

**THE BEHAVIORAL EFFECTS OF OBESTATIN AND PITUITARY
ADENYLATE CYCLASE-ACTIVATING POLYPEPTIDE ON
ANALGESIC TOLERANCE TO MORPHINE AND MORPHINE
WITHDRAWAL IN MICE**

Ph.D. Értekezés tézisei

Lipták Nándor

Kórélettani Intézet

Általános Orvostudományi Kar

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2014

1. Bevezetés

A morfint először egy német gyógyszerész, Friedrich Wilhelm Adam Sertürner izolálta ópiumból 1817-ben, azóta a legelterjedtebb és leghatékonyabb fájdalomcsillapítóként tartják számon. Rendszeres alkalmazása viszont toleranciához és/vagy függőséghez vezethet, ami komoly problémát jelenthet a klinikai felhasználás során. További probléma, hogy morfin megvonás után számtalan negatív mellékhatás jelentkezhethet, mint például a depresszió, szorongás, hyperalgesia, stb.

Ph.D. Kutatómunkám során két neuropeptid, a hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) és az obestatin hatásait vizsgáltam a morfin kezelés és morfin megvonás által kiváltott viselkedési hatásokra.

A PACAP 38-at (továbbiakban: PACAP) először a hypothalamusból izolálták, a hipofízisben fejt ki a hatását azáltal, hogy a cAMP szintet fokozza (*Arimura, 1992*). A PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptorokon keresztül fejt ki hatását. A PACAP a szekretinnel, a glukagonnal, a peptid hisztidin izoleucinamiddal (PHI), a haloderminnel együtt a vasoaktiv intestinalis polipeptid (VIP)-családba tartozó neuropeptid. A PACAP egy rendkívül sokféle fiziológiai hatással rendelkező neuropeptid, amelyet már korábban is vizsgált kutatócsoportunk. Intézetünk korábbi kísérletei bizonyították, hogy a PACAP csökkenti az akut morfin kezelés fájdalomcsillapító hatását, fokozza az analgézis toleranciát és csökkenti az első ugrásig eltelt időt morfin megvonásos ugrás-teszt esetén egérben (*Mácsai és mtsai, 2002*). Továbbá, a PACAP közvetlen gátolja az egyik endogén opiát, a dynorphin spinális felszabadulását (*Liu és mtsai, 2011*).

Az obestatin egy 2005-ben felfedezett, a ghrelinnel közös peptidcsaládba tartozó neuropeptid (*Zhang és mtsai, 2005*). Eredetileg táplálékfelvétel-csökkentő és testtömegcsökkentő hatásait írták le, de utóbbi években viselkedést befolyásoló hatásaira is fény derült. Receptora vagy konkrét hatásmechanizmusa jelenleg még nem ismert.

Célkitűzések:

- PACAP hatásainak vizsgálata naloxonos morfin megvonás után ugrás-teszttel és EPM-mel
- obestatin hatásainak vizsgálata naloxonos morfin megvonás után open-field és EPM tesztekkel
- obestatin hatásainak vizsgálata az akut és krónikus morfin kezelés által kiváltott analgéziára tail-flick tesztekkel

2. Anyagok és módszerek

Kísérleteinkhez CFLP törzsből származó hím 30 ± 5 g tömegű egereket használtunk (Domaszék). Az állatokat természetes 12 órás sötét/világos fényciklusban tartottuk, vizet és ételt szabadon fogyaszthattak. Minden állatot csak egyszer használtunk fel kísérleteinkben. Kísérleteinket a Szegedi Tudományegyetem MÁB (Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság) előírásainak megfelelően végeztük. Az intacerebroventrikularis (i.c.v.) kanülözéshez az egereket nembutallal altattuk. A koponyatető feletti bőrt eltávolítottuk, 3 %-os H_2O_2 segítségével a koponyát borító fasciát feloldottuk, és a Bregma ponttól jobb oldalra, 1-1 mm-re posterior és laterális irányba injekciós tűvel furatot készítettünk, ahová polietilén kanült vezetünk be. A kanült cianoakrilát tartalmú ragasztóval rögzítettük. A kísérleteket 3-4 nap felépülési idő után kezdtük meg. Minden kezelés előtt ellenőriztük a kanülök átjárhatóságát. A nem megfelelően kanülözött állatok eredményeit a statisztikai értékeléseknél nem vettük figyelembe. I.c.v. kezeléssel PACAP-38, obestatin 1-23 (Anaspec, Inc., USA) és [D-Lys3]-GHRP-6, (Sigma Aldrich, USA) peptideket használtunk aCSF (artificial cerebrospinal fluid) 2 μ l-es oldatában. A morfint (Morphinium chloratum, Sigma Aldrich, USA) 10, 20, 40 mg/testtömeg kg, illetve 20, 40, 60, 80, 100 mg/testtömeg kg (Ugrás-teszt, testhőmérséklet) dózisban s.c. alkalmaztuk. A naloxont (Sigma-Aldrich Kft., Hungary) 0,1 0,2; illetve 1 mg/testtömeg kg dózisban használtuk. A kontroll állatok minden alkalommal fizioológias sóoldatot és/vagy aCSF-et kaptak. A szorongással összefüggésbe hozható viselkedési tüneteket emelt keresztlabirintus (EPM) és open-field tesztekkel; a fájdalomcsillapító hatást tail-flick és hot-plate tesztekkel; a fizikai megvonási tüneteket pedig ugrás-teszttel és testhőmérséklettel mérésével végeztük

3. Eredmények és összefoglalás

Kísérleteink során megerősítettük más kutatók eredményeit, miszerint krónikus morfin kezelés után a naloxonos megvonás (0,2 mg/kg) csökkenti a szorongással összefüggésbe hozható tüneteket egérben EPM tesztek során. Ezt a magatartás lehet fajspecifikus, vagy okozhatja menekülő viselkedés, a háttere nem tisztázott (Hodgson et al, 2008). Továbbá, hasonló viselkedési tüneteket regisztráltunk open-field tesztek során az EPM kísérletek során alkalmazott morfin kezelési és megvonási protokoll használata után. A PACAP nem volt szignifikáns hatása sem önmagában, sem a morfin megvonásos kombinált kezelés során EPM kísérleteinkben. Viszont, csökkentette a morfin megvonás által kiváltott hypothermiát, és az első ugrásig eltelt időt morfin megvonásos ugrás-teszt esetén.

Az obestatin EPM és open-field tesztekben is a mérsékelte a morfin megvonás- okozta csökkent szorongásra utaló tüneteket. Tail-flick tesztek esetén fokozta a morfin akut analgéziát és kivédte a krónikus morfin kezelés által előidézett analgézias toleranciát. [D-Lys3]-GHRP-6-tal kombiáltan akut kísérletek esetén az obestatin morfin analgéziát fokozó hatása már nem érvényesült tail-flick és hot-plate tesztek során.

4. Következtetés

A PACAP kezelés nem volt hatékony a morfin megvonás által kiváltott magatartási tüneteket enyhítésében.

Az obestatin csökkentett a morfin megvonás által kiváltott szorongásra utaló tüneteket, emellett növelte a morfin akut analgézias hatását, és kivédte az analgézias toleranciát. Az obestatin egy ígéretes neuropeptid, melynek szerepe lehet az exogén és endogén opiátok hatásainak szabályozásában, fiziológias és pathofiziológias körülmények között.

5. Köszönetnyilvánítás

Először szeretnék köszönetet mondani **Prof. Szabó Gyulának**, hogy a Kórélettani Intézetben végezhettem kísérleteimet és írhattam publikációimat.

Továbbá, szeretném megköszönni **Dr. Roberta Dochnal, Dr. Anikó Babits, Dr. Krisztina Csabafi and Dr. Júlia Szakács** kutatásban nyújtott támogatását.

Szeretnék köszönetet mondani **Prof. Tóth Gábornak** a PACAP-38 peptid szintéziséért.

Emellett, köszönöm **Kiss Gusztáv, Sípos Ildikó és Pál Ágnes** asszisztensek kísérleti munkában nyújtott segítségét.

Végül de nem utolsó sorban, hálás vagyok családomnak folyamatos támogatásukért.

Ph.D. disszertációm az ETT (355-08/2009) a TÁMOP 4.2.1./B-09/KONV-2010-0005 és TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012 pályázati támogatásokkal készült.