ÚJ ANTINOCICEPTIV LIGANDOK JELLEMZÉSE PATKÁNYMODELLBEN: PREKLINIKAI VIZSGÁLATOK

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Kovács Gyula

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Élettani Intézet

Szeged

2017

ÚJ ANTINOCICEPTIV LIGANDOK JELLEMZÉSE PATKÁNYMODELLBEN: PREKLINIKAI VIZSGÁLATOK

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Kovács Gyula

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Élettani Intézet

Szeged

2017

Bevezetés

A fájdalom szerves része életünknek, egy olyan életfontos jel, mely a szervezetünket érő, azt károsító ingerre figyelmeztet. A Nemzetközi Fájdalom Társaság (IASP) definíciója alapján a fájdalom: „egy kellemetlen szenzoros és emocionális élmény, amely összefügg aktuális vagy potenciális sérüléssel, vagy azok keretében leírható" (Merskey és Bogduk 1994). Az IASP 2010-ben deklarálta, hogy a megfelelő fájdalomcsillapítás alapvető emberi jog, megállapította, hogy a krónikus fájdalom egy önálló entitás, melynek kezelése az orvostudomány egy önálló szakterülete, amely megfelelő gyakorlatot és forrást igényel (Declaration of Montreal 2013). A fájdalom kezelése, különösen krónikus esetekben, jelentős egészségügyi probléma, melynek súlyos következményei érintik az egyént, annak családját és a szociális, egészségügyi ellátó rendszert.

Az ópioidok, elsősorban a morfin és annak származékai máig a leghatékonyabb készítmények a fájdalom csillapításában. Báziskészítményként tekintenek rájuk a súlyos, akut és krónikus fájdalommal járó kórképek kezelésében. A krónikus, nem daganatos jellegű fájdalomcsillapításban a hosszan tartó ópioid kezelés szerepe vitatott, de az új terápiás útmutatások javasolják használatukat még ilyen esetekben is (Trescot és mtsai, 2008). Az ópioidok alkalmazhatóságát alapvetően meghatározza mellékhatásaiknak gyakorisága és súlyossága. Újtípusú, kedvezőbb mellékhatás profilú ópioid származékok fejlesztésével növelhetjük a kezelés hatékonyságát és a beteg biztonságát.
Az 1990-es évek elején izolálták és klónozták a három nagy ópioid receptor családot, a μ (MOR), κ (KOR) és δ (DOR) receptor típusokat (Law és Loh 1999, Pasternak, 2004). 1994-ben egy negyedik taggal bővült az ópioid receptorok családja, nociceptin vagy orfanin FQ receptor (NOP) vagy opioid receptor-like orphan receptor (ORL) néven (Mollereau és mtsai, 1994; Meunier és mtsai, 1995). Az ópioid receptorok a G-fehérjéhez kötött heptahelikális transzmembrán (7-TM) receptor (GPCRs) szupercsalád tagjai. A morfin mellett számos ligand, beleértve endogén peptideket képesek aktiválni ezen receptorokat (pl. endorfinok, enkefalinok és dinorfinok), melyekre jellemző, hogy az N-terminális végen Tyr-Gly-Gly-Phe szekvenciát tartalmaznak. 1997-ben Zadina munkacsoportja szarvasmarha és emberi agyvelőből meghatározott egy új szekvenciát, endomorfin-1 néven (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH_2), mely jelentős affinitást mutatott a μ-ópiod receptorhoz (Zadina és mtsai, 1977; Hackler és mtsai, 1997). Ugyanakkor egy másik, csaknem hasonlóan potens anyagot is izoláltak, amely csak egy aminosavban tért el az endomorfin-1-től (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH_2), az endomorfin-2 (EM-2) nevet kapta (Zadina és mtsai, 1977; Hackler és mtsai, 1997). Mindkét ligand hátránya, hogy rövid hatástartammal bír, mely korlátozza felhasználhatóságukat. Az ópioid peptidkutatás fő célkitűzése, hogy olyan új fájdalomcsillapítókat fejlesszenek ki, melyek képesek kiváltani a morfint, annak ismert mellékhatásaitól mentesen (Olson és mtsai, 1998). A természetes aminosavak módosítása különböző pozíciókban 2',6'-dimetil-tirozinra (Dmt^1)-re, 2-aminociklohezán-karboxilsavra [cis-(1S,2R)$Ache^2$/cis-(1R,2S)$Ache^2$], β-metilfenilalaninra [(2R,3R)β$MePhe^4$/(2S,3S)β$MePhe^4$] és para-fluorfenilalaninra ($pFPhe^4$), proteolítikusan stabil vegyületet eredményezett, magas MOR aktivitással

(Mallareddy és mtsai, 2011). A vizsgálati eredmények azt igazolták, hogy a Dmt[1] és Ache[2]-t tartalmazó analógok fokozott MOR aktivitással rendelkeznek, függően a beépült Ache[2] konfigurációjától. A származékok kombinálása pFPhe[4]-val vagy βMePhe[4]-val magasabb kötődési potenciált eredményezett, míg a hatásosságuk nem különbözött az eredeti ligandtól.

A világ számos országában a kannabiszt széles körben használják fájdalomcsillapításra, így napjainkban a készítmény iránti érdeklődés megnövekedett. A kannabinoid receptorok (CB1 és CB2) felfedezése után, melyek szintén a GPCRs szupercsalád tagjai (Howlett és mtsai, 2002), a következő lépést endogén ligandjaiknak a meghatározása jelentette. Az első agyi metabolit, mely aktivitást mutatott a CB1 receptorral, az arachidonoil-etanolamid (anandamid, AEA) volt (Devane és mtsai, 1992), melyet a 2-arachidonoil-glicerol (2-AG) követett (Mechoulam és mtsai, 1995; Stella és mtsai, 1997).

Az AEA kötődve a CB1 receptorhoz, agonista hatást fejt ki. CB2 kötödése is bizonyított, bár biológiailag szignifikáns hatást itt nem tapasztaltak (Devane és mtsai, 1992; Felder és mtsai, 1995; DiMarzo és Deutsh 1998). Ugyanakkor az anandamid egyéb receptorokkal is kölcsönhatásba lép, így a kapszaicin-szenzitív tranziens receptor potenciál vanilloid 1-vel (TRPV1), mely szintén szerepet játszik antinociceptív hatásában (Zygmunt és mtsai, 1999; DiMarzo és mtsai, 2002; Horvath és mtsai, 2008). A 2-AG aktiválja a CB1 receptort, noha a kötődési affinitása relatíve alacsony, ugyanakkor nem rendelkezik TRPV1 aktivitással (Mechoulam és mtsai, 2003).

A gyulladás okozta fájdalomban a kannabinoidok hatását széles körűen vizsgálták perifériás (Richardson és mtsai, 1998; Hargraeves és mtsai, 1998), spinális (Hohmann és mtsai, 1998; Drew és mtsai, 2000) és intracerebrális (Lichtmann és mtsai, 1996; Martin és mtsai, 1999) alkalmazás mellett. A hatékony fájdalomcsillapító dózis alkalmazása mellett azonban gyakran észleltek mellékhatásokat, melyek korlátozták alkalmazhatóságukat, különösen a krónikus állapotok kezelésében. Egy lehetséges alternatívát jelenthetne egy szelektív CB1 receptor agonista, mely nem jut át a vér-agy gáton, így csökkentve a mellékhatás profilt. További lehetőség a CB1, CB2 receptor hatás növelésére a kannabinoidok lebontásának szelektív gátlása, mellyel növelhető az endogén kannabinoidok szintje (Kathuria és mtsai, 2003).

A hemopresszin (HP) egy nonapeptid (H-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Leu-Leu-Ser-His-OH), mely a hemoglobin α láncából származik, kivonására patkány agyszövetből került sor (Rioli és mtsai, 2003; Lippton és mtsai, 2006). Elnevezése abból ered, hogy képes kis mértékben a vérnyomást emelni. In vitro tanulmányok igazolták, hogy a HP inverz agonistaként kapcsolódik a CB1 receptorhoz, képes mind a perifériás, mind a centrális fájdalom utat in vivo befolyásolni (Heimann és mtsai, 2007; Dodd és mtsai, 2010). Ezen tanulmányok megállapításai szerint a HP előkezelés fájdalomcsillapító hatású lokális, szisztémás, spinális valamint agyi szinten.

Célkitűzéseim

- Új EM-2 származékok: EMD1: Tyr-(1S,2R)Ache-Phe-pFPhe-NH2, EMD2: Tyr-(1S,2R)Ache-Phe-(2S,3S)bMePhe-NH2, EMD3: Dmt-(1S,2R)Ache-Phe-pFPhe-NH2, EMD4: Dmt-(1S,2R)Ache-Phe-(2S,3S)bMePhe-NH2) antiallodíniás dózis-hatás vizsgálata, valamint összehasonlításuk morfinnal, krónikus gyulladásos fájdalom modellben, intratekális alkalmazás során.
- Intratekálisan alkalmazott anandamid és 2-AG fájdalomcsillapító hatásának jellemzése, akut ízületi gyulladásos modellben.
- A hemopresszin fájdalomcsillapító hatásosságának megállapítása spinális szinten, akut ízületi gyulladásos modellben.
- Annak meghatározása, hogy a 2-AG hatását hogyan befolyásolják az intratekálisan alkalmazott CB1 és CB2 antagonisták illetve a hemopresszin gerincvelői szinten, akut ízületi gyulladásos modellben.

Anyag és módszer

Kísérleteinket hím Wistar patkányokon végeztük a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi és Etikai Bizottsága által jóváhagyott kísérleti protokoll alapján.
Kísérleteink során a következő szereket használtuk: ketamin hidroklorid, xylazin hidroklorid, gentamicin, mononátrium-jodoacetát (MIA), λ-karragén, morfin hidroklorid, lidokain, 2-arachidonoil-glicerol (2-AG), arachidonoil-etanolamid (anandamid), AM 251 (CB1 receptor antagonista), SSR144528-2 (CB2 receptor antagonista), EM-2 és származékaik; EMD1: Tyr-(1S,2R)Ache-Phe-pFPhe-NH2, EMD2: Tyr-(1S,2R)Ache-Phe-(2S,3S)β MePhe-NH2, EMD3: Dmt-(1S,2R)Ache-Phe-pFPhe-NH2, EMD4: Dmt-(1S,2R)Ache-Phe-(2S,3S)βMePhe-NH2, dimetil szulfoxid (DMSO), etanol valamint hemopresszin.

Intratekális katéterezés

Az állatok elaltatását követően (ketamin hidroklorid és xylazin, 72 illetve 8 mg/kg intraparitoneálisan) az intratekális (i.t.) katétert a cisterna magnán keresztül vezettük be a szubaraknoidális térbe kaudálisan 8,5 cm mélységben (Yaks és Rudy 1976). Ez a szint (T12-L12) a patkányok hátsó mancsát beidegző szegmentumok magasságának felel meg (Dobos és mtsai, 2003). Azokat az állatokat, amelyekben a beavatkozás után neurológiai deficit alakult ki (10 %), illetve azokat, amelyeknél 100 μg lidokain beadása után nem mutatkozott paralízis egyik mancsban sem (0.5 %), kizártuk a további

vizsgálatból (Dobos és mtsai, 2003). Az állatok felépülésére legalább 4 napot biztosítottunk. A vizsgálatot végző személynek nem volt tudomása az alkalmazott kezelésről.

Gyulladás létrehozása

Első kísérleti sorozat

Az ízületbe adott MIA, a glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz gátlása révén a kondrociták glükolízisét befolyásolja, ezáltal porckárosodáshoz, következményes fájdalomhoz vezet, ezért az oszteoartritisz fájdalom modelljeként alkalmazzák (Bove, 2010). Az osteoartritiszt az állatok jobb hátsó lábának a tibio-tarsalis ízületébe, két egymást követő napon injektált MIA-val (1 mg/30µL) váltottuk ki.

Második kísérleti sorozat

A gyulladást ebben a kísérlet sorozatban λ-karragén (tengeri vörös algából kivont szulfatált mukopoliszacharid, 300 µg/30µL) intraartikuláris adásával hoztuk létre, melyet az állat egyik hátsó tibio-tarsalis ízületébe fecskendeztünk (Dobos és mtsai, 2003; Mécs és mtsai, 2009).

Mindkét kísérleti sorozatban a létrejött gyulladást az ízület duzzanata jelezte, melyet az anteroposterior és mediolateralis átmérők mérésével igazoltunk, mind a kísérlet elején, mind a végén.

Magatartás teszt

A lábelhúzás küszöbértékét a talpi nyomás mérésével állapítottuk meg, melyet dinamikus talpi eszteziométerrel mértünk (Ugo Basile, Comerio, Italy). A maximális nyomásérték 50 g volt.

Kísérleti protokoll

Első kísérleti sorozat

MIA beadása előtt meghatároztuk a tibio-tarsalis ízület átmérőit és a mechanikus lábelhúzás küszöbértékét. A méréseket a 7 és 14. napon megismételtük. Ezt követően került sor az i.t. kanül beültetésére. Egy hét elteltével (a 21. napon) meghatároztuk a MIA beadása utáni értékeket, majd a kiválasztott négy új EM-2 ligand különböző dózisának (0.3, 1, 3 és 10 µg) antiallodíniás hatását.

A kontroll csoport fiziológiás sóoldatot kapott. A pozitív kontroll csoport egyedei 10 µg morfint kaptak. A fájdalom küszöb meghatározására 10, 20, 30, 45, 60, 70, 90 és 120 perccel az i.t. beadást követően került sor. Az értékek átlagát 10-30, 45-70 és 90-120 perces időközökben analizáltuk.

Második kísérleti sorozta

Az ízületi átmérő és a mechanikai lábelhúzási küszöb meghatározását követően beinjektáltuk a karragént (karragén beadása előtti érték). A mérést 3 órával a beadás után megismételtük (karragén beadását követő érték). Ezt követően került sor a HP (0.3, 1, 3, 10, 30 µg), 2-AG (1, 10, 100, 200 µg) vagy anandamid (10, 30, 100, 200 µg) i.t. beadására, valamint az érzékenység vizsgálatára 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90 és 105 perc elteltével.
A 2-AG fájdalomcsillapító hatásában szerepet játszó CB1 illetve CB2 receptorok érintettségének meghatározásához az állatok egy részét előkezeltük AM251-vel (CB1 receptor antagonista, 10 µg) vagy SSR-144528-val (CB2 receptor antagonista, 15 µg) 20 perccel a 200 µg 2-AG beadása előtt. A HP antagonista potenciáljának vizsgálatához 3 vagy 30 µg Hp-t egyidőben adtunk 200 µg 2-AG-val.

Statisztikai analízis

Az adatokat egyszempontos és összetartozó mintás varianciaanalízissel vizsgáltuk. Post hoc tesztként a Fisher LSD tesztet alkalmaztuk. A p értéket 0.05 érték alatt tekintettük szignifikánsnak. Az értékek analíziséhez a STATISTICA (Statistica Inc.Tusla, Oklahoma, USA) szoftvert használtuk.

Eredmények

Ízületi ödéma

Első kísérletben a MIA beadását követően jelentős térfogat növekedést tapasztaltunk a gyulladt bokaízületben, összehasonlítva az ellenoldallal (48.4±0.37 mm² szemben 38.3±0.15 mm², $p<0.01$).
A második kísérletben 3 órával a karragén beinjektálását követően szignifikánsan, a beadási értékhez képest jelentősen megnövekedett a boka területe (36±0.1 mm²-ről 73±0.5 mm²-re $p<0.01$).
Az ödéma mértékét egyik kezelés sem befolyásolta.

Mechanoszenzitivitás

Első kísérletsorozat

Az alap lábemelési küszöbérték 41±0.6 g volt. Ezt a MIA beadása jelentősen csökkentette, egy héttel a beadást követően 15±0.6 g volt, mely később 24±0.5 g értéken stabilizálódott. A MIA nem befolyásolta az ép oldal fájdalomküszöbét (43±0.5 g).
Mindegyik alkalmazott EM-2 származék fájdalomcsillapító hatást váltott ki, így összehasonlítottuk az analógok különböző dózisainak hatását az eredeti EM-2-vel. A post hoc összehasonlítás feltárta, hogy a legalacsonyabb dózis (0.3 µg) mellett az EMD3 és az EMD4 rendelkezik fájdalomcsillapító hatással, míg az EM-2 és a másik két származék hatástalannak bizonyult. 3 µg dózis beadása esetén mindegyik származék és az EM-2 is hatásos volt. Post hoc összehasonlítás igazolta, hogy az EMD3 az utolsó időintervallumban (75-120 min) hatásosabb volt, mint az EM-2. Mivel a legmagasabb dózis (10 µg) mellett az EMD3 elhúzódó paralízist okozott, ezért ebben a dózisban, ezt a ligandot nem analizáltuk. A post hoc vizsgálat igazolta, hogy mindegyik szer a kontroll csoporttal összehasonlítva hatásos volt az első és második periódusban, az EMD4 azonban a teljes periódus alatt hatékonyabb volt, mind a kontroll, mind az EM-2-höz viszonyítva. A morfin (pozitív kontroll csoport) elhúzódó hatású, nagy hatékonyságú fájdalomcsillapító tulajdonságot mutatott. EM-2, EMD1 és EMD2 a morfinhoz hasonló hatást csak a vizsgálat első szakaszában (10-30 min) mutatott, míg az EMD4-nek a teljes periódusban a morfinnal megegyező hatását igazoltuk.

Második kísérletsorozat

Az alap mechanikai lábelhúzási küszöbérték 45±0.4 g volt, a karragén ennek szignifikáns csökkenését eredményezte a gyulladt oldalon (10±0.3 g), de az ép oldalra szignifikáns hatása nem volt.
HP-nek az alkalmazott dózisok mellett (0.3-30 µg) sem szignifikáns antiallodíniás, sem motoros gyengülést okozó hatása nem volt.
2-AG fokozatosan kifejlődő, dózisfüggő antiallodíniás hatást fejtett ki, mely maximumát a 45-60 percben érte el. Így, amíg a 2-AG 1 µg dózisban hatástalan volt addig, 200 µg dózis mellett elhúzódó hatást mutatott. Az anandamid dózisfüggő fájdalomcsillapító hatással rendelkezett, mely a maximumát a beadást követően körülbelül 20 percre érte el. 10 µg anandamid hatástalannak bizonyult, míg a 200 µg elhúzódó elhúzódó hatást fejtett ki.
CB1 és CB2 antagonista AM251 és SSR144528-2 hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy önmagukban adva egyik sem befolyásolta a fájdalom küszöbértékét. AM251 előkezelés antagonizálta a 2-AG (200 µg) dózis mellett jelentkező antiallodíniás hatását, míg az SSR144528-2 ezt nem

befolyásolta. 3 vagy 30 µg HP és 200 µg 2-AG együttes adása szignifikánsan csökkentette a 2-AG fájdalomcsillapító hatását.

Megbeszélés

Első kísérlet sorozat

Számos endomorfin derivátum fájdalomcsillapító hatását igazolták szisztémás és intracerebroventricular (i.c.v.) alkalmazás során, akut fájdalom tesztekben, ellenben csak néhány tanulmány vizsgálta spinális alkalmazás esetén ezen készítmények hatásosságát. Ugyanakkor nem rendelkezünk adatokkal ezen vegyületek hatásáról krónikus fájdalom modellben. Különböző ciklikus EM-2 analógok sokkal hatásosabb és/vagy elhúzódóbb fájdalomcsillapító hatásúaknak bizonyultak hot-plate (Hp) tesztben egerekben i.c.v. adást követően, mint az eredeti ligand (Kruszynski és mtsai, 2005; Perlikowska és mtsai, 2009, 2010). D-aminosavat tartalmazó EM analógok szintén hatásos fájdalomcsillapítóknak bizonyultak Hp és tail-flick (TF) tesztekben i.c.v. alkalmazás mellett egerekben. (Liu és mtsai, 2007; Pelikowska és mtsai, 2010). Akut Hp tesztben a természetes (pl. arginin) vagy nem természetes aminosavakat (pl. fenilglicin vagy homofenilalanin) tartalmazó EM analógok mutattak jelentősebb és/vagy fokozottabb fájdalomcsillapító hatást egerekben i.c.v. alkalmazás során (Gao és mtsai, 2006; Yu és mtsai, 2007; Wang és mtsai, 2011). Némely analóg, szemben az eredeti liganddal, képes perifériás adást követően fájdalomcsillapító hatást kifejteni, mely arra hívja fel a figyelmet, hogy ezen anyagok képesek átjutni a vér-agy gáton (Hau és mtsai, 2002; Kruszynski és mtsai, 2005; Shi és mtsai, 2007; Perlikowska és mtsai, 2010; Bedini és mtsai, 2010; Wang és mtsai, 2010). Egymást követő pozícióban lévő N-metilált aminosavat tartalmazó EM-2 analógok nagyobb fájdalomcsillapító hatással rendelkeznek centrális bejuttatást követően egerek Hp tesztjében (Kruszynski és mtsai, 2005). Korábbi dimetil EM-2 analógot (Dmt^1-EM-2) viszgáló tanulmány fájdalomcsillapító hatást mutatott i.t. beadás során formalin tesztben (Labuz és mtsai, 2003). Dmt^1-EM-2 által kifejtett fájdalomcsillapító hatás az első fázisban megegyezett az EM-2-vel, de a második fázisban ez előbbi hatása sokkal nagyobb volt. Ez megegyezett az általunk tapasztaltakkal, EMD1 és EMD2 hasonló hatású volt az EM-2-vel, és ez összhangban van a K_iMOR értékeikkel (Mallaredy és mtsai, 2011). EMD3 és EMD4 fokozott affinitást mutat a MOR-hoz in vitro (Mallaredy és mtsai, 2011). Ebből következőleg modellünkben az elhúzódó fájdalomcsillapító hatás a nagyfokú MOR aktivitásnak és megnövekedett metabolikus stabilitásnak köszönhető. Valamennyi, előzőleg említett tanulmányt akut fájdalom modellekben végezték. Az oszteoartritisz a világon emberek millióit érintő állapot, mely krónikus fájdalom kialakulásához vezet. Újabb vizsgálatok igazolták, hogy a MIA által kiváltott ízületi fájdalom szignifikáns változásokkal jár a gerincvelő szintjén is (Lee és mtsai, 2011). Eredményeink igazolták, hogy a morfin, EM-2 és az alkalmazott

derivátumainak i.t. alkalmazása csökkenti a MIA által létrehozott mechanikai allodíniát, alátámasztva a gerincvelőben az ópioid receptorok szerepét ezen típusú fájdalomban.
Megállapítottuk, hogy az új, nem természetes aminosavakat tartalmazó EM-2 analógok dózisfüggő fájdalomcsillapító hatással rendelkeznek. Az in vitro eredményekkel összhangban, in vivo tesztjeinkben a magas MOR affinitással és hosszú felezési idővel rendelkező ligandok (EMD3 és EMD4) esetében tapasztaltuk a legnagyobb hatást.
Eredményeinknek köszönhetően először igazoltuk, hogy az EM-2 komplex módosítása Dmt, aliciklikus β-aminosav, βMePhe és pFPhe révén, hatékony és elhúzódó hatású fájdalomcsillapítást eredményez krónikus artritisz modellben. EM-2 fenti strukturális módosításai ígéretes stratégiát jelenthetnek új endorfin analógok kifejlesztéséhez, mely növelheti a terápiás felhasználhatóságukat, azonban további vizsgálatok szükségesek, hogy ezen ligandok lehetséges mellékhatásait tisztázzuk.

Második kísérlet sorozat

Kísérleteinkben a spinálisan alkalmazott anandamid és 2-AG szignifikánsan csökkentette a mechanikai érzékenységet gyulladásos fájdalomban.
A kannabinoidok használata a különböző fájdalmas állapotokban széles körben ismert, a hatás jól dokumentált, mind spinális, mind supraspinális és perifériás alkalmazás mellett (Hohmann 2002; Guindon és mtsai, 2007), ugyanakkor az endogén ligandok hatásairól, különösen spinális szinten, relatíve kevés adat áll rendelkezésre. Korábbi tanulmányok igazolták, hogy az i.t. alkalmazott anandamid csökkenti az érzékenységet akut hő-fájdalom tesztben (Hp és TF teszt), továbbá a termális hiperalgéziát akut, karragén által kiváltott, gyulladásos modellben. A fenti hatások kialakulásában mind a CB1, mind a TRPV1 receptor szerepet játszik (Yaksh és mtsai, 2006; Horvath és mtsai, 2008; Tuboly és mtsai, 2009). Tudomásom szerint mi vagyunk az elsők, akik igazolták az anandamid gátló hatását mechanikai allodíniában spinális szinten.
Az anandamid számtalan rendszert befolyásolhat (CB-, TRPV1-, glicin-, szerotonin-3 receptor) és az észlelt hatás ezek együttes eredménye (Hajos és mtsai, 2001; Oz és mtsai, 2002, 2006; Kim és mtsai, 2005; Lozovaya és mtsai, 2005; Hejazi és mtsai, 2006). Korábban számos szerző felvetette, hogy mivel a nagy dózisú anandamid átmeneti fájdalmat okoz, a TRPV1 deszenzitizálása befolyásolhatja az anandamid fájdalomcsillapító hatását (van de Stelt és mtsai, 2005; Horvath és mtsai, 2005). Így lehetséges, hogy a serkentő és gátló transzmitterek felszabadulásának a változása befolyásolhatja a projekciós, a szenzoros és/vagy interneuronok aktivitását.
2-AG, hasonlóan az anandamidhoz, csökkentette az allodíniát karragén által kiváltott artritisz modellben, és ez a hatás CB1 antagonistával gátolható, de nem CB2 antagonistával. 2-AG, a legnagyobb mennyiségben rendelkezésre álló endogén kannabinoid, koncentrációja az agyban 50-500 szoros mértékben meghaladja az anandamid koncentrációját és kimutatták a perifériás rendszerben is (Kondo és mtsai, 1998; Agarwal és mtsai, 2007). 2-AG CB1 és CB2 receptor agonista, de nem kötődik

a TRPV1 receptorhoz (Mechoulam és mtsai, 1995). Csak kevés számú bizonyíték támasztja alá a 2-AG fájdalomcsillapító potenciálját. A 2-AG mint transzmitter részt vesz az endokannabinoidok által közvetített stressz indukálta analgéziában (Hohmann és mtsai, 2005; Suplita és mtsai, 2006). Így 2-AG, de nem anandamid, felszabadulás észlelhető a gerincvelőben az ún. footshock stressz esetében (Suplita és mtsai, 2006; Hohmann és Suplita 2006). Ugyanakkor, monoacilglicerol lipáz gátlásával, mint a fő endokannabinoid lebontó enzim, fokozható a stressz indukálta fájdalomcsillapítás (Suplita és mtsai, 2006). Egerekben 2-AG, szisztémás adagolás mellett fájdalomcsillapító hatást mutatott akut fájdalom tesztben, csökkentette a spontán aktivitást, és a rektális hőmérsékletet (Mechoulam és mtsai, 1995; Ben Shabat és mtsai, 1998). Lokálisan alkalmazott 2-AG csökkentette a fájdalomra adott választ formalin tesztben, csökkentette a mechanikai allodíniát és termális hiperalgéziát neuropátiás fájdalom modellben és szintén hatásosnak bizonyult gyulladásos fájdalomban (Guindon és mtsai, 2007; Desroches és mtsai 2008; Mecs és mtsai, 2010). A 2-AG helyi fájdalomcsillapító hatása CB1 és/vagy CB2 antagonistával gátolható (Guindon és mtsai, 2007; Desroches és mtsai, 2008; Mecs és mtsai, 2010). Ami a spinális alkalmazást illeti, mi voltunk az elsők, akik igazolták a szer fájdalomcsillapító hatását és azt, hogy ez a hatás gátolható CB1 antagonista készítménnyel (CB2 antagonistával nem), állítva ezzel, hogy a 2-AG fájdalomcsillapító hatása spinális szinten főleg a CB1 receptor aktiválásának a következménye. CB1 receptorok megtalálhatók a primer afferens rostok végződéseiben és a gerincvelő hátsó szarvi interneuronokban (Nyilas és mtsai, 2009; Hegyi és mtsai, 2009), így az észlelt fájdalomcsillapító hatást ezek aktiválása magyarázhatja. Fontos figyelembe venni, hogy ezen ligandok képesek befolyásolni a hátsó gyöki ganglionok (DRG) aktivitását is, mivel a kannabinoid receptorok megtalálhatók a DRG sejtjeiben (Bridges és mtsai, 2003; Sagar és mtsai, 2005; Abram és mtsai, 2006).

Annak a megállapításnak, hogy a CB1 és CB2 antagonisták önmagukban alkalmazva hatástalanok voltak a gyulladásos oldalon és a nem gyulladt oldalon is, többféle magyarázata lehet. Az egyik magyarázat szerint a karragén által kiváltott mechanikai fájdalom küszöb (~10-15 g) nagyon alacsony érték, amely már nem csökkenthető antagonista által. Azonban, mivel a normál oldalon az ingerküszöb nem változott, így ez nem valószínű magyarázat. A másik lehetséges magyarázat az, hogy a felszabadult endogén kannabinoidoknak nincs szignifikáns gátló hatása gyulladásos környezetben a mechanikai ingerküszöbre, sem a normál, sem a gyulladásos oldalon. Hasonló következtetésre jutottak csont tumor indukálta fájdalom modellben (Curto-Reyes és mtsai, 2010), ugyanakkor más tanulmányok eredményei azt mutatták, hogy i.t. alkalmazott CB1 receptor antagonisták képesek kiváltani nociceptív választ (Chapman és mtsai, 1999; Lever és mtsai, 2002). Azt feltételezzük, hogy az ellentmondó eredmények magyarázata az eltérő fájdalom modell. Mivel tanulmányunkban nem határoztuk meg a felszabadult endogén kannabinoid szintet, így nem tudjuk eldönteni, hogy az eredményeink a hiányos termelődésnek a következményei vagy az endogén kannabinoid agonista hatásának a hiánya.

Eddig csak kevés számú tanulmány vizsgálta a HP in vitro valamint in vivo hatásait. Sejtvonalakban valamint a striatumban vizsgálták antitestekkel a HP kötődési karakterisztikáját különböző ópioid, kannabinoid, adrenerg, bradikinin és angiotenzin receptorhoz (Heimann és mtsai, 2007). Ezen vizsgálatok azt igazolták, hogy a HP a CB1 receptor inverz agonistája, így a HP képes blokkolni a CB1 receptort, de nincs hatása a CB2 receptorra (Heimann és mtsai, 2007; Dodd és mtsai, 2010). A HP fájdalomcsillapító hatását vizsgálva Dale és munkatársai azt találták, hogy intraplantárisan adott HP (0.1-20 µg) nem befolyásolta a talpi nyomás értékét, de karragén vagy bradikinin előkezelést követően szignifikánsan csökkentette a kialakult mechanikai allodíniát és ezt a hatást ópioid antagonistával nem tudták gátolni (Dale és mtsai, 2005). Mivel az ellenoldalon alkalmazott HP ugyancsak ezt a hatást eredményezte, az eredmények a ligand szisztémás hatását igazolják. Hasonló tesztben, orális (50 vagy 100 µg/kg) vagy i.t. (0.5 vagy 5 µg) alkalmazott HP előkezelést követően az előző kísérlettel megegyező eredményt kaptak (Heimann és mtsai, 2007). Ecetsav által indukált viscerális fájdalom modellben intraperitoneálisan alkalmazott (50 vagy 500 µg/kg) HP jelentős fájdalomcsillapító hatását igazolták. Ezen magas HP koncentráció mellett nem tapasztaltak motoros gyengülést vagy a pentobarbitál indukálta alvás eltérését.

Sajnálatos módon az általunk alkalmazott modellben hasonló fájdalomcsillapító hatást nem tapasztaltunk. Lehetséges, magyarázat lehet az eltérő beadási időpont. Az általunk felállított modellben, a kialakult mechanikai allodíniát követően alkalmaztuk a HP-t (utókezelés), míg a korábbi tanulmányokban, ezt megelőzően alkalmazták (előkezelés). Továbbá különbség volt, mind az alkalmazott fájdalom tesztben (talpi nyomás szemben von-Frey), mind a gyulladáskeltő anyag (karragén) beadásának helyét illetően is (intraplantár szemben intraartikuláris). Eredményeinkkel összecsengenek azok a vizsgálatok, melyek spinális alkalmazás mellett hő-fájdalom és neuropátiás modellben a HP-t nem találták hatékonynak (Hama és Sagen 2011, 2011). A szerzők hatástalannak tartották a HP mint CB1 receptor antagonistát. Ezen megfigyelés ellentétes a mi tapasztalatunkkal, mivel a HP hasonlóan más szintetikus CB1 receptor antagonistához, antagonizálta a 2-AG fájdalomcsillapító hatását. Az eltérő eredmények magyarázata feltételezésünk szerint az eltérő fájdalom modell (neuropátiás szemben akut, gyulladásos fájdalom), valamint a különböző kannabinoid ligand (WIN 55,212-2 szemben 2-AG) alkalmazása lehet.

Következtetésként megállapíthatjuk, hogy a HP nem volt képes befolyásolni a kisalakult mechanikai allodíniát, artritisz indukálta fájdalom modellben, de gátolta a 2-AG fájdalomcsillapító hatását spinális szinten. Először igazoltuk a 2-AG fájdalomcsillapító hatását spinális szinten és igazoltuk az anandamid hatását mechanikai allodíniában, gyulladásos fájdalom modellben.

Következtetések

- Megállapítottuk, hogy az új EM2 derivátumoknak az eredeti ligandhoz hasonló in vivo hatékonyságát oszteoartritiszes fájdalom modellben.

- EMD3 és EMD4 elnyújtott hatása azt sugallja, hogy in vivo, ezen készítmények stabilabbak és magasabb MOR aktivitással rendelkeznek.

- Morfinnal összevetve csak az EMD4 volt az egész vizsgálati periódusban hatékony.

- Spinálisan adott anandamid és 2-AG szignifikánsan csökkentette a mechanikai érzékenységet gyulladásos fájdalomban.

- Kimutattuk, hogy ebben a modellben, sem a CB1, sem a CB2 antagonista önmagában nem befolyásolja az allodínia mértékét.

- Bizonyítottuk, hogy a 2-AG fájdalomcsillapító hatása megfordítható CB1 antagonista készítménnyel, mely azt igazolja, hogy a 2-AG ezen hatása főleg a CB1 receptor aktivitásának a következménye spinális szinten.

- Intratekálisan alkalmazott hemopresszin nem volt képes befolyásolni a mechanikai allodíniát széles dózis-spektrum mellett sem artritisz indukálta fájdalom modellben, de gátolta a 2-AG fájdalomcsillapító hatását spinális szinten.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni különös hálámat témavezetőmnek, Horváth Gyöngyi professzor asszonynak, aki munkám során mindvégig támogatott, bíztatott és ösztönzött tudásom gyarapítására. Hálás vagyok Neki a megfelelő pillanatban adott hasznos tanácsaiért és motiválásáért. Ph.D. munkám során mindvégig tanított és bátorított.
Szeretnék köszönetet mondani Jancsó Gábor professzor úrnak, hogy lehetővé tette részvételemet az idegtudományi programban.
Külön köszönöm az Élettani Intézet munkatársainak legfőképpen Petrovszki Zitának, Kékesi Gabriellának és Tandary-Ábrahám Ágnesnek, hogy idejüket és energiájukat nem kímélve

megosztották velem észrevételeiket és tapasztalataikat, segítették munkámat és biztosították számomra a megfelelő tudományos hátteret.
Személyes köszönettel tartozom korábbi tanítómesteremnek Tóth Kálmán professzor úrnak, aki bevezetett a tudomány világába és felkeltette érdeklődésem a tudomány iránt. Barátként mindig számíthattam tanácsaira, nem csak a tudományos munkám során, de a magánéletemben is.
Hálás vagyok barátaimnak, közvetlen kollégáimnak és az ortopédiai osztály munkatársainak, akik segítették és támogatták eddigi munkámat.
Végezetül, de nem utolsósorban köszönöm szüleim és családom (feleségem és gyermekeim) támogatását és szeretetét, mellyel a nyugodt és békés hátteret megteremtették munkámhoz. Ők a legfontosabbak számomra, Nekik ajánlom munkámat.

Publikációk

Jelen dolgozathoz kapcsolódó publikációk:

I. Kovacs G, Petrovszki Z, Toth G, Mallareddy JR, Benedek G, Horvath G.

Characterization of antinociceptive potencies of endomorphin-2 derivatives.

Acta Physiologica Hungarica 2012;99: 353-6. **IF: 0.821, idézettség 1**

II. Petrovszki Z, Kovacs G, Tomboly C, Benedek G, Horvath G.

The effects of peptide and lipid endocannabionids on arthritic pain at spinal level.

Anesthesia and Analgesia 2012;114: 1346-52. **IF: 3.3, idézettség 4**

A szerző egyéb közleményei

I. Kovács Gy, Tóth K.
Hátfájás – ami mindenkinek van I. rész. Praxis 1999;8: 37-42.

II. Kovács Gy, Tóth K.
Hátfájás – ami mindenkinek van II. rész. Praxis 1999;8: 43-6.

III. Kovács Gy, Tóth K.
Hátfájás - ami mindenkinek van. Nővérpraxis 1999;2: 23-9.

IV. Kovács Gy, Tóth K.
Csigolyaközti fúzió hengeres titán cage alkalmazásával. Magyar Traumatológia Ortopédia Kézsebészet és Plasztikai Sebészet 2003;46: 204-9. **idézettség 1**

V. Nagy E, Tóth K, Janositz G, Kiss A, Kovács Gy, Horváth Gy.
Az ironmen triatlon hatása a testtartás kontrollra. Magyar Sporttudományi Szemle 2004;2-3: 43-6.

VI. Nagy E, Toth K, Janositz G, Kovacs G, Kiss A, Horvath G, Angyan L.
Postural controll in athletes participating in an ironmen triatlon. European Journal of Applied Physiology 2004;92: 407-13. **IF: 1.332, idézettség 58**

VII. Tóth K, Janositz G, Kovács Gy.
Cement nélküli vápával végzett revíziók középtávú tapasztalatai. Magyar Traumatológia Ortopédia Kézsebészet Plasztikai Sebészet 2009;52: 241-8.

VIII. Toth K, Janositz G, Kovacs Gy, Sisak K.
Midterm results of cup revisions using uncemneted acetabular components. Revista De Ortopedie Si Traumatologie 2010;1: 1-7.

IX. Toth K, Janositz G, Kovacs Gy, Sisak K, Rudner E.
Successful treatment of late Salmonella infections into total hip replacement-report of two cases. BMC Infections Diseases 2010;10: 160. **IF: 2.825, idézettség 10**

X. Klára T, Janositz G, Kovács Gy, Csönge L, Csernátony Z, Lacza Zs.
Humán albuminnal kezelt liofilizált strukturális allograftokkal szerzett sebészi tapasztalatok. Magyar Traumatológia Ortopédia Kézsebészet és Plasztikai Sebészet 2012;55: 251-8.

XI. Klara T, Janositz G, Kovacs G, Csonge L, Csernatony Z, Lacza Zs.
Albumin coated structural lyophilized bone graft: A clinical report of 10 cases. Cell and Tissue Banking 2014:15: 89–97 **IF: 0.965, idézettség 8**

XII. Kovács Gyula
Felnöttek könyökfájdalmának kivizsgálása. Orvostovábbképző Szemle. 2015;11: 68-72.

Hívatkozások

Abram SE, Yi J, Fuchs A, Hogan QH. Permeability of injured and intact peripheral nerves and dorsal root ganglia. Anesthesiology 2006;105: 146-53.

Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, Amaya F, Constantin CE, Brenner GJ, et al. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. Nature Neuroscience 2007;10: 870-9.

Bedini A, Baiula M, Gentilucci L, Tolomelli A, De Marco R, Spampinato S. Peripheral antinociceptive effects of the cyclic endomorphin-1 analog c[YpwFG] in a mouse visceral pain model. Peptides 2010;31: 2135-40.

Ben Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, et al. An entourage effect: Inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. Nature Neuroscience 1998;353: 23-31.

Blais PA, Cote J, Morin J, Larouche A, Gendron G, Fortier A, et al. Hypotensive effects of hemopressin and bradykinin in rabbits, rats and mice: A comparative study. Peptides 2005;26: 1317-22.

Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, et al. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 2003;11: 821-80.

Bridges D, Rice ASC, Egertova M, Elphick MR, Winter J, Michael GJ. Localisation of cannabinoid receptor 1 in rat dorsal root ganglion using in situ hybridisation and immunohistochemistry. Neuroscience 2003;119: 803-12.

Bryant SD, Jinsmaa Y, Salvadori S, Okada Y, Lazarus LH. Dmt and opioid peptides: A potent alliance. Biopolymers 2003;71: 86-102.

Chapman V. The cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR141716A, selectively facilitates nociceptive responses of dorsal horn neurones in the rat. British Journal of Pharmacology 1999;127:1 765-7.

Curto-Reyes V, Llames S, Hidalgo A, Menendez L, Baamonde A. Spinal and peripheral analgesic effects of the CB2 cannabinoid receptor agonist AM1241 in two models of bone cancer-induced pain. British Journal of Pharmacology 2010;160: 561-73.

Dale CS, Pagano RdL, Rioli V, Hyslop S, Giorgi R, Ferro ES. Antinociceptive action of hemopressin in experimental hyperalgesia. Peptides 2005;26: 431-6.

Decleration of Montreal 2013
www.iasp-pain.org/Content/NavigationMenu/Advocacy/DeclarationofMontr233al/default.htm

Desroches J, Guindon J, Lambert C, Beaulieu P. Modulation of the anti-nociceptive effects of 2-arachidonoyl glycerol by peripherally administered FAAH and MGL inhibitors in a neuropathic pain model. British Journal of Pharmacology 2008;155: 913-24.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science 1992;258: 1946-19.

Di Marzo V, Deutsch DG. Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. Neurobiology of Disease 1998;5: 386-404 .

Di Marzo V, Blumberg PM, Szallasi A. Endovanilloid signaling in pain. Current Opinion in Neurobiology 2002;12: 372-9.

Dobos I, Toth K, Kekesi G, Joo G, Csullog E, Klimscha W, et al.. The significance of intrathecal catheter location in rats. Anesthesia and Analgesia 2003;96: 487-92.

Dodd GT, Mancini G, Lutz B, Luckman SM. The peptide hemopressin acts through CB1 cannabinoid receptors to reduce food intake in rats and mice. Journal of Neuroscience 2010;30: 7369-76.

Drew LJ, Harris J, Millns PJ, Kendall DA, Chapman V. Activation of spinal cannabinoid 1 receptors inhibits C-fibre driven hyperexcitable neuronal responses and increases GTPγS binding in the dorsal horn of the spinal cord of non-inflamed and inflamed rats. European Journal of Neuroscience 2000; 12: 2079-86.

Felder CC, Joyce KE, Briley EM. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. Molecular Pharmacology 1995;48: 443-50.

Fichna J, do-Rego JC, Kosson P, Costentin J, Janecka A. Characterization of antinociceptive activity of novel endomorphin-2 and morphiceptin analogs modified in the third position. Biochemical Pharmacology 2005;69: 179-15.

Fichna J, Gach K, Perlikowska R, Cravezic A, Bonnet JJ, et al. Novel endomorphin analogues with antagonist activity at the mu-opioid receptor in the gastrointestinal tract. Regulatory Peptides 2010;162: 109-14.

Gao Y, Liu X, Liu W, Qi Y, Liu X, Zhou Y, Wang R. Opioid receptor binding and antinociceptive activity of the analogues of endomorphin-2 and morphiceptin with phenylalanine mimics in the position 3 or 4. Bioorganic and Medical Chemistry Letters 2016;16: 3688-92.

Guindon J, Desroches J, Beaulieu P. The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB2 receptors. British Journal of Pharmacology 2007;150: 693-01.

Guindon J, Hohmann AG. Cannabinoid CB2 receptors: A therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. British Journal of Pharmacology 2007;153: 319-34.

Hackler L, Zadina JE, Ge LJ, Kastin AJ. Isolation of relatively large amounts of endomorphin-1 and endomorphin-2 from human brain cortex. Peptides 1997;18**:** 1635-9.

Hama A, Segan J. Activation of spinal and supraspinal cannabinoid-1 receptors leads to antinociception in a rat model of neuropathic spinal cord injury pain. Brain Research 2011;1412: 44-54.

Hama A, Sagen J. Centrally mediated antinociceptive effects of cannabinoid receptor ligands in rat models of nociception. Pharmacology Biochemistry and Behavior 2011;100: 340-6.

Hajos N, Ledent C, Freund T. Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. Neuroscience 2001;106: 1-4.

Hargreaves KM, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain 1988;32: 77-88.

Hau VS, Huber JD, Campos CR, Lipkowski AW, Misicka A, Davis TP. Effect of guanidino modification and proline substitution on the in vitro stability and blood-brain barrier permeability of endomorphin II. Journal of Pharmacology 2002;91: 2140-9.

Heimann AS, Gomes L, Dale CS, Pagano RL, Gupta A, de Souza LL, et al. Hemopressin is an inverse agonist of CB1 cannabinoid receptors. Proceedings of the National of Sciences of the USA 2007;104: 20588-93.

Hejazi N, Zhou C, Oz M, Sun H, Ye JH, Zhang L. Delta9-tetrahydrocannabinol and endogenous cannabinoid anandamide directly potentiate the function of glycine receptors. Molecular Pharmacology 2006;69: 991-7.

Hegyi Z, Kis G, Hollo K, Ledent C, Antal M. Neuronal and glial localization of the cannabinoid-1 receptor in the superficial spinal dorsal horn of the rodent spinal cord. European Journal of Neuroscience 2009;30: 251-62.

Hohmann AG, Tsou K, Walker JM. Cannabinoid modulation of wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat by spinally administered WIN55,212-2. Neuroscience Letters 1998;257: 119-22.

Hohmann AG. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. Chemistry and Physics Lipids 2002;121: 173-90.

Hohmann AG, Suplita RL. Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. American Association of Pharmaceutical Scientist Journal 2006;8: 693-08.

Horvath G, Kekesi G, Nagy E, Benedek G. The role of TRPV1 receptors in the antinociceptive effect of anandamide at spinal level. Pain 2008;134: 277-84.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA. International union of pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. Pharmacological Reviews 2002;54: 161-02.

Hruby VJ, Li GG, Haskell-Luevano C, Shenderovich M. Design of peptides, proteins, and peptidomimetics in chi space. Biopolymers 1997;43: 219-66.

Janecka A, Fichna J, Janecki T. Opioid receptors and their ligand. Current Topics in Medical Chemistry 2004;4: 1-17.

Kathuria S, Gaetani S, Fegley D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. Nature Medicine 2003;9: 76-81.

Keller M, Boissard C, Patiny L, Chung NN, Lemieux C, Mutter M, Schiller PW. Pseudoproline-containing analogues of morphiceptin and endomorphin-2: Evidence for a cis Tyr-Pro amide bond in the bioactive conformation. Journal of Medical Chemistry 2001;44: 3896-03.

Keresztes A, Szucs M, Borics A, Kover KE, Forro E, Fulop F, et al. New endomorphin analogues containing alicyclic beta-amino acids: Influence on bioactive conformation and pharmacological profile. Journal of Medical Chemistry 2008;51: 4270-9.

Kim HI, Kim TH, Shin YK, Lee CS, Park M, Song JH. Anandamide suppression of Na^+ currents in rat dorsal root ganglion neurons. Brain Research 2005;062: 39-47.

Kondo S, Kondo H, Nakane S, Kodaka T, Tokumura A, Waku K, et al. 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: Identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through Ca^{2+}-dependent and -independent mechanisms. FEBS Letters 1998;429: 152-6.

Kozak KR, Rowlinson SW, Marnett LJ. Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. Journal of Biological Chemistry 2000;275: 33744-9.

Kruszynski R, Fichna J, Do-Rego JC, Chung NN, Schiller PW, Kosson P, et al. Novel endomorphin-2 analogs with mu-opioid receptor antagonist activity. Journal of Peptide Research 2005;66: 125-31.

Labuz D, Chocyk A, Wedzony K, Toth G, Przewlocka B. Endomorphin-2, deltorphin II and their analogs supress formaline-induced nociception and c-Fos expression in the rat spinal cord. Life Sciences 2003;73: 403-12.

Law PY, Loh HH. Regulation of opioid receptor activities. Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics 1999;289: 607–24.

Lee Y, Pai M, Brederson JD, Wilcox D, Hsieh G, Jarvis M, et al. Monosodium iodoacetate-induced joint pain is associated with increased phosphorylation of mitogen activated protein kinases in the rat spinal cord. Molecular Pain 2011;7: 39.

Lever IJ, Malcangio M. CB1 receptor antagonist SR141716A increases capsaicin-evoked release of substance P from the adult mouse spinal cord. British Journal of Pharmacology 2002;135: 21-4.

Lichtman AH, Cook SA, Martin BJ. Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: Evidence supporting periaqueductal gray involvement. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1996;276: 585-93.

Lippton H, Lin B, Gumusel B, Witriol N, Wasserman A, Knight M. Hemopressin, a hemoglobin fragment, dilates the rat systemic vascular bed through release of nitric oxide. Peptides 2006;27: 2284-8.

Lozovaya N, Yatsenko N, Beketov A, Tsintsadze T, Burnashev N. Glycine receptors in CNS neurons as a target for nonretrograde action of cannabinoids. Journal of Neuroscience 2005;25: 7499-06.

Mallareddy JR, Borics A, Keresztes A, Kover KE, Tourwe D, Toth G. Design, synthesis, pharmacological evaluation, and structure-activity study of novel endomorphin analogues with multiple structural modifications. Journal of Medical Chemistry 2011;54: 1462-72.

Martin WJ, Coffin PO, Attias E, Balinsky M, Tsou K, Walker JM. Anatomical basis for cannabinoid-induced antinociception as revealed by intracerebral microinjections. Brain Ressearch 1999;822: 237-42.

Mechoulam R, Ben Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. Biochemical Pharmacology 1995;50: 83-90.

Mecs L, Tuboly G, Toth K, Nagy E, Nyari T, Benedek G, et al. Peripheral antinociceptive effect of 2-arachidonoyl-glycerol and its interaction with endomorphin-1 in arthritic rat ankle joints. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2010;37: 544-50.

Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. IASP Press International Association for the Study of Pain 1994 909 NE 43rd St. Suite 306

Meunier JC, Mollereau C, Toll L. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. Nature 1995;377: 532-5.

Mizoguchi H, Nakayama D, Watanabe H, Ito K, Sakurada W, Sawai T, et al. Involvement of spinal mu1-opioid receptors on the Tyr-d-Arg-Phe-sarcosine-induced antinociception. European Journal of Pharmacology 2006;540: 67-72.

Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P. ORL1, a novel member of the opioid receptor family: Cloning, functional expression and localization. FEBS Lett. 1994;341: 33-8.

Nyilas R, Gregg LC, Mackie K, Watanabe M, Zimmer A, Hohmann AG, et al. Molecular architecture of endocannabinoid signaling at nociceptive synapses mediating analgesia. European Journal of Neuroscience 2009;29: 1964-78.

Oz M, Zhang L, Morales M. Endogenous cannabinoid, anandamide, acts as a noncompetitive inhibitor on 5-HT_3 receptor mediated responses in oocytes. Synapse 2002;46: 150-6.

Oz M. Receptor-independent actions of cannabinoids on cell membranes: focus on endocannabinoids. Pharmacology and Therapeutics 2006;111: 114-44.

Pasternak GW. Multiple opiate receptors: Déjà vu all over again. Neuropharmacology 2004;47: 312-23.

Paterlini MG, Avitabile F, Ostrowski BG, Ferguson DM, Portoghese PS. Stereochemical requirements for receptor recognition of the μ-opioid peptide endomorphin-1. Biophysical Journal 2000;78: 590-9.

Perlikowska R, Gach K, Fichna J, Toth G, Walkowiak B, do-Rego JC, et al. Biological activity of endomorphin and [Dmt1]endomorphin analogs with six-membered proline surrogates in position 2. Bioorganic and Medical Chemistry Letters 2009;17:3 789-94.

Perlikowska R, do-Rego JC, Cravezic A, Fichna J, Wyrebska A, Toth G, et al. Synthesis and biological evaluation of cyclic endomorphin-2 analogs. Peptides 2010;31: 339-45.

Podlogar BL, Paterlini MG, Ferguson DM, Leo GC, Demeter DA, Brown FK, et al. Conformational analysis of the endogenous mu-opioid agonist endomorphin-1 using NMR spectroscopy and molecular modeling. FEBS Lett 1998;439**:** 13-20.

Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, Phillips S, Sellers R, Bunton T, et al. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. Pain 2005;114; 339-346.

Richardson JD, Kilo S, Hargreaves KM. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. Pain 1998;75: 111-9.

Rioli V, Gozzo FC, Heimann AS, Linardi A, Krieger JE, Shida CS, et al. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. Journal of Biological Chemistry 2003;278: 8547-55.

Sagar DR, Kelly S, Millns PJ, O'Shaughnessey CT, Kendall DA, Chapman V. Inhibitory effects of CB1 and CB2 receptor agonists on responses of DRG neurons and dorsal horn neurons in neuropathic rats. European Journal of Neuroscience 2005;22: 371-9.

Sakurada S, Watanabe H, Hayashi T, Yuhki M, Fujimura T, Murayama K, et al. Endomorphin analogues containing D-Pro2 discriminate different mu-opioid receptor mediated antinociception in mice. British Journal of Pharmacology 2002;137: 1143-6.

Shi Z-H, Wei Y-Y, Wang C-J, Yu L. Synthesis and analgesic activities of endomorphin-2 and its analogues. Chemistry and Biodiversity 2007;4: 458-67.

Staniszewska R, Fichna J, Gach K, Toth G, Poels J, Broeck JV, et al. Synthesis and biological activity of endomorphin-2 analogs incorporating piperidine-2-, 3- or 4-carboxylic acids instead of proline in position 2. Chemical Biology and Drug Design 2008;72: 91-4.

Stella N, Schweizter P, Piomelli D. Characterisation of a second endogenous cannabinoid ligand that modulates long term potentiation (LTP) in hippocampus. Society for Neuroscience 1997;23: 264-9.

Sugiura T, Kondo S, Kishimoto S, Miyashita T, Nakane S, Kodaka T, et al. Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. Journal of Biological Chemistry 2000;275: 605-12.

Suplita II RL, Gutierrez T, Fegley D, Piomelli D, Hohmann AG. Endocannabinoids at the spinal level regulate, but do not mediate, nonopioid stress-induced analgesia. Neuropharmacology 2006;50: 372-9.

Tomboly C, Kover KE, Peter A, Tourwe D, Biyashev D, Benyhe S, et al. Structure-activity study on the Phe side chain arrangement of endomorphins using conformationally constrained analogues. Journal of Medical Chemistry 2004;47:7 35-43.

Toth G, Kramer TH, Knapp R, Lui G, Davis P, Burks TF, et al. [D-Pen2,D-Pen5] Enkephalin analogs with increased affinity and selectivity for delta-opioid receptors. Journal of Medical Chemistry 1990;33: 249-53.

Trescot AM, Helm S, Hansen H, BenyaminR, Glaser SE, Adlaka R, et al. Opioids in the management of chronic non-cancer pain: An update of American Society of the Interventional Pain Physicians' (ASIPP) Guidelines Pain Physician 2008: Opioids Special Issue: 11: 5-62.

Tuboly G, Mecs L, Benedek G, Horvath G. Antinociceptive interactions between anandamide and endomorphin-1 at the spinal level. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2009;36: 400-5.

van der Stelt M, Di Marzo V. Endovanilloids - putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. European Journal of Biochemistry 2004;271: 1827-34.

Wang Cl, Guo C, Wang YQ, Zhou Y, Li Q, Ni JM, et al. Synthesis and antinociceptive effects of endomorphin-1 analogs with C-terminal linked by oligoarginine. Peptides 2011;32: 293-9.

Yaks TL, Rudy TA. Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. Science 1976;192: 1357-8.

Yaksh TL, Kokotos G, Svensson CI, Stephens D, Kokotos CG, Fitzsimmons B, et al. Systemic and intrathecal effects of a novel series of phospholipase A2 inhibitors on hyperalgesia and spinal prostaglandin E2 release. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2006;316: 466-75.

Yamazaki T, Ro S, Goodman M, Chung NN, Schiller PWA. Topochemical approach to explain morphiceptin bioactivity. Journal of Medical Chemistry1993;36: 708-19.

Yu Y, Shao X, Wang Cl, Liu HM, Cui Y, Fan YZ, et al. In vitro and in vivo characterization of opioid activities of endomorphins analogs with novel constrained C-terminus: Evidence for the important role of proper spatial disposition of the third aromatic ring. Peptides 2007;2: 859-70.

Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the μ-opioid receptor. Nature1997;386: 499-02.

Zhang J, Chen C. Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons by limiting COX-2 elevation. Journal of Biological Chemistry 2008;283: 22601-11.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. Nature 1999; 400: 452-7.