmát a kontrollhoz viszonyítva. α -MPT /250 mg/kg/ szignifikánsan csökkentette a nucleus caudatus DA tartalmát is / $P < 0,001$ /. Az α -MPT-kezelt egerekben az oxitocin akut adása 0,2 mg/kg/ szignifikánsan / $P < 0,001$ / gátolta az α -MPT indukált DA eltűnést, míg az oxitocin

2. táblázat

Akut és krónikus oxitocin kezelés hatása a DA nyugalmi szintre és felhasználásra egéragyban

	KONTROLL	No	0,002 mg/kg	O X I T O C I N No	0,2 mg/kg	No
N U C L E U S A C C U M B E N S						
Akut kezelés- nyugalmi szint	28,54 $\pm$ 1,18 [±]	/10/	29,78 $\pm$ 1,96	/11/	24,16 $\pm$ 1,63	/11/
Akut kezelés- X-MPT	9,99 $\pm$ 0,72	/19/	9,27 $\pm$ 0,78	/20/	9,86 $\pm$ 0,78	/7/
Krónikus kezelés- nyugalmi szint	27,03 $\pm$ 1,24	/37/	24,94 $\pm$ 0,98	/7/	25,21 $\pm$ 1,50	/28/
Krónikus kezelés- X-MPT	9,80 $\pm$ 0,33	/30/	9,73 $\pm$ 0,46	/16/	12,67 $\pm$ 0,72 ⁺⁺⁺	/23/
N U C L E U S C A U D A T U S						
Akut kezelés- nyugalmi szint	39,05 $\pm$ 2,29	/8/	52,28 $\pm$ 5,09 ⁺	/10/	43,03 $\pm$ 4,38	/11/
Akut kezelés- X-MPT	13,79 $\pm$ 0,72	/30/	11,56 $\pm$ 0,98	/20/	19,98 $\pm$ 1,31 ⁺⁺⁺	/15/
Krónikus kezelés- nyugalmi szint	40,35 $\pm$ 1,70	/28/	49,63 $\pm$ 1,96	/8/	32,26 $\pm$ 1,31	/21/
Krónikus kezelés- X-MPT	17,30 $\pm$ 0,59	/16/	20,50 $\pm$ 0,65 ⁺⁺	/16/	22,92 $\pm$ 0,16 ⁺⁺⁺	/8/

+ P < 0,05 ++ P < 0,01 +++ P < 0,001

A zárójelben lévő számok a minták számát jelentik

* átlag $\pm$ S.E. /nmol/g nedves szövet/

kisebb dózisának /0,002 mg/kg/ nincs hatása.

Az oxitocin krónikus adása a vizsgált két koncentrációban nem befolyásolta a nucleus caudatus DA nyugalmi szintjét sem a kontroll csoporthoz viszonyítva. A nucleus caudatusban az oxitocin /0,002 mg/kg/ $/P < 0,01/$ és /0,2 mg/kg/ $/P < 0,001/$ dózisának krónikus adása is jelentősen megakadályozta az α -MPT indukált DA tartalom csökkenést, tehát a DA felhasználás szignifikánsan csökkent.

A Z-Pro-D-Leu hatását a DA felhasználásra a 3. táblázatban összegeztük. Az α -MPT injekció szignifikánsan lecsökkentette mind az agytörzs $/P < 0,05/$, mind a nucleus caudatus $/P < 0,001/$ DA tartalmát. Az α -MPT-kezelt kontrollhoz viszonyítva a Z-Pro-D-Leu kezelés /2 mg/kg/ nem befolyásolta a DA eltűnést az agytörzsben, míg a dipeptid szignifikánsan $/P < 0,05/$ gátolta az α -MPT indukált csökkenést a nucleus caudatus DA tartalmában.

A 4. táblázatban vizsgáltuk a változások komplexebb mintáját a dopamin felhasználás analizálásával a specifikus agymagvakban. A DA endogén szintje szignifikánsan csökkent az összes agyrégióban α -MPT adását követően $/P < 0,001/$. A Z-Pro-D-Leu /2 mg/kg/ gátolta $/P < 0,05/$ az α -MPT indukált csökkenést a nucleus caudatus DA tartalmában. Másrészt a nucleus accumbensben a dipeptid fokozta a DA eltűnést $/P < 0,05/$. A DA eltűnést az agytörzsben /nucleus tractus solitarius, locus coeruleus/ vagy a mesencephalikus /nucleus raphe dorsalis, substantia nigra,



3. táblázat

Z-Pro-D-Leu hatása a DA felhasználásra egéragyban

	KEZELÉSEK	DA /nmol/g nedves szövet/	No	SZIGNIFIKANCIA
AGYTÖRZS	Kontroll	47,02 $\pm$ 3,27	/6/	-
	α -MPT	27,34 $\pm$ 6,02	/9/	0,05
	α -MPT+Z-Pro-D-Leu	31,65 $\pm$ 6,02	/10/	N.S.
NUCLEUS CAUDATUS	Kontroll	318,04 $\pm$ 20,93	/6/	-
	α -MPT	178,22 $\pm$ 7,26	/10/	0,001
	α -MPT+Z-Pro-D-Leu	216,74 $\pm$ 14,13	/9/	0,05

/Jelöléseket lásd 2. táblázatban/

4. Táblázat

Z-Pro-D-Leu hatása a DA felhasználásra egér agymagvakban

	KONTROLL	No	∠-MPT	No	∠-MPT+Z-Pro-D-Leu	No	FELHASZ- NÁLÁS	SZIGNI- FIKANCIA
Nucl. tractus solitarius	20,05 $\pm$ 4,38	/6/	11,10 $\pm$ 1,31	/10/	7,97 $\pm$ 1,18	/13/	140 %	N.S.
Locus coeruleus	16,52 $\pm$ 3,40	/7/	8,29 $\pm$ 1,44	/12/	5,09 $\pm$ 1,24	/12/	163 %	N.S.
Nucl. raphe dorsalis	18,41 $\pm$ 1,96	/6/	7,64 $\pm$ 1,31	/13/	6,86 $\pm$ 1,24	/12/	111 %	N.S.
Substantia nigra	54,39 $\pm$ 12,67	/7/	16,72 $\pm$ 3,33	/16/	14,76 $\pm$ 1,96	/16/	113 %	N.S.
Area tegmental. ventr.	40,94 $\pm$ 11,49	/6/	17,83 $\pm$ 2,55	/14/	17,50 $\pm$ 2,94	/16/	102 %	N.S.
Nucleus caudatus	420,14 $\pm$ 79,47	/6/	237,56 $\pm$ 24,94	/13/	334,53 $\pm$ 24,88	/14/	71 %	0,05
Nucleus accumbens	397,48 $\pm$ 69,74	/6/	242,33 $\pm$ 17,96	/16/	130,73 $\pm$ 22,14	/15/	160 %	0,05

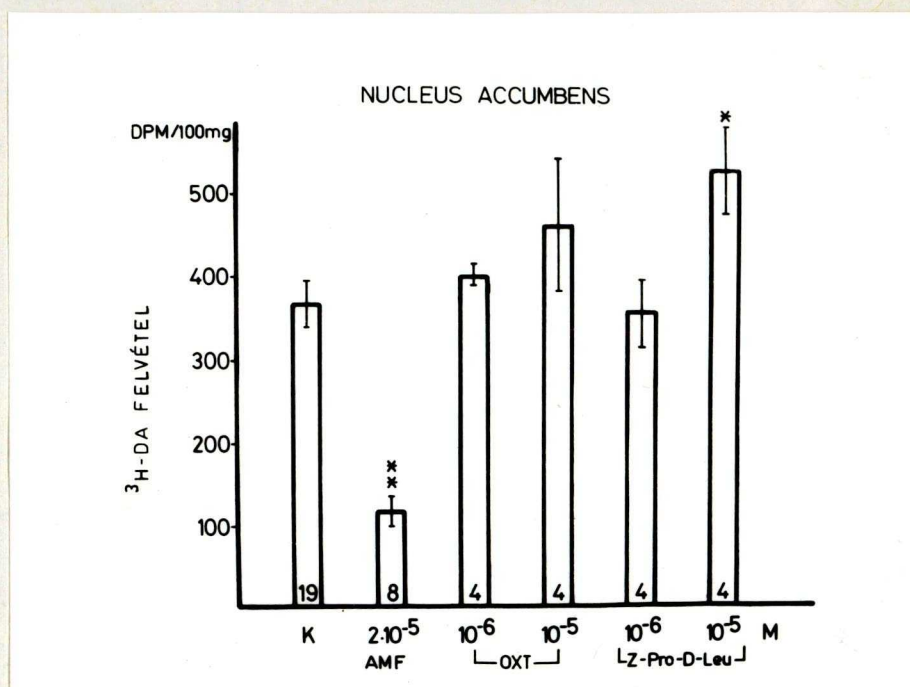
/Jelöléseket lásd 2. táblázatban/

area tegmentalis ventralis/ magvakban nem befolyásolta a Z-Pro-D-Leu kezelés.

In vitro oxitocin és Z-Pro-D-Leu hatását a ^3H -DA felvételre nucleus accumbensben a 6. ábra mutatja. Az amfetamin 2×10^{-5} M koncentrációja jelentősen $/P < 0,01/$ lecsökkentette a ^3H -DA felvételt. Az oxitocin 10^{-6} M és 10^{-5} M koncentrációban nem befolyásolta a ^3H -DA felvételt. Míg a Z-Pro-D-Leu 10^{-6} M koncentrációja nincs hatással a felvételre, addig 10^{-5} M Z-Pro-D-Leu szignifikánsan $/P < 0,05/$ fokozta a ^3H -DA felvételt.

A nucleus caudatusban /7. ábra/ 2×10^{-5} M amfetamin szignifikánsan $/P < 0,001/$ lecsökkentette a ^3H -DA felvételt a kontrollhoz viszonyítva. In vitro 10^{-6} M és 10^{-5} M oxitocin nem befolyásolta a ^3H -DA felvételt. A Z-Pro-D-Leu 10^{-6} M koncentrációja szintén hatástalan, míg 10^{-5} M Z-Pro-D-Leu jelentősen $/P < 0,05/$ fokozta a ^3H -DA felvételt.

In vitro oxitocin és Z-Pro-D-Leu hatását a ^3H -DA felszabadulásra a nucleus accumbensben a 8. ábra mutatja. Az amfetamin 2×10^{-5} M koncentrációja jelentősen $/P < 0,05/$ fokozta a ^3H -DA felszabadulást, míg az oxitocin 10^{-6} M és 10^{-5} M dózisa nem volt hatásos. In vitro 10^{-6} M oxitocin szignifikánsan $/P < 0,05/$ fokozta a ^3H -DA felszabadulást a nucleus accumbensben, míg 10^{-5} M koncentrációban a Z-Pro-D-Leu hatástalannak bizonyult.



6. ábra

Oxitocin és Z-Pro-D-Leu hatása a ³H-DA felvételre
nucleus accumbensben in vitro

K: kontroll

AMF: amfetamin

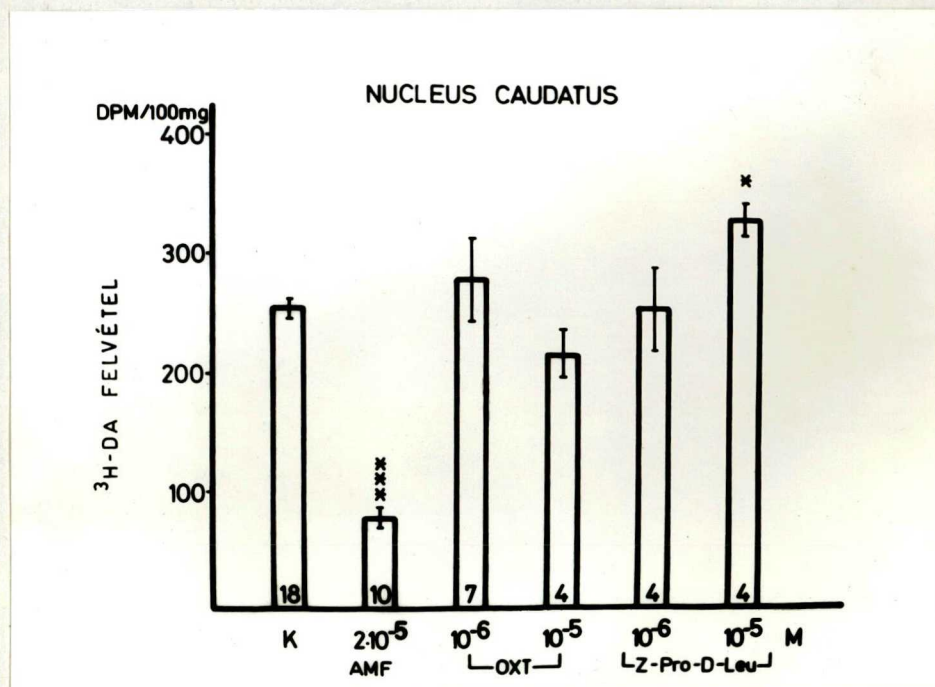
OXT: oxitocin

Az oszlopokban lévő számok a minták számát jelentik.

* P < 0,05

** P < 0,01

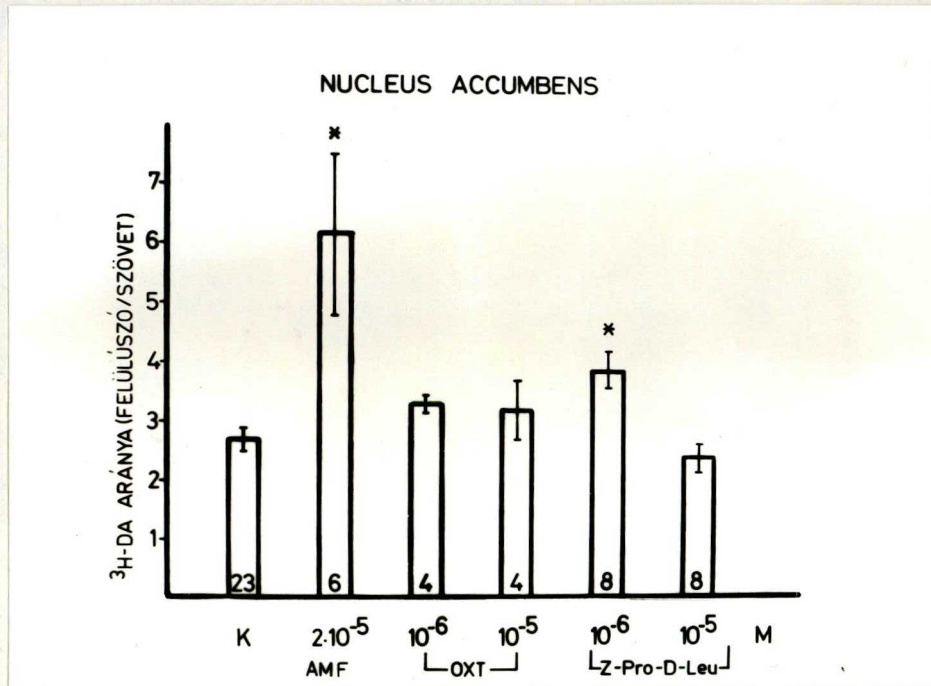
*** P < 0,001



7. ábra

Oxitocin és Z-Pro-D-Leu hatása a ³H-DA felvételre
nucleus caudatusban in vitro

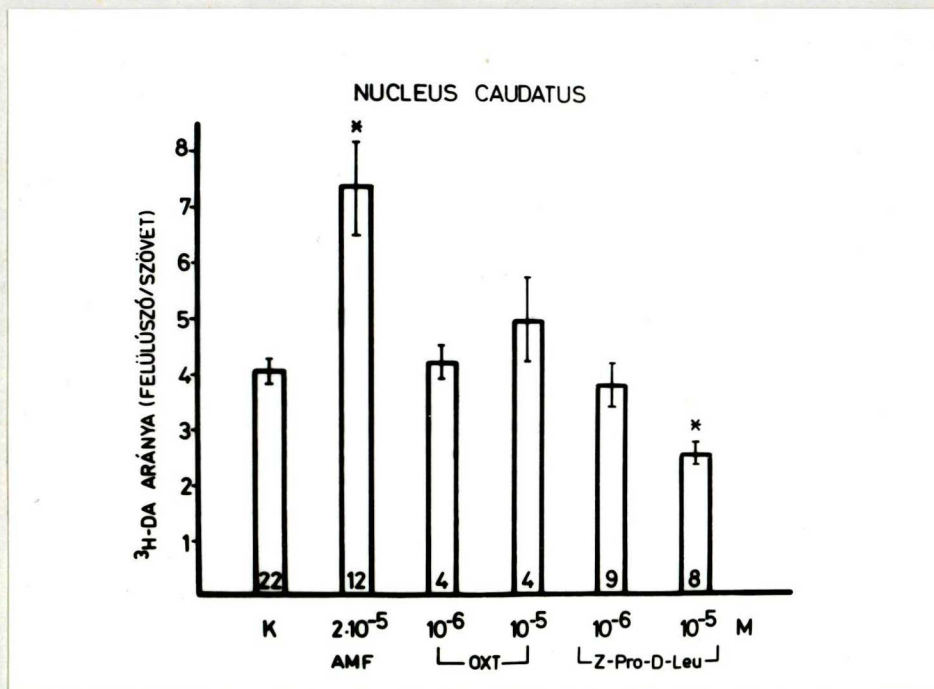
/Jelölést lásd 6. ábra/



8. ábra

Oxitocin és Z-Pro-D-Leu hatása a $^3\text{H-DA}$ felszabadulásra
nucleus accumbensben in vitro

/Jelölést lásd 6. ábra/



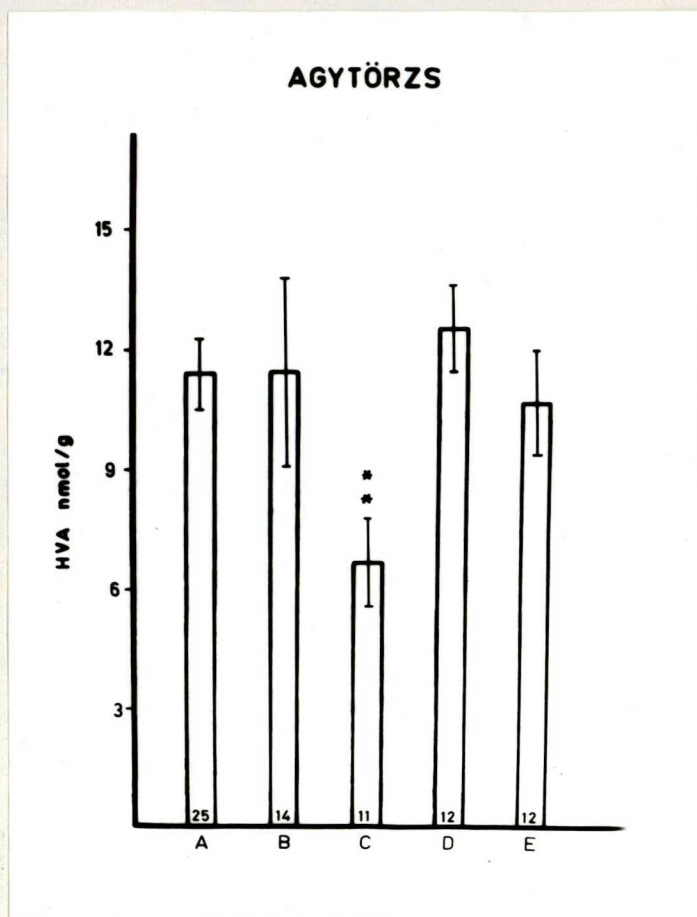
9. ábra

Oxitocin és Z-Pro-D-Leu hatása a $^3\text{H-DA}$ felszabadulásra
nucleus caudatusban in vitro

/Jelölést lásd 6. ábra/

A nucleus caudatusban /9. ábra/ 2×10^{-5} M amfetamin szintén jelentősen $/P < 0,05/$ fokozta a $^3\text{H-DA}$ felszabadulást. Az oxitocin a vizsgált két koncentrációban nem befolyásolta a $^3\text{H-DA}$ felszabadulást. Míg a 10^{-6} M Z-Pro-D-Leu nem változtatta meg jelentősen a $^3\text{H-DA}$ felszabadulást a nucleus caudatusban, addig in vitro 10^{-5} M Z-Pro-D-Leu szignifikánsan $/P < 0,05/$ lecsökkentette ezen agyterületben.

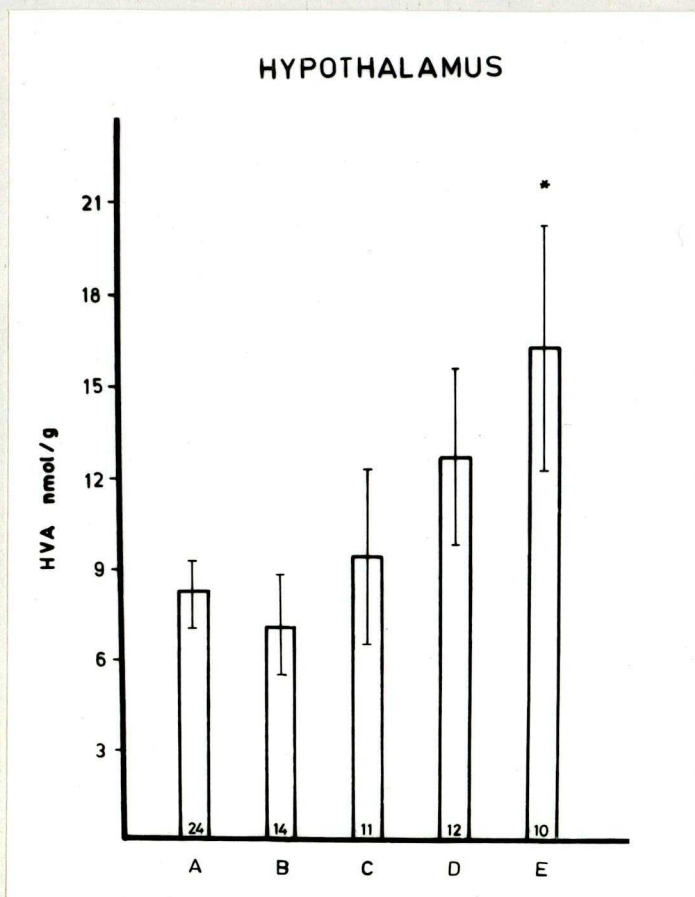
Megvizsgáltuk a Z-Pro-D-Leu, Z-L-pGlu-L-Leu, L-pGlu-L-Leu, Z-L-Gly-L-Pro /2 mg/kg/ kezelések hatására bekövetkező HVA-tartalom változást az egér agytörzsében, hypothalamusában és nucleus caudatusában. Kísérleteink alapján a Z-L-pGlu-L-Leu a kontroll állatokhoz viszonyítva szignifikánsan $/P < 0,01/$ csökkentette a HVA-szintet az agytörzsben /10. ábra/. A Z-Pro-D-Leu, L-pGlu-L-Leu és Z-L-Gly-L-Pro nem befolyásolta a HVA tartalmat a kontrollhoz viszonyítva. A Z-L-Gly-L-Pro viszont a hypothalamus HVA-tartalmát jelentősen növelte $/P < 0,02/$, míg a további három dipeptid hatástalannak bizonyult ezen agyterületben /11. ábra/. A nucleus caudatusban egyik dipeptid sem okozott szignifikánsan változást a kontroll csoporthoz viszonyítva /12. ábra/.



10. ábra

Dipeptidek hatása az agytörzs HVA-tartalmára

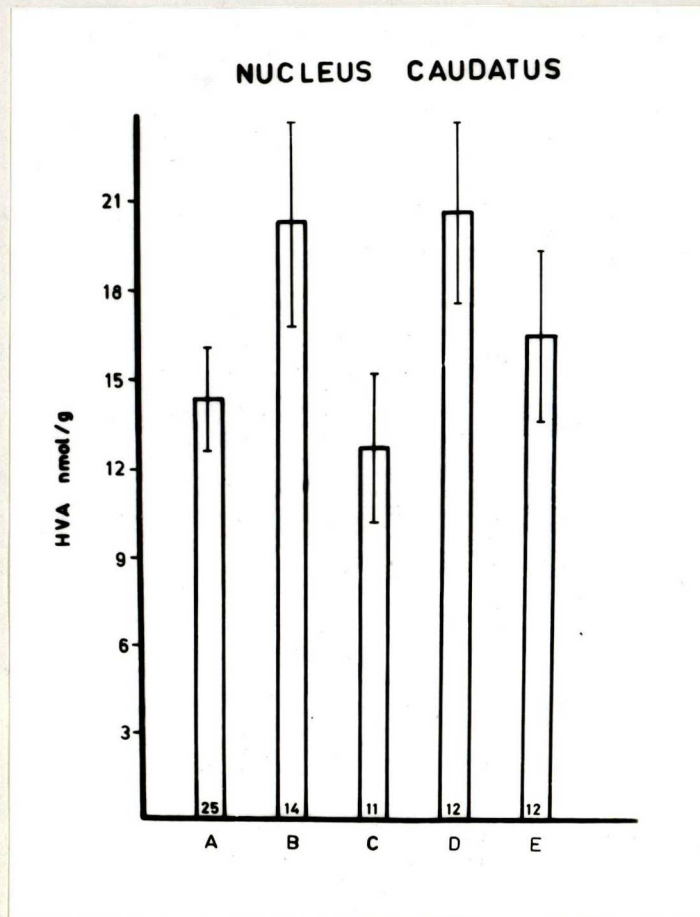
- A: Kontroll
- B: Z-Pro-D-Leu /2 mg/kg/
- C: Z-L-pGlu-L-Leu /2 mg/kg/
- D: L-pGlu-L-Leu /2 mg/kg/
- E: Z-L-Gly-L-Pro /2 mg/kg/



11. ábra

Dipeptidek hatása a hypothalamus HVA-tartalmára

/Jelölést lásd a 10. ábra/



12. ábra

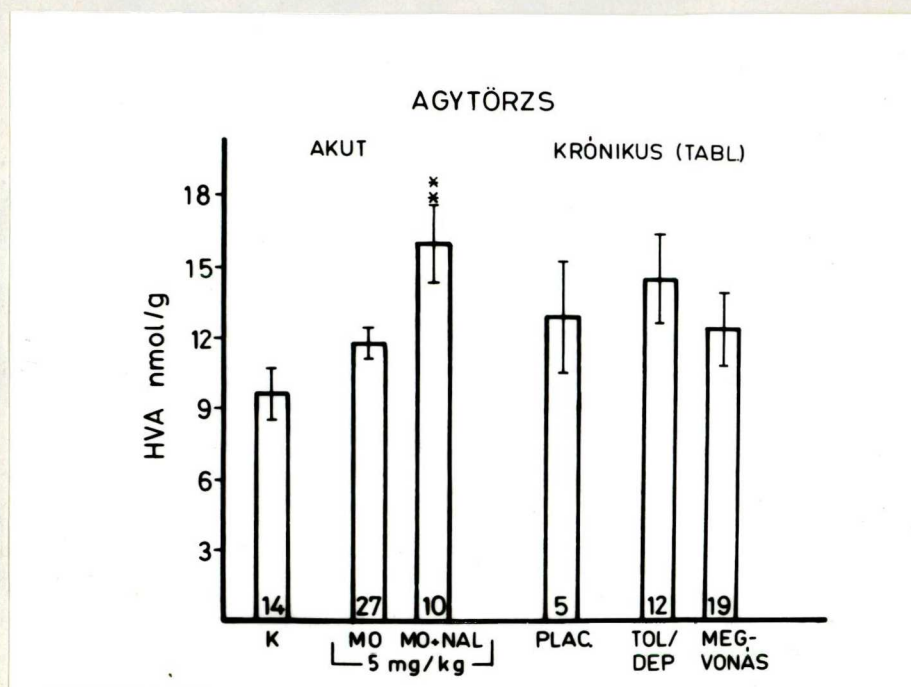
Dipeptidek hatása a nucleus caudatus HVA-tartalmára

/Jelölést lásd 10. ábra/

Az agytörzs HVA-tartalma nem változott sem az akut sem a krónikus morfin kezelés során. Az agytörzs HVA-tartalmát azonban akut naloxon kezelés jelentősen emelte $/P < 0,01/$ /13. ábra/. A hypothalamus HVA-tartalma változatlanul maradt az akut morfin kezelésnél, a morfint tartalmazó tabletta implantálással toleránssá és függővé tett egerekben, valamint a megvonás során is /14. ábra/.

Akut morfin kezelés csökkentette a HVA-tartalmat a nucleus caudatusban $/P < 0,01/$, amelyet az opiát receptorok blokkolása naloxonnal kivédett. Morfint tartalmazó tabletta implantálásával toleránssá és függővé tett egerekben szintén alacsony HVA-tartalmat mértünk a nucleus caudatusban $/P < 0,001/$ a placebo tablettával implantált kontroll állatokhoz viszonyítva. Naloxon kezeléssel kiváltott megvonási tünetek során hirtelen, de kismértékű emelkedés következett be a nucleus caudatus HVA-tartalmában $/P < 0,001/$ /15. ábra/.

Mértük a morfint tartalmazó tabletta implantálással toleránssá, függővé tett és dipeptid kezelést kapott egerek sztereotip ugrási latenciáját a naloxonnal kiváltott megvonási tünetek során, valamint megnéztük ezen állatok agytörzsében, hypothalamusában és nucleus caudatusában a HVA-szint változást.



13. ábra

Akut morfin kezelés, morfin tolerancia, függőség
és megvonás hatása az agytörzs /medulla+pons/
HVA-tartalmára

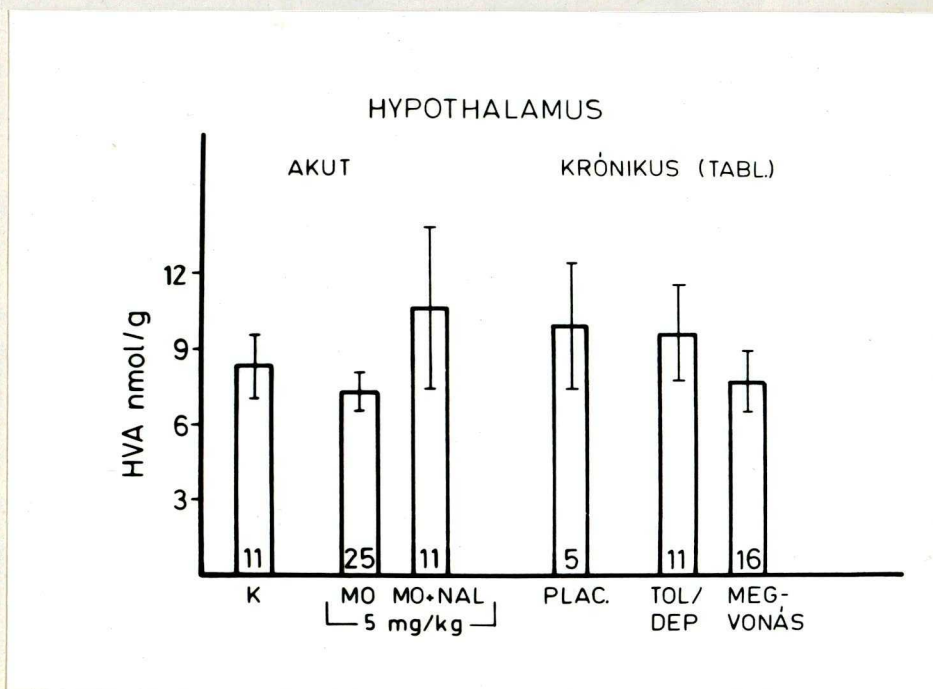
K: Kontroll

MO: Morfin

NAL: Naloxon

PLAC: Placebo

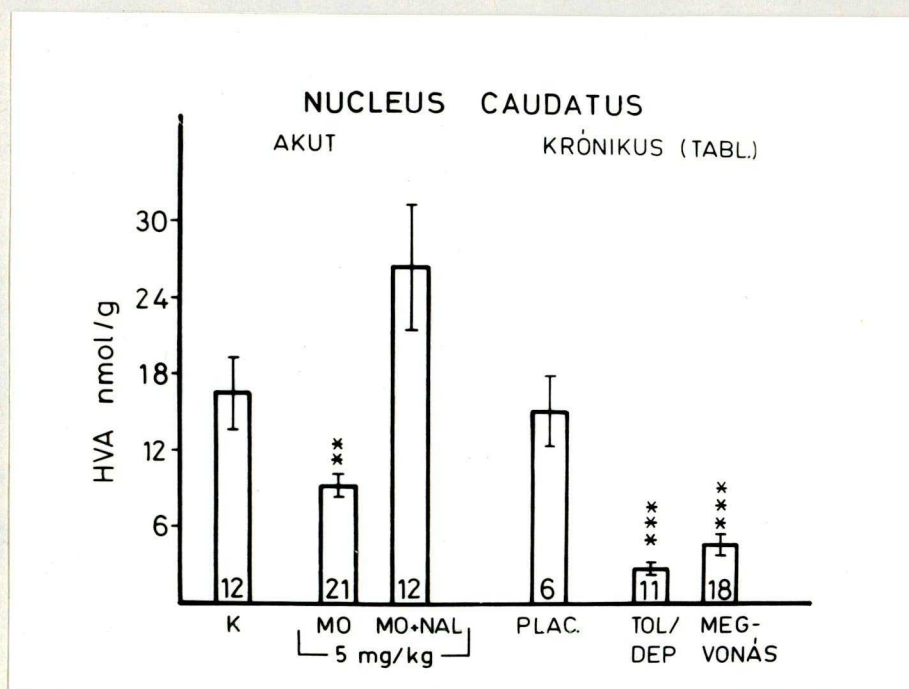
TOL/DEP: Toleráns/dependens



14. ábra

Akut morfin kezelés, morfin tolerancia, függőség és megvonás hatása a hypothalamus HVA-tartalmára

/Jelölést lásd 13. ábra/



15. ábra

Akut morfin kezelés, morfin tolerancia, függőség és megvonás hatása a nucleus caudatus HVA-tartalmára

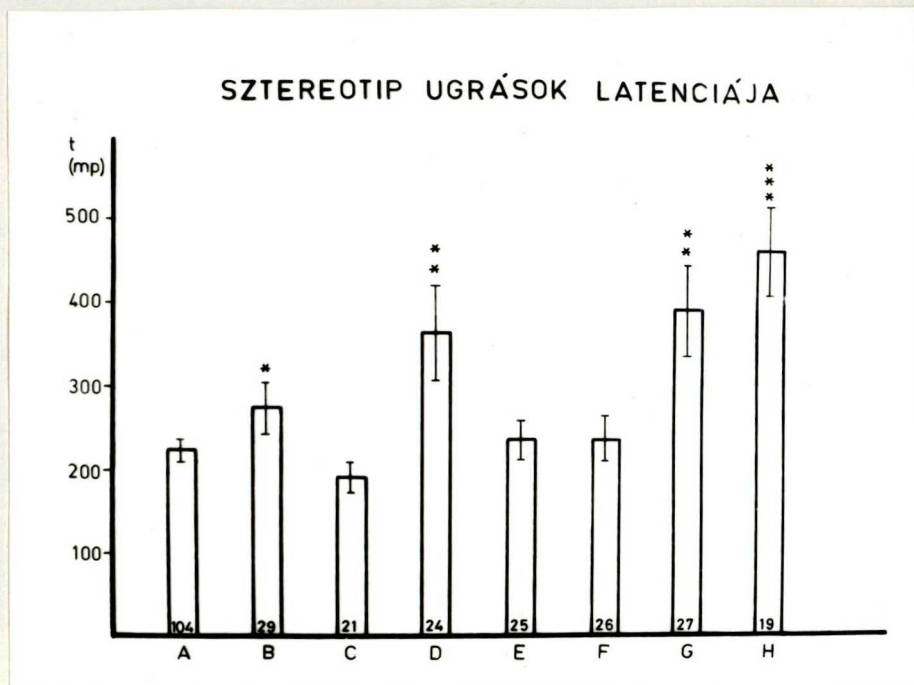
/Jelölést lásd 13. ábra/

A Z-Pro-D-Leu, Z-L-pGlu-L-Leu, L-pGlu-L-Leu, Z-L-Gly-L-Pro dipeptidek hatását a sztereotip ugrások latenciájára a 16. ábra mutatja. A naloxonnal kiváltott megvonás hatására az egerek sztereotip ugrási latenciája szignifikánsan megemelkedett a Z-Pro-D-Leu /2 mg/kg/ / $P < 0,05$ /, L-pGlu-L-Leu /2 mg/kg/ / $P < 0,01$ /, Z-L-Gly-L-Pro /4 mg/kg/ / $P < 0,01$ /, Z-L-pGlu-L-Leu /8 mg/kg/ / $P < 0,001$ / kezelést követően. Hatástalannak mutatkozott a megvonási tünet mérséklésében a Z-L-pGlu-L-Leu /2 és 4 mg/kg/, és a Z-L-Gly-L-Pro /2 mg/kg/ dózisa. Vizsgálataink alapján /17. ábra/ a Z-Pro-D-Leu / $P < 0,05$ / és a Z-L-pGlu-L-Leu / $P < 0,01$ / 2 mg/kg dózisa okozott szignifikánsan változást az egér agytörzs HVA-tartalmában, míg a másik két dipeptidnek nem volt hatása ezen koncentrációban. A Z-Pro-D-Leu növelte a HVA-szintet, a Z-L-pGlu-L-Leu jelentősen lecsökkentette a kontroll csoporthoz viszonyítva. A Z-L-Gly-L-Pro /4 mg/kg/ dózisa jelentősen növelte az agytörzs HVA tartalmát a naloxonnal kiváltott megvonási tünetek során / $P < 0,01$ /, míg a Z-L-pGlu-L-Leu dipeptid 8 mg/kg dózisa növelte csak meg az agytörzs HVA-szintjét / $P < 0,05$ /.

Az L-pGlu-L-Leu 2 mg/kg dózisa a hypothalamus HVA szintjét csökkentette le jelentős mértékben / $P < 0,05$ / /18. ábra/, míg a további három dipeptid a vizsgált

koncentrációk mellett nem befolyásolta a HVA-tartalmat a 6 % etanollal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva.

A nucleus caudatusban /19. ábra/ méréseink alapján egyik dipeptid sem volt hatással a HVA-szintre 2 mg/kg koncentrációban. Viszont a Z-L-pGlu-L-Leu 4 mg/kg dózisa szignifikánsan $/P < 0,01/$ csökkentette a HVA-tartalmat ezen agyterületben, míg Z-L-pGlu-L-Leu /8 mg/kg/ nagymértékben $/P < 0,001/$ növelte a nucleus caudatus HVA-szintjét.



16. ábra

Dipeptidek hatása a sztereotip ugrások latenciájára

A: Kontroll

B: Z-Pro-D-Leu /2 mg/kg/

C: Z-L-pGlu-L-Leu /2 mg/kg/

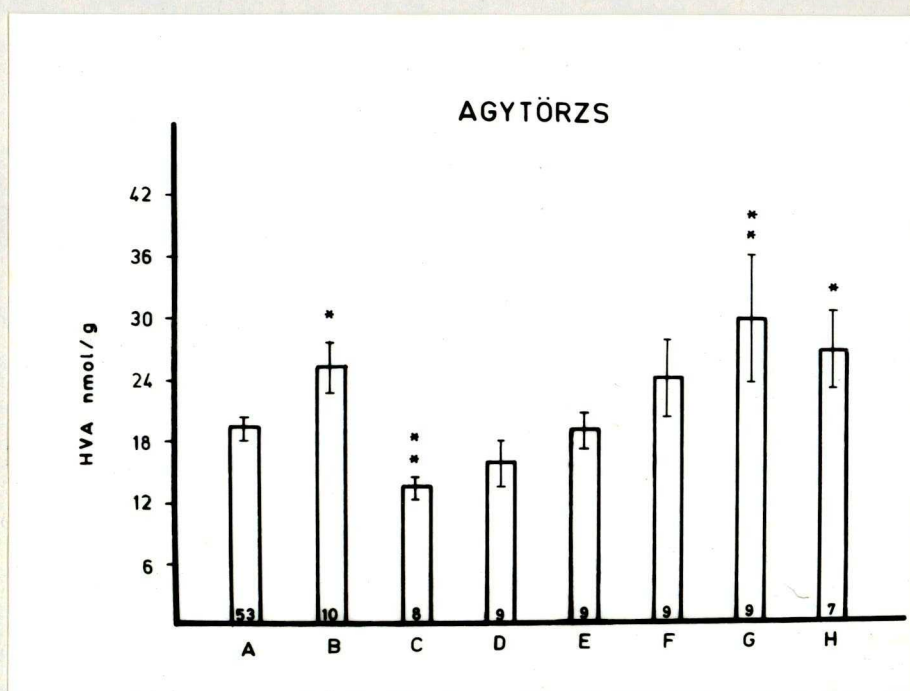
D: L-pGlu-L-Leu /2 mg/kg/

E: Z-L-Gly-L-Pro /2 mg/kg/

F: Z-L-pGlu-L-Leu /4 mg/kg/

G: Z-L-Gly-L-Pro /4 mg/kg/

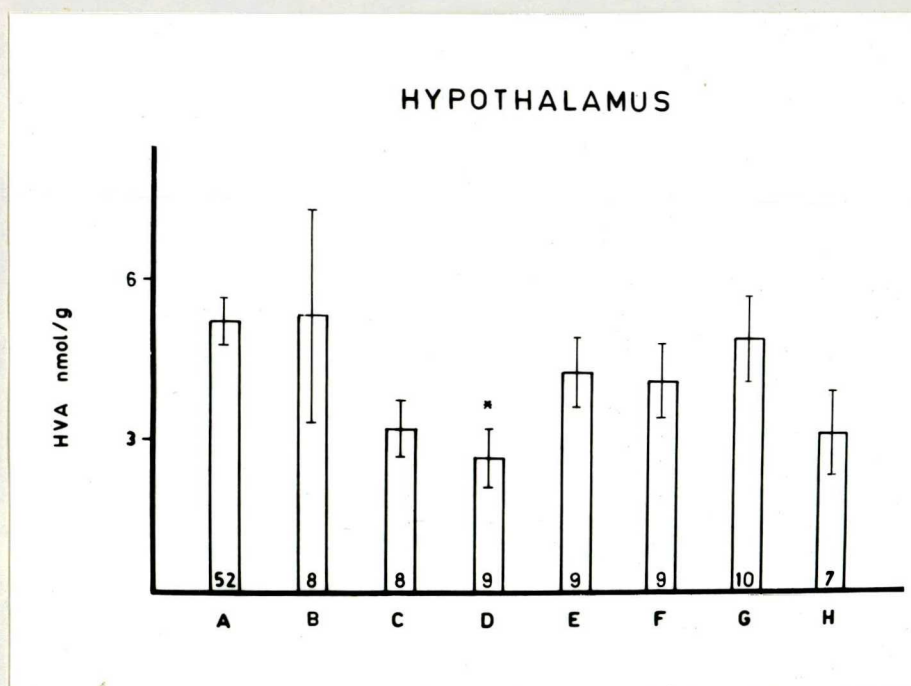
H: Z-L-pGlu-L-Leu /8 mg/kg/



17. ábra

Dipeptidek és megvonás hatása az agytörzs
HVA-tartalmára morfin-toleráns egerekben

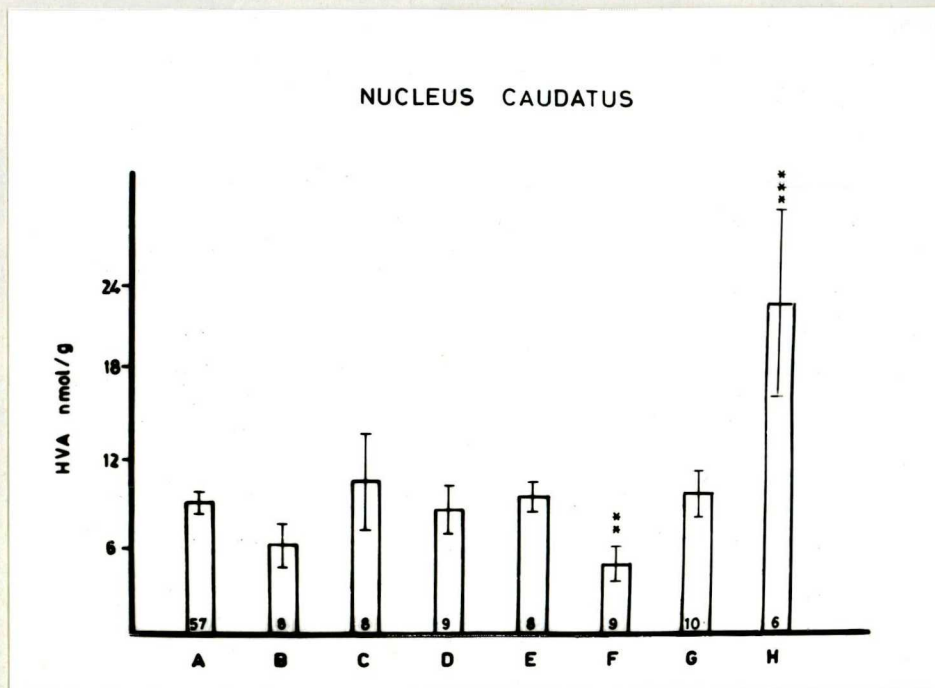
/Jelölést lásd 16. ábra/



18. ábra

Dipeptidek és megvonás hatása a hypothalamus
HVA-tartalmára morfin-toleráns egerekben

/Jelölést lásd 16. ábra/



19. ábra

Dipeptidek és megvonás hatása a nucleus caudatus
HVA-tartalmára morfin-toleráns egerekben

/Jelölést lásd 16. ábra/

4. KÖVETKEZTETÉSEK

Az előző tanulmányok kimutatták, hogy az oxitocin /KOVÁCS és mtsai 1985b/ és annak biológiailag aktív fragmenséből szintetikusan előállított dipeptid a Z-Pro-D-Leu /WALTER és mtsai 1978, RITZMAN és mtsai 1980, KOVÁCS és mtsai 1981, 1985b/ gátolják a morfin tolerancia és dependencia kialakulását egérben. Fel-tételezik, hogy mind az oxitocin /KOVÁCS és mtsai 1985b/ és C-terminális fragmense /KOVÁCS és mtsai 1981, 1983a/ hatásának közvetítésében az agyi dopa-minerg rendszer szerepet játszik. A fenti adatok fel-vetik, hogy az oxitocin és a Z-Pro-D-Leu dipeptid ha-tása a morfin toleranciára és dependenciára kapcsolatban lehet a peptidek által indukált változásokkal az agyi monoaminerg neurotransmisszióban.

Jelen kísérletünkben az oxitocinnak valamint a Z-Pro-D-Leu-nak a DA anyagszerére gyakorolt hatását vizsgáltuk. Neurokémiai módszerekkel kerestünk bizo-nyítékot arra, hogy az oxitocin és annak biológiailag aktív fragmense hatnak-e a DA anyagszerére. A DA a-nyagszerét számos oldalról vizsgáltuk. Mindenek előtt a DA transzmitter nyugalmi szintjét mértük, majd néz-tük a neuronok DA felhasználását a DA szintézis irre-verzibilis gátlása után. A fenti in vivo vizsgálatokat

kiegészítettük a dopaminerg terminálisokat tartalmazó területekben a radioaktív DA felszabadulásának és felvételének mérésével.

Az oxitocin in vivo krónikus adása a vizsgált koncentrációk mellett változatlanul hagyja a DA nyugalmi szintet mind a nucleus accumbensben, mind a nucleus caudatusban és csupán 0,002 mg/kg oxitocin akut adása emeli jelentősen a nucleus caudatus DA tartalmát. A DA felhasználást is megvizsgáltuk akut és krónikus oxitocin kezelés esetén nucleus accumbensben és nucleus caudatusban. Az oxitocin akut adása nincs hatással a nucleus accumbensben a DA felhasználásra a vizsgált koncentrációknál, míg a nucleus caudatusban 0,2 mg/kg oxitocin gátolta az $\mathcal{L}$ -MPT indukált DA eltűnést. Oxitocin /0,2 mg/kg/ krónikus adása szignifikánsan megakadályozta az $\mathcal{L}$ -MPT indukált csökkenést a nucleus accumbensben. Míg a nucleus caudatusban az oxitocin kisebb és nagyobb dózisának krónikus adása is jelentősen megakadályozta az $\mathcal{L}$ -MPT indukált DA-tartalom csökkenést, tehát a DA felhasználás szignifikánsan csökken. Mivel ismert, hogy az $\mathcal{L}$ -MPT a tirozin-hidroxiláz szintnél gátolja a DA szintézist a megfigyelt változások a peptid kezelésnek tulajdoníthatók, és a szintézis utáni folyamatokat /metabolizmus, felvétel, felszabadulás/ tükrözik.

Az oxitocin a vizsgált koncentrációkban 10^{-5} M, 10^{-6} M/ nem befolyásolta az in vitro ^3H -DA felvételt és felszabadulást sem a mesolimbikus dopaminerg rendszer terminálisait tartalmazó nucleus accumbensben, sem a nigrostriatális dopaminerg rendszer terminálisait tartalmazó nucleus caudatusban. Ezen kísérleti eredményeink alátámasztják STARR /1982/ megfigyeléseit az oxitocin hatására vonatkozólag, aki szintén nem tapasztalt a K^+ -al ingerelt DA felszabadulásnál változást az oxitocin kezelés után.

A Z-Pro-D-Leu /2 mg/kg/ nem befolyásolja a DA felhasználást az agytörzsben, de szignifikánsan csökkenti a DA felhasználást a nucleus caudatusban. Mivel a dipeptid csökkentette a DA felhasználást a nucleus caudatusban a DA-szintézis α -MPT-vel történő gátlása után és ez a csökkent felhasználás nem tükröződik vissza a nyugalmi szint változásban a normál állatokban /amit nem kezeltünk α -MPT-vel/, KOVÁCS és mtsai /1983a/ feltételezik, hogy a dipeptidnek hatása van a DA szintézisre és felszabadulásra a nucleus caudatusban.

A DA felhasználás részletesebb analizisét a specifikus egér agymagvakban radioenzimatikus mikroassay-vel végeztük el. Eltérő hatásokat figyeltünk meg a különböző dopaminerg pályákban Z-Pro-D-Leu hatását követve. A dipeptid kissé /de nem szignifikánsan/ növelte

a DA felhasználást a két főleg NA-t tartalmazó agytörzs magban/ nucleus tractus solitarii és locus coeruleus/. Mivel a NA felhasználást nem befolyásolja ezen magokban /KOVÁCS és mtsai 1983a/, nem valószínű, hogy a DA-ban tapasztalt változás a fokozott NA szintézishez szükséges prekursor lenne, hanem a peptid hatása a dopaminerg neuronokban. A Z-Pro-D-Leu-nak nem volt hatása a DA felhasználásra azokban a mesencephalikus magokban, amelyek a mesolimbikus /area tegmentalis ventralis/ és a nigrostriatális /substantia nigra/ dopaminerg projekcióinak DA sejttestjeit tartalmazzák. Ezen dopaminerg pályák legismertebb terminális területeiben azonban feltűnő változást figyeltünk meg Z-Pro-D-Leu adását követően. A nucleus accumbensben - a mesolimbikus dopaminerg rendszer egyik fő terminális régiója - a dipeptid fokozta a DA felhasználást. A nucleus caudatusban a DA felhasználás gátlását találták Z-Pro-D-Leu adását követően. Az adatok alátámasztják a feltevést, hogy a Z-Pro-D-Leu lokalizált változásokat fejt ki a mesolimbikus és a nigrostriatális dopaminerg pálya fő terminális projekcióinak DA felhasználásában.

Az agyi dopaminerg rendszer szerepének tisztázására megvizsgáltuk a Z-Pro-D-Leu hatását a ³H-DA felvételre és felszabadulásra a mesolimbikus dopaminerg rendszer

terminálisait tartalmazó nucleus accumbensben, valamint a nigrostriatális dopaminerg rendszer terminálisait tartalmazó nucleus caudatusban. In vitro Z-Pro-D-Leu 10^{-6} M koncentrációban fokozta a nucleus accumbensben a ^3H -DA felszabadulást. Nagyobb koncentrációban $/10^{-5}$ M/ a dipeptid fokozta a nucleus accumbensben és a nucleus caudatusban a ^3H -DA felvételt is.

Számos egyéb adat azonban arra utal, hogy az oxitocin hatásának közvetítésében jelentős szerepet tölt be az agyi dopaminerg rendszer. Így például az oxitocin serkenti a nagy dózisú apomorfín - kezeléssel /posztoszínaptikus receptor izgató/ kiváltott hipermotilitást, és gátolja a posztoszínaptikus DA receptorek krónikus receptorblokkoló kezelést követően megfigyelhető superszenzitivitását is /KOVÁCS és mtsai 1985b/. Az oxitocin és a DA további kapcsolatára utal az is, hogy krónikus oxitocin kezelés csökkenti a DA receptorként jellemezhető ^3H -spiroperidol kötőhelyeinek számát az egér bazális előagyi struktúráiban /KOVÁCS és mtsai 1985a/.

Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy az oxitocin és a molekula C-terminális részéből származó dipeptid szintetikusan módosított analógja /Z-Pro-D-Leu/ más-más mechanizmussal hatnak az agyi dopaminerg ingerületre. Míg oxitocin esetében a legnagyobb jelentőségűnek a peptid hatását a DA érzékeny posztoszínaptikus

idegelemekre tartjuk, a Z-Pro-D-Leu feltételezéseink szerint közvetlenül befolyásolja a preszinaptikus DA terminálokban a dopaminerg ingerület-átvitelt. Ezt támasztja alá az is, hogy a Z-Pro-D-Leu gátolta a kis dózisú apomorfin kezelés /preszinaptikus dopaminerg izgató/ által kiváltott hipomotilitást és serkentette az amfetamin által előidézett /DA felszabadulást okozó farmakon/ hipermotilitást /KOVÁCS és mtsai 1985b/.

A dopamin egyik fő metabolitjának, a homovanillinsavnak a szintje fontos mutatója a preszinaptikus DA anyagcserének. Korábbi kísérleteink folytatásaként megvizsgáltuk a Z-Pro-D-Leu hatását a HVA tartalomra az egér agytörzsében, nucleus caudatusában és hypothalamusában. Azonban morfin-naiv állatokban Z-Pro-D-Leu /2 mg/kg/ kezelést követően nem találtunk változást sem az agytörzs, sem a nucleus caudatus, sem a hypothalamus HVA-tartalmában.

Mivel KOVÁCS és mtsai /1983b/ morfin toleráns/függő egereknél a megvonás alatt az egér agymagvak DA anyagcseréjében hirtelen emelkedést találtak, s tekintve, hogy a Z-Pro-D-Leu befolyásolja a DA anyagcserét, így kísérleteink során megvizsgáltuk a Z-Pro-D-Leu hatását a HVA-szintre morfin toleráns/függő egereknél is. A morfin dependens állatoknál a Z-Pro-D-Leu az agytörzs HVA-tartalmában szignifikáns növekedést eredményezett

a naloxonnal kiváltott megvonás során. Ennek alapján a HVA-t további vizsgálatra érdemes mérő módszernek tekintettük, amely felvilágosítást szolgáltathat morfin toleráns/függő szervezetben a DA anyagszere aktuális állapotára. Mindezek alapján vizsgálatainkat kiterjesztettük HVA-szint mérésére akut és krónikus morfin kezelés során.

Az eredmények arra mutatnak, hogy akut morfin kezelés csökkentette a HVA-tartalmat az egér nucleus caudatusban abban az agyi struktúrában, amely a nigrostriális dopamin pályák terminálisait tartalmazza, és a dopaminban egyik leggazdagabb terület az agyban. Az akut morfin kezelésnek ez a hatása a HVA tartalomra az endogén opiát receptorokhoz kötődik, miután előzetes naloxon adással ez a hatás felfüggeszthető. Érdekes módon az agytörzsben és a hypothalamusban, amelynek egyrészt lényegesen alacsonyabb a HVA-tartalma és alacsonyabb a DA tartalma /KOVÁCS és mtsai 1983a/, és jóval kevesebb DA terminálist tartalmaznak, az akut morfin kezelés nem hatott, nem befolyásolta a HVA tartalmat. A morfinnal krónikusan kezelt és morfinnal toleránssá és függővé tett állatokban ugyancsak a kontrollnál alacsonyabb HVA-tartalmat mértünk, mint a toleránssá és függővé nem tett állatokban. Érdekes, hogy ennek megfelelően az akut morfin kezelést követő HVA-szint csökkenés a toleráns állatokban nem normalizá-

lódik, tehát nem mutat párhuzamosságot a magatartási tolerancia kialakulásával, azaz ugyanugy alacsony marad, mint akut morfin kezelés után. Naloxon adását követően morfinnal toleránssá és dependenssé tett állatokban, amikoris naloxonnal kiváltjuk a megvonási tüneteket kismértékű, bár statisztikailag jelentős HVA-szint változás következik be a nucleus caudatusban tehát a megvonási tüneteket HVA-szint növekedés követi. Tekintve, hogy a HVA a dopamin egyik fő metabolitja, az eredmények arra utalnak, hogy az akut morfin kezelés csökkentette a dopamin anyagcserét a nucleus caudatusban, amely naloxonnal felfüggeszthető volt. A csökkent anyagcsere megmaradt toleráns állatokban is. A megvonási tüneteket viszont a dopamin anyagcsere fokozódása követte. Ezek az eredmények teljesen összhangban állnak a laboratóriumunkban talált korábbi vizsgálatokkal /KOVÁCS és mtsai 1983b/ amikoris izolált egér agymagvakon vizsgálták a szintézis gátlás után a dopamin eltűnést és azt tapasztalták, hogy a striátumban, szorosabban a nucleus caudatusban, akut morfin kezelés jelentősen csökkentette a dopamin felhasználást, és ez a dopamin felhasználás toleráns állatban normalizálódott. A DA nyugalmi szintje jelentősen alacsonyabb marad toleráns állatokban, mint a nem toleráns állatokban.

Tehát az eredmények, mind az akut kezelést követően, mind a toleráns állatokban teljesen párhuzamosan változnak

a HVA-szinttel. Ugyancsak megerősítik jelenlegi adataink azt a korábbi megfigyelést, hogy a megvonási tünetek során a dopamin anyagcsere hirtelen nagyfokú fokozódása következik be az egér nucleus caudatusban, amely fokozódás elsősorban a nyugalmi szint hirtelen emelkedése miatt következik be. A DA anyagcsere fokozódást kisebb fokú HVA-szint fokozódás kíséri. Ennek alapján felmerül, hogy a DA metabolizmus a megvonási tünetek során csak részben megy a HVA irányába. Elképzelhető, hogy a frissen felszabadult egyéb metabolitok - pl. a 3-metoxi-tiramin vagy a DOPAC - koncentrációja nagyobb fokban tükrözné, mint a másodlagos metabolit, a két enzim által előállított HVA koncentrációja. Mivel megvonási tünetek során emelkedik a HVA-tartalom, felmerül az elvi lehetőség, hogy a a HVA-szint emelkedést a nucleus caudatusban nem a megvonási tünetek produkálják, hanem a HVA szint változása a megvonási tünetek kiváltásához szükséges naloxonnak a közvetlen hatása. Ha feltételezzük, hogy a változás nem a megvonással hanem az endogén opiát receptorok blokkolásával áll kapcsolatban, úgy normál /nem dependens/ állatban is ugyanilyen hatást kellene a naloxonnak produkálnia. Ilyen hatás elvileg lehetséges, mert például az agytörzsben a naloxon a HVA-szintet jelentősen emelte. A nucleus caudatusban azonban



akut naloxon kezelésre szignifikáns emelkedést nem tapasztaltunk, bár tendenciájában akut naloxon kezelés is emelte a HVA-tartalmat. A HVA-szint emelkedése tehát nem magával a naloxon kezeléssel, hanem a naloxonnal kiváltott megvonási tünetekkel áll kapcsolatban.

Ugyanerre a következtetésre utal KOVÁCS és mtsai /1983b/ munkája, ahol a dopamin felhasználást /a szintézis-gátlás után mért dopamin eltűnést/ a nucleus caudatusban a morfin kezelés csökkentette és a naloxon kezelés teljesen a kontroll szintjére állította vissza. Önmagában a naloxonnak nem volt jelentős saját hatása a DA anyagcserére az idézett munkában sem.

Annak ellenére, hogy a saját laboratóriumunkban azonos patkánytörzsen és azonos morfin dózisok mellett kapott korábbi eredményekkel a HVA-szinttel történt jelen megfigyelésünk teljesen összhangban vannak, az irodalmi adatok egy részével ez az összhang nem áll fenn. Az irodalom egységes abban, hogy a morfin toleráns és dependens állatokban a megvonási tüneteket a striátumban a DA anyagcsere illetve a DA nyugalmi szint növekedés követi. Erre mutatnak egéragyban KOVÁCS és mtsai /1983b/ megfigyelései, patkányagyban a DA nyugalmi szint hirtelen emelkedését figyelték meg a megvonási tünetek alatt /SMITH 1972, KUSCHINSKY és HORNYKIEWICZ 1972, 1974/. Ezzel szemben viszont több szerző patkányban /GRAMSCH és mtsai 1977,

WESTERINK és KORF 1975a, b/ azt tapasztalta, hogy akut morfin kezelés jelentősen emelte a striátum HVA-tartalmát patkányban. Hasonló HVA-szint emelkedést tapasztaltak KUSCHINSKY és HORNYKIEWICZ /1974/ egér striátumban is. Ezen ellentmondások oka nem ismeretes pontosan. Az egyik lehetséges magyarázat az alkalmazott morfin dózisban rejlik. A morfin közismerten dózistól függően befolyásolja a kísérleti állatok magatartását. Míg a fájdalomcsillapító hatás az alkalmazott dózissal lineárisan növekszik, az állatok viselkedésének számos paraméterét a morfin dózistól függően kettős hatással befolyásolja. Tehát alacsony illetve magas morfin dózisok ellentétesen befolyásolják a motilitást. Ismeretes, hogy a morfin egyes neurokémiai effektusai is a dózistól függhetnek. Jelen vizsgálatban 5 mg/kg dózisú morfint alkalmaztunk, amely saját egértörzsünkön a fájdalomcsillapító hatás ED_{50} -nek felel meg. Más szerzők /FUKUI és TAKAGI 1972/ akik HVA-szint emelkedést találtak, ennél nagyobb morfin dózissal dolgoztak /20 mg/kg/.

Annak ellenére, hogy amikor vizsgálatainkat elkezdtük ismert volt, hogy a morfin dózistól függően befolyásolhatja például a DA anyagcserét, vizsgálatainkat nem terjesztettük ki különböző dózisú akut morfin kezelés dózis-hatás görbéjének a vizsgálatára. Ennek az oka, hogy ezen vizsgálatoknak nem az akut morfinkezelés neurokémiai hatásainak analízise volt az elsőd-

leges célja, hanem az akut morfinkezelést összehasonlításként annak a modellezésére vizsgáltuk, hogy később toleráns, dependens állatokban a megvonás alatt milyen változások jönnek létre.

A másik lehetséges magyarázat a species különbség. A szerzők legnagyobb része patkányban vizsgálta a HVA-tartalmat /GRAMSCH és mtsai 1977, WESTERINK és KORF 1975a, b/, a mi vizsgálataink egérrel történtek.

Lehetőségként meg kell említeni, hogy számos más ok is lehet, ami miatt a vizsgálatok között jelentős eltérés tapasztalható. Így például az irodalmi adatok többsége probeneciddel történt HVA akkumulációt vizsgált, mi pedig a HVA saját szintjét néztük az agyban probenecid előkezelés nélkül.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált dózisban és időviszonyok mellett CFLP egerekben akut morfin-kezelés csökkentette a nucleus caudatusban a HVA-szintet, amely csökkenés összefüggésben állhat a DA felhasználás egyidejű csökkenésével. Mind a jelenleg vizsgált HVA-tartalom változást, mind a DA felhasználás változását a naloxon felfüggeszti. A toleráns állatokban a HVA-tartalom /FALUDI és mtsai 1985/ tartósan alacsony marad, ugyanúgy ahogy tartósan alacsony marad korábbi vizsgálataink szerint a DA tartalom is /KOVÁCS és mtsai 1983b/. Toleránssá tett

állatokban a megvonási tünetek alatt a HVA tartalom emelkedik ugyanúgy, mint a DA nyugalmi szintje is emelkedik a striátumban /KOVÁCS és mtsai 1983b/. Jelen vizsgálatok alátámasztják azt az irodalomban korábban is ismert elképzelést, mely szerint az akut és krónikus morfin hatást és a megvonási tüneteket a nigrostriatális DA rendszer anyagcsere változásai kísérik. Az eredmények alapján további vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a HVA-szint változásai ok-okozati kapcsolatban állnak-e a megvonási tünetekkel, vagy pedig csupán az akut morfin hatást és a tolerancia kialakulását illetve a megvonási tüneteket követő neurokémiai jelek, tehát következményei a magatartási válasznak.

Ismereteink szerint az általunk vizsgált dipeptidok hatásait a HVA-tartalomra korábbiakban senki sem elemezte. Morfin-naiv állatban akut kezelést követően Z-L-pGlu-L-Leu az agytörzsben, Z-L-Gly-L-Pro viszont a hypothalamusban okozott jelentős HVA-szint változást 2 mg/kg dipeptid dózisinál. A morfin dependens egerekben az agytörzs HVA-tartalmában Z-L-pGlu-L-Leu /2 mg/kg/ csökkenést eredményezett a naloxonnal kiváltott megvonás során. Az L-pGlu-L-Leu /2 mg/kg/ a hypothalamus HVA-szintjét csökkentette jelentősen. A Z-L-Gly-L-Pro 4 mg/kg dózisa az agytörzs HVA-tartalmát növelte, míg

a Z-L-pGlu-L-Leu ugyanazon koncentrációja a nucleus caudatesét jelentős mértékben csökkentette. A Z-L-pGlu-L-Leu 8 mg/kg koncentrációja az agytörzs és a nucleus caudatus HVA-szintjét jelentősen növelte.

A vizsgált dipeptideknek a morfin megvonásra kifejtett hatásai jó egyezést mutatnak KOVÁCS és mtsai /1984/ által közölt adatokkal. A Z-Pro-D-Leu és az L-pGlu-L-Leu 2 mg/kg koncentrációban növelte a sztereotip ugrási latenciát, míg a Z-L-Gly-L-Pro 4 mg/kg koncentrációnál, a Z-L-pGlu-L-Leu 8 mg/kg koncentrációnál növelte jelentősen a leugrási időt a 6 %-os etanollal kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva.

Amint vizsgálati eredményeinkből kitűnik, a négy vizsgált dipeptid akut alkalmazása illetve a morfin toleráns egereknél a krónikus dipeptid kezelés, más és más agyterületnél okozott szignifikáns változást a HVA-tartalomban.

Kísérleteink alapján a Z-L-pGlu-L-Leu 8 mg/kg koncentrációja hatásos a nucleus caudatusban a HVA-szintre, azaz abban az agyterületben, ahol a morfin kezelés is szignifikáns változást okoz. A morfin tabletta implantálásával toleránssá tett egerekben igen alacsony HVA-szintet mértünk, amit a naloxon kezelés valamelyest emelt, de még mindig szignifikánsan alacsonyabb maradt a kontroll csoporthoz viszonyítva. A Z-L-pGlu-L-Leu

8 mg/kg dózisa megvonás alatt lényegesen megemeli a nucleus caudatus HVA-szintjét, így úgy tűnik, hogy ezen dipeptid megvonási tünetet jelentősen mérséklő dózisa a nucleus caudatus HVA-szintjét normalizálja. Tekintettel arra, hogy ugyanakkor az agytörzs HVA-szintjét is növeli, és a többi biológiai hatással rendelkező dipeptid is elsősorban agytörzsi szinten befolyásolja a HVA-szintet az agyban, így nem állíthatjuk, hogy a morfin és a dipeptidek morfin megvonást mérséklő támadáspontja agyi szinten azonos régió lenne. Eredményeink alapján végülis a vizsgált dipeptideknek a hatását nem köthetjük egyértelműen egyetlen agyi struktúra DA illetve HVA-szint változásához.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A DA egyik fő metabolitjának a HVA-nak, a szintje paramétere a preszinaptikus DA anyagcserének, így kísérleti munkánk egyik fontos része volt a HVA-tartalom mérésének beállítása laboratóriumunkban. Az így beállított HVA-mérési módszerrel valamint a transzmitter anyagcsere egyéb vizsgálati módszereinek felhasználásával /in vivo felhasználás, in vitro felszabadulás és felvétel vizsgálat/ a következő biológiai következtetéseket vonhatjuk le.

1. Az oxitocin krónikus adása a vizsgált koncentrációk mellett nem változtatta meg a DA nyugalmi szintjét a nucleus accumbensben és a nucleus caudatusban. Akut oxitocin kezelésnél /0,002 mg/kg/ emelkedett a nucleus caudatus DA tartalma.

2. Az oxitocin akut adása nem befolyásolta a nucleus accumbensben a DA anyagcserét, míg a nucleus caudatusban 0,2 mg/kg oxitocin gátolta az α -MPT indukált DA felhasználást. Az oxitocin /0,2 mg/kg/ krónikus adása gátolta a DA felhasználást a nucleus accumbensben és a nucleus caudatusban.

3. Az oxitocin a vizsgált koncentrációkban / 10^{-5} és 10^{-6} M/ nem befolyásolta a ^3H -DA felvételt és felszabadulást a nucleus accumbensben és a nucleus caudatusban.

4. A Z-Pro-D-Leu 2 mg/kg dózisa csökkentette a DA felhasználást a nucleus caudatusban, míg az agytörzs DA felhasználását nem befolyásolta. Egyedileg izolált agyi magokban kimutattuk, hogy a Z-Pro-D-Leu a nucleus accumbensben fokozta, míg nucleus caudatusban gátolta a DA felhasználást.

5. Kimutattuk, hogy a Z-Pro-D-Leu 10^{-5} M/ fokozta a nucleus accumbensben és a nucleus caudatusban a ^3H -DA felvételt, míg a dipeptid 10^{-6} M koncentrációja fokozta a nucleus accumbensben a ^3H -DA felszabadulást is.

Kísérleti eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy az oxitocin és a molekula C-terminális fragmensének szintetikusán módosított analógja a Z-Pro-D-Leu más-más mechanizmussal hat az agyi dopaminerg ingerületre. Míg az oxitocin feltehetőleg posztszinaptikus a Z-Pro-D-Leu preszinaptikus támadásponttal hat.

6. Morfin-naiv állatokban a Z-Pro-D-Leu /2 mg/kg/ kezelést követően nem változott sem az agytörzs, sem a nucleus caudatus, sem a hypothalamus HVA tartalma, ugyanakkor a morfin dependens állatoknál a Z-Pro-D-Leu szignifikánsan növelte az agytörzs HVA-tartalmát a naloxonnal kiváltott megvonás során.

7. Akut morfin kezelés csökkentette a HVA-tartalmat az egér nucleus caudatusában, míg az agytörzs és a hypothalamus HVA-szintje változatlan maradt. Az eredmé-

nyek arra utalnak, hogy akut morfin kezelés csökkentette a DA anyagszerét a nucleus caudatusban, amelyet a naloxon adása kivédett.

8. Morfint tartalmazó tabletta implantálásával toleránssá és függővé tett egerekben alacsony HVA-szintet mértünk a nucleus caudatusban, míg a naloxonnal kiváltott megvonási tünetek során kismértékű emelkedés következett be a nucleus caudatus HVA tartalmában. Kísérleti eredményeink megerősítik azt a korábbi feltételezést, mely szerint az akut és krónikus morfin hatást és a megvonási tüneteket a nigrostriatális DA rendszer anyagszere változásai kísérik.

9. Morfin-naiv egerekben akut kezelést követően a Z-L-pGlu-L-Leu az agytörzsben, a Z-L-Gly-L-Pro a hypothalamusban okozott jelentős HVA-szint változást a vizsgált dózisban.

10. Morfin toleráns/dependens egerekben az agytörzs HVA-szintjét a naloxonnal kiváltott megvonás esetén a Z-L-pGlu-L-Leu 2 mg/kg dózisa csökkentette, míg ugyanezen dipeptid 8 mg/kg dózisa jelentősen növelte az agytörzs HVA-tartalmát. Ugyanakkor a Z-L-pGlu-L-Leu 4 mg/kg dózisa jelentős mértékben csökkentette a nucleus caudatus HVA-szintjét, míg 8 mg/kg dózisa szignifikánsan növelte a nucleus caudatus HVA-tartalmát. Az L-pGlu-L-Leu /2 mg/kg/ a hy-

pothalamus HVA-szintjét csökkentette jelentősen, míg a Z-L-Gly-L-Pro /4 mg/kg/ az agytörzs HVA-szintjét növelte.

Vizsgálati eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a dipeptidek akut alkalmazása illetve a morfin toleráns egereknél a krónikus dipeptid kezelés más és más agyterületben okozott szignifikáns HVA-szint változást. Ezen dipeptidek biológiai hatását egybevetve a biokémiai vizsgálati eredményekkel, megállapíthatjuk, hogy a morfin-megvonási tüneteket mérséklő hatásért nem egyetlen agyi struktúra DA és HVA szint változása a felelős.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Anden, N. E., Roos, B. E., Werdinius, B.: On the occurrence of homovanillic acid in brain and cerebrospinal fluid and its determination by a fluorometric method. *Life Sci.* 1963, 7:448-458
2. Baumgarten, H. G., Björklund, A., Lachenmayer, L., Nobin, A., Stenevi, U.: Long-lasting selective depletion of brain serotonin by 5,6-dihydroxy-tryptamine. *Acta Physiol. Scand.* 1971, 373:1-15
3. Collier, H. O. J.: Supersensitivity and dependence. *Nature /London/* 1968, 220:228-231
4. Creese, I., Burt, D. R., Snyder, S. H.: Dopamine receptor binding: Differentiation of agonist-antagonist states with ^3H -dopamine and ^3H -haloperidol. *Life Sci.* 1975, 17:993-1002
5. Cuello, A. C., Hiley, R., Iversen, L. L.: Use of catechol-o-methyl-transferase for the enzyme radiochemical assay of dopamine. *J. Neurochem.* 1973, 21:1337-1340
6. De Wied, D., Wimersma Greidanus, Tj. B., Bohus, B., Urban, I., Gispen, W. H.: Vasopressin and memory consolidation. In: *Perspectives in*



- Brain Research, Progress in Brain Research.
Elsevier, Amsterdam 1976, 45:181-191
7. Eitan, A., Hershkowitz, M.: The effects of dibutyryl cyclic AMP, theophylline and papaverine on the release of ³H-catecholamines from rat brain striatal and cortical synaptosomes. Europ. J. Pharmacol. 1977, 46:323-327
 8. Faludi, M., Kovács, G. L., Telegdy, Gy.: Morfin tolerancia és megvonás hatása a homovanillinsav-tartalomra agéragy különböző területeiben. Kísérletes Orvostudomány, 1985, 37:160-166
 9. Fukui, K., Takagi, H.: Effect of morphine on the cerebral contents of metabolites of dopamine in normal and tolerant mice: its possible relation to analgesic action. Br. J. Pharmacol. 1972, 44:45-51
 10. Fuxe, K., Hökfelt, T., Agnati, L. F., Johannsson, V., Goldstein, M., Perez, M. de la Mora, Possani, L., Tapia, R., Teran, L., Palacios, R.: Mapping out central catecholamine neurons: Immunohistochemical studies on catecholamine-synthesizing enzymes. Psychopharmacology: A Generation of Progress. Szerk. Lipton, M. A., DiMascio, A., Killam, K. F., Raven Press, New York 1978, pp. 67-94

11. Gramsch, Ch., Bläsig, J., Herz, A.: Changes in striatal dopamine metabolism during precipitated morphine withdrawal. *Europ. J. Pharmacol.* 1977, 44:231-240
12. Iwamoto, E. T., Ho, I. K., Way, E. L.: Elavation of brain dopamine during naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent mice and rats. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 1973, 187:558-567
13. Iwamoto, E. T., Loh, H., Way, E. L.: Circling behavior after narcotic drugs and during naloxone-precipitated abstinence in rats with unilateral nigral lesions. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 1976, 197:503-516
14. Jacobowitz, D. M., Richardson, J. S.: Method for rapid determination of norepinephrine, dopamine, and serotonin in the same brain region. *Pharmac. Biochem. Behav.* 1978, 8:515-519
15. Jaffe, J. H., Sharpless, S. K.: Pharmacological denervation supersensitivity in the central nervous system: a theory of physical dependence. *Proc. Ass. Res. nerv. ment. Dis.* 1968, 46:226-246

16. Johnson, J. C., Ratner, M., Gold, G. J., Clouet, D. H.: Morphine effects on the levels and turnover rate of catecholamines in rat brain. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 1974, 9:41-53
17. Kovac, W., Denk, H.: Der Hirnstamm der Maus. Topographie, Cytoarchitektonik and Cytologie. Wien, New York: Springer-Verlag. 1968
18. Kovács, G. L., Acsai, L., Tihanyi, Á., Faludi, M., Telegdy, G.: Influence of Z-Prolyl-D-Leucine on *L*-MPT-induced catecholamine utilization in specific mouse brain nuclei. Pharmac. Biochem. Behav. 1983a, 18:345-349
19. Kovács, G. L., Acsai, L., Tihanyi, Á., Telegdy, G.: Catecholamine utilization in distinct mouse brain nuclei during acute morphine treatment, morphine tolerance and withdrawal syndrome. Europ. J. Pharmacol. 1983b, 93:149-158
20. Kovács, G. L., Faludi, M., Falkay, G., Telegdy, G.: Peripheral oxytocin treatment modulates central dopamine transmission in the mouse brain. 1985a, /Közlésre előkészítve/
21. Kovács, G. L., Horváth Zs., Sarnyai, Z., Faludi, M., Telegdy, G.: Oxytocin and a C-terminal derivative /Z-Prolyl-D-Leucine/ attenuate tolerance

- to and dependence on morphine and interact with dopaminergic neurotransmission in the mouse brain. *Neuropharmacol.* 1985b, 24:413-419
22. Kovács, G. L., Szontágh, L., Balásperi, L., Hódi, K., Bohus, P., Telegdy, G.: On the mode of action of an oxytocin derivative /Z-Pro-D-Leu/ on morphine-dependence in mice. *Neuropharmacol.* 1981, 20:647-651
23. Kovács, G. L., Szontágh, L., Balásperi, L., Telegdy, G.: Dipeptides delay the onset of morphine withdrawal in the mouse. *Acta Physiol. Hung.* 1984, 63:83-84
24. Kovács, G. L., Telegdy, G.: Role of oxytocin in memory and amnesia. *Pharmac. Ther.* 1982, 18:375-395
25. Kovács, G. L., Vécsei, L., Telegdy, G.: Opposite action of oxytocin to vasopressin in passive avoidance behaviour in rats. *Physiol. Behav.* 1978, 20:801-802
26. Krivoy, W. A., Zimmermann, E., Lande, S.: Facilitation of development of resistance to morphine analgesia by desglycinamide-lysine-vasopressin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1974, 71:1852-1856

27. Kuschinsky, K., Hornykiewicz, O.: Morphine catalepsy in the rat: relation to striatal dopamine metabolism. *Europ. J. Pharmacol.* 1972, 19:119-122
28. Kuschinsky, K., Hornykiewicz, O.: Effects of morphine on striatal dopamine metabolism: possible mechanism of its opposite effect on locomotor activity in rats and mice. *Europ. J. Pharmacol.* 1974, 26:41-50
29. Lindvall, O., Björklund, A.: Anatomy of the dopaminergic neuron systems in the rat brain. *Advances in Biochemical Psychopharmacology, Dopamine.* Szerk. Roberts, P. J., Woodruff, G. N., Iversen, L. L., Raven Press, New York 1978, 19:1-23
30. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193:265-275
31. Martin, I. L., Baker, G. B., Fleetwood-Walker, S. M.: Modification of the radioenzymatic assay for the catecholamines. *Biochem. Pharmacol.* 1978, 27:1519-1520
32. Martin, W. R.: Pharmacological redundancy as an adaptive mechanism in the central nervous system. *Fed. Proc.* 1970, 29:13-18

33. Moore, K. E., Kelly, P. H.: Biochemical pharmacology of mesolimbic and mesocortical dopaminergic neurons. Psychopharmacology: A Generation of Progress. Szerk. Lipton, M. A., DiMascio, A., Killam, K. F., Raven Press, New York 1978, pp. 221-234
34. Palkovits, M.: Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. Brain Res. 1973, 59:449-450
35. Papeschi, R., Theiss, P., Herz, A.: Effects of morphine on the turnover of brain catecholamines and serotonin in rats - acute morphine administration. Europ. J. Pharmacol. 1975, 34:253-261
36. Ritzmann, R. F., Walter, R., Bhargava, H. N., Krivoy, W. A.: The inhibition of the development of tolerance to and physical dependence on morphine by peptides. In: Neuropeptides and Neural Transmission, Szerk. Ajmone Marsan, C., Traczyk, W. Z., Raven Press, New York 1980, pp. 237-244
37. Schulz, H., Kovács, G. L., Telegdy, G.: The effect of vasopressin and oxytocin on avoidance behaviour in rats. In: Cellular and Molecular Basis of Neuroendocrine Processes. Szerk.

- Endrőczy, E., Akadémiai Kiadó, Budapest 1976,
pp. 555-564
38. Sharpless, S., Jaffe, J.: Withdrawal phenomena as
manifestations of disuse supersensitivity.
Scientific basis of drug dependence. Szerk.
Steinberg, H., Churchill, J. A., London 1969,
pp. 67-76
39. Shuster, L.: Repression and de-repression of enzyme
synthesis as a possible explanation of some
aspects of drug action. Nature /London/ 1961,
189:314-315
40. Siegel, S.: Evidence from rats that morphine tole-
rance is a learned response. J. comp. Physiol.
Psychol. 1975, 89:498-506
41. Siegel, S.: Tolerance to the hyperthermic effect
of morphine in the rat is a learned response.
J. comp. Physiol. Psychol. 1978, 92:1137-1149
42. Smith, C. B.: Neurotransmitters and the narcotic
analgesics. In: Chemical and biological as-
pects of drug dependence C. R. C. Press,
Cleveland, 1972, pp. 495-504
43. Starr, M. S.: Influence of peptides on ^3H -dopamine
release from superfused rat striatal slices.
Neurochem. Internat. 1982, 4:233-240

44. Szabó, G., Kovács, G. L., Telegdy, G.: A modified screening method for rapid simultaneous determination of dopamine noradrenaline and serotonin in the same brain region. *Acta Physiol. Hung.* 1983, 61:51-57
45. Telegdy, G., Kovács, G. L.: Role of monoamines in mediating the action of hormones on learning and memory. In: *Brain mechanisms in memory and learning: From Single Neuron to Man.* Szerk. Brazier, M. A. B. 1979a, pp. 249-268
46. Telegdy, G., Kovács, G. L.: Role of monoamines in mediating the action of ACTH, vasopressin and oxytocin. In: *Central Nervous System Effects of Hypothalamic Hormones and Other Peptides.* Szerk. Collu, R., Barbeau, A., Ducharme, J. R., Rochefort, J. G. Raven Press, New York 1979b, pp. 189-205
47. Van der Gugten, J., Palkovits, M., Wijnen, H. J. L. M., Versteeg, D. H. G.: Regional distribution of adrenaline in rat brain. *Brain Res.* 1976, 107:171-175
48. Van Ree, J. M., De Wied, D.: Prolyl-Leucyl-Glycinamide /PLG/ facilitates morphine dependence. *Life Sci.* 1976, 19:1331-1340

49. Walter, R., Ritzmann, R. F., Bhargava, H. N.,
Rainbow, T. C., Flexner, L. B., Krivoy, W.
A.; Inhibition by Z-Pro-D-Leu of development
of tolerance to and physical dependence on
morphine in mice. Proc. natn. Acad. Sci.,
U.S.A. 1978, 75:4573-4576
50. Way, E. L., Loh, H. H., Shen, F. H.; Simultaneous
quantitative assesment of morphine tolerance
and physical dependence. J. Pharmacol. exp.
Ther. 1969, 167:1-8
51. Westerink, B. H. C., Korf, J.; Determination of
nanogram amounts of HVA in the CNS with a
rapid semi-automated fluorimetric method.
Biochem. Med. 1975a, 12:106-115
52. Westerink, B. H. C., Korf, J.; Influence of drugs
on striatal and limbic homovanillic acid con-
centration in the rat brain. Europ. J.
Pharmacol. 1975b, 33:31-40

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok dr. Telegdy Gyula tanszékvezető egyetemi tanár úrnak, az orvostudományok doktorának, hogy lehetővé tette és értékes tanácsaival segítette doktori értekezésem elkészítését a SZOTE Kóréletteni Intézetében.

Köszönetemet fejezem ki dr. Kovács L. Gábor egyetemi docensnek, az orvostudományok kandidátusának, hogy készséges útmutatásaival, tanácsaival irányította munkámat.

Ezuton köszönöm meg dr. Baláspiri Lajosnak, a SZOTE Orvosi Vegytani Intézet egyetemi docensének, hogy rendelkezésemre bocsátotta az általa szintetizált dipeptideket, valamint dr. Hódi Klárának, a SZOTE Gyógyszertechnológiai Intézet egyetemi adjunktusának a kísérletekhez szükséges morfin-tablettákat.

Hálával tartozom még a Kóréletteni Intézet mindazon dolgozójának, akik segítségemre voltak a gyakorlati kivitelezésben.

